TESIS DOCTORAL

PÁTINAS OSCURAS SOBRE ROCAS GRANÍTICAS: GÉNESIS Y COMPOSICIÓN



Noelia Aira Touzón

Departamento de Edafoloxía e Química Agrícola

Julio 2007

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Departamento de Edafoloxía e Quimica Agrícola.

Tesis Doctoral

PATINAS OSCURAS SOBRE ROCAS GRANÍTICAS: GÉNESIS Y COMPOSICIÓN.

Noelia Aira Touzón

Julio, 2007

Drª Benita Silva Hermo, Profesora Titular de Edafología y Química Agrícola, y la **Drª Beatriz Prieto Lamas**, Investigadora del programa Ramón y Cajal, ambas pertenecientes al Departamento de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Santiago de Compostela.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada: **Pátinas oscuras sobre rocas graníticas: génesis y composición,** que para optar al grado de Doctora en Biología presenta Dña. **Noelia Aira Touzón**, fue realizada en el Departamento de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Santiago de Compostela bajo nuestra dirección y supervisión.

Considerando que constituye trabajo de Tesis Doctoral, autorizamos su presentación en la Facultad de Biología de la Universidad de Santiago.

Y para que así conste, expedimos la presente certificación en Santiago de Compostela a 16 de Julio del 2007.

Drª Benita Silva Hermo

Drª Beatriz Prieto Lamas

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a todas las personas que me han ayudado y poyado tanto profesional como personalmente en la elaboración de este trabajo.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directoras, la Dra. Beatriz Prieto Lamas y la Dra. Benita Silva Hermo, por sus consejos científicos, sus apoyos y la ayuda desinteresada prestada siempre que lo he necesitado, y sobre todo por toda la confianza depositada en mí a lo largo de estos años.

Agradecer también al Dr. Cesareo Saiz-Jimenez y a todo su grupo de investigación del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología del CSIC de Sevilla, por acogerme, enseñarme y hacerme sentir una más dentro del equipo en los meses en los que colaboré con ellos.

A la Dra. Valme Jurado Lobo por haberme enseñado las técnicas moleculares que luego he aplicado en esta tesis, por su paciencia y su gran amabilidad.

Al Dr. Pepe Sordo por su ayuda en la lectura e interpretación de infrarrojos.

A Rosa, Patri y Remi, que además de compañeros de trabajo son ante todo unos buenos amigos, quiero agradecerles su amistad incondicional y su ayuda tanto personal como profesional siempre que la he necesitado.

A José que siempre ha estado a mi lado cuando más lo necesitaba, para ayudarme en los atrancos y para celebrar conmigo los avances. Gracias por estar siempre ahí.

A mis compañeros de laboratorio, tanto los que están en este momento como todos los que han pasado por este laboratorio durante la elaboración de este trabajo, por sus consejos, su ayuda y todas las horas compartidas dentro y fuera del trabajo.

A mis amigos Laura, Carlos, Ion, Patri, Zuri, Yoli, Sandra, Genma, Ponton, Carla, Moisés… por estar ahí siempre que los necesito y por todos los bueno momentos vividos juntos.

A mis padres, mis hermanas y familia, sin ellos esta tesis no habría podido llevarse a cabo, gracias por apoyarme siempre y por estar ahí siempre que lo he necesitado.

ÍNDICE

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS **3**

2. INTRODUCCIÓN **9**

2.1 Alteración de las rocas graníticas **9**

2.1.1 Alteración en el medio natural ***10***

2.1.2 Alteración en los monumentos ***12***

2.1.2.1 El agua **14**

2.1.2.2 Temperatura **20**

2.1.2.3 Sales solubles **21**

2.1.2.3 Organismos **26**

2.2 Alteraciones cromáticas de las superficies **27**

2.3 Origen de las pátinas y costras negras **32**

2.3.1 Costras y pátinas de contaminación atmosférica ***32***

2.3.1.1 Costras y pátinas de yeso **33**

2.3.1.2 Costras y pátinas de otros compuestos diferentes al yeso **39**

2.3.2 Costras de origen biológico ***41***

2.4 Métodos de estudio de pátinas y costras negras **47**

2.4.1 Caracterización morfológica ***47***

2.4.2 Caracterización química ***50***

2.4.3 Caracterización mineralógica ***57***

2.4.4 Caracterización biológica ***58***

3. MATERIAL Y MÉTODOS **75**

3.1 Toma de muestras **75**

3.2 Caracterización morfológica de las muestras **81**

3.2.1 Descripción con estereomicroscopio ***81***

3.2.2 Microscopía electrónica de barrido (MEB) ***81***

3.2.2.1 Estudio morfológico **82**

3.2.2.2 Estudio químico **83**

3.2.3 Medida del color ***83***

3.3 Caracterización mineralógica de las muestras **84**

3.3.1 Difracción de rayos-X (DRX) ***84***

3.4 Caracterización química de las muestras **85**

3.4.1 Análisis elemental (CHNS) ***85***

3.4.2 Fluorescencia de rayos-X (FRX) ***86***

3.4.3 Espectroscopía IR-Raman ***87***

3.5 Caracterización biológica de las pátinas **87**

3.5.1 Determinación del contenido de clorofila ***87***

3.5.2 Determinación del contenido de proteínas ***89***

3.5.3 Identificación de ácidos grasos ***90***

3.5.4 Técnicas de biología molecular ***92***

3.5.4.1 Extracción de ADN genómico **93**

3.5.4.2 Primera amplificación del gen ARN-16S (1ª PCR) **94**

3.5.4.3 Geles de agarosa **96**

3.5.4.4 Segunda amplificación del gen ARN-16S (2ª PCR) **97**

3.5.4.5 Electroforesis en gel en gradiente desnaturalizante **98**

3.5.4.6 Clonación **101**

3.5.4.7 Secuenciación **106**

3.5.4.8 Identificación de las secuencias **106**

4. RESULTADOS **109**

4.1 Caracterización morfológica de las muestras **109**

4.1.1 Observación al estereomicroscopio ***109***

4.1.2 Observación al microscopio electrónico de barrido (MEB) ***123***

4.1.3 Medida del color ***140***

4.2 Caracterización mineralógica **142**

4.2.1 Descripción de las rocas *142*

4.2.2 Análisis mineralógico por DRX *146*

4.3 Caracterización química **154**

4.3.1 Análisis elemental (CHNS) *154*

4.3.2 Análisis químico total por fluorescencia de rayos-X *157*

4.3.3 Microanálisis (EDAX) *166*

4.3.4 Estudio de la distribución de elementos químicos *180*

4.3.5 Espectroscopía IR-Raman *193*

4.4 Caracterización biológica **203**

4.4.1 Determinación de proteínas y clorofila *203*

4.4.2 Análisis de ácidos grasos de cadena corta *207*

4.4.3 Identificación de los organismos mediante técnicas de biología molecular *213*

5. DISCUSIÓN **229**

6. CONCLUSIONES **265**

7. BIBLIOGRAFÍA **271**

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las rocas al estar expuestas a la intemperie sufren una serie de trasformaciones como consecuencia de su interacción con los distintos agentes ambientales, la primera, y la más evidente, es el cambio de coloración de su superficie. Este cambio de color frecuentemente se debe a la aparición de una pátina generalmente oscura, a veces muy sutil otras veces más o menos gruesa, cuya formación obedece a procesos diversos dependiendo de la naturaleza de las rocas y de las condiciones ambientales.

La mayoría de las investigaciones sobre estos procesos se han llevado a cabo sobre monumentos y otras obras de arte ya que en estos casos la presencia de una pátina coloreada, generalmente oscura o totalmente negra, supone cuando menos un perjuicio estético y en ocasiones implica un grave deterioro del sustrato. Los mayores conocimientos que se tienen en relación con las pátinas derivan del estudio de rocas de naturaleza calcárea (calizas, areniscas calcáreas o mármoles) ya que son estos materiales los predominantes en la construcción de los monumentos que constituyen el Patrimonio histórico-artístico de toda Europa. En rocas graníticas, casi exclusivas en el patrimonio monumental construido de Galicia, los estudios son escasos y los mecanismos de formación de las pátinas oscuras no están claros.

Con el presente estudio se pretende contribuir al conocimiento de la naturaleza y procesos de formación de las pátinas oscuras que se encuentran frecuentemente sobre las superficies graníticas expuestas a la intemperie. La investigación se ha realizado tanto en afloramientos rocosos naturales como en edificios y monumentos situados en diferentes ambientes, para así poder comparar la influencia de este factor en los procesos formadores de pátinas negras. Dadas las condiciones ambientales reinantes, en términos generales, en Galicia con escasa contaminación ambiental y elevada humedad relativa, se cree

que el factor biótico puede tener importancia en la formación de las patinas por lo que se le presta una especial atención.

Este conocimiento será de gran utilidad en dos campos. Por una parte en la conservación del patrimonio monumental, ya que al conocer los procesos que van a dar lugar a la formación de pátinas negras será mas fácil encontrar procedimientos adecuados para la eliminación de estas pátinas. Por otra parte, y con fines opuestos, conocer los mecanismos de formación de las pátinas permitirá inducir su desarrollo como una medida correctora del impacto paisajístico generado por la apertura de frentes de canteras que dejan al descubierto grandes áreas de roca granítica inalterada.

Para conseguir el objetivo propuesto se aborda el trabajo desde cuatro puntos de vista diferentes:

- Caracterización morfológica de las patinas, que permitirá analizar aspectos importantes como su grosor, el grado de cubrición y adherencia al sustrato, su penetración en él, etc., todo ello de gran interés desde el punto de vista práctico.

- Caracterización química, que permitirá evaluar en qué medida la composición de la roca determina la composición de las pátinas o hasta que punto éstas están formadas por elementos ajenos al sustrato.

- Caracterización mineralógica, que permitirá identificar minerales neoformados en las pátinas, lo que ayudará a comprender su génesis.

- Caracterización biológica, fundamental en este estudio ya que, como ya se ha dicho, se presupone que los agentes biológicos tienen un papel importante en la formación de las pátinas. En este punto se abordan dos aspectos: intentar confirmar la presencia de organismos vivos o de restos de ellos en las pátinas analizando compuesto indicativos, como son clorofila, proteínas y ácidos grasos e intentar su identificación por medio de técnicas basadas en la biología molecular para conocer las poblaciones de organismos predominantes en estas pátinas negras.

INTRODUCCIÓN

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Alteración de las rocas graníticas

Bajo el término de roca granítica se engloban además del granito otras rocas plutónicas con textura holocristalina, formadas principalmente por cuarzo, feldespato potásico y plagioclasas, entre las que se encuentran las ganodioritas, gneises de origen granítico y otras rocas filonianas con esta composición. La similar composición mineralógica de todas estas rocas hace que se comporten de forma muy parecida ante los procesos de meteorización, con diferencias dependiendo del grado de tectonización y de la abundancia relativa de cada uno de sus componentes.

El granito es una roca formada en zonas profundas de la corteza terrestre por enfriamiento de un magma. Cuando aflora a la superficie y entra en contacto con la atmósfera, la hidrosfera y la biosfera, tienen lugar una serie de reacciones físicas y químicas entre el medio externo y la roca que se conocen como alteración superficial o meteorización.

El proceso de meteorización ocurre cualquiera que sea el lugar donde las rocas se encuentran, es decir afecta tanto a las rocas de los afloramientos naturales como a las rocas que forman parte de las edificaciones, si bien en el último caso concurren una serie de factores que pueden potenciar los mecanismos de meteorización o superponerse a ellos.

2.1.1 Alteración en el medio natural

La alteración del granito en el medio natural ha sido estudiada por numerosos investigadores (Collier, 1961; Tardy *et al*., 1973; Chesworth, 1973, 1979; Dejou *et al.*, 1977; Curmi, 1979; Meunier, 1980; Melfi *et al.*, 1983; Sequeira, 1989 ; Sequeira *et al.*, 1990, 2002; Gordon y Dorn, 2005; Scarciglia *et al.*, 2005) en el caso de Galicia, debido a que el granito representa un gran porcentaje del total del sustrato geológico, también se han llevado a cabo numerosos estudios en este tema, formando parte la mayoría de ellos de investigaciones acerca de procesos edafogénicos (Parga Pondal, 1958; Calvo *et al.*, 1981; Calvo y Macias, 1981; Guitián y Calvo, 1981; Macías *et al.*, 1982; García-Rodeja y Macías, 1985; Romero *et al.*, 1992a, 1992b; Taboada , 1992; Taboada y García, 1999; Taboada *et al.*, 2006).

En cuanto a la evolución del proceso, todos los investigadores aceptan que la alteración física o mecánica de las rocas graníticas en clima templado se traduce, en general, en una desagregación intensa que conduce a la formación de una saprolita y posteriormente de una "arena". Esto es debido a la alteración diferencial de los minerales constituyentes que, en las mismas condiciones, poseen una susceptibilidad diferente frente a los agentes de alteración. El orden de alterabilidad ha sido establecido:

plagioclasa>biotita>feldespato potásico>cuarzo

Las plagioclasas, los feldespatos y las micas son los minerales más susceptibles de sufrir alteraciones, por lo cual la mayoría de los trabajos se centran en ellos. Caben destacar los trabajos de Torrent y Benayas (1977), García Paz (1982), Romero *et al* (1992a y 1992b) sobre la alteración de las plagioclasas y los feldespatos y los trabajos de Robert (1973), Tardy *et al.* (1973), Vicente *et al*. (1977), McKeage *et al*. (1983), Crawofd *et al.* (1983),

Sequeira braga (1988), Sequeira braga *et al.* (1989) sobre la alteración de las micas.

Los productos de alteración mayoritarios son los filosilicatos de tipo 1:1, sobre todo caolinita y haloisita, acompañados de oxihidróxidos de hierro poco cristalinos que confieren a la roca una coloración pardo-amarillenta a medida que progresa la alteración. Otro producto de alteración frecuente es la gibsita, que aparece en las primeras fases de alteración y se forma a partir de las plagioclasas en medios bien drenados y en ausencia de materia orgánica (Macías, 1981; Taboada y García, 1999).

El cuarzo y la moscovita permanecen prácticamente inalterados, ocupando sus posiciones originales, esta es la razón de que se mantenga la organización macroscópica de la roca largo tiempo. La moscovita si pasa el tiempo suficiente para que progrese el proceso de alteración tiende también a formar los mismos compuestos que la biotita.

Desde un punto de vista geoquímico, la alteración del granito se caracteriza por un importante lavado de bases que tiene lugar desde las primeras etapas. Taboada (1992) estableció para el macizo de Forgoselo (A Coruña) la siguiente secuencia de movilidad de los elementos: Na>Ca>Mn>Ti>K, Si>P, Mg>Fe>Al. Sin embargo esta secuencia no es siempre igual ya que hay otros autores que presentan modificaciones, sobre todo en el caso del Ca y Mg (Guitian y Calvo, 1981).

Los procesos de alteración no dependen solamente del material de partida sino también del ambiente de meteorización. Uno de los factores que afectan en gran medida a la alteración es la presencia de materia orgánica en el medio ya que, la tendencia de alteración varía; el aumento de la acidez y el efecto complejante de los ácidos orgánicos, hacen que las micas, incluso la

moscovita, sean atacadas transformándose en vermiculita hidroxialumínica (Vicente *et al.,* 1977; Robert y Berthelin, 1986). Ejemplos del papel de los organismos en la alteración del granito son los trabajos de Prieto *et al*. (1997), en el que se asocia la presencia de vermiculita hidroxialumínica y caolinita en afloramientos graníticos con la colonización por líquenes, el estudio realizado por Arocena *et al.* (2003) en el que se describe la importancia de los líquenes en la formación de arcillas 2:1 y de óxidos de Fe y Mn en ambientes alpinos, y el de Tuk *et al.* (2006) en el que se demuestra que la presencia de bacterias en la alteración del granito favorece la neoformación de arcillas ya que los biofilms creados por los microorganismos atrapan cationes y crean un lugar propicio para la formación de complejos amorfos que más tarde podrían dar lugar a compuestos minerales.

Sin embargo, debemos decir que en comparación con otras rocas las rocas graníticas son muy resistentes a la alteración. Drever (1994) calcula que el tiempo que tardaría en desaparecer los minerales de una roca granítica de 1mm de tamaño en una disolución de agua pura a pH 5 y 25 ºC oscila entre 10^7 y 10^5 años, mientras que para una roca carbonatada, en las mismas condiciones, el tiempo sería mucho menor (1,75 y 0,6 años)

2.1.2 Alteración en los monumentos

Mientras la meteorización en el medio natural es un proceso lento a escala humana, en los edificios la alteración de las rocas puede acelerarse de un modo importante.

El hecho de que la roca haya sido extraída de una cantera, manipulada y colocada en una edificación donde actúan otros mecanismos además de los que actúan en el medio natural, ya que la roca se encuentra formando parte de una

estructura compleja sometida a tensiones, en contacto con otros materiales de construcción y expuesta a condiciones ambientales que en muchos casos pueden ser muy agresivas, pueden incidir en un drástico incremento de su deterioro.

Los procesos de deterioro que afectan a las rocas graníticas comienzan con la extracción en la cantera y con el proceso de elaboración y trabajado de los bloques para ser posteriormente colocados en los edificios.

Una primera consideración a tener en cuenta tiene que ver con la elección del material, ya que al ser el granito una roca muy dura y resistente, su extracción resulta difícil y costosa, por lo que muy a menudo para salvar este inconveniente se seleccionan materiales graníticos con cierto grado de alteración, elección poco recomendada ya que la piedra es más susceptible a la alteración (Delgado, 1989).

Una vez elegido el material, la primera acción deteriorante se da en el momento de la extracción de la piedra de la cantera. Según Lazarini y Tabasso (1986), los métodos de extracción inducen las primeras modificaciones en el estado superficial de la roca, dando lugar a microfisuras, que a su vez, van a favorecer la actuación de otros factores de deterioro. Estos autores señalan también que cualitativamente no existen diferencias sustanciales en cuanto a los métodos de extracción artesanales y modernos, aunque cuantitativamente consideran que son más deteriorantes los primeros.

Después de la extracción de la roca en la cantera, el granito antes de ser colocado en los edificios sufre un proceso de elaboración y trabajado. Este proceso consiste en (ITGE, 1992):

1. Aserrado y dimensionado del bloque, mediante telares de flejes diamantados a los que se les adiciona un abrasivo.

Artesanalmente se realizaba mediante punteros de acero introducidos con mazas en la piedra.

2. Tratamiento de superficie, por métodos automatizados (pulido, flameado y abujardado) o artesanales.

Estos procesos de elaboración y trabajado de las rocas graníticas provocan presión y calor suficiente para producir un incremento en la fisuración y como consecuencia se produce un aumento de la porosidad que facilita la penetración del agua y de otras disoluciones (Winkler, 1975; Riganti *et al*., 1978).

Una vez que el granito ha sido extraído de la cantera y trabajado hasta obtener bloques de tamaño y características adecuadas, éste se coloca en las edificaciones donde va a estar sometido a múltiples agentes de alteración, entre los que destacan el agua, los cambios de temperatura, las sales solubles y los organismos.

2.1.2.1 El agua

La mayor parte de los mecanismos de alteración del granito en los edificios dependen del agua. Ésta puede actuar desde un punto de vista químico, a través de procesos de disolución, hidrólisis e hidratación, y como agente físico, a través de cambios de estado dentro de los poros de la roca o como movilizador de otros agentes de deterioro como las sales solubles. El agua es enormemente perniciosa para las edificaciones pues hace disminuir la resistencia mecánica de las rocas y favorece la colonización biológica (Kowalski, 1966; Silva *et al*., 1998).

El agua penetra en los materiales rocosos que constituyen los edificios principalmente a través de la condensación del vapor de agua de la atmósfera, del agua de lluvia y del agua que asciende por capilaridad desde el suelo.

Cuando la atmósfera se encuentra saturada en vapor de agua si la temperatura de una pared es menor del punto de rocío se produce condensación sobre ella. El agua de condensación es la responsable en muchos casos del hinchamiento de minerales arcillosos que constituyen algunas rocas, causando expansión y finalmente fracturación y resquebrajamiento (Torraca, 1981).

La condensación también se ha citado como causa de la solubilización de algunos elementos que recubren la piedra como pueden ser pinturas murales o enlucidos (Brunet y Vidal, 1984, 1988; Camuffo, 1993; Casar, 1993).

En los poros de la roca, el proceso de condensación es mucho más complejo que el que se produce en la atmósfera, y depende mayormente de las fluctuaciones de la presión de vapor del aire.

En el interior del sistema poroso el agua forma un menisco y, en este caso, la humedad de equilibrio que conduce a la saturación se rige por la ley de Kelvin:

$$\text{Ln}\,(e/e_s) = -\,(2\sigma V_m/rRT)\cos\theta$$

Siendo e, la presión total de vapor a una temperatura de T; e_s, la presión parcial de saturación a esa temperatura; σ, la tensión superficial del agua; V_m, el volumen molar del agua; r, el radio de curvatura del menisco; R, la constante de los gases y θ, el ángulo de contacto agua-aire.

Según esta ecuación la porosidad total y las características geométricas del sistema poroso de las rocas son dos factores que junto a la temperatura

influyen en los procesos de condensación-evaporación. Cuanto más pequeño sea el radio del poro, menor será la relación e/e_s y, como e/e_s: HR/100, menor será la humedad relativa en equilibrio, y por lo tanto aun en climas áridos es muy probable la condensación en el interior de las rocas (Camuffo, 1993).

La presencia de sales higroscópicas en el interior de los poros y la presencia de contaminantes incrementan la probabilidad de condensación, produciéndose a humedades relativas más bajas (Vos, 1976; Camuffo, 1993)

El mecanismo de condensación-evaporación depende también en gran medida del sistema poroso. Camuffo y Bernardi (1985) y Camuffo (1982, 1993) establecen varios modelos dependiendo del tipo de sistema poroso:

1. En un sistema con porosidad esférica, donde existe un poro de radio r_s , comunicado al exterior por una apertura grande, esta cavidad se mantiene vacía hasta que se alcanza la humedad relativa crítica dada por la ecuación de Kelvin para un radio r ($r=r_s$ en el estado inicial); en este momento comienza a llenarse de agua aumentando la humedad relativa de equilibrio a medida que el radio del menisco aumenta, hasta que el menisco se transforma en una capa plana de agua. Este proceso es reversible cuando se restablece la humedad de equilibrio que es inicialmente más baja.

2. Otro tipo de sistema poroso sería en el que hay una cavidad esférica de radio r_s comunicado a través de una apertura pequeña. Esta cavidad comenzará a llenarse de agua cuando se alcance la humedad relativa establecida por la ecuación de Kelvin para el radio r ($r=r_s$, en el momento inicial). Este llenado se produce sin incrementar la humedad relativa, puesto que por

el contrario produce un descenso progresivo de la humedad de equilibrio ya que el radio del poro se hace cada vez más pequeño. Este proceso de saturación no es reversible, ya que al final este proceso estaría en equilibrio con una humedad relativa mucho menor que la inicial.

3. Otro caso sería un sistema poroso donde hay una cavidad de radio r_s a la que se accede a través de un capilar de radio r_c. Dentro de este caso hay varias posibilidades: si $r_c>r_s/2$ la condensación se produce primero en la cavidad; si $r_c=r_s$ la condensación se produce al mismo tiempo en la cavidad que en el capilar; Si $r_c<r_s/2$ la condensación se produce en primer lugar dentro del capilar. Ésta última situación supone que el aire queda atrapado dentro del poro lo que evita que continúe la condensación hacia el interior si no es a través de fluctuaciones en la temperatura o en la presión atmosférica.

Los procesos de condensación-evaporación favorecen la disolución y cristalización de sales solubles, ya que durante la condensación se disuelven algunos materiales que poseen sales solubles como los morteros y enlucidos que cristalizan posteriormente cuando disminuye la húmedad relativa y se produce el proceso de evaporación (Camuffo, 1993)

El agua de lluvia es un agente muy activo en la alteración de la piedra. Es el factor desencadenante de la acción deteriorante de los contaminantes atmosféricos, ya que lleva en disolución gran diversidad de compuestos provenientes de la atmósfera. Además provoca la movilización de otros elementos deteriorantes que se encuentran sobre la superficie de la piedra, como son las sales; las lluvias poco intensas facilitan la movilización de éstas,

mientras que las lluvias fuertes provocan menos deterioro por sales ya que provocan un lavado de estas.

La penetración del agua de lluvia depende en gran medida de la naturaleza del material rocoso y sólo es posible si el material no esta totalmente seco (Camufo, 1989, 1993, 1995). Si el material está algo húmedo, como ocurre normalmente en climas húmedos, las gotas de lluvia penetran en el interior de los capilares de la roca utilizando un mecanismo cóncavo, produciendo un descenso en la presión de vapor que facilita la penetración. Sin embargo si la roca está completamente seca, es decir en sus poros no hay moléculas de agua, la superficie de las gotas que intentan penetrar en los capilares lo hace de forma convexa, por lo que el trabajo requerido para superar la tensión superficial entre el mecanismos y la pared es muy grande y el agua no puede penetrar en el capilar.

Esto implica que en climas muy secos, o muros con insolación directa, donde la piedra está totalmente seca el agua de llovizna no penetra en la piedra, al no haber una capa inicial de agua que facilite la penetración, y es necesaria la acción del viento y de los cambios de presión para forzar la penetración del agua hacia el interior de los poros.

El agua puede penetrar también en la piedra por succión capilar procedente del subsuelo, favoreciendo la adsorción de agua y la condensación dentro de los poros de la roca, además si contiene sales puede actuar junto con el agua de condensación movilizándolas y favoreciendo los procesos de deterioro relacionados con las sales.

Además de los procesos en los que interviene el agua líquida, un mecanismo de alteración que tiene gran importancia en las áreas de clima continental es la formación de cuñas de hielo. El agua líquida cuando se congela

aumenta su volumen aproximadamente un 9%, por lo que si ese agua se encuentra dentro de poros y fisuras del granito origina una serie de tensiones internas que causan la desagregación de la roca. Los principales factores que condicionan la acción deteriorante del hielo son: el contenido en agua y el grado de saturación de la roca, la porosidad y la velocidad de descenso de la temperatura.

Cuanto mayor sea el contenido en agua y al grado de saturación de las rocas, mayor será su grado de heladicidad y habrá mayor facilidad para que se formen cuñas de hielo y se produzca la desagregación de la roca (Winkler, 1975; Hatsagortsian, 1985)

Con respecto a la porosidad se considera que a mayor tamaño de poro, mayor es el deterioro producido por la cristalización del hielo (Hatsagortsian, 1985; Fitzner, 1993). Sin embargo Torraca (1981) señala que en climas mediterráneos el efecto del hielo es más fuerte en rocas con un tamaño de poro medio (0,1-1μm), y esto se explica por la mayor facilidad que presentan este tipo de poros para llenarse con agua de condensación en humedades relativas medias (Camuffo, 1993).

El último de los factores implicados es el cambio brusco de la temperatura, ya que si esto ocurre, el hielo puede bloquear la migración del agua produciendo daños, sobre todo si esto ocurre en muchos ciclos (Latridou y Ozouf, 1978).

2.1.2.2 Temperatura

Las condiciones climáticas extremas son también un factor a tener en cuenta. La roca colocada en un edificio va a estar sometida a cambios de temperatura drásticos, lo que provoca una contracción y una dilatación de sus minerales que crea tensiones en el material (Helmi, 1985; Galán, 1991; Iñigo y Vicente-Tavera, 2001, 2002). Este mecanismo en los granitos puede adquirir importancia ya que los coeficientes de expansión del cuarzo y de los feldespatos son muy diferentes. De Castro y Braga (2004) estudiaron el coeficiente de expansión térmico de diversas rocas graníticas, viendo que éste disminuye al aumentar la porosidad de la roca y aumenta con el tamaño de grano y el contenido de cuarzo.

Cuando el incremento de la temperatura está provocado por un incendio se producen fuertes tensiones que pueden llegar a fracturar la roca y también se originan cambios mineralógicos; el más evidente es la deshidratación de los hidróxidos de hierro que lleva consigo el enrojecimiento de la roca. Rivas *et al.* (2002) consideran que el calentamiento producido por hogueras es la causa de la formación de placas en el interior de muchos dólmenes. Delgado (1982) en un estudio con rocas ígneas a las que se le aplicaba un aumento de la temperatura en intervalos de100 ºC, observó que se producía un aumento de la porosidad del orden de un 300 % entre 400 y 700 ºC.

Si el estrés térmico va acompañado de agua, se inducen, además, cambios mineralógicos. Aires *et al*. (1975) comprobaron la formación de nuevas fisuras y la apertura de las existentes, así como el anubarramiento y picoteo de la superficie de rocas graníticas sometidas a cambios de temperatura entre 20 y 70 ºC.

2.1.2.3 Sales solubles

Las sales solubles son uno de los agentes más alterantes en los monumentos (Arnold, 1976; Arnold y Kueng, 1985; Arnol y Zehnder, 1985, 1989; Helmi, 1985; Casal, 1989; Grossi y Esbert, 1994; Santamaría, 1994; Rivas, 1996; Rivas *et al.*, 2003) Las sales se movilizan en disolución acuosa hacia el interior de la masa rocosa, cuando el agua se evapora cristalizan dependiendo de la solubilidad de la sal, de las características del sistema poroso del material y de las condiciones ambientales.

La humedad y la migración del agua en el sistema poroso de la roca son los factores determinantes de la cristalización de las sales. Muchos investigadores insisten en la importancia del microclima del edificio en el proceso de cristalización, es decir, las humedades a las que está expuesto y la intensidad y periodicidad de los procesos de evaporación y aporte de agua.

Si la sal es muy soluble, puede aparecer cristalizada en la superficie de la piedra en forma de eflorescencias, que no son estables y se ven modificadas por variaciones en la humedad. Si la sal es poco soluble cristaliza en el interior de la roca siguiendo una pauta de distribución que depende en gran medida de las características físicas de la roca. La cristalización de la sal se produce siempre en estado de saturación o sobresaturación, y por tanto puede estar provocada por un descenso de la temperatura que da lugar a un aumento de la concentración, o por la evaporación de la solución.

Las rocas graníticas debido al tipo de sistema poroso que presentan son rocas muy susceptibles a los procesos de alteración por las sales. En Galicia donde la mayor parte de los monumentos están construidos con rocas graníticas y donde, debido a las condiciones climáticas y topográficas, existe una gran

influencia marina, las sales son el principal agente de alteración de los monumentos (Casal *et al.,* 1989)

Los principales tipos de alteración que sufren los granitos en edificios (desagregación arenosa y deplacaciones superficiales), están relacionados con la cristalización de sales. La desagregación arenosa se relaciona principalmente con la presencia de sales de alta solubilidad, sobre todo ClNa, mientras que las deplacaciones se relacionan con la presencia de sulfato cálcico en la superficie de la piedra (Silva *et al.*, 1993, 1996a, 1996b; Rivas *et al.* 2003).

Las sales provocan alteración en los monumentos atendiendo a tres mecanismos diferentes: presión de cristalización, presión de hidratación y presión por expansión térmica de la sal.

La presión de cristalización de la sal dentro de los poros será más elevada cuanto mayor sea la relación entre la concentración actual de la sal y la concentración de saturación de la misma. Así la cristalización de la sal sólo se produce entre los estados de saturación y sobresaturación, de todos modos, la cristalización puede alcanzarse, a través de un incremento de la temperatura, que provoca un incremento en la concentración debido a la evaporación.

En sistemas complejos, donde hay muchas sales en disolución esto se complica, ya que determinadas sales pueden producir descensos o aumentos de la humedad en equilibrio con otras sales (Arnold y Zehnder, 1988; Price y Brimblecombe, 1996).

Este proceso tiene mayor o menor susceptibilidad dependiendo de los materiales rocosos sobre los que actue. Según Torraca (1981), Hatsagortsian (1985) y Fitzner (1993) este efecto será más deteriorante cuanto menor sea el tamaño de poro.

Otro de los mecanismos a través de los cuales las sales provocan alteración es la presión de hidratación, este mecanismo se basa en la capacidad que presentan las sales de mantenerse en varios estados de hidratación, que son estables en condiciones de temperatura y presión parcial de vapor de agua específicos para cada sal. Para cada estado de hidratación corresponde un incremento de volumen y el paso de un estado a otro conlleva una presión sobre la roca. Ciertos autores consideran este proceso de hidratación-deshidratación más deteriorante que el de cristalización, al ser un proceso que puede ocurrir incluso múltiples veces al día (Winkler y Wilhelm, 1970).

Las disoluciones salinas en los monumentos no son sistemas de una única sal y hay sales como el ClNa, muy higroscópicas, que son capaces de reducir la temperatura o aumentar la presión de vapor de la solución, produciendo el paso de una fase deshidratada a una hidratada, aumentando la presión de hidratación (Arnold y Zehnder, 1985).

El último de los mecanismos que actúa en el deterioro provocado por las sales es la expansión térmica de la sal, ya que existe un contraste muy grande entre la expansión térmica de la sal y la sufrida por la roca. En el caso de las rocas graníticas, expuestas a una temperatura de 60 ºC éstas se expanden un 0,2%, mientras que la halita a la misma temperatura se expande un 0,5% (Winkler, 1975).

El origen de las sales presentes en monumentos es muy diverso. Pueden proceder del suelo, del subsuelo y de los cimientos y ascender por capilaridad, de las salpicaduras de agua de lluvia o de aguas estancadas que llevan disueltas sales sobre todo cloruros y sulfatos en suelos urbanos y nitratos y sulfatos en suelos rurales (Winkler y Wilhelm, 1970; Arnold y Zehnder, 1988, 1989).

Otra fuente muy importante de sales son los morteros, cementos y otros materiales de construcción (De Vechi *et al.*, 1981; Arnold y Zehnder, 1989; Cooper *et al.*, 1991; O`Brien *et al*., 1995; Rivas *et al.*, 1997; Silva *et al.*, 1996b, 2003, 2005). Los morteros de yeso pueden aportar sales directamente sobre la piedra y además los morteros de cal, aportan carbonatos y calcio que mediante procesos de sulfatación con los contaminantes atmosféricos pueden dar lugar a yeso. Otras sales como los carbonatos de sodio y potasio pueden provenir del cemento o de productos de limpieza y consolidantes (Lazarini y Tabaso, 1986).

Los cloruros de sodio y potasio, y en menor media los sulfatos y nitratos, tienen principalmente un origen marino y generalmente su acción se encuentra asociada al desarrollo de desagregación arenosa (Rossi-Manaresi y Tucci, 1989; Cuttano *et al*., 1981; Rivas *et al*., 2000). Generalmente la concentración de estas sales aumenta con la proximidad a la costa, pero también puede variar en distribución por factores atmosféricos como la dirección de la lluvia, topografía, estación del año etc.

Rivas *et al.* (2003) estudiaron el efecto del cloruro sódico y del agua del mar en varios granitos gallegos observando que al humedecer la roca con una solución de ClNa se produce en ésta un aumento de la fisuración, principalmente intergranular. En cambio aunque el agua de mar posee principalmente éste compuesto, como contiene también otros iones que modifican la solubilidad de esta sal, la fisuración que aparece en las rocas al ser humedecidas con agua de mar es transgranular, con fisuras perpendiculares a la exposición al agua. Esto se ha desmostrado también en otros trabajos donde se comprobó que el NaCl genera principalmente una desagregación granular (Rivas *et al.* 1997, 2000). La desagregación provocada por estas sales es muy importante en los monumentos que se encuentran en las zonas de costa (Silva *et al.*, 1996b).

Otra fuente importante de sales es la emisión de contaminantes a la atmósfera, las cuales por procesos de deposición seca o húmeda se depositan en la superficie de los monumentos. Los principales compuestos emitidos a la atmósfera son el CO_2 y los óxidos de nitrógeno y azufre.

El CO_2 se solubiliza en el agua de lluvia creando una disolución levemente ácida que disuelve las rocas calizas, los mármoles y los morteros de cal.

Los óxidos de nitrógeno tienden a formar HNO_3 en la atmósfera provocando una acidificación del agua de lluvia, que da lugar a la disolución de las rocas calcáreas. Además, los óxidos de nitrógeno actúan como catalizadores de la oxidación de otros compuestos como el dióxido de azufre (Fassina, 1991; Henriksen, 1994; Moroni y Poli, 2000).

Los óxidos de azufre están implicados en procesos de sulfatación y formación de yeso que precipita en la superficie dando lugar a las costras negras (Schiavon *et al.*, 1994, 1995; Schiavon, 2000, 2007).

Los organismos que viven sobre los monumentos también son los responsables de la formación de algunas sales. Las aves producen deyecciones que son disueltas por el agua de lluvia aportando fosfatos de magnesio, calcio y nitratos. Las bacterias nitrificantes son las responsables de la mayoría de los nitratos que aparecen en la piedra, a las bacterias oxidantes de sulfuro se les atribuye la presencia de sulfatos en las piedras y algunas especies de líquenes u otros organismos producen oxalatos (Prieto *et al.*, 1997; Ascaso *et al*. 1998; Arocena *et al.*, 2003).

2.1.2.4 Organismos

Los organismos son los responsables del biodeterioro de la piedra, y son muchos los autores que consideran este proceso como uno de los más importantes dentro de la alteración de la piedra (Warscheid y Braams, 2000; De los Ríos *et al.,* 2004; Nuhoglu *et al.,* 2006). Se considera biodeterioro al conjunto de cambios irreversibles y no deseables que se producen por la acción de los organismos vivos sobre los materiales.

Los organismos pueden actuar produciendo un deterioro físico, debido al avance de ciertas estructuras como las raíces, ricinas, hifas etc. que penetran en el material y acaban desagregándolo (Mirshra *et al.*, 1995; Lisci *et al.*, 2003; De los Ríos *et al.,* 2004). Y por unos mecanismos químicos debido a los productos metabólicos que producen como los ácidos orgánicos (Papida *et al.,* 2000; De los Ríos *et al.,* 2004; Nuhoglu, *et al.,* 2006) o los polisacaridos (Albertano *et al.,* 2000).

En los estudios realizados sobre rocas graníticas la mayoría de los estudios realizados sobre deterioro se refieren al daño causado por los líquenes en la alteración de la piedra (Prieto *et al*., 1998, 2002; Silva *et al*., 1999; Silva y Prieto, 2004). Cabe citar un trabajo realizado por Prieto *et al*. (2002) en el que se hace especial hincapié sobre la alteración mineralógica que originan estos organismos sobre los sustratos graníticos. Esta alteración puede resumirse en varios puntos:

1. Formación de caolinita y vermiculita hidroxialumínicas.
2. Formación de geles de sílice.
3. Neoformación de minerale entre los que se destacan el oxalato cálcico, el oxalato magnésico, el carbonato cálcico y el yeso.
4. Formación de óxidos de hierro.

2.2 Alteraciones cromáticas de las superficies

Uno de los primeros síntomas de alteración de las rocas es el cambio de color de su superficie que puede ocurrir mediante diversos procesos, siendo uno de los más comunes la oxidación. Estos cambios de coloración tienen especial relevancia cuando las rocas forman parte de las edificaciones y es en este ámbito donde se le ha prestado mayor atención. La alteración cromática, y en particular el ennegrecimiento de los edificios, es la causa del mayor número de intervenciones sobre ellos y supone un gasto importante para los particulares y las entidades responsables del mantenimiento del patrimonio monumental.

El ennegrecimiento de la piedra en inglés recibe el nombre de "Soiling", término que podría traducirse por "ensuciamiento". En diversos estudios se ha relacionado este ensuciamiento con la deposición de materia particulada atmosférica sobre la superficie de los materiales (Newby *et al*., 1991; Grossi *et al.,* 2003).

Dentro de las alteraciones cromáticas se engloban todos los procesos que dan lugar a modificaciones de la superficie externa de la piedra, sin provocar generalmente alteraciones importantes del material subyacente, sino que consisten básicamente en un cambio de color. Las alteraciones cromáticas pueden ser de varios tipos según su color y espesor. Dependiendo de las publicaciones consultadas se encuentran distintos nombres e incluso distintas definiciones para la misma formación, de modo que hay bastante confusión en la nomenclatura.

Por ejemplo Ordaz y Esbert (1988) diferencian tres tipos de alteraciones cromáticas, a parte de las eflorescencias que son las concentraciones de sales depositadas sobre la superficie de la piedra y que por tanto también pueden causar cambios en su color:

Costra: Lámina o corteza de material coherente que se forma en la parte externa de una piedra, como producto de una transformación superficial. Su naturaleza química, mineralógica y física es parcial o totalmente distinta del material pétreo sobre el que se asienta. Las costras generalmente tienen una estructura en capas y su espesor es variable pudiendo alcanzar varios milímetros las más gruesas. Se diferencian por su morfología, dureza y color siendo las más frecuentes, negras o grisáceas. Suelen contener yeso de neoformación, aunque no en todos los casos ocurre esto.

Depósito superficial: Acumulación de sustancias de diversos orígenes (polvo, humo, hollín, organismos, etc.) en la superficie de la piedra. Normalmente los depósitos superficiales presentan escasa coherencia, y baja adherencia al soporte sobre el que se asientan, su espesor es variable.

Pátina: Capa o película delgada que se forma en la superficie de la piedra por diversas causas. Se trata de una modificación superficial del material que no implica necesariamente procesos de degradación o deterioro. Dentro del término pátina caben varias acepciones:

-Tonalidad o aspecto externo que cualquier piedra adquiere con el paso del tiempo y bajo los efectos de la intemperie: **pátina de envejecimiento**.

-Decoloración por causas naturales o artificiales

-Película coloreada natural o artificial: **pátina cromática: patinadura, policromía**.

-Recubrimiento de carácter orgánico de tonalidad variable: **pátina biogénica**.

-Teñido superficial debido a diversas sustancias como el orín, verdín: **pátina de tinción**

-Ensuciamiento superficial, pátina de suciedad o enmugrecimiento: **pátinas negras.**

Otros autores como García Valles *et al.* (1998), utilizan otra terminología para referirse a los depósitos superficiales presentes en la piedra y hablan de:

Costra: depósito superficial que puede ser de diferente formación, color o composición que la roca sustrato.

Pátina: Cada una de las capas por las que está constituida una costra, y que se diferencian por el color, microestructura o composición.

Lámina: La pátina a su vez puede estar constituida por una estructura micro laminar con varios niveles.

Martín (1990) hace una clasificación más detallada de las alteraciones cromáticas diferenciando tres tipos: variaciones cromáticas propiamente dichas, costras y depósitos.

Variaciones cromáticas: Dentro de ellas distingue por un lado los cambios de color propiamente dichos que se caracterizan por la variación de la tonalidad o lustre de la piedra, la **limonitización** producida por la alteración de minerales de Fe que se transforman en hidróxido de hierro de color amarillento, y la **tinción** o el desplazamiento hacia la superficie de la piedra de productos de corrosión de metales, provenientes de rejas de ventanas, clavos, grapas etc. que normalmente son óxidos e hidróxidos de metales como el hierro y el cobre.

Otras variaciones cromáticas fundamentalmente causadas por los organismos son la **bioalteración cromática,** producida por la transmisión de pigmentos metabólicos de los organismos al sustrato pétreo y el **moteado** que consiste en la presencia de pequeñas áreas pigmentadas de modo diferente.

También dentro de este grupo de alteraciones cromáticas estarían las **pátinas,** que representan un estado de envejecimiento del material a la vez que una alteración cromática y una modificación superficial más significativa. Esta alteración superficial está estrechamente relacionada con aquellas modificaciones naturales, no ligadas a fenómenos de alteración evidentes, y que se manifiestan principalmente en forma de una variación del color y del aspecto superficial de la piedra. En el caso de que sea una alteración provocada por medios artificiales se denomina **patinadura**.

Costras: Se denomina así a la modificación de la parte exterior de la piedra como resultado de una transformación superficial, que se manifiesta por la formación de una corteza exterior endurecida. Se distingue visiblemente de la parte que está por debajo, por sus características morfológicas y especialmente por su color. También su naturaleza química o mineralógica, así como las características físicas, pueden ser muy distintas. Si este fenómeno se produce en el exterior de una roca caliza, a la parte más externa y más o menos dura se le denomina **calcín**; en general esta parte está formada principalmente por sulfatación atmosférica, por tanto está constituida en gran parte por yeso y entonces recibe el nombre de **sulfín**. Cuando la costra está producida por organismos recibe el nombre de **biocostra**.

Depósito: los depósitos son acumulaciones sobre la superficie de la piedra de materiales sueltos o más o menos compactos y de extensión limitada. Las variaciones más importantes son:

Depósitos superficiales: consisten en la acumulación de material, suelto, extraño a la piedra y de diversa naturaleza. Tienen espesor variable, generalmente con escasa coherencia y adherencia al material que está debajo. Cuando el depósito es producido por acumulación de restos de origen biológico, como microorganismos, restos orgánicos, excrementos de aves etc., se denomina **biodepósito superficial**.

Concreciones o incrustaciones: son depósitos compactos formados por la aportación y deposición de sustancias escasamente solubles, muchas veces procedentes del propio sustrato. Es una alteración superficial que implica la presencia en la superficie de la piedra de una masa más o menos compacta, dura y adherente, formada por depósitos o por desecación. El depósito es de dimensiones limitadas, generalmente isométrico, aunque a veces adopta la forma de estalactita o estalagmita con eventual englobamiento de microorganismos. Dicho depósito puede formarse por aporte a la superficie de carbonato cálcico en disolución. Sobre materiales calizos muy porosos, el depósito también puede originarse por cristalización en superficie de carbonatos o sulfatos cálcicos.

Cuando el depósito aparece como embutido en la piedra recibe el nombre de **incrustación** y suele ser estratiforme.

Cuando este tipo de incrustaciones se forman por algas o líquenes poseen un color y consistencia variables y se denominan **bioincrustaciones**.

Las **eflorescencias** pueden considerarse como un caso intermedio, puesto que se trata de acumulaciones de partículas o pequeños cristales de sal, transportados a través de la piedra y depositados sobre ella al evaporarse el agua. Son generalmente blancos y poco coherentes. Estas sales pueden provenir de la propia piedra, pero también de materiales situados en la proximidad de la misma (morteros, ladrillos, hormigón).

En la **subeflorescencia** las sales que se mueven hacia la superficie de la piedra cristalizan inmediatamente debajo de ella, en contraposición con las eflorescencias que lo hacen encima.

En materiales pétreos con grandes poros, la cristalización de las sales solubles puede tener lugar en el interior del material, dando lugar a **criptoeflorescencias**.

Las **bioeflorescencias** son eflorescencias formadas por un tipo especial de crecimiento de actinomicetes (eflorescencias blancas) o de algas azules o verdes (eflorescencia blanca, rosa o amarilla).

2.3 Origen de las pátinas y costras negras

Las pátinas y costras negras pueden tener orígenes muy diversos dependiendo del material pétreo sobre el que se encuentren y de las condiciones ambientales, pero englobando de algún modo sus principales factores de formación se pueden considerar principalmente dos: por un lado un origen debido a la contaminación atmosférica y por otro lado un origen biológico, debido a los organismos que colonizan la piedra.

2.3.1 Costras y pátinas de contaminación atmosférica

En las grandes ciudades o áreas industriales la atmósfera aparece cargada de numerosas partículas de polvo, carbón, etc. así como de óxidos de nitrógeno y azufre. Todos estos componentes entran en contacto con los materiales pétreos expuestos a la intemperie dando lugar a diversas alteraciones, sobre todo a las costras negras, que contribuyen de manera notable al deterioro del patrimonio.

Se pueden clasificar las costras o pátinas negras en función del constituyente principal que las forma; así en la bibliografía se describen costras de yeso, costras de material carbonoso y en algunos casos costras formadas principalmente por compuestos de fósforo.

2.3.1.1 Costras y pátinas de yeso

En muchas de las costras negras presentes en edificios de zonas urbanas aparece el yeso como principal componente, sobre todo cuando la roca es de naturaleza calcárea. Hoy día está demostrado que se forma principalmente por reacción de compuestos de azufre presentes en la atmósfera con el calcio presente en el sustrato pétreo (Schiavon *et al*, 1994; García-Valles *et al*., 1996, 1998; Galleti *et al*, 1997; Moropoulou *et al.,* 2003; Maravelaki-Kalaitzaki, 2004, 2005).

El azufre en la atmósfera es un elemento bastante frecuente que proviene de procesos naturales o de actividad antropogénica. Las principales fuentes de emisión de compuestos de azufre son la quema de combustibles fósiles, la descomposición de la materia orgánica, los gases desprendidos por los volcanes y los aerosoles marinos (Kellog *et al.,* 1972).

Los compuestos de azufre no se acumulan en la atmósfera en la forma en la que se emiten, sino que cada uno de ellos interviene en un ciclo, en el cual el azufre se transforma en diferentes fases y en diferentes combinaciones químicas, existiendo un delicado balance entre la emisión de compuestos de azufre a la atmósfera y su vuelta o deposición sobre las superficies.

Las reacciones de trasformación del azufre en la atmósfera tienden a aumentar su estado de oxidación; para que estas reacciones se produzcan es muy importante la presencia de radicales OH^- ya que este anión actúa de catalizador. Las reacciones de oxidación del azufre hacen posible que el SH_2 gracias a la presencia de O_2, O_3 y OH_2, se transforme en SO_2 que es el compuesto de azufre mayoritario en la atmósfera (Sze y Ko, 1980).

A principios de los años 70 comenzaron los primeros estudios sobre el papel del SO_2 en la alteración de los materiales pétreos y se demostró la formación de sulfato de calcio en la superficie de materiales calcáreos (calizas, mármoles, dolomitas y algunos tipos de areniscas calcáreas) expuestos a entornos urbanos e industriales (Skiotis *et al.*, 1979) dando lugar a las costras negras de sulfatación. Este tipo de costras se forman en zonas con abundante humedad pero poco expuestas a la lluvia, ya que la lluvia lavaría el sulfato cálcico por ser muy soluble (Lamb *et al.*, 1987). La necesidad de agua, ya sea en estado líquido o gaseoso, es uno de los factores principales en la formación de costras de yeso, ya que al aumentar la humedad aumenta la reactividad de los materiales. Lamb *et al.* (1987) demostraron que en ausencia de humedad o con una humedad relativa menor al 40 % las reacciones del SO_2 con el $CaCO_3$ de las rocas prácticamente no tienen lugar.

Para que se produzca una costra de yeso es necesario por una parte la presencia en el agua de compuestos de azufre, y por otra parte CO_2 u otros contaminantes que hagan que este agua posea un pH ácido, lo cual permite la disolución del carbonato cálcico de la roca caliza y la liberación del calcio.

Perez Bernal y Bello López (2004) describen las diferentes fases en que tiene lugar la sulfatación de las calizas:

I. Disolución o adsorción del SO_2: el SO_2 presenta una solubilidad en agua bastante alta, lo cual, junto con su carácter ácido lo convierte en el agente de alteración más importante frente a otros contaminantes gaseosos como el NO_2. También se puede producir adsorción del SO_2 gas sobre la roca:

$$SO_{2\,(g)} + H_2O_{(l)} \rightarrow SO_2.H_2O_{(l)}$$

$$SO_{2\,(g)} \rightarrow SO_{2\,(ad)}$$

II. Hidrólisis del SO_2: al disolverse el SO_2 en agua se dan los equilibrios ácido base correspondientes

$SO_2. H_2O_{(l)} \rightarrow HSO_3^- + H^+$

$HSO_3^- \rightarrow SO_3^{-2} + H^+$

III. Disolución del $CaCO_3$: el $Ca CO_3$ es muy poco soluble en agua pura , la presencia de CO_2, los cambios de temperatura y la presencia de especies ácidas como el SO_2 hacen que la solubilidad del carbonato aumente:

$CaCO_3 + 2H^+ \rightarrow Ca^{+2} + CO_2 + H_2O$

IV. Formación de sulfito cálcico hemihidratado: el calcio originado por la solubilización del carbonato reacciona con los oxianiones de S(IV) para dar el sulfito cálcico hemihidratado, muy poco soluble en agua.

$Ca^{+2} + SO_3^{-2} \rightarrow Ca\ SO_3\ 1/2\ H_2O$

$SO_{2\ (g)} \rightarrow SO_{2\ (ads)}$ ---- $H_2O^- \rightarrow CaSO_3 .1/2\ H_2O$

V. Formación de yeso: se admiten varias posibilidades:

a) Oxidación del sulfato cálcico hemihidratado:

   $CaSO_3. 1/2\ H_2O \rightarrow CaSO_4\ 2H_2O$

b) Reacción del SO_2 adsorbido o disuelto en la capa de hidratación de la roca con el carbonato cálcico: S (IV) ac $\rightarrow SO_4^{-2} + 2H^+$

c) Oxidación del SO_2 atmosférico hasta dar ácido sulfúrico, siendo este ácido el que reacciona con el carbonato cálcico:

   S (IV) ac $\rightarrow SO_4^{-2} + 2H^+$

   $SO_2 + 1/2\ O_2 \rightarrow SO_3$

   $SO_3 + H_2O \rightarrow H_2SO_4$

   $CaCO_3 + 2H^+ + SO_4^{-2} \rightarrow CaSO_4\ 2H_2O + CO_2$

La formación y desarrollo de las costras de yeso se puede esquematizar en varios pasos (Gauri *et al*., 1989):

1. Formación de una capa inicial de yeso que recubre el material.
2. Una vez formada una primera capa de yeso, ésta crece hacia el exterior por reacción entre iones calcio y sulfato, en presencia de humedad y partículas atmosféricas.
3. El calcio migra hacia el exterior a través de la capa de sulfato cálcico quedando huecos bajo la capa de alteración en el material original, esta estructura porosa facilita que partículas atmosféricas puedan quedar atrapadas, originando el color oscuro de las costras.

Para que tengan lugar estas reacciones de formación de yeso algunos autores consideran sólo necesario la presencia de una capa de agua mientras que otros consideran necesaria la presencia de algún catalizador. Así, Fuzzi y Vitori, (1975), Ausset *et al.* (1999) y Ausset y Lefèvre (2000) consideran que algunos elementos contenidos en las partículas atmosféricas hacen que aumente considerablemente la oxidación del SO_2. De Santis y Allegrini (1992) demuestran que elementos como el oxido de nitrógeno o el hierro y el manganeso hacen que se incremente la formación de cristales de yeso. Rodríguez Navarro y Sebastián (1996) ponen de manifiesto que la formación de cristales de yeso aumenta con la presencia de cenizas volantes y de partículas carbonosas procedentes de las combustiones. En un estudio más reciente Perez Bernal (2000) comprobó que distintos elementos pueden actuar como catalizadores y que los productos que más aceleran la formación de cristales de yeso son:

- Cloruro de cálcico y cloruro de zinc (II), actúan modificando la higroscopicidad del sustrato y aumentan la reactividad del carbonato, sin embargo este efecto sólo influye en la reacción del sulfito cálcico.
- Cloruro de manganeso (II), óxido de manganeso (IV) y cloruro de níquel, favorecen enormemente la formación de sulfito cálcico.

- Cloruro de hierro (III) y el cloruro de cobre (II), favorecen la formación de sulfito cálcico así como la de sulfato cálcico.
- Óxido de níquel que favorece la formación de sulfato cálcico.

El yeso es un mineral de color blanco, por tanto para que se formen costras de color oscuro es obvio que entran en juego otros constituyentes. Diferente autores han detectado gran diversidad de elementos y compuestos en las costras de sulfatación, entre ellos destacan las partículas generados en procesos de combustión que pueden estar formadas por gran número de cationes metálicos (K, Al, Fe, Mn, Cu, Ni, Zn, Cr, Ti, V, Pb, Ga…). Otros componentes frecuentes en estas costras son partículas carbonosas, partículas de aluminosilicatos de forma esférica o pseudoesférica, así como partículas de óxidos de hierro, todas ellas originadas en los procesos de combustión de carbones e hidrocarburos (Van Grieten y Torfs, 1996; Del Monte *et al.*, 2001; Sabbioni *et al.,* 2004). Maravelaki-Kalaitzaki (2005) divide las partículas procedentes de la combustión que aparecen en edificios en dos tipos: partículas esféricas de carbono que proceden de la combustión de fueles y gasóleos y poseen pocos elementos minerales, y partículas inorgánicas compuestas por aluminosilicatos esféricos emitidos por la combustión de carbón. Además pueden aparecer granos de cuarzo, feldespatos y granos de calcita procedentes de la roca, así como diferentes sales, tales como nitratos y cloruros.

La mayoría de los estudios realizados sobre costras de yeso se han centrado en materiales de naturaleza calcárea, principalmente mármoles. Así, García-Vallés *et al* (1996, 1998) en diferentes monumentos construidos con piedra caliza encuentran que la costra negra está formada principalmente por yeso y calcita, aunque también encuentran otros compuestos formando parte de las pátinas como son los fosfatos de calcio y los oxalatos. Esto mismo es encontrado por Maravelaki-Kalaitzaki (2004, 2005) en estudios sobre las pátinas

y las costras negras del Partenón de Atenas y por Jiménez del Haro *et al.* (2004) en costras negras de la catedral de Sevilla.

En otros materiales de naturaleza no calcárea tales como los granitos o las areniscas silíceas, el calcio está presente en pequeñas cantidades, por lo se puede considerar que el origen del yeso formado sobre estas rocas tiene un componente exógeno importante.

En Galicia la cantidad de SO_2 en agua de lluvia es medida a través de la red gallega de calidad del aire que posee 62 estaciones fijas de las cuales 47 tienen conexión a tiempo real con el laboratorio de medio ambiente de Galicia (LMAG). Según datos de 2002 (Xunta de Galicia, 2005) las zonas de Galicia con mayor cantidad de azufre en agua de lluvia son las áreas industriales y las áreas urbanas que las rodean, concretamente los valores más elevados se encuentran en la zona del polígono industrial de A Coruña (556,4 μeq/l media anual). En Santiago, según datos de este mismo año, el valor medio de SO_2 en agua de lluvia es de 251,2 μeq/l; este es un valor considerablemente menor el de A Coruña pero suficientemente elevado como para explicar la formación de algunos depósitos o costras de yeso pues hay que tener en cuenta que es un proceso acumulativo. En las zonas rurales y no afectadas por actividades industriales la cantidad de SO_2 presente en el agua de lluvia es mucho menor, así por ejemplo en la estación de Sergude próxima a Santiago tenemos un valor medio anual de SO_2 de tan solo 42,2 μeq/l.

El calcio atmosférico medido en el agua de lluvia llega a ser importante también en lugares como A Coruña donde en el año 2002 se registró un valor medio de 350 μeq/l, o en los alrededores de la fábrica de cemento de Oural (Lugo) donde alcanza valores de 637 μeq/l. En Santiago los valores medios de calcio alcanzaron los 150,5 μeq/l en este mismo año. En el ámbito rural la

cantidad de de Ca^{+2} presente en agua de lluvia es mucho menor, de modo que en estaciones como la de Sergude sólo llega a los 26,6 μeq/l.

Por lo tanto, en el caso de monumentos graníticos gallegos, mientras que el azufre necesario para la formación de yeso puede proceder de la atmósfera, hay que descartar el origen atmosférico del calcio. A este respecto Silva *et al.* (2005) hacen una síntesis de los posibles orígenes del yeso encontrado en monumentos graníticos gallegos resaltando la importancia de los enlucidos o revestimientos y de los morteros de juntas como fuente de calcio, que se puede sulfatar, o incluso de yeso si se trata de morteros bastardos. Estos posibles orígenes del yeso también fueron apuntados por Cooper *et al.* (1991) y Sanjurjo-Sanchez *et al.*, (2004).

Otras fuentes de calcio pueden ser las partículas calcíticas del suelo o de la contaminación particulada (Begonha y Sequeira, 1996), o la disolución de las plagioclasas (Schiavon, 2000).

2.3.1.2 Costras y pátinas de otros compuestos diferentes al yeso

Como ya se ha comentado el yeso es el principal componente de la mayor parte de las costras negras, sin embargo se han citado casos de costras o pátinas en los que otros compuestos son mayoritarios e incluso algunas en las que no se identifica yeso. Así se han descrito pátinas formadas principalmente por hidrocarburos y partículas carbonosas, formadas por compuestos de fósforo y calcio, pátinas de hierro, e incluso puede haber pátinas formadas principalmente por oxalatos.

Las partículas formadas casi exclusivamente por carbono resultantes de los procesos de combustión, como ya se ha dicho, son un constituyente importante de las costras de yeso (Schiavon *et al*., 1994; Galletti *et al*., 1997), pero existen algunas costras o pátinas negras donde este material carbonoso es el principal componente. Las alteraciones cromáticas oscuras encontradas en monumentos de ambientes contaminados se atribuyeron en los primeros trabajos a depósitos de hollín, partículas carbonosas atmosféricas e hidrocarburos mal quemados (Saiz-Jiménez, 1991; Hermosin *et al.*, 2004)

A partir de estudios en los que se realiza una especiación del carbono que aparece en pátinas negras, para ver qué cantidad pertenece al carbono orgánico proveniente de contaminación o de los organismos y diferenciarlo del carbono que procede de los carbonatos de la roca y del carbono elemental que también puede provenir de las partículas de polución atmosférica (Sabbioni *et al.,* 2000; Ghedini *et al.,* 2003; Bonazza *et al.,* 2005), se comprobó que el carbono no carbonatado es un elemento muy importante en la formación de algunas pátinas y costras negras de monumentos.

En costras de monumentos urbanos aparecen además de carbono y elementos constituyentes de los compuestos orgánicos otros elementos como el hierro, aluminio, vanadio y plomo. Así, en algunos casos el principal constituyente de las costras negras es el hierro, que les da una coloración parda-rojiza. Eberhard y Mehner (1998) estudiaron el Fe en las costras negras observando que la forma más probable en que aparece es como oxido de hierro hidratado (ferrihidrita), como jarosita o como gohetita. Todos estos minerales en presencia de materia orgánica tienden a transformarse en magnetita, que forma el 45% del Fe presente en estas costras. El Fe aparece también junto con el Mn en forma de óxidos en pátinas formadas principalmente por la disolución de los feldespatos y la biotita, en zonas donde estos óxidos no son lavados y pueden permanecer en grietas y huecos (Moropoulou *et al.,* 2003)

Otro de los elementos formador de pátinas negras es el fósforo, que puede aparecer en la pátina principalmente formando fosfato cálcico, apatito o hidroxiapatito y en la mayoría de los casos aparece también acompañando a pátinas de yeso (García-Vallés *et al*., 1996; Prudêncio *et al.*, 2000; Moropoulou *et al.*, 2003; Polikreti y Maniatis; 2003; Maravelaky-Kalaitzaky, 2005)

2.3.2 Costras de origen biológico

Las costras negras se han asociado sobre todo con procesos relacionados con la contaminación atmosférica, sin embargo algunos autores han demostrado la existencia de costras y pátinas negras biogénicas (Ortega-Calvo y Saiz-Jimenez, 1997). En ellas pueden aparecen muchos tipos de organismos distintos entre los que destacan bacterias, algas y hongos. Existen algunas pátinas o costras formadas sólo por un grupo de organismos pero normalmente en ellas aparecen varios grupos mezclados formando pátinas muy complejas (Urzi y Realini, 1998).

Las bacterias se han encontrado en muchas de las pátinas negras de monumentos (Gomez-Alarcón *et al.*, 1995a; Descheemaeker y Swings, 1995; Gorbushina *et al.*, 2004). Dentro de las bacterias responsables de la formación de pátinas oscuras se han identificado las siguientes:

Bacterias del ciclo del azufre (*Thiobacillus, Desulfovibrio spp.*…) que son capaces de inducir la neoformación de yeso sobre una roca (Pochon y Jato, 1968; Flores *et al.*, 1996). Estas bacterias utilizan los compuestos reducidos de azufre presentes en la parte superficial de la piedra para oxidarlos y transformarlos en sulfatos, que en presencia de calcio se unen con éste formando sulfato de calcio anhidro, que luego al hidratarse se transforma en yeso.

Bacterias del ciclo del nitrógeno: estas bacterias pueden atacar la roca calcárea utilizándola como fuente de carbono y formar ácido nitroso y ácido nítrico a partir de la oxidación de sales amoniacales; los productos de esta alteración son el nitrato cálcico y el yeso (Winkler, 1975; Mansch y Bock, 1998).

$2CaCO_3+(NH_4)_2+4O_2$----(bacterias nitrificantes)→$Ca(NO_3)_2+CaSO_4+2CO_2+4H_2O$

Las bacterias del ciclo del hierro pueden oxidar el hierro ferroso a hierro férrico que se combina con el oxígeno para formar óxidos de hierro de color rojizo, provocando así una alteración cromática.

Uno de los géneros de bacterias que aparece más frecuentemente en las pátinas es el género Bacillus (Gorbushina *et al*., 2004, Nuhoglu *et al.*, 2006), sin embargo el genero bacteriano predominante depende de la patina y puede variar mucho entre una pátina y otra. Así, McNamara *et al*. (2006) en un estudio sobre los microorganismos que colonizan la superficie de la piedra y los que se encuentran en su interior, realizado en ruinas Mayas, observaron que los principales organismos que aparecen pertenecen al género *Proteobacterias* y *Acidobacteria*, pero el porcentaje varía entre ambos zonas; en el caso de la superficie de la roca las proteobacterias representan casi el 50% del total de especies presentes, sin embargo en el interior de la piedra, disminuye mucho el porcentaje de proteobacterias, y las acidobacterias son los organismos que reperesentan mas del 50% del total. Las proteobacterias se han encontrado también en otros estudios como las principales bacterias que forman parte de los biofilms que se depositan sobre la piedra (Sarró *et al.*, 2006)

Las pátinas oscuras sobre la piedra a veces tienen su origen en la proliferación de algas de consistencia viscosa que favorecen la adherencia de polvo y partículas atmosféricas (Grant, 1982) y la posterior desecación por el sol (Dan *et al.*, 1982). Las algas son a menudo los primeros organismos en colonizar la piedra ya que sólo necesitan para su desarrollo agua, luz y CO_2 que toman de la atmósfera. Suelen ser las responsables de la formación de los biofilms verdosos que recuben parte de los edificios en zonas con alta humedad ambiental. Estas pátinas pueden ser aprovechadas como sustrato orgánico por otros organismos tanto autótrofos como heterótrofos para su implantación (Gomez Alarcón *et al*., 1995b).

Otro papel importante de las algas relacionado con la formación de pátinas, es su capacidad para favorecer la neoformación de minerales. En algunos trabajos se ha demostrado que las algas, debido a los procesos de respiración y fijación de CO_2, favorecen la carbonatación y algunos grupos de algas, especialmente las algas verdes y las cianobacterias, son capaces de neoformar Calcita en mármoles y rocas calcáreas (Urzi *et al.*, 1997; García Valles *et al.*, 2000; Sarró *et al.*, 2006) y oxalatos de calcio (García Valles *et al*., 2000). Además de la neoformación de minerales, las algas contribuyen a la disolución de ciertos minerales a partir de los ácidos orgánicos excretados por sus procesos metabólicos (Sand, 1997).

Las cianobacterias tienen un papel muy importante en la colonización de los edificios y en la formación de pátinas negras. Videla *et al.* (2000) estudiaron pátinas negras desarrolladas en yacimientos arqueológicos Mayas de México y observaron que los principales organismos que colonizaban la piedra eran las cianobacterias junto a las algas clorofitas. Otros estudios sobre pátinas oscuras en ruinas Mayas de la peninsula del Yucatán (México) es el de Ortega-Morales *et al.* (2000) que identificaron las algas y cianobacterias que aparecen en las muestras observando que predominan las cianobacterias (78 % del total).

Además de estos hay otros trabajos en los que se identifican sobre todo cianobacterias como formadoras de pátinas negras de origen biológico (Crispin *et al.*, 2003, 2004; Gaylarde *et al.*, 2007).

Otros de los organismos que se han identificado frecuentemente en las pátinas o costras negras sobre materiales pétreos, son los hongos (Wollenzien *et al.*, 1995; Albertano y Urzí, 1999; Gorbushina *et al.*, 2004). Metabólicamente los hongos son organismos heterótrofos, muchos de ellos saprofitos, que se alimentan de materia orgánica en descomposición. Su presencia en las rocas es posible porque aprovechan el material orgánico existente sobre la superficie pétrea procedente de otros organismos muertos y/o de la deposición de productos orgánicos de combustión o productos de desecho de las actividades industriales que pueden ser utilizados como fuente de carbono (Hirsch *et al.*, 1995; Nuhoglu *et al.*, 2006). Estos organismos desarrollan distintas estrategias para sobrevivir en ambientes extremos, como por ejemplo la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y pigmentos oscuros.

Las EPS son producidas por los microorganismos para protegerse ante la desecación y los biocidas. Muchas de ellas son sustancias mucilaginosas, en la mayoría de los casos polisacáridos, que favorecen la adherencia de partículas y otros contaminantes y/o nutrientes produciendo un color negruzco en la superficie de la piedra (Urzi *et al.*, 1991; Gaylarde, 2002). La función de los pigmentos es la protección de la luz ultravioleta y de otros factores químicos y biológicos (Wheeler y Bell, 1998). Los principales pigmentos producidos son las melaninas; dentro de esta denominación se agrupa un amplio número de macromoléculas de origen biológico con una coloración oscura, generalmente negra, compuestas de varios tipos de monómeros fenólicos o indólicos, habitualmente unidos a proteínas y a veces a carbohidratos. Las melaninas son también producidas por microorganismos animales, protozoos y plantas (Nicolaus *et al.*, 1995)

Los hongos productores de melanina se denominan hongos negros o dematiaceos y su presencia se ha evidenciado en multitud de ambientes y sobre diferentes tipos rocas (Urzi *et al.*, 1992; Gorbushina *et al.*, 1993). Las melaninas fúngicas pueden englobarse en cuatro grupos diferentes: DOPA melanina (dihidroxifenilalanina), GHB melanina (glutaminil-4-hidroxibenceno), catecol melanina y DHN melanina (dihidroxinaftalenomelanina).

Las melaninas son generalmente insolubles en agua y en soluciones ácidas o disolventes orgánicos. Su coloración negra se debe a la absorción en todas las longitudes de onda del espectro visible, pero tienen un máximo de absorción en el rango ultravioleta y esta absorción decrece al aumentar la longitud de onda. Sus funciones principales son las siguientes:

1. Protección contra la radiación: los hongos melanizados son predominantes y poseen una mayor viabilidad en rocas de zonas muy expuestas a la elevada radiación (Urzi *et al.*,1997)
2. Protección contra la lisis enzimática: algunos estudios parecen demostrar que las melaninas protegen a los hongos contra los enzimas que provocan lisis celular (Rehnstrom y Free, 1997)
3. Protección contra las temperaturas extremas (Rosa y Casadevall, 1997)
4. Protección contra la desecación: no hay muchos estudios sobre este particular, pero parece que las cepas con melanina tienen mayor capacidad de retención de agua y mayor resistencia a la desecación (Rehnstrom y Free, 1997)
5. Protección frente a sustancias tóxicas: muchos compuestos químicos como herbicidas, colorantes, alcaloides o medicamentos, tales como anestésicos o antibióticos, se unen a las melaninas que los inactivan (Larson y Tjalve, 1979)

Además de la producción de sustancias orgánicas, los hongos también son capaces de formar costras negras por otros mecanismos, por ejemplo causando la recristalización de minerales. Se ha demostrado que algunos hongos son capaces de inducir el paso de Mn^{+4} a partir de Mn^{+2} dando lugar a coloraciones negruzcas en mármoles (Kumbrein, 1992).

Algunos hongos (*Exidia sp*) durante el crecimiento de sus hifas son capaces de producir substancias que bajan el pH favoreciendo los procesos de disolución de los materiales calcáreos y provocando el deterioro del material y favoreciendo la formación de costras negras (Gaylarde, 2002; Sarró *et al.*, 2006). Sobre rocas silíceas los hongos también son capaces de solubilizar minerales como el feldespato (Gaylarde, 2002)

Otros organimos muy frecuentes sobre los materiales pétreos son los líquenes; aunque no forman las características costras o pátinas negras tienen frecuentemente color oscuro contribuyendo al envejecimiento de la piedra y de hecho se habla muchas veces de pátinas liquénicas. Son organismos muy ubicuos pues el hecho de que sean organismos simbiontes formados por un alga y un hongo los hace resistentes a condiciones extremas. Producen en la roca un biodeterioro notable ya que sus hifas penetran en la roca produciendo su alteración física provocando una desagregación al penetrar entre los granos minerales y una alteración química debido a las sustancias que excretan produciendo efectos como la transformación de la biotita en vermiculita o la neoformación de oxalatos de calcio (Ariño *et al.*, 1995; Ariño y Gómez, 2002; Prieto *et al.*, 1999, 2002; Silva y Prieto, 2004).

2.4 Métodos de estudio de pátinas y costras negras

Las pátinas negras pueden estar formadas por una gran cantidad de compuestos de naturaleza orgánica e inorgánica. Cada pátina puede estar constituida por compuestos de un solo tipo o de ambos tipos a la vez, lo que les confiere una gran complejidad y hace que su estudio haya que abordarlo desde múltiples puntos de vista.

Los métodos de estudio de las pátinas negras se pueden clasificar según el objetivo del estudio. Así se habla de estudios morfológicos cuando lo que se pretende es conocer la estructura, el espesor, el color, etc. de la pátina sin entrar a caracterizar sus componentes, estudios químicos cuando lo que se busca es conocer la composición química, tanto orgánica como inorgánica, de las pátina, estudios mineralógicos en los que se determina si en la pátina aparece algún mineral de neoformación que la diferencie de la roca soporte, y estudios biológicos para determinar si la pátina es de naturaleza biológica y qué organismos la forman.

2.4.1 Caracterización morfológica

El estudio morfológico fue uno de los primeros criterios empleados para caracterizar las pátinas negras. Para el estudio morfológico de las pátinas uno de los métodos más sencillos es su observación al estereomicroscopio (García-Vallés *et al*., 1996 1998; Videla *et al*., 2000) y al microscopio óptico, tanto de luz trasmitida como de luz reflejada (García-Vallés *et al*.,1996 ; Galletti *et al*., 1997; Videla *et al*., 2000; Polikreti y Maniatis, 2003; Rampazzi *et al*, 2004; Malaveraki-Kalaitzaki, 2004, 2005; Carta *et al*., 2005; Sanchez-Moral *et al*., 2005). Ambas técnicas se utilizan como un primer acercamiento al estudio de las pátinas ya que permiten describir rasgos morfológicos importantes, tales

como su espesor, si están formadas por una o varias capas, su grado de adherencia y la penetración en el sustrato rocoso, etc. Además el microscopio permite un estudio inicial de la mineralogía así como de la porosidad y de la textura de la roca sobre la que aparece la pátina.

Otra técnica óptica fundamental en el estudio de pátinas negras es el microscopio electrónico de barrido (MEB). Este microscopio permite una mayor amplificación que el microscopio óptico y por lo tanto con él se pueden observar estructuras que no son visibles con el anterior. Además, este microscopio en la mayoría de los casos se encuentra asociado a una sonda de fluorescencia de rayos-X que permite realizar análisis químico de las estructuras observadas con el microscopio (Schiavon *et al*., 1994; Galletti *et al*., 1997; Polikreti y Maniatis, 2003; Sabbioni *et al*., 2004; Malaveraki-kalaitzaki, 2004, 2005; Potgieter-Vermaak, 2005; Sanchez-Moral *et al*., 2005; Gaylarde *et al*., 2007).

El MEB permite realizar también análisis muy puntuales para poder estudiar la pátina, la roca y la zona de contacto entre ambas, así como observar la presencia de sales que aparecen cristalizadas sobre el sustrato pétreo (Laiz *et al*., 1999; Cardell *et al*., 2002) y de partículas depositadas en la superficie y procedentes de la contaminación ambiental (Sabbioni *et al*., 1995, 2004; Ausset *et al*. 1999).

Las rocas de naturaleza calcárea son uno de los principales materiales utilizados en la construcción de edificios antiguos, por lo que la mayoría de los estudios en el ámbito de la alteración de monumentos se centran en este tipo de material. Los estudios con MEB en iglesias construidas en mármol permitieron a Rampazzi *et al*. (2004) observar la morfología de las pátinas y ver la distribución de los elementos que las forman. Otros estudios sobre pátinas formadas en roca calcárea son los de Alvarez y Fort (2003) que gracias a esta técnica observaron la morfología de la pátina y comprobaron que estaba constituida principalmente

por calcio, fósforo y azufre, lo que indica la presencia en la pátina de fosfato de calcio y yeso.

Schiavon *et al*. (1994) también utilizando el MEB, descubrieron la presencia de yeso sobre rocas graníticas de Galicia y norte de Portugal, que en este caso atribuyeron a la sulfatación de los morteros de juntas. Sanjurjo *et al* (2004) en un estudio sobre patinas negras de la iglesia de las Capuchinas de A Coruña, también de granito, gracias al microscopio electrónico observaron que la patina está formada por yeso que atribuyeron a un antiguo enlucido y no a la contaminación atmosférica.

Hay otras rocas que han sido utilizadas como material arquitectónico y por lo tanto en las que también pueden aparecer pátinas, el MEB es también un instrumento válido e importante, un ejemplo de estas rocas es un estudio realizado por Moropoulou *et al*. (2003) sobre andesitas en el monasterio de San Francisco (Quito, Ecuador) donde empleó el MEB para caracterizar la costra que aparece sobre este edificio, observando que estaba formada por yeso y fosfato cálcico.

Con este microscopio, además de un estudio químico y morfológico se puede realizar un estudio de los organismos presentes en la pátina, pero existe una limitación ya que los organismos al poseer mucha agua en sus tejidos se colapsan con el alto vacio necesario en esta técnica, y para poder observarlos con una mejor resolución es necesario realizar un proceso laborioso de deshidratación y fijación. Esta técnica se empleó por Zanardini *et al*. (2000) para el estudio experimental de mármoles inoculados con organismos y expuestos a los agentes atmosféricos durante seis meses, estudiando posteriormente el deterioro del material, y por Videla *et al*. (2000) en muestras de pátinas tomadas en monumentos Mayas de la península del Yucatán,.

También, De los Rios *et al*. (2004) sobre la fachada del convento de Santa Cruz la Real (Segovia), utilizaron esta técnica para el estudio de los organismos que colonizan la piedra y el deterioro que provocan.

Puesto que una de las características de las pátinas es su coloración oscura, el color es una propiedad empleada por diversos autores para la caracterización morfológica de las pátinas. Maravelaki-Kalaitzaki (2005) en un estudio sobre costras negras y pátinas sobre mármol del Partenón de Atenas, empleó la coloración como criterio para diferenciar entre pátinas y costras ya que observó que, en general, las costras poseen una coloración más oscura que las pátinas. En otros estudios como el de Grossi *et al*. (2003) determinaron el cambio de color en determinados materiales pétreos cuando son puestos en contacto con la atmósfera, viendo que los parámetros cromáticos cambian y las muestras tienden al oscurecimiento siendo el parámetro que determina la luminosidad el que más disminuye. Alvarez y Fort (2003) basándose en medidas de color diferencian en el Palacio Nuevo de Bazan (Madrid) dos tipos de pátina una de color ocre claro y otra de color ocre oscuro.

2.4.2 Caracterización química

Los primeros trabajos sobre pátinas negras se centraron principalmente en el estudio de su composición química, ya que muchas de ellas están formadas por la acumulación de un determinado compuesto sobre la superficie de la roca. Los compuestos químicos que forman las pátinas no son solamente de naturaleza inorgánica, sino que en muchos casos el componente orgánico es muy importante y puede ser incluso el principal. La parte orgánica de las pátinas puede provenir de dos fuentes diferentes, por un lado, de la contaminación, ya que en algunos procesos como la quema de hidrocarburos se emiten a la atmósfera grandes cantidades de compuestos formados principalmente por

carbono, y por otro de la presencia de organismos que colonizan la superficie. El estudio químico de las pátinas debe realizarse teniendo en cuenta lo anterior y los métodos de estudio diferirán si se analizan compuestos orgánicos o inorgánicos.

Existen algunas técnicas que permiten la determinación de compuestos químicos orgánicos e inorgánicos a la vez, tales como la Espectroscopia Infrarroja por trasformada de Fourier (FTIR). Esta técnica se ha utilizado frecuentemente en el estudio de pátinas negras. Así, Galleti *et al.* (1997) la emplearon para el estudio de una costra negra de la Abadía de San Denis (Francia); observaron que esta costra está formada principalmente por yeso y sin embargo no fueron capaces de determinar el componente orgánico ya que este componente aparece en muy baja concentración. Alvarez y Fort (2003) utilizando esta técnica detectaron en pátinas sobre roca calcárea la presencia de silicatos, yeso, oxalatos de Ca y cadenas alifáticas, pero sin embargo también apuntan a que debido a la mezcla de todos estos componentes los espectros son complejos y difíciles de identificar. Estos compuestos junto con otros como el hidroxiapatito fueron detectados utilizando FTIR en pátinas y costras de monumentos de Atenas por Maravelaki-Kalaitzaki (2004, 2005).

Otra técnica espectroscópica muy utilizada para la determinación de compuestos orgánicos e inorgánicos sobre materiales pétreos es la espectroscopía Raman que debe su nombre al físico de origen Indio que descubrió, en 1928, el efecto de dispersión Raman. Dicho efecto, es al igual que en el caso de los infrarrojos, un cambio en la energía vibracional de las moléculas. La espectroscopia Raman es muy utilizada en los estudios de deterioro ya que es una técnica no destructiva y muy sensible. A la hora de analizar pátinas sobre materiales pétreos tiene la ventaja de su alta resolución y su baja penetrabilidad en el material, por lo que sólo analiza la capa más superficial, que corresponde precisamente a la pátina negra. Este tipo de

espectroscopia fue utilizada en el estudio de pátinas negras por Rampazzi *et al.* (2004) y Maravelaki-Kalaitzaki, (2005) entre otros. Potgieter-Vermaak *et al*. (2005) hicieron un estudio sobre limpieza con láser de costras negras en la catedral de Sevilla y utilizaron éste método junto a otros para caracterizar la costra y ver las diferencias entre ésta y la zona limpiada con láser.

Un método útil para estudiar la composición orgánica e inorgánica de la pátina es el análisis elemental de CNHS, ya que todos estos elementos forman parte de los dos tipos de compuestos. Sabbioni *et al* (2004) utilizaron este tipo de análisis para cuantificar el carbono presente en las muestras de costras negras de edificios construidos con roca carbonatada en Italia. Realizaron una especiación del carbono, diferenciándolo en carbono total, carbono no carbonatado y carbono elemental y con estos tres valores calcularon el carbono que forma parte de los carbonatos y el carbono orgánico. Este mismo procedimiento ha sido utilizada por Ghedini *et al.* (2003, 2004) y por Bonazza *et al.* (2004, 2005) para realizar una especiación del C en diferentes monumentos Europeos. En otros estudios como el de Ausset *et al.* (1999) y el de Del Monte *et al*. (2001) además de carbono, se cuantifica nitrógeno e hidrógeno. Jiménez del Haro *et al*. (2004) utilizaron este método para la cuantificación del azufre de una costra negra de la Catedral de Sevilla.

Para el estudio de compuestos químicos de naturaleza inorgánica se emplean sobre todo técnicas espectroscópicas como son: la espectroscopia de absorción/emisión atómica, la espectroscopia de masas con plasma de acoplamiento inducido (ICP/MS) y la fluorescencia de rayos-X.

La espectroscopia de absorción y emisión atómica es hoy día una de las técnicas más utilizadas en el estudio de los elementos metálicos que componen las muestras. Los átomos al ser excitados emiten o absorben la radiación produciendo espectros característicos de cada elemento que permite no solo

identificar el elemento químico a medir sino también cuantificarlo. Para ello las muestras se ionizan por lo que los elementos a medir deben estar en medio líquido y para ello las pátinas deben digerirse con determinados ácidos que solubilicen los elementos que las forman.

Estudios donde se cita este método son el de: Fobe *et al*. (1993) que utilizaron esta técnica para el estudio de los cationes que aparecían en costras de edificios Belgas y el de Maravelaki-Kalaitzaki (2005) en el que estudian la composición química de muestras de costras negras que aparecen en el Partenón (Atenas).

Otro de los métodos de análisis químico cuantitativo es la espectroscopia de masas con plasma de acoplamiento inducido (ICP/ICP-MS). La muestra se introduce nebulizada a través de un plasma de argón obtenido por radiofrecuencia; el plasma pasa su energía a la muestra provocando su atomización e ionización. El conjunto de iones al estar sometidos a una campo eléctrico y magnético se agrupan en haces dependiendo de su masa específica lo que hace que se obtengan grupos de iones que serán desviados dependiendo de su masa. Al calcular esa desviación se puede identificar y cuantificar cada ión. Esta técnica tiene la ventaja con respecto a la anterior que puede medir simultáneamente la mayoría de los elementos; puede medir un mayor número de elementos ya que permite también cuantificar algunos elementos no metálicos como el bromo, el cloro, el yodo y el azufre y además es más sensible y consigue medir concentraciones menores. Sin embargo al igual que la espectroscopía de absorción /emisión atómica es necesario la digestión de la muestra.

En los estudios de pátinas negras esta técnica es una de las más utilizadas actualmente. Sabbioni (1995) utilizó ICP en una muestra del Arco de Trajano (Ancora, Italia) para cuantificar los elementos en la pátina y en la roca y

con ellos calcular un factor de enriquecimiento de la pátina respecto de la roca. García-Valles *et al*. (1998) utilizaron esta técnica para analizar químicamente las pátinas de varios monumentos europeos, destacando sobre todo que en algunas de ellas es el manganeso el que le da el color marrón- anaranjado a las pátinas. Más recientemente, Valls del Barrio *et al*. (2002) en un estudio sobre una pátina roja desarrollada sobre dolomía, utilizaron la técnica de ICP para analizar la concentración de Mg, Ca, Sr, Ti y Fe tanto en el sustrato como en la pátina para ver la diferencia entre ambas, observando que se producía un enriquecimiento en Fe, Sr y Ti en las pátinas con respecto a las rocas. Otro estudio similar a los anteriores es el de Álvarez y Fort (2003) que analizaron en muestras de patina y roca numerosos elementos observando que los que aparecían en mayor cantidad en la pátina respecto de la roca eran Al, Fe, K, Ti y P.

Hay numerosos estudios donde se combinan ambas técnicas; por ejemplo Sanchez-Moral *et al*. (2005) en muestras de las catacumbas de Roma emplean por un lado la espectroscopia de absorción/emisión atómica para cuantificar los elementos mayoritarios de las muestras objeto del estudio (Si, Ti, Al, Mn, Ca, Na, K, P), y por otro ICP-MS para determinar la concentración de los elementos traza (Sr, Ba, Pb, Cr, Co, Ni, Cu, Zn y Mo). También Ausset *et al*. (1999) combinaron las dos técnicas para determinar la composición química de las cenizas volantes que se depositan sobre los edificios de la ciudad de Milán.

Otra técnica analítica común para la determinación de compuestos inorgánicos en muestras de pátinas negras es la fluorescencia de rayos-X, esta presenta la gran ventaja con respecto a las otras dos de trabajar con muestra fresca molida, sin necesidad de realizar su digestión. El fundamento de esta técnica consiste en aprovechar la emisión secundaria o fluorescente de rayos-X que se genera al radiar una muestra con un haz de rayos-X. Esta radiación es característica para cada elemento químico por lo que a partir de su espectro característico se puede identificar un elemento y, conociendo la intensidad de la

radiación, se puede determinar la concentración de dicho elemento. Malaveraki-Kalaitzaki (2004, 2005) la utilizó para determinar qué elementos aparecen en las pátinas y costras de monumentos de Atenas, Moropoulou *et al.* (2003) para caracterizar la roca sobre la que se asientan las pátinas en un estudio sobre deterioro del Monasterio de San Francisco en Quito (Ecuador), y Del Monte *et al*. (2001) para el estudio de costras negras en edificios de la ciudad de Bolonia (Italia). Jiménez del Haro *et al*. (2004) utilizaron fluorescencia de rayos-X combinada con espectroscopia de absorción/emisión atómica para caracterizar químicamente costras negras de la catedral de Sevilla.

Otra técnica que empleada para caracterizar compuestos metálicos en pátinas es la espectroscopia de Mössbauer. Esta técnica estudia la estructura electrónica de los sólidos; en la mayoría de los casos se centra en el estudio de los átomos de Fe. Mediante este método se puede caracterizar el estado de oxidación en que se encuentra el Fe, así como determinar en qué compuestos aparece y estudiar el magnetismo de las muestras. Esta técnica se emplea para estudiar las pátinas negras ya que el hierro es un elemento muy importante en la formación de éstas (Steger y Mehner, 1998; Valls del Barrio *et al*., 2002)

En muchos casos las pátinas y costras negras tienen también un componente soluble, el cual se caracteriza mediante el análisis de los aniones empleando cromatografía iónica (Fobe *et al.*, 1993; Maravelaky-Kalaitzaki, 2004; Jiménez del Haro *et al*., 2004; Bonazza *et al*., 2005).

En el estudio del componente orgánico hay que tener en cuenta que se trata de una fracción muy compleja; para su estudio es necesario en primer lugar separarla del resto de los componentes realizando una extracción con un solvente orgánico. La separación de los diferentes compuestos para su identificación se suele hacer hoy día mediante diferentes técnicas cromatográficas.

Para la caracterización de compuestos orgánicos en pátinas negras se emplea sobre todo la combinación de pirolisis, cromatografía de gases y espectrometría de masas (Py- GC/MS). Saiz-Jimenez *et al*. (1991) recalcan la utilidad de la pirolisis en el estudio del componente orgánico de las alteraciones cromáticas de la piedra, en un estudio sobre los daños causados por la polución atmosférica sobre diversas partes de la Catedral de Sevilla y de la Iglesia de Delft (Países Bajos).

Schiavon *et al*. (1994, 1995) utilizaron esta técnica para la identificación de los compuestos orgánicos que aparecen en pátinas sobre rocas graníticas, lo que les permitió concluir que su origen era sobre todo de contaminación atmosférica. Galletti *et al*. (1997) analizarón por Py- GC/MS las pátinas negras de la Abadía de San Denis en Francia encontrando que la pátina está formada sobre todo por hidrocarburos policíclicos aromáticos.

Otro de los métodos utilizados es la combinación de Termal Hidrólisis-Metilación, en la cual la muestra se piroliza en presencia de hidróxido de tetrametil amonio, con cromatografía de masas y espectrometría de masas (THM/CG/MS). Éste ha sido utilizado por Galletti *et al*. (1997) y Gaviño *et al*. (2004) en el estudio de costras negras de la Abadía de San Denis (París) y por Hermosin *et al*. (2004) para analizar costras negras de monumentos europeos.

Otra variante de éstas técnicas es la que utiliza como extractante CH_2Cl_2, acompañado de una cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-MS). Este procedimiento ha sido utilizado también por Galletti *et al*. (1997) en el estudio de la costra negra de la Abadía de San Denís (Paris).

2.4.3 *Caracterización mineralógica*

La composición mineralógica de la pátina y sus diferencias con la roca aportan información muy importante sobre sus génesis. La principal técnica utilizada para la caracterización mineralógica es la Difracción de Rayos-X (DRX). Permite identificar las fases cristalinas de una muestra. El fundamento teórico se basa en el fenómeno de la difracción de los rayos-X cuando inciden sobre una estructura cristalina, los rayos salen difractados de un modo característico dependiendo del compuesto.

La DRX es muy sencilla y se utiliza en la mayoría de los trabajos que se realizan sobre pátinas negras como complemento a otras técnicas químicas o biológicas (Garcia-Vallés *et al*., 1998; Alvarez y Fort, 2003; Moropoulou *et al*., 2003; Polikreti y Maniatis, 2003; Sabbioni *et al*., 2004; Bonazza *et al*., 2005; Maravelaki-Kalaitzaki, 2004, 2005; Carta *et al*., 2005).

Fobe *et al.* (1993) utilizando DRX junto con otros métodos de tipo químico encuentran la presencia de yeso en pátinas de edificios belgas. También Valls del Barrio *et al*. (2002) utilizan esta técnica junto a otras químicas y biológicas para caracterizar una pátina naranja-rojiza sobre la catedral de Lleida y la roca dolomítica sobre la que se asienta, observando que en la pátina además de dolomita aparece también calcita, weddellita (oxalato cálcico) y cuarzo. En 20 muestras de costras de la fachada de la Catedral de Sevilla, Jiménez del Haro *et al*. (2004) utilizaron DRX para caracterizar mineralógicamete la costra, observando que está constituida por yeso, cuarzo y calcita. También Sanchez-Moral *et al*. (2005) la utilizan para caracterizar semicuantitativamente la mineralogía de los materiales sobre los que se depositaba un biofilm en las catacumbas de Roma. Sarró *et al*. (2006) caracterizan mineralógicamente la piedra y las diferentes alteraciones que tiene la fuente de los leones de la

Alhambra (Granada) mediante DRX, acompañando la determinación por biología molecular de los organismos que colonizan la fuente.

Además de DRX para el análisis mineralógico en algunos trabajos también se emplea ATD (Análisis térmico diferencial) y ATG (análisis térmico gravimétrico) como técnicas complementarias. Ghedini *et al*. (2003) emplearon estos métodos para cuantificar la cantidad de yeso, así como de otros productos procedentes de la degradación de la piedra, que parecen en las pátinas. En otros estudios como el de Bonazza *et al*. (2004,2005) se utilizan asociadas a la difracción de rayos- X, como complemento de la anterior, para cuantificar la cantidad de carbonato y yeso presente en las costras. Otro estudio donde se utilizan tanto ATG como difracción de rayos-X para el estudio de pátinas es el de Potgieter-Vermaak *et al.* (2005) para analizar la mineralogía de la costra y de las zonas limpiadas con el láser. En algunos estudios como el de Valls del Barrio *et al*. (2002) utilizan el ATD para determinar las fases minerales y la materia orgánica presente en muestras de pátina y roca de la catedral de Lleida.

2.4.4 Caracterización biológica

Cuando se trata de caracterizar el componente biológico de las pátinas se debe recurrir a los métodos de identificación disponibles los cuales, han ido evolucionando desde los primeros estudios meramente morfológicos, hasta los actuales métodos basados en la biología molecular.

La identificación de los organismos en las pátinas y costras negras comenzó haciendose de forma morfológica, estudiando las características fenotípicas de los organismos, mediante la observación directa de éstos al microscopio. Se recurría al uso de tinciones ya que la visión directa de los microorganismos al microscopio era muy difícil. Las primeras tinciones utilizadas permitían simplemente dar contraste a las células. En estudios

posteriores comenzaron a utilizarse las tinciones diferenciales que tiñen solamente alguna parte de los organismos; destacando la tinción de Gram (1844) que tiñe la pared bacteriana y permite diferenciar las bacterias en Gram positivas y Gram negativas. Videla *et al*. (2000) utilizaron este tipo de tinciones para caracterizar los organismos presentes en una pátina negra.

La tecnología de los microscopios fue perfeccionándose y haciendose más resolutiva. Así el microscopio de contraste de fase permite ver los organismos sin teñir (Groth *et al*., 1999) y el microscopio de fluorescencia permite observar los organismos que emiten fluorescencia natural o inducida a través del marcaje con un fluorocromo (Valls del Barrio *et al*., 2002).

En la actualidad se siguen utilizando criterios morfológicos para la caracterización de los organismos que colonizan los edificios (Videla *et al*., 2000; Crispin *et al*., 2003, 2004; Nuhoglu *et al*., 2006) Para ello se utilizan manuales como el de Holt *et al*. (1994) que recoge una serie de pruebas que permiten diferenciar entre todas las bacterias cultivables.

En muchos casos la identificación de los organismos no se puede realizar simplemente con la observación directa de la muestra y es necesario aislarlos. Uno de los sistemas de aislamiento más adecuados es el cultivo, que pemite observar su crecimiento en medios que reúnen las condiciones de temperatura, presión de oxígeno, humedad, alcalinidad o acidez idóneas para casa microorganismo (Roszak y Collwell, 1987). Existen medios que denominamos generales, ya que en ellos pueden crecer la mayoría de los organismos, y existen otro tipo de medios de cultivo que se conocen como selectivos, ya que poseen alguna característica que inhibe el crecimiento de la mayoría de los organismos permitiendo solamente que crezca la especie que se quiere estudiar.

La principal ventaja de los cultivos es que se puede estudiar como se comporta la especie aislada ante determinadas condiciones ambientales inducidas. El gran problema de esta técnica es que existen muchas especies de microorganismos que no son cultivables, ya que en la actualidad no se conocen los requerimientos específicos de todas las especies, sin embargo se está avanzando considerablemente en este campo (Sait *et al.*, 2002).

En el campo de estudio del deterioro del patrimonio se emplearon frecuentemente los cultivos combinados con otros métodos para identificar microorganismos. Así por ejemplo Gomez Alarcón *et al*. (1995a, 1995b) en estudios realizados sobre edificios de Alcala de Henares (Madrid) y Carrascosa del Campo (Cuenca) utilizaron cultivos sobre placas de Petri para aislar y cuantificar la cantidad de organismos presentes en las muestras. Albertano y Urzí (1999) utilizaron los cultivos para caracterizar las cianobacterias que aparecen sobre la piedra en las catacumbas de Roma. Laiz *et al* (2000) utilizaron estas técnicas para identificar los organismos presentes en pinturas prehistóricas de dos cuevas de la sierra de Cazorla, encontrando que hay una gran diversidad de especies, predominando las bacterias Gram +, sobre todo los géneros *Bacillus spp* y *Micrococcus spp* debido a la dispersión por el aire de estas bacterias. Ortega-Morales *et al*. (2000) identificaron los organismos fotoautótrofos en ruinas Mayas (Yucatán, Méjico) observando la dominancia de las cianobacterias dentro de toda la población de fotoautótrofas. También Crispin *et al* (2003) utilizando cultivos identificaron las poblaciones fotoautótrofas en edificios de Latino América y Europa.

Las técnicas de cultivo sirven no sólo para la identificación de organismos presentes en las muestra, sino también para caracterizar las diversas sustancias que producen los organismos durante el crecimiento, como son los polisacáridos extracelulares o las melaninas (Diakumaku *et al*., 1995; Gutiérrez

et al., 1995), las cuales tienen especial relevancia en la formación de biofilms y probablemente de costras.

Aunque los cultivos ofrecen muy buenos resultados, gracias al perfeccionamiento de los microscopios se pudo observar que la cantidad de microorganismos presentes en las muestras era mucho mayor que las que aparecían en los cultivos de esas mismas muestras, por lo tanto en la actualidad se han comenzado a utilizar otras técnicas para la detección de los microorganismos, como son los estudios de ácidos grasos (Heyrman *et al*., 1999) o las técnicas de biología molécular (Gonzalez y Saiz-Jimenez, 2004, 2005).

Las pruebas bioquímicas empleadas en la identificación de organismos se fundamentan en la capacidad de algunos microorganismos para fermentar azúcares, en la presencia de determinadas enzimas, en la capacidad de degradar diversos compuestos, en la producción de compuestos coloreados, etc. Incluso bacterias muy relacionadas pueden separarse en dos especies diferentes utilizando estas técnicas. Se utilizan sobre todo en la identificación de bacterias patógenas y es en este campo donde se han hecho mayores avances.

En la actualidad el tiempo empleado en la realización de pruebas bioquímicas para la identificación de microorganismos se ha reducido considerablemente utilizando sistemas miniaturizados, que realizan varias pruebas a la vez. Estos sistemas consisten en placas, con varios compartimentos donde en cada uno de estos se realiza una prueba bioquímica diferente. Las pruebas se clasifican en grupos y cada resultado positivo se le asigna un valor numérico, hasta obtener un código, que al introducirse en una base de datos corresponde con un género bacteriano concreto.

Este tipo de análisis también se han empleado en el campo de la conservación y restauración del patrimonio artístico, para evidenciar la presencia de los diferentes organismos. Hay procedimientos sencillos para identificar qué tipos de organismos componen las pátinas como por ejemplo determinar la cantidad de clorofila, ya que esta es indicativa de la presencia de organismos fotosintéticos (Ortega-Morales *et al*., 2000), u otros pigmentos que son característicos de diferentes grupos de organismos. Así, Gaylarde *et al* (2007) en muestras de costras negras determinaron la cantidad de clorofila y carotenoides para caracterizar los organismos presentes en ellas.

Las técnicas bioquímicas suelen ser complementarias a otras como los cultivos. Así, Zanardini *et al*. (2000) expusieron a la intemperie durante seis meses bloques de mármol para observar cómo afectaba la contaminación atmosférica a los procesos de biodeterioro. Utilizaron técnicas de cultivo para aislar los organismos que crecían sobre los bloques de piedra y para caracterizar los organismos utilizaron técnicas bioquímicas. Laiz *et al*. (1999 y 2003) en el estudio de varias cuevas con pinturas murales en el norte de España también utilizaron cultivos para aislar los organismos y técnicas bioquímicas para identificarlos.

Otro sistema para identificar los organismos que colonizan una superficie es el análisis de ácidos grasos (Müller *et al*., 1998; Heyrman *et al*., 1999; Schutter y Dick, 2000). Los lípidos son componentes de todas las membranas de las células vivas, no obstante la composición lipídica de la membrana citoplasmática de diversos microorganismos varía. Cada microorganismo posee una composición lipídica característica que puede emplearse para definir la estructura de la comunidad.

El análisis de los esteres metílicos de ácidos grasos (FAME "fatty acid metyl ester") es cada vez más frecuente para la detección e identificación de microorganismos. El procedimiento consiste en la esterificación de los lípidos, la inyección, la separación, la identificación y la cuantificación de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases. La identificación se realiza por comparación entre los tiempos de retención de los compuestos de la muestra y patrones de cada lípido purificado por separado.

El sistema de identificación de los ácidos grasos de origen biológico más utilizado es el sistema MIDI, basado en la cromatografía de gases de los esteres metílicos de los ácidos grasos celulares (FAMEs) de cadena corta, concretamente de 9 a 20 átomos de carbono. Tiene una gran resolución pues se han encontrado más de 300 compuestos de este tipo y la información que proporcionan sus correspondientes picos cromatográficos es utilizada cuantitativa y cualitativamente por el sistema para identificar el organismo. Este sistema se ha desarrollado para identificar numerosas cepas de levaduras, bacterias aerobias y anaerobias, incluyendo la micobacterias. Con este material se han construido un total de ocho librerías para la identificación de los organismos.

Aparte de los análisis FAME también se usan el análisis de ácidos grasos unidos a fosfolípidos (PLFA, "phospholipid-linked fatty acid") para caracterizar las comunidades bacterianas. Este análisis proporciona no sólo información sobre la composición y la abundancia relativa de la población en el conjunto de la comunidad, sino que también da información sobre el estado de las poblaciones.

Estas técnicas son muy prometedoras por su rapidez y su bajo coste, pero sin embargo la interpretación de los perfiles FAME de muestras complejas es difícil, ya que muchos ácidos grasos son comunes a microorganismos

diferentes, pero pueden utilizarse para comparar entre sí distintas comunidades bacterianas.

Laiz *et al*. (2003) realizaron el aislamiento de bacterias a diferentes temperaturas en pinturas murales en cuevas del norte de España y observaron que dependiendo de la temperatura, cambia el perfil de ácidos grasos lo que se interpreta como una consecuencia de la adaptación de los organismos a las diferentes temperaturas. Otro estudio sobre pinturas prehistóricas es el de Spades y Russ (2005) que estudiaron la composición lipídica de las comunidades microbianas en cuevas de la región de Texas (U.S.A) utilizando cromatografía de gases.

En la actualidad, la mayoría de los estudios combinan técnicas morfológicas con técnicas bioquímicas. Así, Ortega-Morales *et al*. (2000) en un estudio sobre ruinas Mayas (Yucatán, México) para la identificación de los organismos utilizan tanto los estudios morfológicos y la observación directa al microscopio como estudios bioquímicos analizando la cantidad de clorofila y el perfil de ácidos grasos. Nuhoglu *et al*. (2006) estudiaron la población microbiana de edificios antiguos en Erzurum (Turquia) utilizando para el aislamiento de los organismos presentes en las muestras cultivos selectivos y para la identificación la observación al microscopio de los organismos teñidos, tests bioquímicos en el caso de los hongos y técnicas de identificación de ácidos grasos en el caso de las bacterias.

A finales del siglo XX se comenzaron a utilizar técnicas de biología molecular para detectar las especies microbianas no cultivables (Wintzingerode *et al*.., 1997; González y Saiz-Jiménez, 2004, 2005). La utilización de estas técnicas puso de manifiesto una mayor diversidad de organismos. Así, Woese *et al*. (1987) utilizando técnicas morfológicas y bioquímicas reconocieron la existencia de once divisiones en el reino bacteria, posteriormente estas

divisiones pasaron a 12 al separar las bacterias Gram + en Firmicutes (bajo contenido G-C) y Actinobacteria (alto contenido G-C). Una década después Hugenholtz *et al*. (1988) utilizando técnicas moleculares incrementaron el número de divisiones hasta 36, de las cuales 12 no tenían ningún representante que se hubiera cultivado hasta ese momento. En una reciente revisión Rappé y Giovannoni (2003) recogen la existencia de 52 divisiones de las cuales 25 no tienen ningún representante cultivado. En los últimos años se está avanzando en el cultivo de especies de bacterias que hasta ahora solo eran conocidas por su secuencia de ADN, esto es posible gracias al desarrollo de medios de cultivo específicos, introduciendo en los medios de cultivo tradicionales pequeñas modificaciones. Los grupos en los cuales no hay ningún representante cultivado se conocen como divisiones *candidata*; algunos autores como Rappé y Giovannoni (2003) apuntan a la posibilidad de que estas divisiones *candidata* fuesen el resultado de errores durante el proceso de identificación (en la amplificación por PCR), sin embargo las divisiones propuestas han sido confirmadas por diversos estudios provenientes de autores independientes.

Así, es evidente que las técnicas de cultivo son insuficientes para reflejar la gran diversidad microbiana existente en los ambientes naturales, por lo que se hace necesario el empleo de las técnicas moleculares para alcanzar un nivel mayor de comprensión de las comunidades microbianas.

La mayoría de las técnicas moleculares para la detección de microorganismos, se basan en genes del ADN que codifican para el ARN ribosómico. El ARN ribosómico forma parte de los ribosomas junto con unas serie de proteínas y es el encargado de la traducción de los ARN mensajeros en proteínas; es un ARN muy conservado, aunque existen pequeñas diferencias entre los organismos. Cada célula contiene entre 1 y 10 copias de ADN ribosómico en el genoma, dependiendo de la especie; para poder realizar un estudio del mismo es necesario incrementar el número de copias y esto se

consigue gracias a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR "Polymerase Chain Reaction"). Para la caracterización de las distintas poblaciones se utiliza una técnica conocida como DGGE ("Denaturing Gradient Gel Electrophoresis") que se basa en la visualización de las diferentes secuencias correspondientes a las distintas especies microbianas. Para ello se realiza una electroforesis en gradiente desnaturalizante. La migración diferencial de los fragmentos del ADN permite distinguir los distintos microorganismos en las muestras y por lo tanto observar la diversidad microbiana de la población.

Para amplificar el ADN utilizando PCR, se utilizaron en un primer momento como enzimas encargadas de la amplificación fragmentos *Klenow* de *E. coli* (Oeste, 1988) o fragmentos de Polimerasa de T_4 (Cariello *et al*., 1988) sin embargo este proceso era muy poco efectivo ya que había que añadir polimerasa después de cada ciclo, porque estas enzimas eran sensibles a las altas temperaturas que se empleaban para la desnaturalización del ADN. Esto se solucionó con el empleo de polimerasas termo resistentes, capaces de permanecer activas tras numerosos ciclos de desnaturalización del ADN. Las polimerasas de ADN termo resistentes permanecen activas a altas temperaturas, incluso tras los 95 ºC empleados para desnaturalizar el ADN y presentan máxima actividad entorno a los 72ºC. Gracias a esta técnica es posible aumentar el número de copias de una secuencia específica de ADN, facilitando su estudio.

La PCR, es un paso crítico en los estudios moleculares, pero no está exenta de problemas innatos a la técnica. En la propia PCR se introducen errores debido a las amplificaciones preferenciales de secuencias, debido a su mayor afinidad por los cebadores utilizados. Speksnijder *et al*. (2001) confirmaron que se puede cambiar la secuencia hasta en un 2% de los casos. Este error se ha disminuido con el empleo de polimerasas termoestables con capacidad correctora, por ejemplo la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (polimerasa Taq) comete un error cada once mil bases incorporadas (Cariello *et al*., 1988) y

la polimerasa de *Pyrococcus furiosus* un error cada 625.000 bases incorporadas (Lundberg *et al*., 1991), aunque esta polimerasa es menos eficiente en la amplificación.

Los cebadores específicos de dominio han de tener una eficiencia en la hibridación uniforme, para garantizar la amplificación de todos los ADN ribosómicos 16S encontrados en una muestra. Si se produce una amplificación incompleta y su recombinación y posterior amplificación se pueden generar quimeras. Al aumentar el número de ciclos de amplificación se aumenta la posibilidad de generar estas quimeras. La incidencia de estas quimeras según Wintzingerode *et al*. (1997) sería de entre un 5,4% y un 8,6% y este porcentaje disminuiría en varios ordenes de magnitud si se aumenta el tiempo de elongación durante la PCR.

Para la visualización de las secuencias de ADN una de las técnicas más sencillas es la electroforesis en gel de agarosa, pero esta técnica sólo permite observar si se ha producido o no amplificación, ya que separa los fragmentos por tamaños. Sin embargo no es válida para separar diferentes secuencias ya que después de la amplificación todas las secuencias tienen la misma longitud. No obstante, es útil para comprobar si hay producto durante la amplificación del ADN.

Para el estudio de las comunidades microbianas hacen falta técnicas más complejas, en las que se visualice un perfil de comunidades o "*fingerprinting*"; existen diversas técnicas, una de las más usadas es la DGGE (electroforesis en gel en gradiente desnaturalizante), pero también hay otras técnicas entre las que destacan, la TGGE (Electroforesis en gel en gradiente de temperatura), SSCP (polimorfismo de configuración de hebra simple) y RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos terminales de restricción).

La DGGE es una de las técnicas más eficaces para identificar las diversas bacterias que forman las comunidades microbianas. Esta técnica consiste en una electroforesis en gradiente desnaturalizante (DGGE "Denaturing Gradient Gel Electrophoresis") que fue desarrollada por Fisher y Lerman (1979) para separar los fragmentos de ADN del fago λ y de *E. coli* ; en ese estudio ya se apuntaba su utilización para estudios de mapeo de fragmentos de ADN bacteriano.

La separación está basada en una reducción de la movilidad electroforética de las moléculas de ADN de doble cadena al desnaturalizarse parcialmente en un gel de poliacrilamida, que contiene un gradiente lineal de agentes desnaturalizantes. Utilizando esta técnica se pueden separar fragmentos de ADN de la misma longitud pero distinta secuencia de bases, con unas diferencias mínimas, de hasta un único nucleótido (Muyzer y Smalla 1998).

Las moléculas de ADN a medida que avanzan en el gel van encontrando una mayor concentración de agentes desnaturalizantes. La desnaturalización se produce en unos fragmentos conocidos como dominios de desnaturalización; cuando el dominio con el punto de desnaturalización más bajo alcanza una concentración de desnaturalización determinada, se produce un cambio en la conformación del ADN, pasando de conformación helicoidal a una conformación parcialmente abierta. Cuando el fragmento de ADN adquiere esta conformación abierta su velocidad de migración disminuye hasta prácticamente detenerse, con las dos hebras abiertas unidas por una cola rica en G+C. La cola rica en G+C proporciona una mayor estabilidad a los fragmentos de ADN durante la migración en el gradiente desnaturalizante. Esta cola se obtiene con el uso de cebadores específicos con una cola G+C durante la amplificación. De este modo las moléculas con secuencias diferentes se detendrán en distintos puntos del gel y se puede así diferenciar unas secuencias de otras por la distancia recorrida.

La desnaturalización de los dominios de desnaturalización de los fragmentos de ADN durante la DGGE depende de la secuencia de bases, ya que la estabilidad de las uniones entre las bases depende no sólo del tipo de bases que sean (el par CG es más estable que el par AT ya que en primero está unido por tres puentes de hidrógeno y el segundo sólo por dos), sino también de la secuencia en la que esté inmersa. Gotoh y Tagashira (1981) demostraron que la estabilidad intrínseca de cada par de bases está influenciada por sus vecinas.

Esta técnica fue utilizada por primera vez para el estudio de diversidad en comunidades microbianas por Muyzer *et al*. (1993), combinando la amplificación de secuencias especificas de ADN genómico por PCR con la DGGE para diferenciar secuencias del gen del ARN ribosómico 16S de diversas especies.

Presenta ventajas, pero también desventajas con respecto a otras técnicas. Así, una de las principales ventajas de la DGGE es la posibilidad de identificar los organismos presentes, mediante el corte y secuenciación de las bandas que aparecen después de la electroforesis, por técnicas de hibridación con sondas específicas, o bien con técnicas de clonación etc. Otra de las ventajas es la posibilidad de obtener información sobre mutaciones puntuales, ya que el cambio en un solo nucleótido puede se detectado por esta técnica (Myers *et al*. 1985)

La principal desventaja de esta técnica es que distintas secuencias pueden migrar hasta el mismo punto (Vallaeys *et al*., 1997), esto sobre todo es importante cuando se recortan bandas para su secuenciación ya que pueden recogerse bandas situadas muy próximas entre sí. Otra desventaja es que aunque es capaz de identificar mutaciones en una secuencia no da información de a qué nivel se encuentra la mutación (Cariello *et al*., 1988), aunque esta información puede obtenerse con la secuenciación de los fragmentos de ADN.

El empleo de esta técnica para el estudio de poblaciones naturales ha ido en aumento, siendo en la actualidad una de las más utilizadas. Se ha utilizado para caracterizar poblaciones de diferentes organismos, por ejemplo Nübel *et al*. (1997) son los primeros en emplear esta técnica para el estudio de poblaciones de cianobacterias, diseñando cebadores específicos para estos organismos. Los primeros en utilizar esta técnica en organismos eucariotas fueron Kowachuk *et al*. (1997a) en un estudio en infecciones fúngicas por *Ammophia arenaria*. Otro trabajo pionero utilizando esta técnica fue el de Ovreas *et al*. (1997) ya que estos autores fueron los primeros en estudiar la población de Arqueas mediante DGGE. Otros estudios en los que se utiliza esta técnica para caracterizar poblaciones o cambios espacio-temporales de las poblaciones son los realizados por Teske *et al*. (1996), Santegoeds *et al*. (1996) y Kowachuk *et al*. (1997b).

Una vez visualizados los distintos componentes de la población se procede a la identificación de los fragmentos de ADN para conocer qué organismos forman parte de la población. Para ello existen principalmente dos métodos cuyo uso está muy extendido: la creación de genotecas o clones de ADN y la escisión/reamplificación de bandas electroforéticas.

La escisión reamplificación es una técnica fácil y barata, pero simplemente permite el estudio de las poblaciones mayoritarias ya que las poblaciones minoritarias darían bandas tenues y difíciles de cortar y aislar y por lo tanto no se podrían caracterizar fácilmente. Otra de las desventajas de esta técnica es la posibilidad de que dos secuencias migren de forma muy parecida quedando muy juntas y por lo tanto que se confundan las bandas. Sin embargo esta técnica permite un estudio de los principales organismos componentes de la población y es frecuentemente utilizada.

Los clones o genotecas de ADN permiten un estudio de toda la población, tanto de los organismos mayoritarios como de los minoritarios ya que todas las secuencias de ADN tienen la misma probabilidad dentro del vector y por lo tanto de ser clonadas, por lo que incluso una secuencia que está en muy baja proporción podría llegar a ser detectada con un proceso adecuado de selección. Su principal inconveniente es el elevado coste. Otro de los inconvenientes de la clonación (con respecto de las bandas cortadas) es el gran número de clones con los que hay que trabajar.

En el campo del deterioro del patrimonio, las técnicas moleculares son muy utilizadas en la actualidad para la identificación de los organismos que lo causan, debido a que los métodos clásicos basados en el cultivo han proporcionado información importante pero limitada ya que la cantidad de muestra necesaria es mucho menor (Schabereiter-Gunter *et al*., 2001; González y Sainz-Jiménez, 2004, 2005). Gracias a estas técnicas se ha visto que la diversidad de organismos que colonizan los diferentes materiales es muy grande, a diferencia de lo que se veía con técnicas de cultivo. Así Piñar *et al*. (2002) en un estudio sobre pinturas murales de tres monumentos europeos (dos iglesias y una necrópolis romana), combinaron técnicas moleculares con técnicas de cultivo tradicional y observaron que mediante cultivos aparecía una dominancia de especies de los generos *Bacillus, Paenibacillus*, *Micrococus*, *Staphylococcus* y *Kocuria*, sin embargo con técnicas moleculares se obtuvieron resultados diferentes ya que en ese caso la diversidad bacteriana era mucho mayor permitiendo detectar grupos de bacterias que no habían podido ser cultivadas.

Schabereiter-Gunter *et al*. (2002a, 2002b), emplearon estas técnicas para identificar los organismos presentes en las pinturas rupestres de las cuevas prehistóricas de Tito Bustillo, la Garma y Altamira en el Norte de España, en esta última, la más estudiada, Schabereiter-Gurtner *et al*. (2002b) encontraron que las bacterias dominantes son las Proteobacterias, que representan un 50%

del total, y las Acidobacteria que representan casi el 25% de las secuencias. Gurtner *et al*. (2000) utilizaron estas técnicas en estudios sobre diversidad bacteriana en pinturas murales de una capilla del castillo de Herberstein (Austria) y de la iglesia ade St. Martín (Alemania); compararon los resultados obtenidos con técnicas moleculares y con técnicas de cultivo, llegando a la conclusión que ambas son complementarias a la hora de identificar toda la población. Crispin *et al*. (2004) utilizaron estas técnicas para identificar cianobacterias en cinco iglesias de Brasil y McNamara *et al*. (2006) utilizaron técnicas moleculares para identificar los organismos que colonizaban el interior y el exterior de la piedra de una necrópolis Maya en Yucatán (México).

Palla *et al*. (2002) han utilizado estas técnicas para la identificación de *Nocardia restricta* en 173 muestras de roca calcárea degradada, obteniendo que en un 30 % del total de las muestras aparece esta bacteria y que además en las muestras aparecen muchas otras bacterias relacionadas con la contaminación y los depósitos que se acumulan en la piedra. Sanchez-Moral *et al* (2005) estudiaron el deterioro producido en las Catacumbas de Roma debido a la presión de visitantes. Y emplearon estas técnicas para identificar los organismos que aparecen en los biofilms.

Sarró *et al*. (2006) hicieron un estudio sobre la colonización biológica de la fuente de los leones del palacio de la Alhambra de Granada, para ello analizaron muestras de biofilms, de agua de la fuente y de otros productos como los resultantes de la corrosión o los morteros. Para la identificación utilizaron técnicas de biología molecular y también técnicas de cultivos y técnicas morfológicas de observación directa con el microscopio de fluorescencia.

Aparte de estudios sobre piedra y pinturas murales también se han utilizado técnicas moleculares para la identificación de los organismos que causan deterioro sobre otros materiales como el papel (Michaelsen *et al*., 2006),

el vidrio (Drewello *et al*., 2000; Müller *et al*., 2001; Carmona *et al*., 2006) o incluso algunos materiales de más reciente incorporación al patrimonio como son las películas fotográficas o de video (Abrusci *et al*., 2005).

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Toma de muestras

Para denominar las alteraciones cromáticas objeto de este estudio, a lo largo de esta memoria se utiliza el término pátina, por ser el más general y el que se emplea cuando no se conoce exactamente su origen.

Para poder comparar los procesos que dan lugar al oscurecimiento de los granitos en diferentes ambientes, se tomaron muestras de pátinas oscuras existentes en afloramientos graníticos naturales y de pátinas formadas sobre monumentos construidos con las mismas rocas. En todos los casos se tomaron también muestras superficiales de la misma roca en una zona lo más cercana posible a la pátina donde la roca estaba más o menos limpia, o al menos no poseía pátina.

Se recogieron nueve muestras de pátinas en afloramientos situados en seis lugares diferentes, uno perteneciente a la provincia de Pontevedra y el resto a la provincia de A Coruña (Figura 1):

- Tres de estas muestras se tomaron en un afloramiento granítico situado cerca del dolmen de Axeitos, concello de Ribeira (A Coruña); se decidió recoger tres muestras porque aún siendo todas oscuras y muy próximas entre sí presentaban tonalidades claramente distintas: gris, rojiza y negra. Como referencia válida para las tres se tomó roca sin pátina en el mismo afloramiento.
- En el Monte Pedroso, a pocos kilómetros al oeste de la ciudad de Santiago, se muestrearon dos bolos graníticos situados muy cerca de la cima. En cada uno de ellos se tomó una muestra de pátina y otra de roca limpia.

- En la cantera de Lamas de Abade, situada en las afueras de Santiago (a 1,5 km) en una zona urbana, se recogió sobre un gran bloque de piedra otra muestra de pátina y la correspondiente muestra de roca sin pátina.
- Otras muestras de patina y de roca sin pátina fueron tomadas en el Monasterio de San Xusto de Toxosoutos, perteneciente al concello de Lousame (A Coruña). En este caso las muestras se recogieron en los afloramientos graníticos que constituyen la cimentación de la iglesia
- En una roca muy cercana al faro de Corrubedo en el concello de Ribeira (A Coruña) se recogió otra muestra de pátina y de roca limpia.
- Por ultimo, una muestra de pátina y otra de la roca correspondiente, fueron recogidas en Paredes, Campo Lameiro (Pontevedra), en un afloramiento situado al lado del petroglifo conocido como Outeiro dos Cogoludos.

En cuanto a las muestras de monumentos, se recogieron doce en total, tres en el interior de tres dólmenes y nueve en edificios de cuatro lugares diferentes (Figura 1):

- Las muestras de los dólmenes fueron tomadas en el interior de los dólmenes de: Axeitos, Parxubeira y Cabaleiros. El dolmen de Axeitos está situado cerca del afloramiento del mismo nombre, la pátina se tomó en uno de los ortostatos que forman la cámara y en el mismo ortostato se recogió una pequeña lasca de roca limpia. Anta de Parxubeira está situado en el lugar de Eirón del ayuntamiento de Mazaricos, la muestra de pátina fue tomada en la parte interna de la losa de cubierta de la cámara; en una zona próxima al dólmen y sobre el mismo tipo de roca se tomo un trozo de roca limpia. El dolmen de Cabaleiros está situado en el lugar de Cabaleiros en el ayuntamiento de Tordoia, la muestra de pátina se tomó también en la losa de cubierta y en una zona próxima del interior del dolmen se tomó un trozo de roca limpia.

- Otras cinco muestras fueron recogidas en la ciudad de Santiago de Compostela, en edificios de interés histórico-artístico como son el Monasterio de San Martín Pinario, el colegio San Francisco Javier, la Facultad de Historia, el Palacio de Fonseca y la fachada de la casa situada en el nº 2 de la plaza del Toural. En todos los casos se tomaron también muestras sin pátina, cuando fue posible en el mismo sillar y cuando no en un sillar cercano a las pátinas y de una roca de características similares.
- Dos muestras fueron tomadas en monumentos de la ciudad de A Coruña. Una de ellas en el muro norte de la plaza de María Pita y la otra en la iglesia de San Jorge. Igualmente se tomaron muestras de pátina y de roca sin pátina de una zona cercana.
- En el convento del Carmen de Padrón (A Coruña) se tomaron del mismo modo una muestra de pátina y otra de roca sin pátina.
- En la Fachada principal de la catedral de Lugo se tomo una muestra de pátina y otra de roca sin pátina.

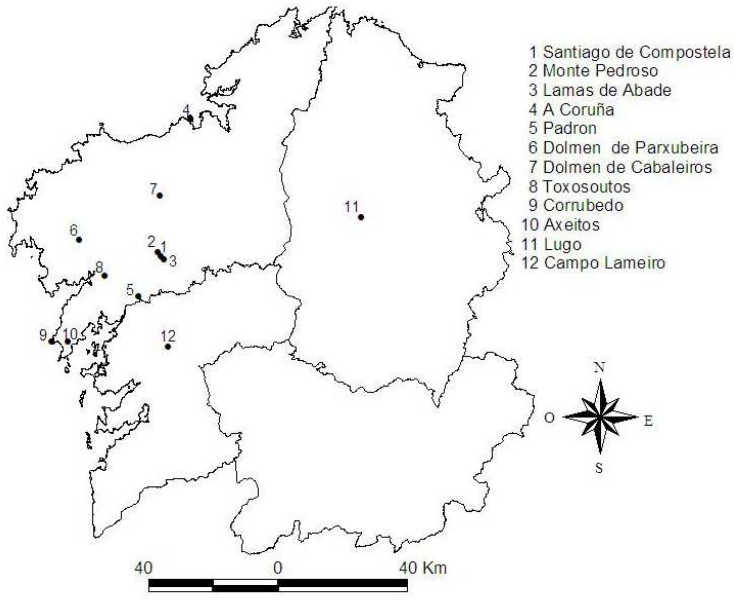


Figura 1: Lugares de toma de muestras

En los afloramientos naturales se extrajeron fragmentos de piedra utilizando cincel y martillo y en el laboratorio se procedió a separar con el máximo cuidado las pátinas de la roca subyacente; en el caso de rocas sin pátina también se seleccionó para los análisis la zona más superficial.

En los monumentos para evitar causar un daño excesivo a los edificios se seleccionaron siempre pátinas existentes sobre placas o escamas, esto es, capas de piedra que ya estaban algo separadas de la masa de los sillares. Estas capas se recogieron con facilidad con ayuda de una espátula o un bisturí.

Para los análisis de biología molecular las muestras fueron tomadas también en forma de placas o escamas con la ayuda de un bisturí estéril e introducidas en placas de Petri separadas para evitar posibles contaminaciones entre las muestras.

En la tabla 1 se presentan la nomenclatura de las muestras y su localización en coordenadas UTM.

Tabla 1: Nomenclatura de las muestras analizadas

Muestra	Descripción	Coordenadas UTM
AXR	Roca del afloramiento de Axeitos (Ribeira)	X:498625, Y:4716575
AXRP	Pátina roja de Axeitos (Ribeira)	
AXGP	Pátina gris de Axeitos (Ribeira)	
AXNP	Pátina negra de Axeitos (Ribeira)	
CBR	Roca del afloramiento de Corrubedo	X:492675, Y:4713095
CBP	Pátina sobre el afloramiento de Corrubedo	
CLR	Roca del afloramiento de Campo Lameiro	X:538875, Y:4710675
CLR	Pátina sobre el afloramiento anterior	
LAR	Roca del afloramiento de Lamas de Abade (Santiago)	X:538075, Y:4746175
LAP	Pátina sobre el afloramiento anterior	
P1R	Roca del afloramiento 1 del monte Pedroso (Santiago)	X:535625, Y:4749825
P1P	Pátina sobre el afloramiento anterior	
P2R	Roca del afloramiento 2 del monte Pedroso (Santiago).	X:535625, Y:4749825
P2P	Pátina sobre el afloramiento anterior	
TXR	Roca del afloramiento de Toxosoutos	X:515000, Y:4740200
TXP	Pátina sobre el afloramiento anterior	
AXDP	Pátina del dolmen de Axeitos (Ribeira)	X:498775, Y:4716575
PXR	Roca del dolmen de Parxubeira (Mazaricos)	X:505292, Y:4754379
PXP	Pátina del dolmen de Parxubeira (Mazaricos)	
CAR	Roca del dolmen de Cabaleiros (Tordoia)	X:536696, Y:4771881
CAP	Pátina del dolmen de Cabaleiros (Tordoia)	
FJR	Roca del colegio San Francisco Javier (Santiago)	X:537400, Y:4747500
FJP	Pátina del colegio San Francisco Javier (Santiago)	
FR	Roca del palacio de Fonseca (Santiago)	X:537325, Y:4748000
FP	Pátina del palacio de Fonseca (Santiago)	

Tabla 1: Continuación

Muestra	Descripción	Coordenadas UTM
HR	Roca de la facultad de Historia (Santiago)	X:537475, Y:4747850
HP	Pátina de la facultad de Historia (Santiago)	
SMR	Roca del Monasterio de San Martín Pinario (Santiago)	X:537325, Y:4748000
SMP	Pátina del Monasterio de San Martín Pinario (Santiago)	
TR	Roca del la fachada de la casa del Toural (Santiago)	X:537425, Y:4747525
TP	Pátina del la fachada anterior (Santiago)	
JR	Roca de la iglesia de San Jorge (A Coruña)	X:549175, Y:4802450
JP	Pátina de la iglesia de San Jorge (A Coruña)	
MPR	Roca del muro de la plaza de María Pita (A Coruña)	X:549125, Y:4802675
MPP	Pátina del muro de la plaza de María Pita (A Coruña)	
LUR	Roca de la Catedral de Lugo	X:617600, Y:4763050
LUP	Pátina de la Catedral de Lugo	
PAR	Roca del convento del Carmen de Padrón	X:527625, Y:4732100
PAP	Pátina del convento del Carmen de Padrón	

3.2. Caracterización morfológica de las muestras

3.2.1. Descripción con estereomicroscopio

Todas las muestras fueron observadas en primer lugar con una lupa binocular que permite una amplificación de 60X, y que tiene acoplada una cámara de fotos digital, con el objeto de estudiar sus características macroscópicas.

3.2.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las muestras fueron estudiadas con un microscopio electrónico de Barrido (LEO-435VP) que permite una amplificación de hasta 290.000 aumentos y 6 nm de resolución, y analizadas químicamente utilizando una microsonda de fluorescencia de rayos- X acoplada al MEB (EDX) que permite el análisis de los elementos químicos a partir del Berilio.

Cada una de las muestras se preparó de dos maneras diferentes. Por un lado se tomaron fragmentos de 1- 5 cm^2 secos al aire para observar la superficie y por otro se prepararon en forma de probeta pulida para estudiar secciones perpendiculares a la superficie.

Para la realización de las probetas pulidas las muestras de roca con pátina se incluyeron en resina de poliéster utilizando las siguientes proporciones:

- 100 ml de resina de Poliester.
- 50 ml de estireno utilizado como disolvente.
- 0,025 % de catalizador (peróxido de metil-etil-cetona)

Las probetas se cortaron utilizando una cortadora BUEHLER Isomet 1000 realizando secciones perpendiculares a la superficie.

El MEB utiliza como fuente de energía un haz de electrones que al chocar con la muestra provocan una emisión secundaria de radiación, que es recogida por un detector. Dependiendo de los electrones recogidos en el detector se obtiene diferente información; así, si el detector recoge los electrones secundarios, que son muy poco energéticos y muy resolutivos, se obtiene información sobre la topografía y morfología de la pátina. Sin embargo, si lo que el detector recoge son los electrones retrodispersados, se pierde el estudio de la profundidad pero permite diferenciar entre componentes de la muestra, ya que diferencia los elementos por su peso atómico, dando información sobre las capas que forman la pátina y los componentes de cada una de ellas. Así, las muestras secas al aire se analizaron en el modo de electrones secundarios y las muestras preparadas en forma de probeta pulida se analizaron en el modo de electrones retrodispersados.

3.2.2.1. Estudio morfológico

El estudio morfológico utilizando el microscopio electrónico se realizó tanto sobre las muestras secas al aire como sobre las probetas pulidas.

Las muestras sin impregnar permiten analizar la superficie de la pátina, dando información de su relieve y permitiendo observar la morfología microscópica de ésta así como observar algunas estructuras de interés que la forman o aparecen sobre ella.

Con las probetas se pierde la perspectiva del relieve pero se pueden diferenciar capas dentro de la pátina, permitiendo también un estudio del grosor

de ésta y de sus relaciones con la roca, ya que podemos analizar el límite entre ellas.

3.2.2.2. Estudio químico

Mediante la microsonda de fluorescencia de rayos-X asociada al MEB se realizó un análisis químico de los elementos que conforman la patina. Para ello, las muestras secas al aire utilizadas en el estudio morfológico, se analizaron por ambos lados, es decir, la superficie y el reverso de las muestras. Para conocer la composición global se analizaron dos campos de $2mm^2$ sobre la superficie y la parte interior. También se analizaron químicamente todas las estructuras o rasgos representativos que aparecen sobre la pátina.

Sobre las secciones pulidas perpendiculares a las pátinas se realizó un *"maping"* o estudio de distribución de los elementos químicos que forman la pátina y de los que pertenecen a la roca.

Existe una limitación con las pátinas formadas principalmente por carbono, ya que al utilizar una resina orgánica es muy difícil diferenciar el carbono que corresponde a la resina del que corresponde a la pátina.

3.2.3. Medida del color

En este trabajo el color se midió mediante técnicas cuantitativas utilizando un colorímetro para sólidos Minolta CR-310. El color se expresa como resultante de la suma de los tres colores principales (rojo, verde y azul) y por su luminosidad (que va del negro al blanco). En este estudio se trabajó con el espacio de color L* a* b* (también referenciado como CIELAB) que es uno de los más conocidos y utilizados (figura 2), en donde:

- L* mide la claridad y toma valores de entre 0 (negro) y +100 (blanco)
- a* y b* pueden considerarse como los dos ejes cromáticos principales, ortogonales entre sí, variando a* entre -60 (verde) y + 60 (rojo), y b* entre -60 (azul) y +60 (amarillo)

Puesto que el color de las pátinas y de la roca no es homogéneo en toda su extensión, fue necesario calcular previamente el número mínimo de medidas a realizar para que su valor medio fuera representativo. En ambos casos (rocas y pátinas) se encontró que con 20 medidas era suficiente.

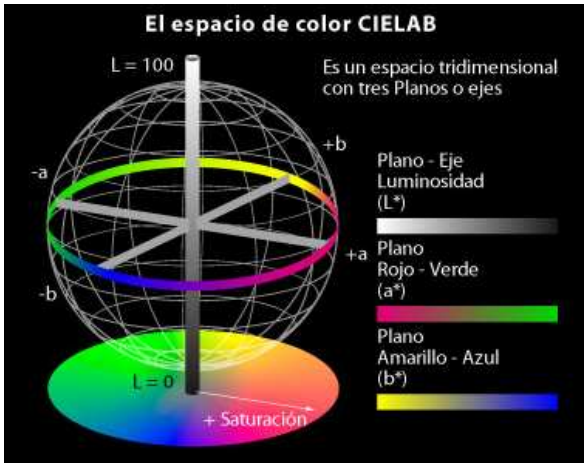


Figura 2: Representación en un eje tridimensional de las variables que definen el color en el espacio de color L*a*b*.

3.3. Caracterización mineralógica de las muestras

3.3.1. Difracción de rayos-X (DRX)

El análisis mineralógico de las pátinas y rocas sin pátina fue realizado por difracción de rayos X empleando un difractómetro Philips PW1710 con

goniómetro vertical PW1820/00 de geometría Bragg-Brentano θ/2θ, con un generador de tubo cerámico de 2.2 Kw, ánodo de cobre tipo PW 2773/00, detector proporcional PW1711/10 y monocromador de grafito PW1752/00.

Las muestras fueron preparadas por molienda y tamizado (hasta un tamaño menor de 50 μm) y analizadas por el método del polvo cristalino; el tiempo de medida fue de 2 segundos por paso, suficiente para obtener una buena relación intensidad/ruido en este tipo de muestras.

Para la identificación de los compuestos minerales se utilizó un programa informático asociado a una base de datos (DIFRACplus de Bruker).

3.4. Caracterización química de las muestras

3.4.1. Análisis elemental (CHNS)

La cantidad de nitrógeno, hidrógeno, azufre y carbono totales presentes en las pátinas y en las rocas sin pátina de una zona adyacente se determinó utilizando un analizador LECO CHNS-932. La muestra fue molida y tamizada hasta un tamaño menor de 50μm.

En este analizador la muestra se piroliza a 1000ºC y los gases resultantes son reconducidos por una corriente de He hacia los detectores donde se mide el porcentaje de carbono, hidrógeno y azufre mediante una celda de infrarrojos y el porcentaje de nitrógeno mediante conductividad térmica.

3.4.2. Fluorescencia de rayos-X (FRX)

La determinación de la composición química total de las muestras (elementos mayoritarios, minoritarios y elementos traza) se realizó mediante Fluorescencia de rayos–X. Se utilizaron dos equipos diferentes dependiendo de si lo que se iba a medir eran elementos ligeros (Mg, Al, Si, P, S y Cl) o elementos traza (con un peso molecular entre el K y el U). Los elementos traza (K-U) se midieron con un Espectrómetro de manufactura *USC-Dr. Andrij Cheburkin*, con tubo emisor de Rayos X de 2,2 kw, con ánodo de molibdeno y un detector semiconductor refrigerado con nitrógeno líquido. El equipo utilizado para la medida de elementos ligeros (Mg, Al, Si, P, S y Cl) es similar al anterior, y se diferencia en que posee un tubo de Ag con un ánodo secundario de pirografito. También posee una bomba de vacío para eliminar el aire de la cámara de medida (que podría interferir con la señal de las muestras) y un carrusel para análisis automático de 20 muestras.

Ambos equipos fueron calibrados para una matriz inorgánica (Si-Al-O) con patrones y estándares internacionales (NIST: *National Institute of Standars and Technology*).

Para la preparación de las muestras se realizó una molienda hasta su homogenización. Mediante esta técnica se analizaron todos los elementos químicos que aparecen en las muestras que tengan un peso atómico mayor que el del Mg. Los resultados se expresaron como porcentaje de su correspondiente óxido en el caso de los elementos que aparecen en mayor cantidad en las rocas graníticas, como son el Si, Al, Fe, Ca, Mg, K, Ti, S y P, y el resto de elementos se expresaron en mg/kg ya que en las muestras aparece muy poca cantidad.

3.4.3. Espetroscopía IR-Raman

La espectroscopia IR-Raman proporciona información sobre la estructura química de los compuestos orgánicos e inorgánicos presentes.

Para el análisis no fue necesaria ninguna preparación especial de la muestra. Se tomaron fragmentos de aproximadamente $1cm^2$ de superficie secos al aire, que fueron introducidos directamente en el espectrómetro y analizados tanto por la superficie que corresponde a la pátina, como por la parte interna de las muestras que corresponde a la roca granítica.

El espectrómetro utilizado fué un Módulo FT-Raman BRUKER, modelo FRA 106 equipado con un láser de Nd:Yag de 350mW y una longitud de onda de excitación de 1.064 nm que cubre un intervalo de registro de 3500 a 20 cm^{-1} . Se utilizó un detector de germanio refrigerado por nitrógeno líquido.

3.5. Caracterización biológica de las pátinas

3.5.1. Determinación del contenido de clorofila

Para determinar la cantidad de clorofila presente en las pátinas, éstas se separaron de la roca subyacente. Esta labor fue en algunos casos muy difícil, quedando casi siempre parte de la roca adherida a la pátina. Por esta razón el dato de clorofila/g de pátina no es muy significativo, de modo que resulta más interesante conocer la cantidad de clorofila por unidad de superficie. Para conocer la superficie de cada muestra empleada en estos análisis se hizo un molde de ella con papel de aluminio y mediante un programa informático de

tratamiento digital de imágenes (Micro Image 4.0, Olimpus) se calculó su superficie.

Posteriormente las muestras se trituraron y se les añadió un extractante, que en este caso fue dimetil-sulfóxido (DMSO), ya que se comprobó que su poder extractante es mayor al de otros solventes y los pigmentos extraídos con este método se mantienen estables varios días al almacenar el extracto refrigerado (Shoaf y Lium, 1976 ; Hiscox y Israelstam, 1979; Burnisom, 1980; Bell y Sommerfeld, 1987; Ariño, 1996). La relación extractante/ roca fue de 2ml de DMSO por gramo de muestra. Esta mezcla se mantuvo durante 1h a 65 ºC, agitando de vez en cuando para favorecer la extracción. Transcurrido este tiempo se filtraron los extractos con filtros ALBET 145 y se realizó una segunda extracción sobre la misma muestra.

En los extractos se determinó la absorbancia a 665 y 750 nm utilizando un espectrofotómetro UV-visible Varian Cary 100 conc. Después de realizar estas medidas se acidificaron 5ml del extracto con HCl (5µl de HCl por cada ml de muestra), se esperó 10 minutos y se volvió a medir la absorbancia a 665 y a 750 nm.

Para el cálculo de la cantidad de clorofila se utilizó la formula propuesta por Wollemweider (1979):

$$\mu gr\ Chl\ a = 28{,}917\ [(D_{665}-D_{750})_a-(D_{665}-D_{750})_d\ ](V/L)$$

Donde:

$(D_{665}-D_{750})_a$ es la diferencia entre los dos valores de absorbancia antes de acidificar.

$(D_{665}-D_{750})_d$ es la diferencia entre los valores de absorbancia después de acidificar.

V es el volumen de extractante usado.

L es la longitud de la celda de medida, en cm.

Restando la densidad óptica después de acidificar se elimina la influencia de los productos de degradación de la clorofila, obteniéndose así el valor de *clorofila a*, este valor es proporcional a la biomasa de organismos vivos.

3.5.2. Determinación del contenido de proteínas

Al igual que en el caso de la clorofila, los datos finales de proteínas se refieren a unidad de superficie, por lo que se siguió el mismo procedimiento para medir las superficies de las muestras de pátinas y de las rocas tomadas para el análisis.

La extracción de las proteínas presentes en la pátina y en la roca se realizó resuspendiendo una cantidad de material pétreo en NaOH 1N e incubando a 37 ºC durante 16 horas (Valero, 2000). Se utilizó una proporción de 2 ml de NaOH por cada gramo de roca. Al cabo de las 16 horas se filtraron los extractos con filtros ALBET 145 procurando no perder material ya que hay que realizar una segunda extracción sobre la misma muestras igual a la primera.

Los extractos se analizaron siguiendo el método de determinación de proteínas de Lowry modificado por Peterson (Peterson, 1977)

El método se fundamenta en la unión del reagente de Lowry (tartatro cúprico alcalino) con los péptidos y en el desarrollo de un color azul al añadirles el reagente folin ciocalteaus fenol.

Para calcular la concentración de proteínas se preparó una recta patrón; a partir de una solución madre con 400 μg/ml se obtuvieron las siguientes diluciones 40, 120, 200, y 320 μg/ml. También se preparó un blanco con H_2O y

un blanco con NaOH que se le restó a las muestras para eliminar las interferencias del NaOH en la medida.

Se tomó 1ml de muestra, de patrón y de cada uno de los blancos en tubos de ensayo y se les añadió 1ml de reagente de Lowry; se agitaron y se mantuvieron a temperatura ambiente 20 minutos. Al cabo de ese tiempo se añadió 0,5 ml de folin ciocalteaus fenol y se mezcló rápidamente.

El color se midió al cabo de 30 minutos en un espectofotómetro UV-visible Varian Cary 100 conc a 750 nm. Como el volumen fue muy pequeño para medir en la cubeta del espectofotómetro se añadió a los tubos 2,5 ml de agua.

Para el cálculo final de las proteínas se tuvo en cuenta que los patrones estaban preparados en agua y que la extracción se hizo con NaOH, por lo que el valor del blanco de NaOH se restó a todas las muestra.

3.5.3. Identificación de ácidos grasos

El análisis de los ácidos grasos de las muestras se realizó siguiendo el protocolo indicado por el fabricante del sistema de identificación MIDI (Newark, Delaware, USA). Se separó la pátina de la roca con la ayuda de un bisturí, hasta obtener una cantidad aproximada de 200 mg de muestra. La muestra se introdujo en un tubo de vidrio y se procedió a la extracción de los ácidos grasos mediante cuatro pasos:

1. Primero se realizó una saponificación, añadiendo 1ml de reactivo 1 (15 gr NaOH + 50 ml metanol + 50 ml H_2O), se agitó durante 5-10 segundos en un vortex y se colocó en un baño de

agua a 100 ºC durante 5 minutos. Pasado ese tiempo se volvió a agitar y se colocó otra vez en el baño durante 25 minutos. Después de estos 30 minutos de saponificación los tubos se enfriaron en un baño de agua.

2. El segundo paso fue una metilación, que se realizó añadiendo a los tubos anteriores 2 ml de reactivo 2 (27,1 ml de HCl + 27,1 ml de H_2O + 48 ml metanol), agitándolos durante 5-10 segundos en un vortex e introduciéndolos en un baño de agua a 80 ºC durante 10 minutos. Pasado este tiempo los tubos se enfriaron rápidamente en un baño de agua fría.

3. El siguiente paso fue la extracción, que consistió en añadir a los tubos 1,25 ml de Reactivo 3 (50 ml eter metil terbutilico (MTBE) + 50 ml hexano). Se agitó suavemente durante 10 minutos y se eliminó la fase inferior conservando la superior.

4. El último paso fue un lavado básico que consistió en la adición de 3 ml de reactivo 4 (6 g NaOH + 500 ml de H_2O). Se agitó suavemente durante 5 minutos y al cabo de ese tiempo se recogieron los 2/3 de la fase orgánica del tubo (fase superior).

Las muestras se analizaron utilizando un cromatógrafo de gas Hewlett-Packard 6890 (Hewlett-Packard, Palo Alto, California, USA) equipado con un detector de ionización de llama y una columna capilar de sílice (25 m x 0,20 mm x 0,33 μm fenil metil silicona, Ultra-2 Hewlett-Packard).

El sistema está controlado por un programa informático de Chemstation (Angilent) y Sherlock (MIDI). Las condiciones experimentales se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Condiciones experimentales del análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases.

Temperatura del inyector	250 ºC
Temperatura del detector	300 ºC
Gas tranportado al detector	N_2 30 ml/min
Tiempo de purgado	1 minuto
Gas transportador	H_2, 8 psi
Temperatura del horno	65 ºC durante 1 min
Programa	20 ºC/min a 170 ºC 5 ºC/min a 260 ºC 40 ºC/min a 310 ºC Mantenido durante 15 minutos
Volumen de inyección	2 µl

Cada muestra fue analizada por triplicado y los datos mostrados son las medias entre las tres réplicas y su desviación estándar.

3.5.4. Técnicas de Biología Molecular

Para los análisis de biología molecular se raspó la superficie de las muestras con la ayuda de un bisturí tratando de tomar sólo la pátina y no la roca subyacente. De cada muestra se tomó cantidad suficiente para llenar tres viales eppendorf, analizando el contenido de uno de ellos y conservando los demás a -20 ºC.

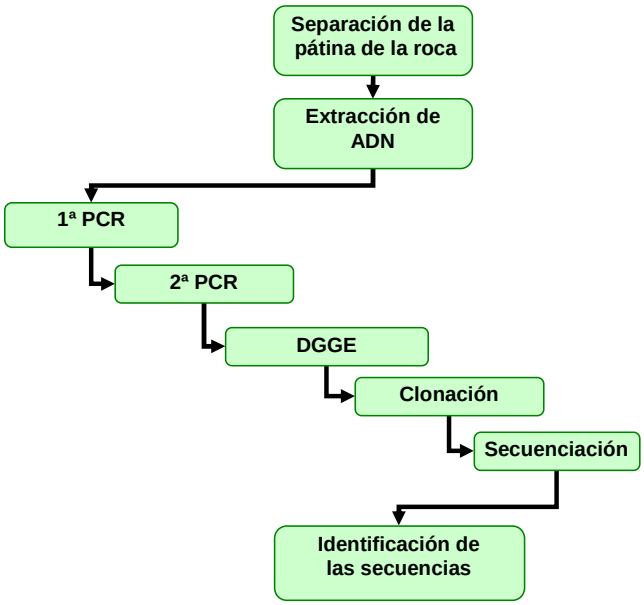
Se tomaron muestras tanto de las pátinas como de las rocas sin pátina para ver si había diferencias entre ambas fracciones, y comparar los diferentes organismos que viven sobre la pátina y sobre la roca.

Se analizaron todas las muestras de pátinas, aunque los afloramientos de Axeitos fueron analizados como una única muestra y los del monte Pedroso también. En el caso de las rocas sin pátina, por falta de muestra, se analizaron

todas las muestras de monumentos salvo la de la Iglesia de San Jorge y la Plaza de María Pita, y en las muestras de afloramientos solamente se analizó la roca de Lamas de Abade.

Los análisis se llevaron a cabo en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología del CSIC (Sevilla), en el grupo de investigación de "Deterioro de Monumentos" del Departamento de Biogeoquímica y Dinámica de Contaminantes, dirigido por el Dr. Cesáreo Saiz Jiménez.

El protocolo de análisis consistió en:



3.5.4.1. Extracción de ADN genómico

En primer lugar las muestras separadas de la roca se homogeneizaron y se procedió a la extracción del ADN genómico utilizando el Kit de extracción NuceoSpin Food (Macherey-Nagel, Alemania), siguiendo las especificaciones

del fabricante y utilizando un control negativo (sin muestra) para confirmar que la extracción había salido correctamente.

3.5.4.2. Primera amplificación del gen ARN-16S (1ª PCR)

La identificación de los organismos presentes en las muestras se llevó a cabo mediante la amplificación y secuenciación del gen que codifica para el ARN ribosómico (ARNr) 16S, ya que es una molécula altamente conservada presentando regiones comunes a todos los organismos, pero además con variaciones que se concentran en zonas específicas. A partir de dicha secuencia se puede obtener información filógénetica y taxonómica de los organismos (Rosello-Mora y Amann, 2001)

La amplificación se llevó a cabo por el método de la reacción en cadena de la polimerasa ("Polymerase Chain Reaction", PCR). Se realizó una primera PCR específica para bacterias, otra para cianobacterias y otra para células eucariotas. Con esta primera amplificación por PCR se amplificaron 900 pares de bases (pb) en el caso de las bacterias, 600 pb en las cianobacterias y 1700 pb en células eucariotas.

La mezcla de la reacción de amplificación (50 µl) contiene: 1 µl de ADN genómico, 5µl de tampón para PCR 10x Biotaq (Bioline, Randolph, Massachussets, U.S.A.), 1 µl de la mezcla de los cuatro nucleótidos (dNTP) Biotaq (10 mM), 1,5 µl de $MgCl_2$ (1,5 mM), 1 µl de cada uno de los cebadores (Tabla 3) (50 µM) y 0,2 µl de la ADN polimerasa Biotaq equivalente a 1 unidad. Se completa hasta 50 µl con H_2O estéril libre de ADNasas y ARNasas.

Para la amplificación de las secuencias del gen que codifica para el ARNr 16S se empleó un termociclador (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) con programas diferentes para amplificar bacterias, cianobacterias y células eucariotas.

Programa para bacterias:

Un ciclo de desnaturalización de 2 minutos a 95 ºC, seguido de 35 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 95 ºC, 15 segundos de reasociación de oligonucleótidos a 55 ºC y 2 minutos de elongación a 72 ºC, seguido por un ciclo de extensión final durante 10 minutos a 72 ºC, finalizando a 4 ºC.

Programa para cianobacterias:

Un ciclo de desnaturalización de 2 minutos a 95 ºC, seguido de 35 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 95 ºC, 15 segundos de reasociación de oligonucleótidos a 60 ºC y 1 minuto de elongación a 72 ºC, seguido por un ciclo de extensión final durante 10 minutos a 72 ºC, finalizando a 4 ºC.

Programa de células eucariotas:

Un ciclo de desnaturalización de 2 minutos a 95 ºC, seguido de 35 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 95 ºC, 12 segundos de reasociación de oligonucleótidos a 50 ºC y 2 minutos de elongación a 72 ºC, seguido por un ciclo de extensión final durante 10 minutos a 72 ºC, finalizando a 4 ºC.

Se utilizó un control negativo de la PCR (sin muestra) para comprobar que no había contaminación y que la amplificación fue realizada correctamente. También se utilizó un control positivo (extracto que contenía algunos organismos similares a los que se quería amplificar analizados previamente) para comprobar que la PCR se realizó correctamente.

Esta primera amplificación se realizó dos veces para comprobar que en las muestras que daban negativo no había organismos, ya que a veces se producen problemas de amplificación por la existencia de mucha cantidad de ADN. Para la repetición de esta amplificación se utilizó 1 µl de ADN igual que la primera vez y también una dilución 1:1 de ADN con agua estéril (0,5 µl: 0,5 µl).

Tabla 3: Cebadores empleados en la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S; F: Se refiere al cebador "sentido" ("forward"); R: es el cebador "antisentido" ("reverse"); (*) los prefijos (por ejemplo 616) se refieren a la localización del cebador en el gen del ARNr 16S utilizando *E.Coli* como referencia.

	Cebador	Secuencia	Referencia
Bacterias (*)	616F	5´- AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3´	Snaidr *et al*., 1997
	907R	5´-AATTCCTTTGAGTTT-3´	Weisburg *et al*., 1991
Cianobacterias	Cya 106 F	5´-CGGACGGGTGAGTAACGCGTCA-3´	Nübel *et al*., 1997
	Cya 781R (A+B)	5´-GACTACWGGGGTATCTAATCCCATT-3´	Nübel *et al*., 1997
C.Eucariotas	Euk A	5´-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3´	Diez *et al*., 2001
	Euk B	5´- TGATCCTTCTGCAGGTTCACCTAC-3´	Diez *et al.*, 2001

3.5.4.3. Geles de Agarosa

Para comprobar que la amplificación por PCR fue satisfactoria se realizó una electroforesis en gel de Agarosa al 1,5 % (p/v) con los productos de la reacción. Para ello se empleó un baño con tampón TAE 0,5x y una fuente de alimentación modelo EPS 600 (Amersham Pharmacia Biotech, Piskataway, N.J.,

U.S.A). Se mezclaron 5 µl de producto y 3 µl de colorante SYBR Green I (molecular Probes, Eugene, U.S.A) 1/100000 en concentración final, como recomiendan Scneeberger *et al*. (1995). También se utilizó un marcador de tamaño para ver que las bandas de la electroforesis se correspondían con el tamaño esperado (se utilizó como marcador de tamaño secuencias de ADN de tamaño conocido amplificadas en otras ocasiones). La electroforesis se desarrolló durante 25 minutos a 90-100 V. El gel de Agarosa se observó en un trans-iluminador de luz UV (Vilber Lourmat, Francia).

El tampón TAE 0,5x se prepara a partir de TAE 50x que a su vez está preparado mezclando 242 g de Base TRIS (Hidroxitrimetil-aminometano) con 57,1 ml ácido acético glacial y 32,7 g EDTA ajustando el volumen a un litro con H_2O destilada y autoclavándolo durante 15 minutos a 121 ºC .

3.5.4.4. Segunda amplificación del gen ARNr 16S (2ªPCR)

Con las muestras que dieron positivo en la primera PCR se realizó una segunda PCR, esta vez para amplificar solamente 200 pb. Esta segunda PCR se hizo sólo para bacterias y cianobacterias, no para células eucariotas (que siguen otro protocolo diferente). La mezcla de reacción amplificadora es igual que para la primera PCR solamente cambiando los cebadores (tabla 4). La amplificación de las secuencias se hizo de la misma forma que la PCR anterior, cambiando sólo el ciclo que en este caso es el siguiente: un ciclo de desnaturalización de 2 minutos a 95 ºC, seguido de 35 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 95 ºC, 15 segundos de reasociación de oligonucleótidos a 60 ºC y 30 segundos de elongación a 72 ºC. Todo ello seguido por un ciclo de extensión final durante 30 minutos a 72 ºC, finalizando a 4 ºC.

Tabla 4: Cebadores empleados en la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S; F: Se refiere al cebador "sentido" ("forward"); R: es el cebador "antisentido" ("reverse"); (*)los prefijos (por ejemplo 341) se refieren a la localización del cebador en el gen del ARNr 16S utilizando *E.Coli* como referencia.

	Cebador	Secuencia	Referencia
Bacterias (*)	341F-GC	5´-tail-CCTACGGGAGGCAGCAG-3´	Muyzer *et al*., 1993
	518R	5´-ATTACCGCGGCTGCTGG-3´	Muyzer *et al*., 1993
Cianobacterias	Cya 359 F-GC	5´-GGGGAATYTTCTGCAATGGG-3´	Nübel *et al*., 1997
	Cya 781R(B)	5´-GACTACAGGGGTATCTAATCCCTTT-3´	Nübel *et al*., 1997

Para comprobar que la amplificación de PCR fue satisfactoria se realizó una electroforesis en gel de Agarosa al 2% (p/v) igual que la realizada en el caso de los productos de la primera PCR.

3.5.4.5. Electroforesis en gel en gradiente desnaturalizante (DGGE)

Con los productos positivos amplificados se realizó una electroforesis en gel en gradiente desnaturalizante (DGGE), técnica que separa las cadenas de ADN dependiendo de la cantidad de bases G-C que contengan. Este análisis permite ver los diferentes organismos que aparecen en las muestras y así decidir con que muestras hacer la clonación.

Para la preparación de los geles de poliacrilamida se empleó un formador de gradientes Gradient Delivery System Model 475 (Biorad, Munich, Alemania).

En la preparación de un gel para DGGE se emplean 11 ml de cada una de las soluciones desnaturalizantes, obteniendo un total de 22 ml. El volumen del gel se completa con una solución al 0 % de desnaturalización, para favorecer la migración inicial de las secuencias. Las soluciones utilizadas para preparar el gel de acrilamida son de baja densidad al 30% de desnaturalización (low) y de alta densidad al 50 % de desnaturalización (high). La mezcla de estas dos soluciones se llevó a cabo en el aparato formador de gradiente. La polimerización es catalizada con N-N-N´-N´-Tetrametiletilendiamida (TEMED) y una solución al 10% de peroxodisulfato amónico (APS). El gel se dejó polimerizar alrededor de 2 horas antes de su utilización.

Low (-) 30%: 7 ml de solución 0% + 4 ml solución 80% + 7,7 µl TEMED + 55 µl de APS
High (+) 50%: 4,1 ml de solución 0 % + 6,9 ml de solución 80% + 7,7 µl TEMED + 55 µl de APS.
Solución 0%: 10 ml solución 0% + 5 µl de TEMED + 38 µl de APS

Se añadieron las soluciones de alta y baja densidad a la vez, entre dos vidrios, que previamente se habían limpiado con etanol y colocado en un soporte. Después se colocó el peine que va a formar los pocillos y se añadió la solución 0 %, con ayuda de una pipeta Pasteur. Este preparado se dejó solidificar, aproximadamente 2 horas.

Soluciones:
APS: (APS 10% p/v) 1g APS + 10 ml H_2O
TEMED: TEMED comercial, hay que añadirlo en campana porque es cancerígeno.
Solución 0%: 150 ml de Bis Acrilamida + 7,5 ml de TAE 50x + 600 ml de H_2O.
Solución 80%: 150 ml de Bis Acrilamida + 7,5 ml de TAE 50x + 150 ml de H_2O + 240 ml de Formamida + 252 g de Urea

Antes de comenzar la electroforesis se realizó un paso previo conocido como *"Prerum"* que consiste en calentar la cubeta de DGGE Dcode-System (Bio-rad, Munich, Alemania), que contiene tampón TAE 0,5X a 60 ºC, durante 45 minutos. Pasado ese tiempo se colocó el gel, a 200 V y 120 A y se conectó el campo eléctrico *("Rum")* durante 30 minutos. Después de esto se cargó el gel con 15 µl de muestra natural y 5 µl de colorante Blue para DGGE. En el gel se pone también un marcador de tamaño (se cargan 7 µl de marcador de tamaño + 5 µl de Blue para DGGE), que consiste en una mezcla de cuatro organismos diferentes que en el gel aparecen en el siguiente orden: 1-*Pseudomonas sp*., 2-*E. coli*, 3-*Paenibacillus sp*., y 4-*Streptomices sp*.

Esta técnica se empleó también más adelante al realizar la clonación, en este caso las cantidades de clones cargadas en el gel son diferentes a las cantidades cargadas cuando se trata de muestras naturales. Para los clones se cargan 5 µl de clon + 5 µl de colorante Blue para DGG.

Se dejó durante 3 horas y media y luego se tiñó con bromuro de etidio. La tinción se realizó introduciendo el gel en una cubeta de bromuro de etidio 0,05x (se preparó añadiendo por cada 100ml de H_2O destilada 10 µl de bromuro de etidio comercial) durante 5 minutos y luego se enjuagó en agua destilada durante unos 1-2 minutos. Pasado ese tiempo se le hicieron fotografías en un transiluminador de luz UV (Vilber Lourmat, Francia).

En los geles cada banda corresponde a un organismo diferente, ya que la cantidad de bases G-C son diferentes dependiendo del tipo de organismos, por lo que con esta técnica tenemos una idea de qué muestras son diferentes y cuántos organismos aparecen en ellas. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se hizo clonación con las muestras elegidas, para luego secuenciar y conocer los organismos que estaban presentes en cada muestra.

Después de conocer en que muestras se va a realizar clonación, se purificaron los productos obtenidos de la primera PCR (900, 600 y 1500 pb respectivamente), para eliminar nucleótidos, cebadores y restos de enzimas que pueden influir en la reacción de clonación. Para ello se empleó un kit de purificación Jetquick (Genomed, Loen, Alemania), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Después de obtener el ADN purificado se procedió a la clonación de las muestras seleccionadas por DGGE.

3.5.4.6. Clonación

La clonación consiste en la introducción de un segmento de ADN (inserto) dentro de un vector de clonación. Como vector de clonación se utiliza la bacteria *E.coli* resistente a la ampicilina, ya que es una bacteria fácil de cultivar y al ser resistente a la ampicilina puede crecer en un medio con este antibiótico donde no crecen otras bacterias.

Con el objetivo de facilitar el estudio de las poblaciones naturales se prepararon genotecas a partir de los productos de PCR obtenidos. Para la clonación se utilizó el kit "TA-TOPO-cloning Kit for secuencing" (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.).

En primer lugar se llevó a cabo la ligación de los fragmentos a clonar al vector, utilizando para ello topoisomerasa en lugar del método clásico que utilizaba ligasas. Con el método de las topoisomerasas resulta una ligación mucho más rápida (5 minutos frente a unas 6 horas) y específica que por el método clásico.

En segundo lugar, se llevó a cabo la transformación, que consiste en la introducción del plásmido en las células competentes de *E. coli*., siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante que se describe a continuación:

Se utilizaron 2 µl de producto de PCR junto con 0,5 µl de solución salina y 0,5 µl del vector (PCR-TOPO) preparado para la ligación con la topoisomerasa adherida. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos.

1 µl de la reacción de ligación se mezcló cuidadosamente con células competentes de *E.coli* (TOP10). A continuación las células son sometidas a choque térmico a 42 ºC durante exactamente 30 segundos en un baño de agua. Pasado ese tiempo se transfirieron inmediatamente a hielo. Tras dos minutos en hielo, se añadieron 250 µl de medio de recuperación SOC, a temperatura ambiente y se incubó todo en tubos en posición horizontal a 37 ºC, agitando a 250 r.p.m. durante 1 hora.

Después de esta incubación se sembraron en placas de LB con 100 µg/ml de ampicilina, de cada muestra se sembraron 2 placas, una con 20 µl y otra con 100 µl. Estas placas se incubaron durante 24 h a 37 ºC y transcurrido este tiempo, se seleccionaron los clones entre las colonias obtenidas. El plásmido presenta resistencia a ampicilina y por ello las células que crecen son las que presentan el plásmido.

El medio de cultivo LB está constituido por: Bacto triptona (10 g/l) + Extracto de levadura (5 g/l) + NaCl (5 g/l). Para preparar medio sólido se añade también agar (20 g/l) y después de la esterilización se distribuye en placas de Petri para que solidifique. La solución se esteriliza en autoclave a 121 ºC durante 20 minutos.

Los clones se sembraron en medio sólido LB+Ampicilina y las placas se incubaron durante 24 h a 37 ºC. Para cada muestra se selecciona un número de clones diferente dependiendo de las bandas que presente en la DGGE (a mayor número de bandas, mayor número de clones vamos a seleccionar). En nuestro caso se seleccionaron los siguientes clones:

- Para muestras de bacterias, en todas las muestras se seleccionaron 15 clones, salvo en las muestras de Padrón, donde se seleccionaron 10 clones y la muestra de la roca de Lamas de Abade, donde se seleccionaron 25 clones.
- Para las muestras de cianobacterias, se seleccionaron en todos los casos 15 clones de cada muestra.
- Para las muestras de células eucariotas, se seleccionaron 5 clones de cada muestra.

Las muestras de estas células fueron recogidas con un toque de palillo estéril sobre la colonia y se resuspendieron en 20 µl de agua esteril. A continuación, las muestras fueron sometidas a tres ciclos de congelación/descongelación. La congelación se llevó a cabo en un ultra congelador Revco (Revco Scientific Inc. Asheville, Carolina del Norte, EE.UU) a -80 ºC, mientras que la descongelación se realizó en un termoagitador termomixer 5436 (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) a 65 ºC.

A partir de los clones obtenidos como se ha descrito, se amplificó el fragmento de ADN clonado en el vector. Esta amplificación se llevó a cabo por una reacción doble de PCR ("*nested PCR*"), se realizó una doble reacción para evitar amplificar el ADN que codifica para el ARN ribosómico 16S de las células de *E.coli* huéspedes. Esto se consigue realizando una primera amplificación utilizando los cebadores específicos para el vector de clonación y una segunda reacción sobre el producto de la primera PCR.

La mezcla de la reacción de amplificación (50 µl) contiene: 1 µl de ADN genómico, 5 µl de tampón para PCR 10x Biotaq (Bioline, Randolph, Massachussets, U.S.A.), 1 µl de la mezcla de los cuatro nucleótidos (dNTP) Biotaq (10 mM), 1,5 µl de $MgCl_2$ (1,5 mM), 1µl de cada uno de los cebadores (50 µM) y 0,2 µl de la ADN polimerasa biotaq equivalente a 1 unidad. Se completa hasta 50 µl con H_2O estéril libre de ADNasas y ARNasas.

Para la amplificación de las secuencias del gen que codifica para el ARNr 16S se empleó un termociclador (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) con el siguiente programa: un ciclo de desnaturalización de 2 minutos a 95 ºC, seguido de 35 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 95 ºC, 15 segundos de reasociación de oligonucleótidos a 55 ºC y 2 minutos de elongación a 72 ºC, todo ello seguido por un ciclo de extensión final durante 10 minutos a 72 ºC, finalizando a 4 ºC.

Para la primera amplificación se utilizaron los cebadores T7 (5´TAATACGACTCACTATAGGG-3´) y M13 (5´-CAGGAAACAGCTATGA C-3´), que son los cebadores específicos para el vector de clonación.

Se comprobó la existencia de producto de la PCR mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 %, tal y como se describió anteriormente. Mediante esta PCR se comprobó qué clones habían incorporado el inserto, ya que ocurre en ciertas ocasiones que hay clones sin inserto. Para ver si los insertos son diferentes entre los diferentes clones se realizó el segundo paso de la amplificación y luego una DGGE.

El segundo paso de amplificación mediante PCR, depende de si lo que se amplifican son bacterias o cianobacterias y se realizó del mismo modo que la segunda PCR para amplificar el ADN, utilizando el mismo ciclo y los mismos cebadores.

Por último se realizó una DGGE, similar a las realizadas anteriormente para ver cuáles de los clones son iguales o cuáles son diferentes y así realizar la secuenciación de los que son diferentes.

Los clones que son diferentes entre sí se secuenciaron, para lo cual es necesario sacar el inserto del interior del plásmido, utilizando en nuestro caso un enzima de restricción, EcoR I (Fermentans, vilnius, Lituania) que reconoce la secuencia de ADN: 5´-GAATTC-3´ y 3´- CTTAAG-5´ cortando así el plásmido por los lugares en los que está unido el inserto.

La digestión se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante y el proceso consistió en una incubación durante 2 h en un baño de agua a 37 ºC. Se utilizó una mezcla de 12,5 µl formada por 1,5 µl de solución Tampón 0,25 µl de enzima EcoR I (Fermentans, vilnius, Lituania) y el resto de agua estéril. A este preparado se le añadió 2,5 µl de producto de PCR.

Después de la digestión, para ver si los resultados eran positivos se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % igual a las realizadas anteriormente. Los clones negativos pueden deberse a pequeños fragmentos de ADN resultantes de cebadores.

Después de la digestión del plásmido todos los clones que poseían inserto se secuenciaron, pero antes se purificaron para eliminar los nucleotidos, cebadores y restos de enzimas que pueden interferir en la reacción de secuenciación. Para ello se empleó el *kit* de purificación Jetquick (Genomed, Löhne, Alemania) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

3.5.4.7. Secuenciación

Los fragmentos amplificados del ADN de las cadenas "sentido" y "antisentido" se secuenciaron en un secuenciador capilar modelo ABI 3700 (Applied Byosystems, Foster City, California, U.S.A.). Las secuenciaciones se llevaron a cabo en el centro de investigaciones biológicas del CSIC en Madrid (CIB, CSIC, Madrid). Para la secuenciación se emplearon los cebadores 27F, 519F, 907R y 1522R, obteniéndose las secuencias correspondientes a las dos hebras del fragmento de ADN estudiado. Las cuatro secuencias obtenidas sirvieron para obtener las secuencias del gen amplificado (aproximadamente 1500 bases) utilizando el programa phred/phrap/Consed (Gordon *et al*., 1998).

3.5.4.8. Identificación de las secuencias

Los resultados de las secuencias fueron visualizados mediante el programa Chromas 1.41 (www.technelysium.com.au/chromas.html) para comprobar la calidad de la secuencia, editar manualmente las secuencias generadas por el secuenciador, y en su caso tratar de solucionar posibles interferencias fallidas de los cromatogramas.

La base de datos empleada para la obtención de los homologos más cercanos a nuestras secuencias fue la "National Center for Biotechnology Information (NCBI)" (www.**ncbi**.nlm.nih.gov/) La homología de las secuencias se realizó utilizando el algoritmo BLAST (Altschul *et al*., 1990). Este algoritmo de búsqueda utiliza una secuencia de fragmentos cortos de la secuencia analizada, para encontrar secuencias homólogas entre bases de datos de ADN.

Las secuencias fueron introducidas en la base de datos del NCBI para la obtención de los homólogos más próximos el día 7/03/2007.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Caracterización morfológica de las muestras

A simple vista, aunque todas las pátinas son oscuras difieren en la tonalidad del color (negro, gris, rojizo, etc.) y también en su aspecto. Para caracterizarlas morfológicamente de forma más precisa, se observaron con una lupa binocular que permite una amplificación de hasta 60 aumentos (estereomicroscopio) y mediante microscopio electrónico de barrido (MEB). Además se determinó su color de manera objetiva utilizando un colorímetro para sólidos.

4.1.1 Observación al estereomicroscopio

El estereomicroscopio permite analizar los rasgos macroscópicos de las muestras, además de distinguir aquellos componentes que puedan ser identificados a menos de 60 aumentos.

Pátinas del afloramiento de Axeitos (AXGP, AXNP y AXRP)

Las tres pátinas (figura 3) se tomaron en el mismo afloramiento, en el lugar de Axeitos y cerca del dolmen (figura 9). AXRP es una pátina de color marrón-rojizo (en seco y en húmedo), constituida por un depósito más o menos continuo que recubre la roca y que es muy difícil de separar de ésta. AXGP y AXNP son muy parecidas, ambas están formadas por un depósito estriado que da lugar a un recubrimiento continuo y, en general, de espesor fino, pero con zonas más engrosadas en forma de ondas o crestas. La principal diferencia entre ambas es la coloración, que en el caso de AXGP es gris (en seco y en húmedo) y

en el caso de AXNP es negra (tanto en húmedo, como en seco). Encima de esta pátina se observan zonas de color verde más claro que parecen algas o cianobacterias que la colonizaron posteriormente y sobre la superficie de las tres pátinas se observan también algunos talos liquénicos.

Pátina del afloramiento de Corrubedo (CBP)

Pátina de intenso color negro (en húmedo y en seco), continua de manera que recubre totalmente los granos minerales, consistente y fuertemente adherida a la roca. Presenta un aspecto céreo. En algunas zonas debajo de la pátina aparecen manchas de un color verde claro que podrían corresponderse con colonias de algas (figura 4).

Pátina del afloramiento de Campo Lameiro (CLP)

Pátina de color negro, fuertemente adherida a la roca y que bajo la lupa se puede ver que está formada por fibras alargadas, que podrían corresponder a hifas de hongos u otros organismos. En húmedo se distinguen unas partículas esféricas de color rojizo (figura 5).

Pátina del afloramiento de Lamas de Abade (LAP)

Pátina de color negro-verdoso, de escaso espesor, continua, es decir recubre el sustrato rocoso totalmente, pero a la lupa se ve que está formada por pequeñas esférulas de color verdoso. Sobre esta pátina se distinguen organismos tales como líquenes. En húmedo la coloración verdosa se acentúa (figura 6).

Pátinas del afloramiento del Monte Pedroso (P1P y P2P)

Estas pátinas fueron tomadas en dos afloramientos muy próximos entre sí en la cima del Monte Pedrosos (figura 7). La pátina P1P es un depósito fino, de color negro con tonalidades ligeramente moradas, formada por pequeñas

partículas esferoidales. Al humedecerse varía el color a marrón violáceo y se observan pequeños puntos negros en la parte más superficial. La pátina P2P es de color más negro que la anterior, aunque en húmedo adquiere una tonalidad verdosa, e incluso se pueden ver zonas de color verde más claro. Constituye una capa fina y discontinua formada por pequeñas partículas esféricas. Las dos se encuentran profusamente colonizadas por líquenes.

Pátina del afloramiento de Toxosoutos (TXP)

Pátina de color negro, que en húmedo adquiere una tonalidad más verdosa, continua, muy fina y muy bien adherida a la roca de modo que es muy difícil separarla de ella. A la lupa se puede ver que está formada por pequeños glomérulos. (figura 8).

Pátina del dolmen de Axeitos (AXDP)

Presenta un color negro intenso, que no varía en húmedo y en seco. Está formando una película en general muy fina, pero con zonas de mayor espesor. Aparentemente está constituida por un depósito inorgánico formado por partículas esféricas negras muy juntas que le dan un aspecto de película continua (Figura 9)

Pátina del dolmen de Cabaleiros (CAP)

Esta pátina presenta en seco un color marrón oscuro, aunque a la lupa se pueden diferenciar partículas de color marrón más claro; al humedecerse se oscurece considerablemente. Está formada por una capa fina que recubre completamente la roca y se adhiere fuertemente a ella, siendo muy difícil de separar (figura 10).

Pátina del dolmen de Parxubeira (PXP)

Presenta color negro tanto en húmedo como en seco. Se trata de una película fina, formada por partículas esféricas muy juntas que le dan un aspecto de pátina continua. Sobre la superficie se observan muchas partículas de polvo (figura 11).

Pátina del Colegio San Francisco Javier (FJP)

Pátina de color negro, tanto en húmedo como en seco, consistente, de apariencia cérea y fuertemente adherida a la superficie de la roca. Se distribuye de forma desigual por la superficie, es decir no es continua, y su grosor es variable.

Pátina del Palacio de Fonseca (FP)

Pátina de color marrón claro en algunas zonas, y grisáceo en otras (en húmedo y en seco). Se trata de una capa de consistencia compacta que recubre la roca de forma continua. Presenta aspecto céreo y se separa con facilidad de la roca. Cuando se levanta la pátina se puede ver que sobre la roca hay un revestimiento rojizo en algunas zonas, y blanquecino en otras; este último de aspecto muy pulverulento que se mezcla con los granos minerales de la roca (figura 12).

Pátina de la Facultad de Historia (HP)

Pátina de color gris oscuro, que al humedecerse se vuelve de color negro intenso. Muy encostrada de modo que se adhiere fuertemente a la roca y la recubre formando una película continua y consistente, de apariencia cérea. La lupa permite observar que presenta mucho polvo en su superficie (Figura 13).

Pátina del Monasterio de San Martín Pinario (SMP)

Pátina continua de color gris oscuro, que se aclara en húmedo, adherida fuertemente a la roca y formada por un polvillo que recubre homogéneamente la roca. En algunas zonas este polvillo se acumula formando pequeñas crestas; si se rasca con un punzón se aprecia que no es muy consistente; parece como si estuviese formada por pequeñas arenas unidas entre sí (figura 14).

Pátina de la casa nº 2 del Toural (TP)

Pátina de color gris claro en la parte más interna y que gradualmente se va haciendo más oscura hacia la parte más superficial. Está formada por un depósito que recubre completamente la roca. En la superficie se aprecian muchas partículas de polvo de color blanquecino. En húmedo el color apenas cambia, se aclara un poco, y se aprecia mejor la gradación de color desde la parte externa a la parte interna (Figura 15).

Pátina de la Iglesia de San Jorge de A Coruña (JP)

Película gris oscura que en húmedo adquiere una tonalidad prácticamente negra. Esta formada por un depósito que recubre totalmente la roca y posee muchas partículas de polvo en su superficie (figura 16).

Pátina de la Plaza de María Pita de A Coruña (MPP)

Pátina de color negro en seco y en húmedo. Está formada por pequeñas partículas esféricas de color negro que al aparecer todas juntas le da un aspecto continuo; aunque se encuentra bien adherida a la roca se puede separar fácilmente de ella con ayuda de un punzón (figura 17).

Pátina del convento del Carmen de Padrón (PAP)

Esta pátina se encuentra en la cara externa de las placas que se separan con facilidad de los sillares. En la cara interna de estas placas existe colonización por algas y líquenes además de nidos de arañas e insectos. La pátina forma un recubrimiento muy continuo de color grisáceo. En húmedo se distingue que la generalidad del depósito es de color gris claro con pequeñas manchas de color negro repartidas por toda la superficie (Figura 18).

Pátina de la Catedral de Lugo (LUP)

Película de color gris oscuro, tanto en seco como en húmedo. Forma un recubrimiento muy continuo y difícil de separar de la roca que en algunas zonas aparece más engrosado, formando crestas u ondas (figura 19).



Figura 3: Detalle de las pátinas tomadas en el afloramiento de Axeitos; a: pátina roja, b: pátina negra y c: pátina gris.



Figura 4: Detalle de la pátina negra recogida en el lugar de Corrubedo, cerca del faro.



Figura 5: Detalle de la pátina tomada en un afloramiento rocoso muy cerca de los petroglifos de Outeiro dos Cogollados en Campo Lameiro



Figura 6: Detalle de la pátina muestreada en un afloramiento próximo a la cantera de Lamas de Abade (Santiago de Compostela).



Figura 7: Detalle de las pátinas tomadas en el monte Pedroso. A afloramiento 1 y B afloramiento 2.



Figura 8: Detalle de la pátina muestreada en un afloramiento próximo al Monasterio de San Xusto de Toxosoutos.



Figura 9: Detalle de la pátina tomada en el interior del Dolmen de Axeitos.



Figura 10: Detalle de la pátina muestreada en el interior del Dolmen de Cabaleiros.



Figura 11: Detalle de la pátina tomada en el interior del Dolmen de Parxubeira.



Figura 12: Detalle de la pátina de la fachada del Palacio de Fonseca (Santiago de Compostela).



Figura 13: Detalle de la pátina de la Facultad de Historia (Santiago de Compostela).



Figura 14: Detalle de la pátina de la fachada del Monasterio de San Martín Pinario (Santiago de Compostela)



Figura 15: Detalle de la pátina de la casa nº2 en la plaza del Toural (Santiago de Compostela).



Figura 16: Detalle de la pátina de la Iglesia de San Jorge (A Coruña).



Figura 17: Detalle de la pátina de la Plaza de María Pita (A Coruña).



Figura 18: Detalle de la pátina del Convento del Carmen de Padrón.



Figura 19: Detalle de la pátina tomada en la fachada principal de la Catedral de Lugo.

4.1.2. Observación al microcopio electrónico de barrido (MEB)

Como ya se ha comentado en el apartado material y métodos, gracias al microscopio electrónico de barrido se estudian las muestras de dos modos diferentes; por un lado se estudió la superficie de las pátinas, gracias al empleo de electrones secundarios, y por otro lado también se estudia la pátina en profundidad y la interfase pátina/roca, mediante el estudio de las probetas pulidas utilizando electrones retrodispersados.

Tabla 5: Espesor, nº de capas y limite con la roca, de cada pátina.

	Muestra	Nº de Capas	Espesor (μm)	Límite con la roca
Afloramientos	**AXNP**	1	100-200	Neto
	AXRP	1	20-70	Neto
	CBP	1	10-95	Brusco
	CLP	1	15-260	Difuso
	LAP	1	50-140	Neto
	P1P	1	40-360	Difuso
	P2P	1	10-260	Neto
	TXP	1	5-20	Neto
Monumentos	**DAXP**	1	5-15	Neto
	CAP	1	5-15	Neto
	PXP	1	20-200	Neto
	FJP	1	5-95	Neto
	FP	2	100-140 1000	Brusco
	HP	1	10-30	Neto
	SMP	2	18-130 660-960	Difuso
	TP	2	50-470 85-260	Difuso
	MPP	1	5-35	Neto
	JP	1	85-260	Brusco
	PAP	3	65 50 50	Difuso
	LUP	1	30-125	Difuso

El estudio al MEB permite establecer diferencias morfológicas importantes entre las pátinas de afloramientos y las de monumentos. Todas las pátinas de los afloramientos están formadas por una única capa, que varía de espesor desde 5 μm hasta 360 μm (tabla 5), y su composición es fundamentalmente orgánica; las pátinas de afloramientos, sin embargo, pueden estar constituidas por una o más capas (tabla 5) y son fundamentalmente inorgánicas.

Las pátinas tomadas en el afloramiento de Axeitos (AXGP, AXNP y AXRP) (Figura 20) están formadas principalmente por un depósito de material biológico que se observa al MEB como un entramado compacto de estructuras de diferentes organismos, claramente diferenciado de la roca. Se pueden distinguir hifas, filamentos, células más o menos esféricas (aunque en las fotos se ven colapsadas por el vacío necesario para su visualización al MEB). En el caso de la pátina gris (AXGP), parece que está formada casi exclusivamente por material orgánico (figura 20 a y b), mientras que en las otras dos, se observan partículas minerales entremezcladas con las estructuras biológicas (figura 20 c, d, e, y f). El análisis de los cortes perpendiculares de las muestras de AXNP y AXRP establece claras diferencias entre ambas pátinas, ya que la pátina negra (AXNP) tiene un espesor de entre 100 y 200 μm, es muy continua, está formada principalmente por carbono (figura 54 d) y posee un límite neto con la roca (tabla 5), mientras que la pátina roja (AXRP) también es continua y su límite con la roca es neto, si bien penetra en algunas fisuras. Pero posee un espesor mucho menor (20 a 70 μm) (tabla 5) y el contenido en carbono no es mayor que el de la roca (figura 54 a).

Las pátinas de los afloramientos de Campo Lameiro y Corrubedo (CLP y CBP) al ser observadas con bajas amplificaciones presentan una morfología similar; ambas aparecen como depósitos continuos y agrietados de naturaleza orgánica (figura 21). Las diferencias entre ellas se aprecian al observarlas con

mayor aumento. Entonces se puede ver que en el caso de Campo Lameiro las estructuras biológicas poseen una forma alargada, formando un entramado de micelios o hifas, y en el caso de Corrubedo sin embargo, la pátina parece formada por un entramado de estructuras biológicas con muchos poros y de aspecto mucilaginoso. El estudio de las secciones trasversales de las muestras, revela que ambas pátinas son muy continuas, recubriendo completamente la roca, sin embargo, CBP posee un espesor de 10 a 95 μm y el límite con la roca es brusco, comportándose como una película adherida a la roca (tabla 5), mientras que CLP es más gruesa que la anterior (15 a 260 μm) y su límite con la roca es difuso, ya que se introduce entre los granos minerales (tabla 5). El microanálisis químico indica que ambas pátinas estan formadas fundamentalmente por carbono y es esta gran cantidad de carbono lo que las diferencia de la roca soporte (figura 53 a y c).

Al estudiar la superficie de la pátina de Lamas de Abade (LAP) se observa que también está formada mayoritariamente por estructuras biológicas pero, estas estructuras aparecen entremezcladas con numerosas partículas minerales (figura 22). El espesor de la pátina es de 50 a 140 μm y el límite con la roca es neto (hay una pequeña zona de interfase roca-patina pero prácticamente la pátina no penetra en la roca) (tabla 5). El MEB permite ver sobre la superficie de esta pátina unas partículas esféricas a veces huecas que analizadas con EDAX resultaron ser de pirita (Figura 22 d), probablemente procedentes de la roca. También se observan otras partículas esféricas de diferente naturaleza mineral (Figura 22 c y e) que analizadas por EDAX resultaron ser fundamentalmente de hierro y titanio (Figura 47).

Las pátinas recogidas en el monte Pedroso, en dos afloramientos diferentes pero sobre el mismo tipo de granito, son ambas de composición fundamentalmente biológica, pero se diferencian en la continuidad; P1P (figura

23 a) es densa, continua, posee un espesor de 40 a 360 μm y posee un límite con la roca difuso (tabla 5) ya que en algunas zonas penetra mucho dentro de ella introduciéndose por las fisuras y entre los granos minerales formando un entramado complejo. Sin embargo, también posee algunas zonas donde la adherencia con la roca no es muy buena y parece que se está desprendiendo de ella (figura 55 a). P2P es discontinua, más delgada (10 a 260 μm), posee un límite neto con la roca (tabla 5) y está formada por estructuras en forma de hifas que se introducen entre los minerales y en los huecos de la roca (Figura 23 b y c). Al igual que para el resto de muestras de afloramientos el estudio de las probetas pulidas indica que la principal diferencia entre pátina y roca es el mayor contenido de carbono que presenta la pátina, con respecto a la roca subyacente.

La patina recogida en el lugar de Toxosoutos está, al igual que las anteriores, formada básicamente por material biológico que se entremezcla con la matriz mineral recubriendo la roca de forma discontinua (Figura 23 d, e y f). En las fotos se puede ver que los organismos que conforman la pátina poseen estructura filamentosa y que en algunos casos aparecen rodeando granos de feldespato, que son claramente reconocibles por sus planos de exfoliación (figura 23 e). Posee un espesor de 5 a 20 μm y el límite con la roca subyacente es neto (tabla 5) ya que la zona de interfase roca-pátina es muy delgada, aunque existe una cierta penetración de la pátina en la roca pues, como ya se ha dicho, las estructuras biológicas rodean los granos minerales más superficiales.

En cuanto a las pátinas tomadas en los monumentos, como ya se ha comentado tienen una morfología bastante diferente de las anteriores: su espesor varía ente 5 μm y 1 mm, el número de capas también es variable (entre 1 y 3) (tabla 5) y son de composición principalmente inorgánica.

La pátina tomada en la fachada del colegio Francisco Javier (FJP) (Figura 24 d) es una pátina continua, que posee un límite neto con la roca y tiene un espesor muy variable: hay zonas muy delgadas con un espesor de 5μm y otras zonas donde la pátina puede llegar a los 95 μm (tabla 5). Se pueden observar algunas estructuras biológicas que se entremezclan con otros componentes minerales. Aparecen en esta pátina un número bastante elevado de partículas esféricas minerales formadas principalmente por hierro y calcio (Figura 48 B).

La pátina de la facultad de Historia (HP) forma una película continua, aunque agrietada, de espesor variable entre 10 y 30 μm y de naturaleza inorgánica (Figura 24 e), aunque en la superficie también se ha detectado carbono (principal elemento que la diferencia de la roca). El límite con la roca es neto (tabla 5). Por debajo de la pátina se aprecia cierta alteración en la roca subyacente ya que se observa que las micas aparecen muy abiertas (Figura 24 f).

En las muestras tomadas en el monasterio de San Martín Pinario (SMP), de la casa nº 2 del Toural (TP) y en la Iglesia de San Jorge (JP), las pátinas parecen casi exclusivamente formadas por un depósito de partículas inorgánicas (Figura 25).En todas ellas, en algunas zonas se observan cristales de yeso, con un hábito muy característico que, sin duda, han contribuido a la alteración de los minerales ya que en la pátina de San Martín Pinario se observa que precipitan entre las láminas de las micas provocando su apertura (figura 25 a). En la pátina de San Jorge además de yeso aparecen algunas partículas que al ser analizadas con la microsonda asociada al MEB se comprobó que estaban compuestas principalmente por plata (figura 50).

La pátina de San Martín Pinario (SMP) está formada por dos capas que se diferencian en el contenido de carbono (figura 60 a). La capa más externa tiene un mayor contenido de carbono; su espesor varía entre 18 y 130 μm y el límite con la capa interna es difuso (tabla 5). La segunda capa tiene un espesor variable entre 660 y 960 μm y el límite con la roca es difuso (tabla 5). De hecho tiene una morfología similar a la roca y es difícil de diferenciar de ella visualmente, pero se puede diferenciar claramente por la composición química, ya que está constituida principalmente por calcio y fósforo (figura 60 a, b y c).

La pátina del Toural (TP), está formada por dos capas, la más interna tiene un espesor de 50 a 470 μm, forma un recubrimiento que se introduce entre los granos minerales y es muy difícil de distinguir de la roca subyacente, siendo el límite con la roca difuso (tabla 5), la capa más superficial tiene un espesor de 85 a 260 μm y posee una coloración más oscura (al MEB) lo que indica un mayor contenido en carbono (figura 60 d).

La pátina de la Iglesia de San Jorge (JP), tiene un espesor de 85-260 μm y el límite con la roca es muy brusco (tabla 5), sin que exista penetración de la pátina entre los minerales de la roca; existe una grieta que marca la separación entre ambas. La parte más externa de esta pátina presenta una coloración más oscura lo que indica un cierto contenido de carbono en la superficie, si bien la composición de la pátina es mayoritariamente inorgánica (figura 61 a).

La pátina del palacio de Fonseca (FP) está formada por un depósito de partículas inorgánicas muy diferentes tanto en la morfología como en composición a las demás pátinas estudiadas (figura 26 a y b). Sobre la superficie aparecen partículas muy reflectantes a los electrones compuestas fundamentalmente por plomo. En este caso también se identificó yeso y otras partículas esféricas formadas principalmente por carbono. Esta pátina está

constituida por dos capas (figura 59), una capa externa formada principalmente por carbono, de un espesor ente 100-140μm y que se diferencia de la inferior por poseer una coloración mas oscura y una capa interna de aproximadamente 1 mm (tabla 5), que no presenta carbono en su composición.

La pátina del Convento del Carmen de Padrón (PAP) es una película continua, agrietada y de naturaleza inorgánica (Figura 26 c). Sobre su superficie aparece un depósito brillante de composición diferente al resto de la pátina; su análisis por EDAX reveló que está constituido sobre todo por Pb (Figura 51 A). Es una pátina bastante homogénea, cuyo límite con la roca es difuso, siendo muy difícil diferenciarla de la roca subyacente (figura 62 d). Está constituida por tres capas: la primera posee un mayor contenido en carbono que las capas siguientes y su espesor es de 65 μm. La segunda tiene menos carbono que las otra dos y tiene un espesor de aproximadamente 50 μm. La tercera capa, la más próxima a la roca, es muy similar a la primera y su espesor es de 50 μm. Esta última capa es difícil de diferenciar de la roca y en algunos puntos el límite no está muy claro (tabla 5).

La pátina de la Catedral de Lugo (LUP) es, al igual que la anterior, una pátina de naturaleza inorgánica aunque se puede observar también cierto componente biológico (figura 26 d, e y f). También en esta muestra aparece un depósito brillante (figura 26 d), que al analizarlo por EDAX resultó ser de plomo (figura 51B). El espesor de esta capa varía de 30 a 125μm, siendo muy difícil diferenciarla de la roca al MEB (figura 62 a), ya que la coloración es muy similar al tratarse de una pátina de naturaleza inorgánica, y cuyo límite con la roca es difuso (tabla 5). Se aprecia cierta alteración de la roca, ya que las biotitas comienzan a romperse por sus planos de foliacion (figura 26 f).

La pátina de la plaza de María Pita de A Coruña es una pátina mixta, formada por un componente biológico y un componente inorgánico importante (figura 27). En esta pátina aparecen algunas partículas constituidas por fósforo, calcio e hierro y numerosas partículas esféricas, algunas formadas principalmente por silicio y aluminio, otras compuestas sobre todo por hierro y otras de carbono (figura 27 c). Otra característica de esta pátina es la gran variedad de diatomeas que posee (figuras 27 e y f). En sección transversal se ve que el espesor de esta pátina varía entre 5 y 35 μm y que el límite entre roca y pátina es neto (tabla 5). Desde el punto de vista químico existe una mayor cantidad de carbono en la pátina que en la roca subyacente (figura 61 d).

Las pátinas tomadas en el interior de los dólmenes están formadas por un depósito continuo, de naturaleza mixta, inorgánica y orgánica, pero la contribución relativa de uno u otro componente varía de una pátina a otra. Las pátinas del dolmen de Axeitos y de Cabaleiros tienen un aspecto muy similar, estando formadas principalmente por una matriz mineral en la que aparecen ciertos rasgos orgánicos (figura 28) En ambos casos se observan algunas partículas esféricas; el análisis de estas partículas con la microsonda reveló que estaban constituidas por hierro y potasio como elementos mayoritarios (figura 48 A). En el Dolmen de Parxubeira (PXP), a diferencia de los anteriores, el componente biológico parece ser mucho más importante y se observan numerosas hifas de hongos que se entremezclan con el material inorgánico (Figura 24 a, b y c). La principal diferencia entre pátina y roca en los tres casos es el contenido de carbono, mayor en la pátina. Poseen un límite neto con la roca sin que exista penetración de las pátinas en el interior de los sustratos pétreos. La pátina del dolmen de Axeitos (AXDP) y la pátina del dolmen de Cabaleiros (CAP) poseen un espesor entre 5 y 15 μm, mientras que la pátina del dolmen de Parxubeira (PXP) tiene un espesor mayor que las anteriores (20-200 μm) (tabla 5).

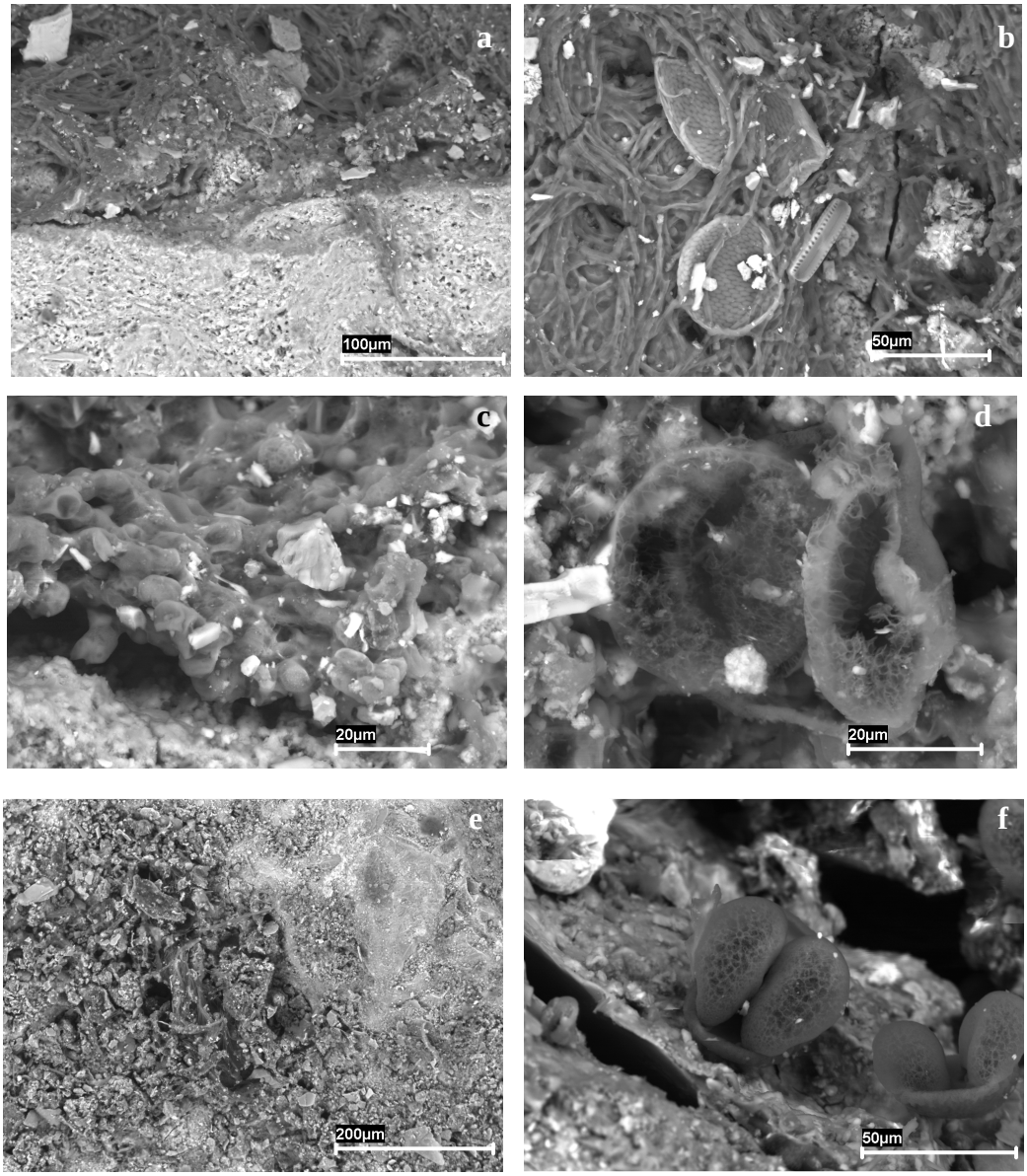


Figura 20 : Fotografías al microscopio electrónico de las pátinas del afloramiento de Axeitos: pátina gris (a y b), pátina negra (c y d) y pátina roja (e y f).

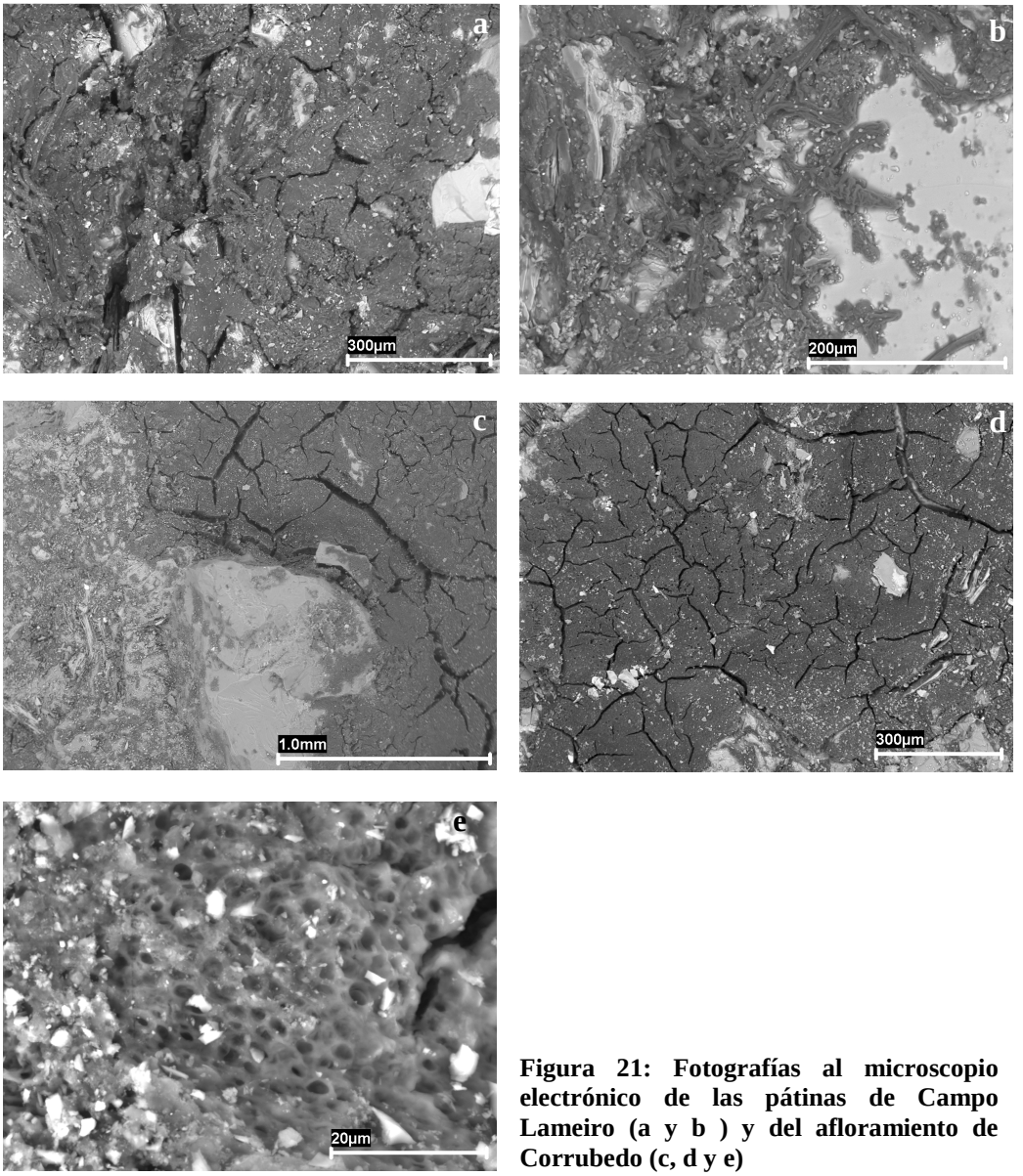


Figura 21: Fotografías al microscopio electrónico de las pátinas de Campo Lameiro (a y b) y del afloramiento de Corrubedo (c, d y e)

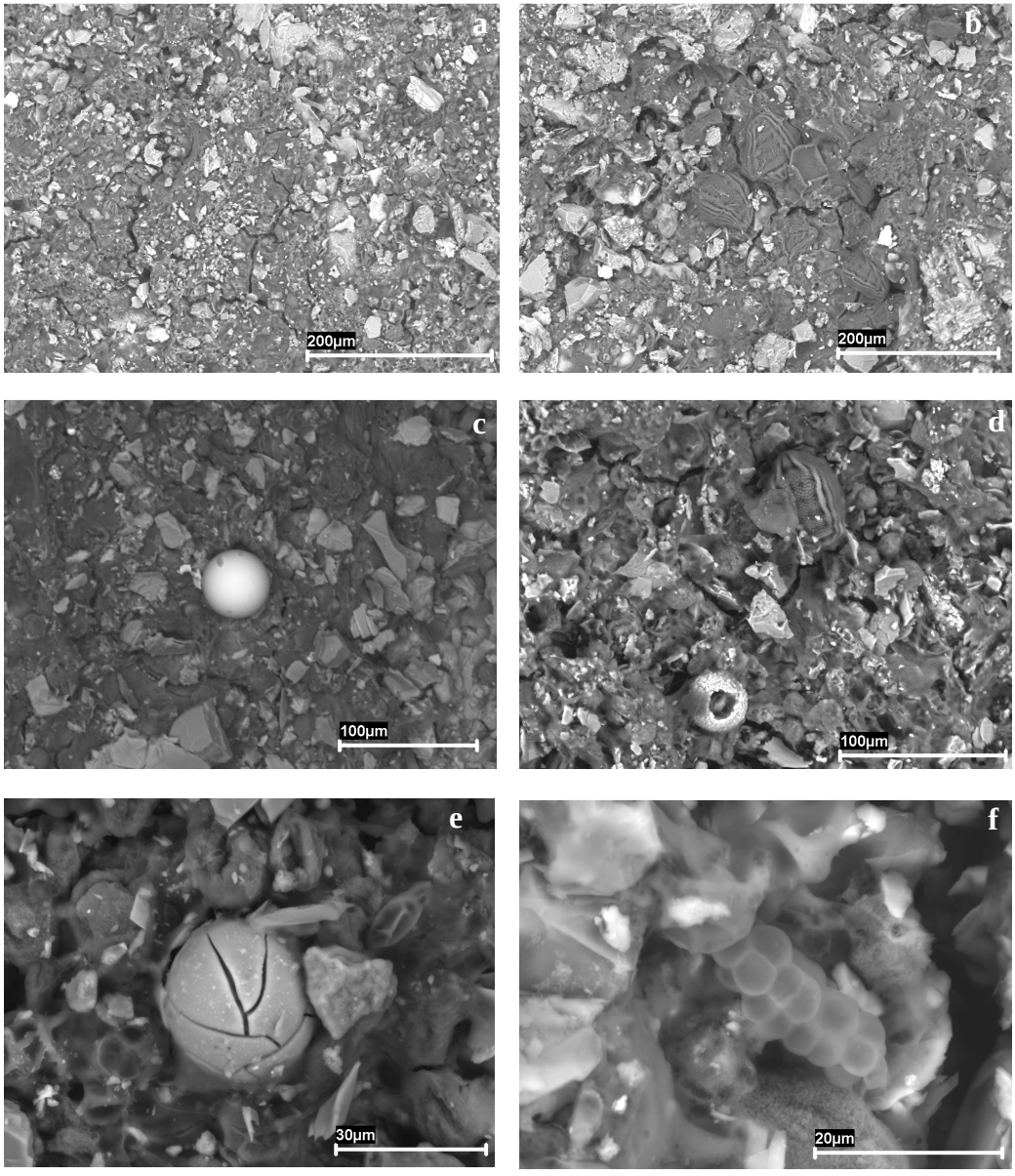


Figura 22: Fotografías al microscopio electrónico de la pátina de Lamas de Abade .

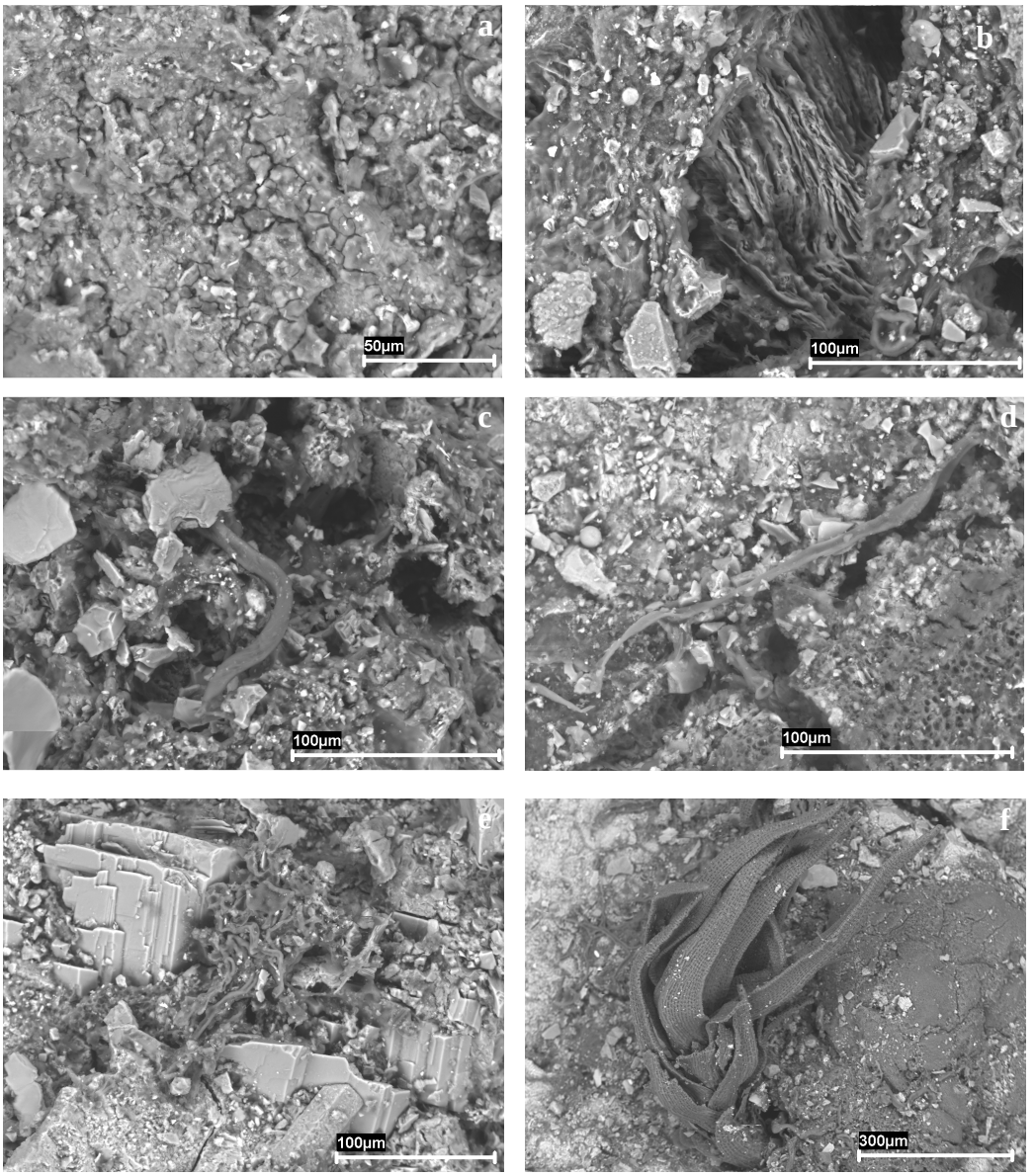


Figura 23: Fotografías al microscopio electrónico de las pátinas del afloramiento 1 del monte Pedroso (a), del afloramiento 2 del monte Pedroso (b y c) y del afloramiento de Toxosoutos (d, e y f).

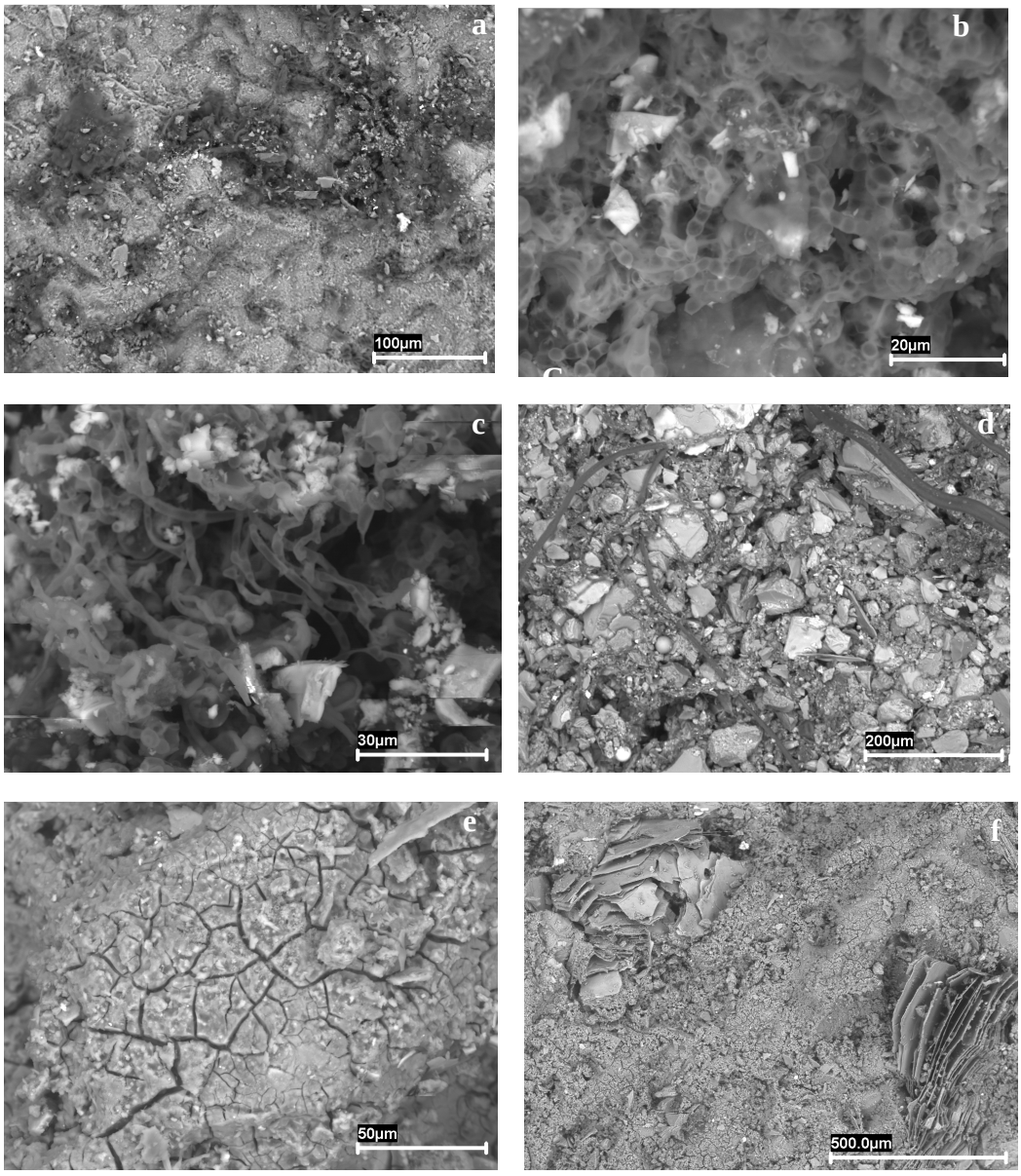


Figura 24: Fotografías al microscopio electrónico de la patina del Dolmen de Parxubeira (a, b y c), de la patina del colegio Francisco Javier (d), y de la pátina de la Facultad de Historia (e y f).

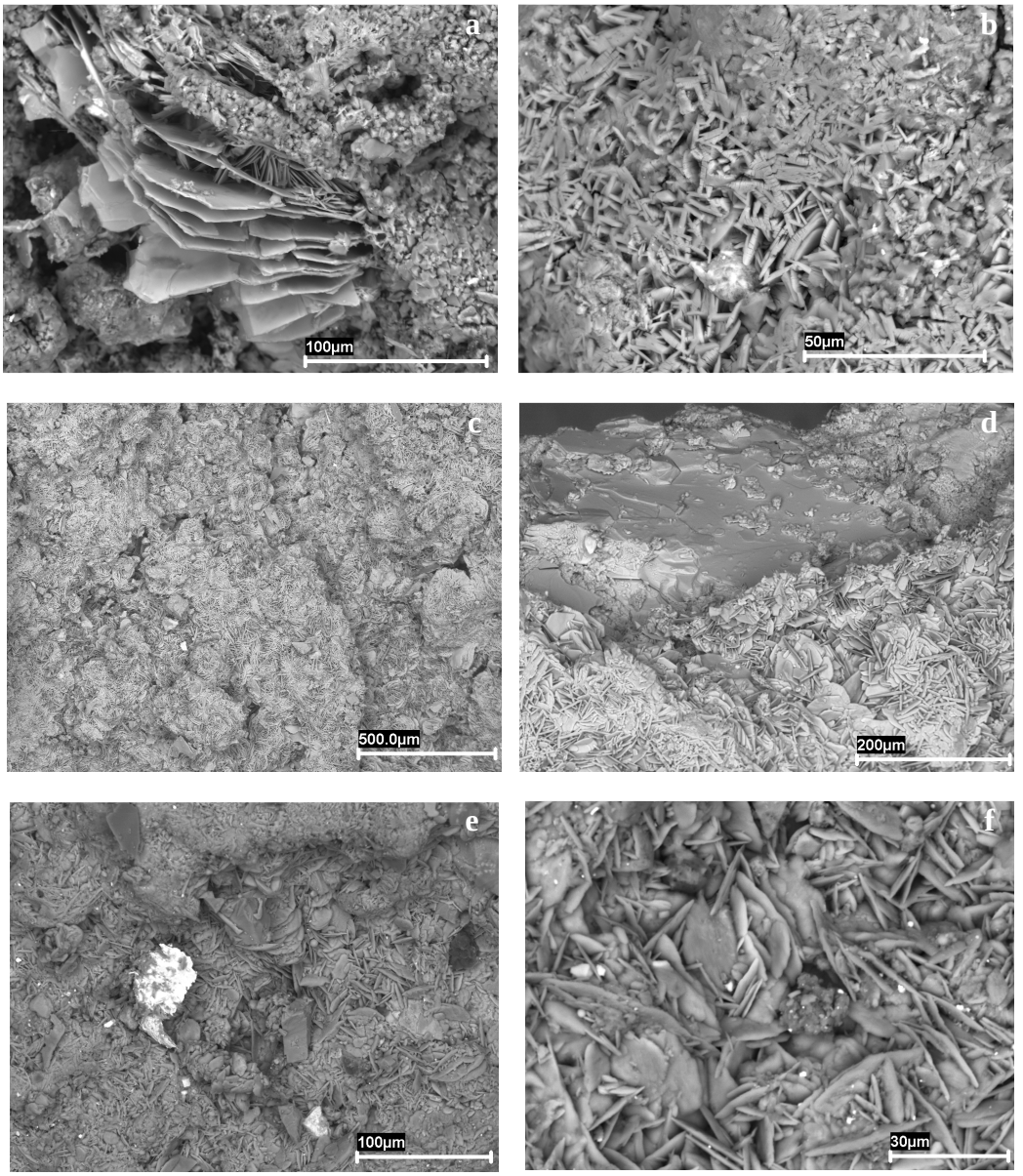


Figura 25: Fotografías al microscopio electrónico de las pátinas del monasterio de San Martín Pinario (a y b), de la Fachada de la casa del Toural (c y d) y de la Iglesia de San Jorge (e y f).

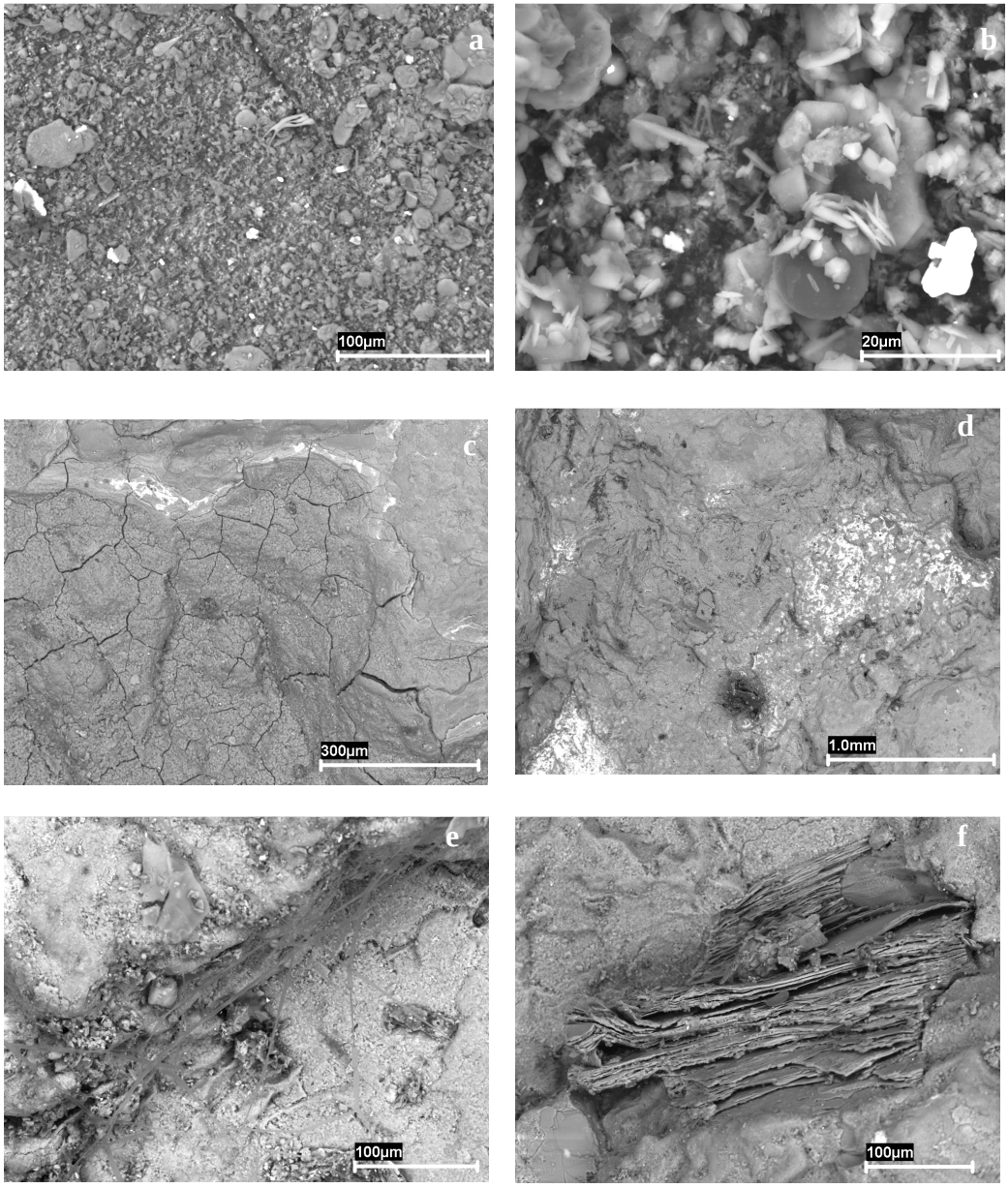


Figura 26: Fotografías al microscopio electrónico de las pátinas de la fachada del Palacio de Fonseca (a y b), del Convento del Carmen de Padrón (c), y de la Catedral de Lugo (d, e y f).

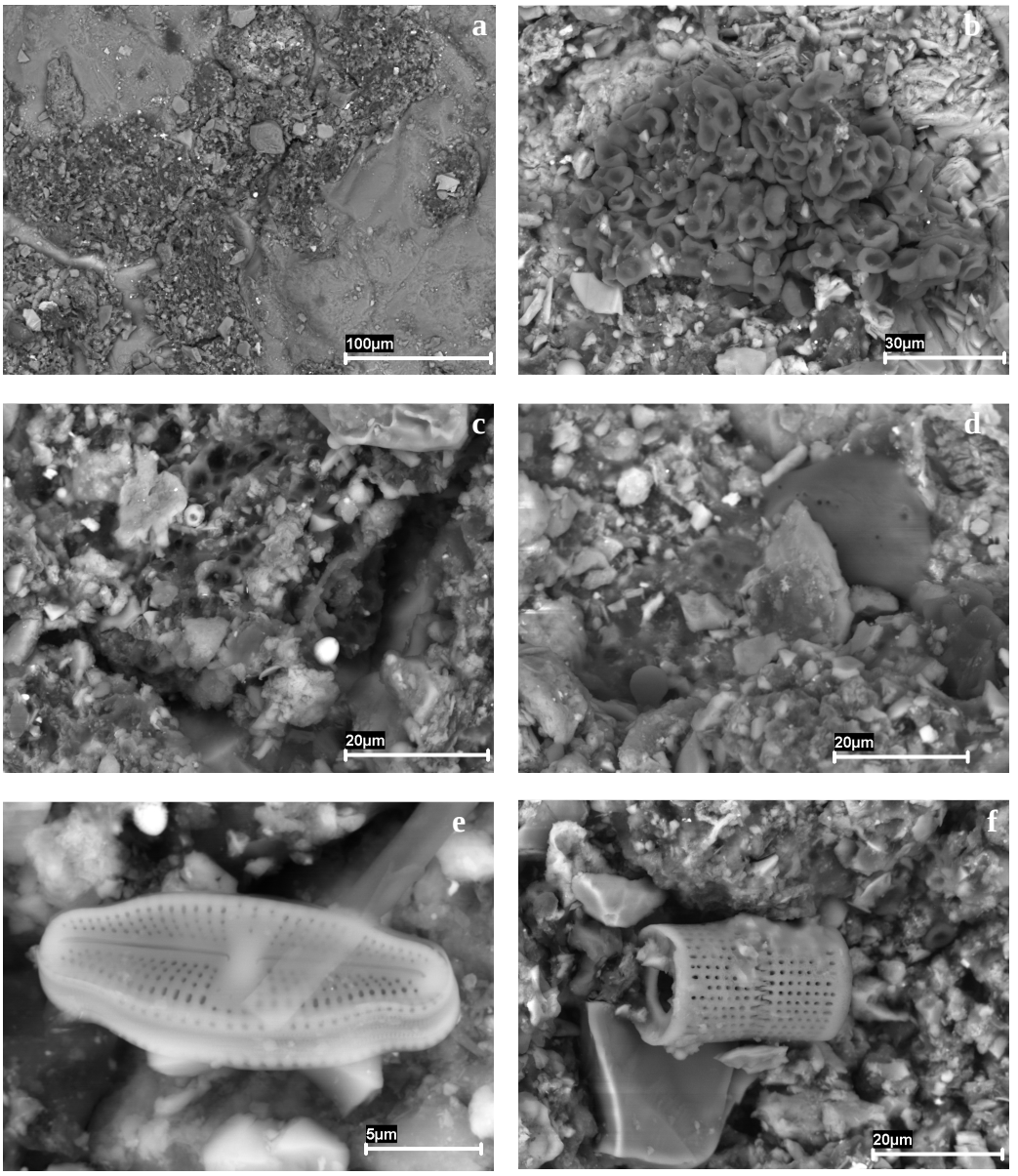


Figura 27: Fotografías al microscopio electrónico de la pátina del muro de la plaza de María Pita en A Coruña.

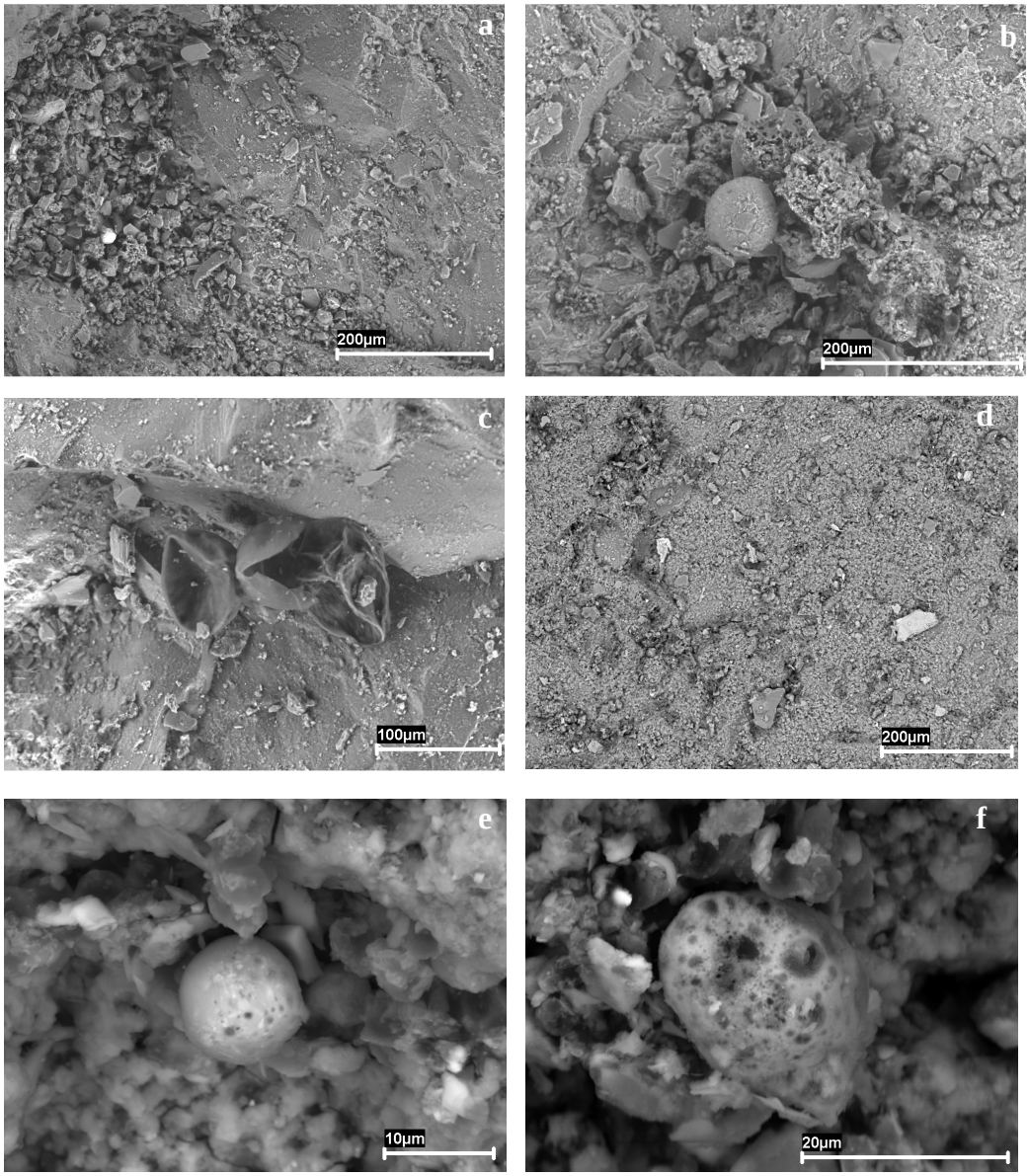


Figura 28: Fotografías al microscopio electrónico de las patinas de los Dolmenes de Axeitos (a , b y c) y Cabaleiros (d, e y f) .

4.1.3 Medida del color

A simple vista la mayoría de las muestras poseen una coloración negruzca o gris oscura, pero sin embargo hay una clara diferencia entre las que pertenecen a monumentos de ambiente urbano donde el color es más nítidamente negro, y las de afloramientos donde la pátina adquiere tonalidades verdosas o incluso rojizas o violáceas.

Cuando se mide el color con el colorímetro Minolta CR-310 se pueden cuantificar las diferencias existentes entre las diversas pátinas y entre las pátinas y la roca subyacente.

En las figuras 29 y 30 se representa el color en el espacio L*a*b* de las diferentes pátinas estudiadas así como el de la roca subyacente correspondiente. Aparecen dentro de un círculo rojo los puntos pertenecientes a las muestras de rocas y el resto de los puntos corresponden a las pátinas. En ambas figuras podemos observar que el color de la pátina es diferente del de la roca subyacente, tanto en monumentos como en los afloramientos. En los afloramientos, se observa una disminución en el componente L*(luminosidad) de las pátinas con respecto de la roca, es decir un acercamiento al negro, como es lógico, y se ve también una disminución clara en el componente b*, que indica un incremento en la tonalidad azul, y en algunas de las muestras se aprecia también una disminución del componente a*, lo que indica una tendencia al verde. En los monumentos, al igual que en los afloramientos, se aprecia una disminución en las pátinas del componente L* pero, a diferencia de éstos, los parámetros correspondientes a la cromaticidad (a* y b*) no varían de forma tan clara.

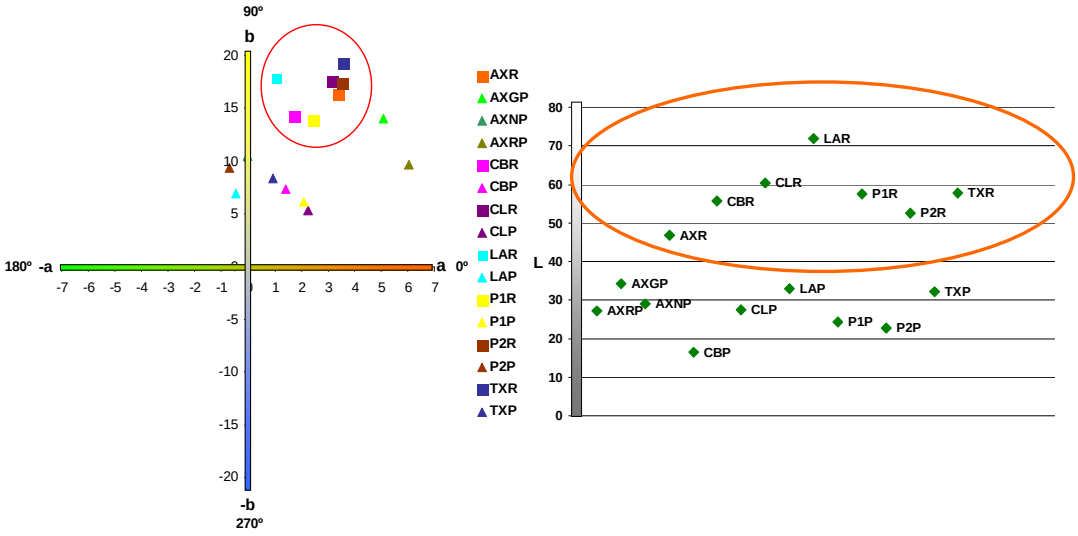


Figura 29: Representación en diagramas cartesianos a* y b*, y L* de los parámetros de color para cada una de las muestras de afloramientos naturales. Rodeadas en rojo aparecen las muestras de rocas y el resto de los puntos corresponden a las pátinas.

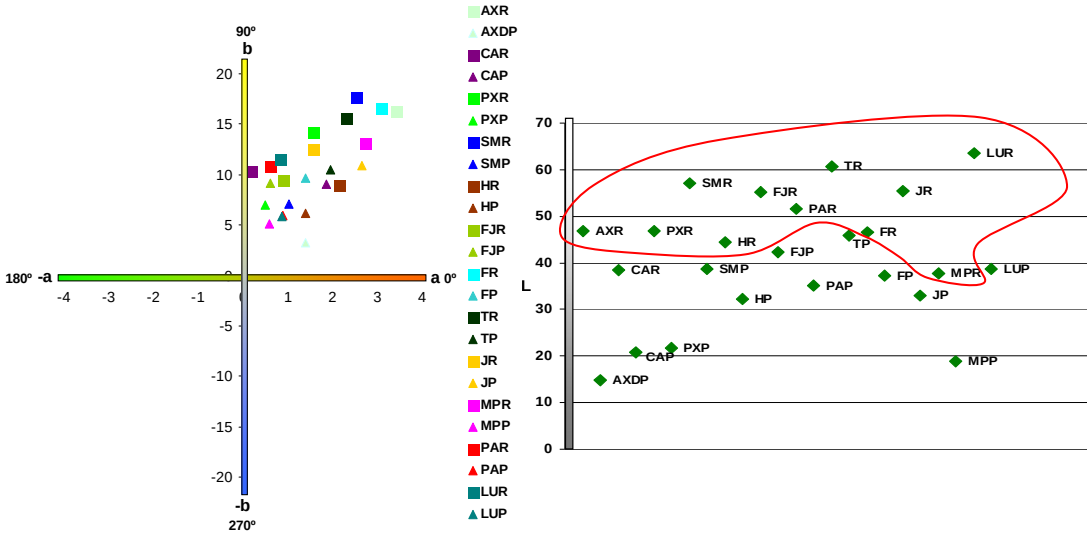


Figura 30: Representación en diagramas cartesianos a* y b*, y L* de los parámetros de color para cada una de las muestras de monumentos. Rodeadas en rojo, para el parámetro L*, aparecen las muestras de la roca y el resto de los punto corresponden a las pátinas.

4.2 Caracterización mineralógica

4.2.1 Descripción de las rocas

A continuación se presenta una breve descripción petrográfica de los granitos que constituyen el sustrato sobre el que se han formado las pátinas analizadas en este estudio.

Granito del afloramiento de Axeitos:

Pertenece a la facies externa leucócrata del *Plutón Granítico de Caldas de Reis*, formación que se engloba dentro de las granodioritas y granitos tardihercínicos (I.G.M.E., 1981, hoja 151). Se trata de un granito de grano medio-grueso, de textura heterogranular alotriomorfa a subidiomorfa. Posee como minerales esenciales cuarzo, feldespato potásico (ortosa), plagioclasas, biotita y moscovita y como minerales accesorios, circón y opacos. Esta roca posee una coloración rojiza debida a los feldespatos. Constituye el material de construcción del Dolmen de Axeitos.

Granito del afloramiento de Corrubedo

Esta roca es un granito de dos micas de grano fino-medio, bastante deformado, con enclaves biotíticos, conocido como granito de Corrubedo. En tramos localizados presenta megacristales, normalmente orientados según la dirección de la estructura general. Englobado dentro de este granito existen zonas afectadas por una fuerte migmatización. Constituye una variedad del granito del Barbanza (I.G.M.E., 1981, hoja nº151).

Granito del afloramiento de Campo Lameiro:

Esta roca pertenece a los granitoides migmatíticos englobados en el *Dominio migmatítico y de las rocas graníticas del grupo de Lage* (I.G.M.E., 1982, hoja nº 152). Se trata de un granito alcalino, de dos micas, de textura granuda y tamaño de grano medio-fino, atravesado por numerosas pequeñas venas pegmo-aplíticas muy ricas en cuarzo y moscovita. Sus componentes principales son cuarzo, feldespato potásico, plagioclasa, biotita y moscovita y sus minerales accesorios son sillimanita, andalucita, apatito, circón y opacos.

Granito del afloramiento de Lamas de Abade :

Esta roca pertenece al *Dominio del borde externo del complejo de Ordes y del complejo de Noia* (I.G.M.E., 1981, hoja nº 94).Se trata de un ortoneis biotítico con una marcada esquistosidad correspondiente a la primera fase hercínica y reorientado por las siguientes fases de deformación. De modo disperso presenta glándulas de feldespato, deformadas y con sombra de presión. Como minerales principales posee cuarzo, microclina, plagioclasa, moscovita y biotita y como accesorios posee apatito, opacos, granate, circón, clorita, clinozoisita, y raramente esfenas y carbonatos.

Granito del afloramiento del Monte Pedroso:

La roca recogida en este lugar se conoce como granito de Figueiras y pertenece a la *Serie de granitoides migmatiticos* perteneciente al *Dominio migmatítico y de rocas graníticas del grupo de Laxe* (I.G.M.E., 1981, hoja nº 94). Tiene su origen en la migmatización de los sedimentos y ortoneises glandulares del Dominio antes citado, por lo que es frecuente la presencia de restitos de la roca original. Texturalmente es una roca granuda alotriomorfa a hipidiomorfa con tamaño de grano muy variable; presenta una orientación a veces muy marcada, casi néisica y orientaciones de fluidez. Los componentes principales son cuarzo, plagioclasa, feldespato potásico, biotita y moscovita y

como accesorios presenta óxidos de hierro, apatito y circón. Esta roca fue profusamente utilizada en la ciudad de Santiago de modo que constituye el material de construcción de muchos edificios y monumentos.

Granito del afloramiento de Toxosoutos:

Esta roca es un granito de dos micas de grano fino-medio con megacristales, perteneciente al *Dominio migmatítico y de rocas graníticas del grupo de Laxe* (I.G.M.E., 1981, hoja nº 120).En general es un granito bastante homogéneo, presentando en algunos tramos una tonalidad más clara siendo casi un leucogranito. La biotita aparece con una disposición lineal, lo que confiere a la roca una ligera orientación en algunas zonas, en otras zonas se observan megacristales sin una orientación predominante. Presenta una textura granular alotriomorfa. Los componentes principales son cuarzo, plagioclasas, microclina, moscovita y biotita y como accesorios aparece circón, apatito, sericita, rutilo y clorita secundaria.

Granito del dolmen de Arca da Parxubeira

La roca con la que se construyó este dolmen es un granitoide migmatítico perteneciente al *dominio migmatítico de las rocas granítica del grupo de Lage* (I.G.M.E., 1981, hoja nº 93). Se trata de leucogranitos formados principalmente por cuarzo, microclina, plagioclasa, biotita y moscovita como minerales principales y apatito, circón, opacos y más escasamente rutilo y óxidos de hierro como minerales secundarios. Los minerales de esta roca se encuentran en cierto modo milonitizados y cataclastizados y presentan una marcada orientación.

Granito del dolmen de Cabaleiros

La roca con la que se construyó el dolmen de Cabaleiros se encuentra englobada dentro del *Compleo de Ordenes*. Se trata de una granodiorita biotítica (I.G.M.E., 1981, hoja nº 69) con abundantes megacristales de feldespato. Su textura es heterogranular paralotriomorfo y presenta signo de cataclasis. Está constituida por cuarzo, plagioclasa, feldespato potásico, biotita y moscovita. Además como minerales accesorios pueden aparecer circón, apatito y minerales opacos, epidota y esfena.

Granito de Padrón:

El granito con el que está construido el Convento del Carmen de Padrón se corresponde con el que existe en los alrededores de esta localidad, que en el mapa geológico (I.G.M.E., 1981, hoja nº 120) se identifica como un granitoide migmatítico englobado dentro del *Dominio migmátitico y de las rocas graníticas del grupo de Lage*. Es un granito heterogéneo y con granulometría variada. La roca de este edificio corresponde una variedad de dos micas de grano medio fino.

Granitos de A Coruña

Las dos muestras estudiadas en la ciudad de A Coruña se corresponden con dos granitos muy diferentes que afloran en esta ciudad.

La parte norte de la plaza de María Pita está formada por una roca granítica que corresponde a la que en el mapa geológico (I.G.M.E., 1975, hoja nº 21) se identifica como granodiorita precoz. Es una roca de grano grueso, de tonalidades grisáceas que presenta grandes cristales de feldespato casi siempre maclados. El cuarzo normalmente aparece en agregados. La plagioclasa casi siempre maclada a veces zonada con antipertitas y mirmequitas y las biotitas

aparecen también en agregados sin orientar. Como minerales accesorios posee moscovita, apatito, zircón, epidota y opacos.

La iglesia de San Jorge ha sido construida con un tipo de roca granítica que aflora en la zona oeste de la ciudad de A Coruña y se identifica en el mapa geológico (I.G.M.E., 1975, hoja nº 21) como un leucogranito. Posee una textura granuda de grano fino y color blanquecino. El feldespato potásico en cristales xenomorfos es microclina y se encuentra en menor proporción que la plagioclasa. Ésta generalmente es más idiomórfa, en cristales tabulares con maclas polisintéticas. El cuarzo aparece en agregados heterogranulares. La característica más notable es el tamaño de grano muy fino y la ausencia de biotita.

Granito de la Catedral de Lugo

El granito con el que se construyó la catedral de Lugo, es un granito que en el mapa geológico (I.G.M.E., 1975, hoja nº 72) se denomina como leucogranodiorita. Es un granito leucocrato de grano medio grueso y de dos micas, pudiendo en algunas zonas ser más abundante la moscovita que la biotita. Presenta como minerales principales cuarzo, feldespato potásico (microclina), plagioclasa (fundamentalmente sódica), moscovita y biotita y como minerales accesorios posee apatito, circón y clorita pseudomorfica de biotita. Así mismo puede tener proporciones variables de turmalina y granates.

4.2.2 Análisis mineralógico por DRX

Se analizaron en todos los casos muestras de las pátina y la roca granítica por debajo de ella. En las figuras 31-36 se representan los difractogramas de cada pátina y de la correspondiente roca subyacente, de

manera que se puede visualizar fácilmente la existencia de efectos diferentes entre ellas.

En los afloramientos (Figuras 31 y 32), tanto en las pátinas como en la roca subyacente aparecen los mismos minerales, no existe diferencia entre ambas. En todos los casos se identificaron únicamente los componentes principales de las rocas graníticas, es decir cuarzo, feldespato potásico, plagioclasas y micas. No se observa la presencia de minerales producidos por la meteorización del granito, tales como caolinita o vermiculita. Por este motivo en las figuras solamente se presentan los difractogramas de las muestras de Axeitos, Corrubedo, Campo Lameiro y Lamas de Abade a modo de ejemplo, ya que en el resto ocurre exactamente lo mismo.

En cuanto a las muestras tomadas en los monumentos (figuras 33 a la 36), su mineralogía es más variada. El dolmen de Axeitos se comporta igual que los afloramientos, es decir solamente se detectaron los minerales esenciales de la rocas graníticas y no hay diferencias entre pátina y roca, sin embargo en los dólmenes de Cabaleiros y Parxubeira sí hay diferencias entre la pátina y la roca, ya que en la roca se detecta la presencia de caolinita, lo que indicaría un cierto grado de meteorización.

En lo que se refiere a los monumentos urbanos, en cinco de ellos no existen diferencias entre pátina y roca subyacente, apareciendo solamente los minerales típicos del granito. Estos monumentos son el Monasterio de San Martín Pinario y el colegio Francisco Javier en Santiago, la plaza de María Pita en A Coruña, el convento del Carmen de Padrón y la catedral de Lugo. En el resto de los monumentos (facultad de Historia, palacio de Fonseca, casa del Toural, todos de la ciudad de Santiago, y la iglesia de San Jorge en A Coruña), además de los minerales del granito aparece yeso. En los casos del palacio de Fonseca y de la casa del Toural el yeso aparece tanto en la pátina como en la

roca subyacente (figuras 34 A y 35 A), en cambio en la facultad de Historia y en la iglesia de San Jorge el yeso aparece exclusivamente en la pátina (figuras 34 B y 35 B). En la pátina del palacio de Fonseca (figura 34 A) además de yeso aparecen otros compuestos: calcita, portladita, gohetita y un compuesto de potasio, plomo y cloro que según la base de datos del servicio de DRX de la U.S.C. se trata de pseudocotumnita (KPb_2Cl_5/$KCl.2PbCl_5$).

En las muestras de Fonseca y San Jorge (figura 34 A y 35 B) se observa la presencia de caolinita; en la primera aparece en la roca pero no en la pátina y en el segundo caso ocurre al revés, aparece en la pátina pero no en la roca.

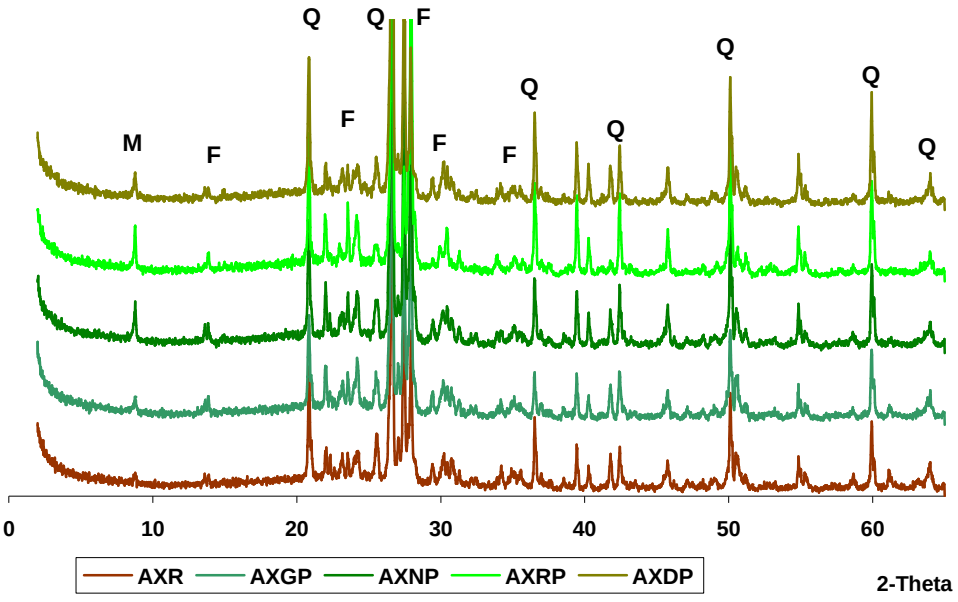


Figura 31 : Difractogramas de rayos-X de las muestras recogidas en el lugar de Axeitos: pátina gris (AXGP), pátina negra (AXNP), pátina roja (AXRP), pátina del Dolmen de Axeitos (AXDP) y roca subyacente a las pátinas (AXR). Q: cuarzo; M: biotita/moscovita; F: feldespato potásico/plagioclasa.

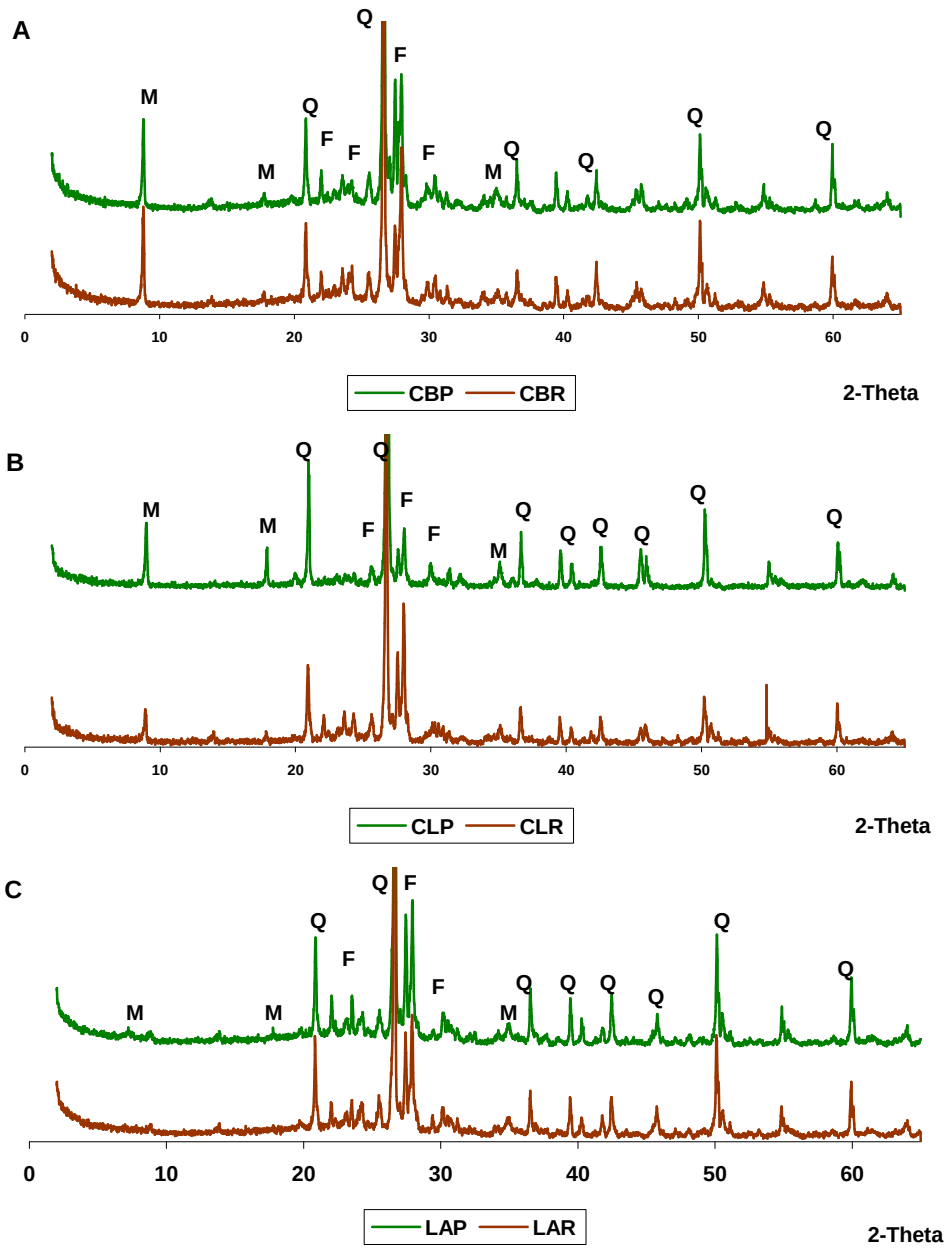


Figura 32: Difractogramas de rayos-X de A: la pátina de Corrubedo (CBP) y la roca subyacente (CBR), B: la pátina de Campo Lameiro (CLP) y la roca subyacente (CLR) y C: la pátina de Lamas de Abade (LAP) y la roca subyacente (LAR). Q: cuarzo; M: moscovita/biotita; F: feldespato potásico/plagioclasa.

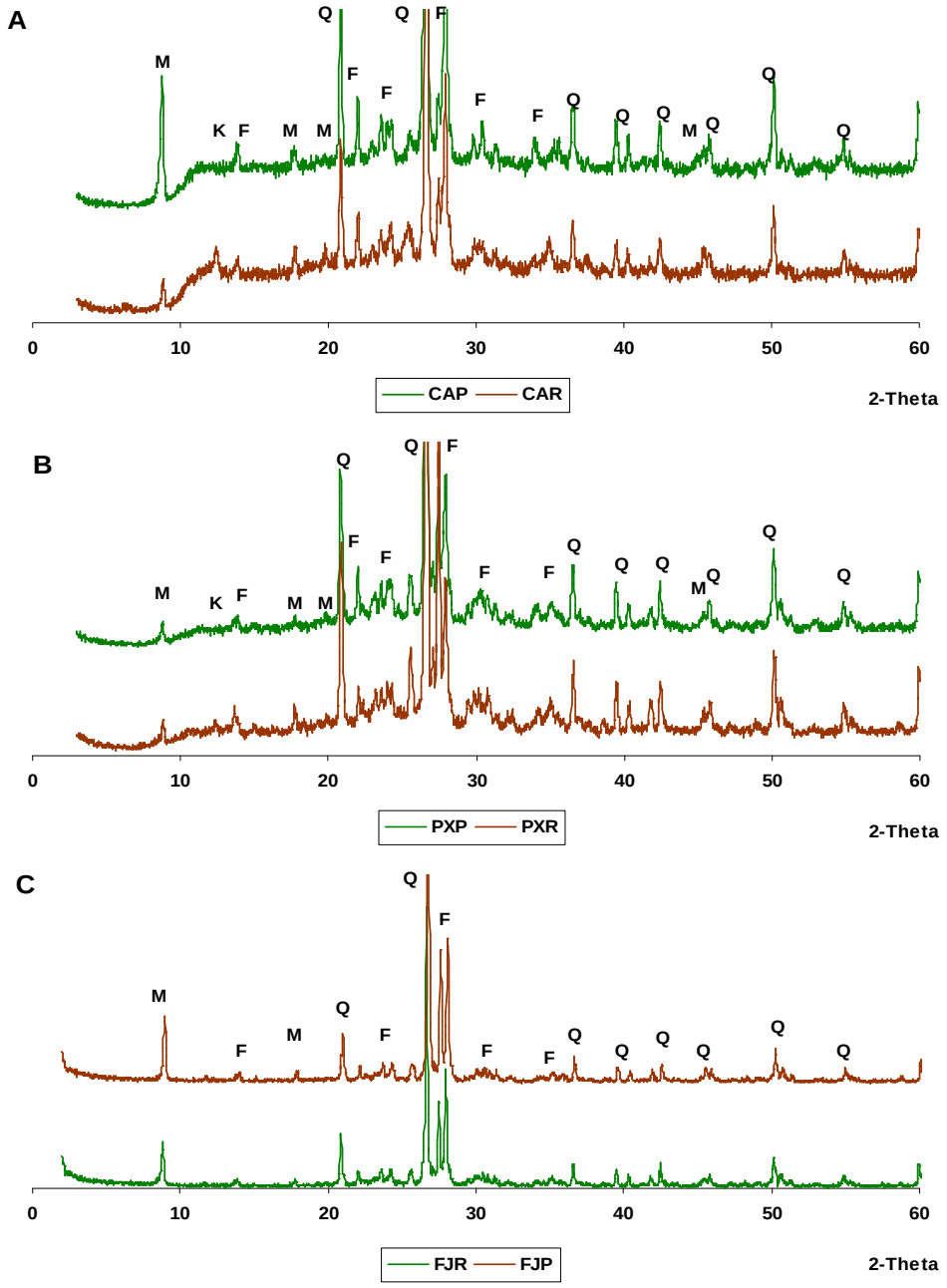


Figura 33: Difractogramas de rayos-X de A: la pátina del dolmen de Cabaleiros (CAP) y la roca subyacente (CAR), B: la pátina del dolmen de Parxubeira (PXP) y la roca subyacente (PXR) y C: la pátina del colegio Francisco Javier (FJP) y la roca subyacente (FJR). Q: cuarzo; M: moscovita/biotita; F: feldespato potásico/plagioclasa ; K: caolinita.

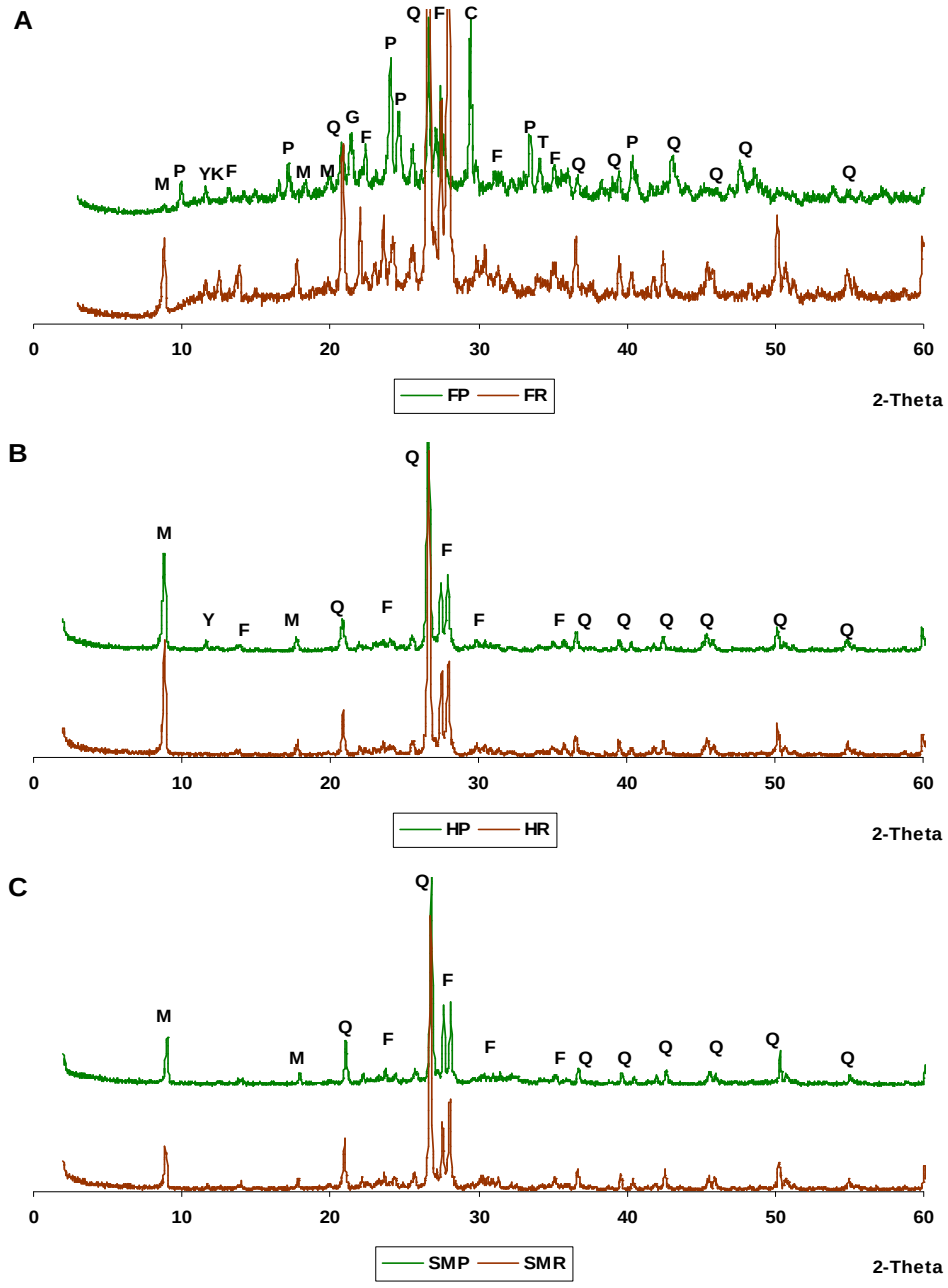


Figura 34: A: Difractogramas de rayos-X de A: la pátina del Palacio de Fonseca (FP) y de la roca subyacente (FR), B: la pátina de Historia (HP) y de la roca subyacente (HR) y C: la pátina del Convento del Carmen de Padrón (PAP) y de la roca subyacente (PAR). Q: cuarzo; M: biotita/moscovita; F:feldespato potásico/plagioclasas; K: Caolinita; Y: yeso; P: pseudocotumnita (KPb_2Cl_5/ KCl. $2PbCl_2$,) C: Calcita, T: Portlandita; G: gohetita.

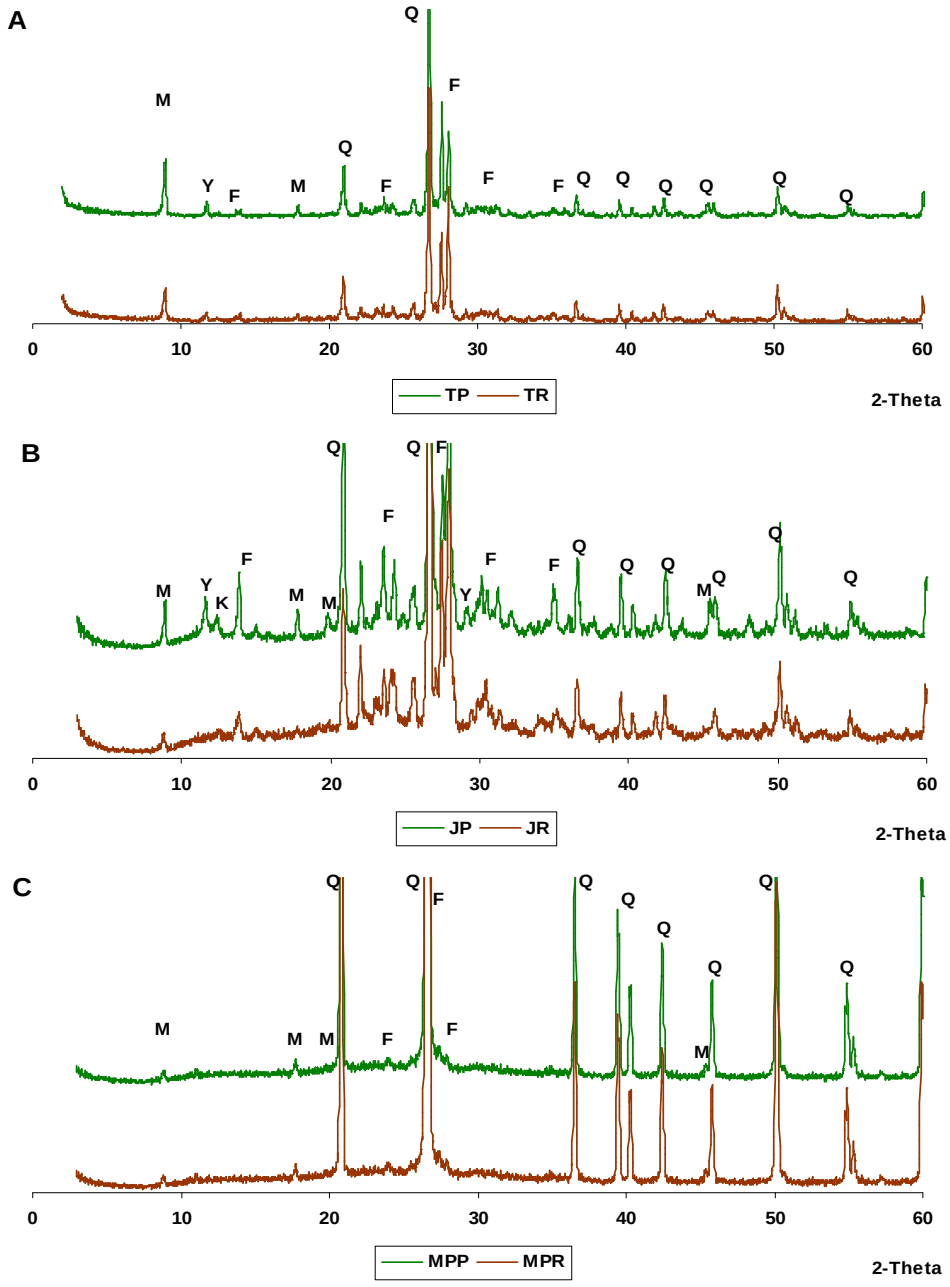


Figura 35: Difractogramas de rayos-X de A: la pátina del Toural (TP) y de la roca subyacente (TR), B: la Iglesia de San Jorge de A Coruña (JP) y de la roca subyacente (JR) y C: la pátina de la plaza de María Pita (MPP) y de la roca subyacente (MPR). Q: cuarzo; M: moscovita/biotita; F: feldespato potásico/plagioclasas; K: caolinita; Y: yeso.

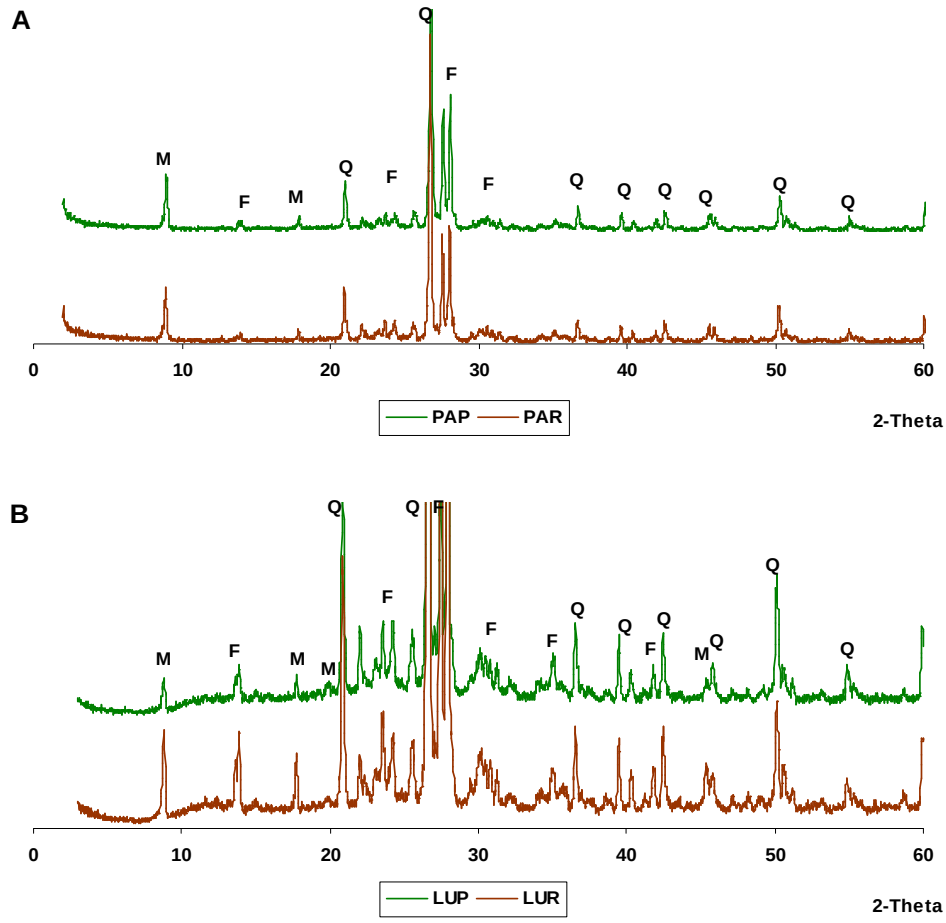


Figura 36: Difractogramas de rayos-X de A: la pátina del Convento del Carmen de Padrón (PAP) y de la roca subyacente (PAR) y B: la pátina de la Catedral de Lugo (LUP) y de la roca subyacente (LUR). Q: cuarzo; M: moscovita/biotita; F: feldespato potásico/plagioclasas; K: caolinita.

4.3 Caracterización química

4.3.1 Análisis elemental (CHNS)

Mediante este análisis se determinó el contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno, y azufre de las muestras de pátinas y de las muestras de roca sin pátina que se tomaron en un área adyacente en el mismo afloramiento o en el caso de los monumentos, en la misma pared.

En la Tabla 6 se muestran los porcentajes de cada uno de estos elementos así como la suma de todos ellos expresada en porcentaje con respecto al peso total de muestra. En el caso de los afloramientos naturales se puede observar un notable aumento en las pátinas con respecto de la roca sin pátina del contenido de carbono, hidrógeno y nitrógeno, y la inexistencia de azufre. Es una excepción la muestra de Campo Lameiro, donde en la pátina se detecta menos nitrógeno que en la roca y donde aparece cierta cantidad de azufre, aunque muy pequeña.

En los dólmenes, al igual que en los afloramientos, no hay azufre, y el carbono, hidrógeno y nitrógeno se comportan de forma diferente en cada caso. Así, en el dolmen de Axeitos hay un mayor porcentaje de estos tres elementos en la pátina que en la roca. En el dolmen de Cabaleiros hay más cantidad de carbono y de nitrógeno en la pátina que en la roca y para el nitrógeno ocurre lo contrario, es mayor en la roca que en la pátina. En el dolmen de Parxubeira el único elemento que se encuentra en mayor cantidad en la pátina que en la roca es el nitrógeno.

En los monumentos urbanos, es decir todos menos los dólmenes, lo más destacable es la presencia de azufre en casi todos ellos salvo en los siguientes

casos: en la iglesia de San Jorge, donde no hay azufre en la roca sin pátina pero sí en la pátina, y en la plaza de María Pita y la catedral de Lugo donde no hay azufre ni en la pátina ni en la roca sin pátina. El azufre aparece siempre en mayor cantidad en la pátina que en la roca sin pátina, salvo en el monasterio de San Martín Pinario donde ocurre lo contrario. En las pátinas del Toural, palacio de Fonseca e iglesia de San Jorge el porcentaje de azufre supera el 1 %.

El contenido de carbono es mayor en todas las pátinas con respecto a las rocas sin pátina salvo en la casa del Toural y en la catedral de Lugo. Destacan las pátinas de San Martín Pinario con un 2,51 % de carbono y sobre todo, la pátina de Fonseca donde el carbono llega a ser del 23,21 % del peso total de la muestra.

El contenido de hidrógeno y nitrógeno varía de unas muestras a otras. El hidrógeno es en general mayor en las pátinas que en la roca sin pátina pero hay algunas excepciones donde el porcentaje es igual en las dos muestras (casa del Toural) o donde ocurre lo contrario (convento del Carmen de Padrón). Para el nitrógeno hay una mayor variabilidad y hay muestras (San Martín Pinario, Historia, palacio de Fonseca, iglesia de San Jorge, plaza de María Pita, convento del Carmen de Padrón y en la catedral de Lugo) donde es mayor en la pátina que en la roca y muestras donde ocurre lo contrario (colegio Francisco Javier y Toural).

Teniendo en cuenta el total de estos cuatro elementos hay tres pátinas donde su porcentaje con respecto al total de la muestra supera el 2%. Se trata de las pátinas de la iglesia de San Jorge, donde estos elementos representan un 2,06% del total de la pátina, la pátina del monasterio de San Martín Pinario, donde representan un 3,69 %, y sobre todo la pátina del palacio de Fonseca donde estos elementos representan el 28,25 % del total de la muestra.

Tabla 6: Porcentaje de C, H, N, y S en las muestras de pátina y de rocas sin pátina, así como la suma de estos cuatro elementos expresados en porcentaje con respecto al peso total de la muestra (n.d: por debajo del límite de detección).

AFLORAMIENTOS					
Muestra	**%C**	**%H**	**%N**	**%S**	**%Total**
AXR	0,09	0,06	n.d	n.d	0,15
AXGP	0,19	0,10	0,02	n.d	0,31
AXNP	0,21	0,10	0,02	n.d	0,32
AXRP	0,31	0,12	0,03	n.d	0,46
CLR	0,12	0,16	0,02	0,01	0,30
CLP	0,27	0,27	n.d	0,09	0,62
CBR	0,07	0,11	n.d	n.d	0,18
CBP	0,40	0,15	0,03	n.d	0,59
LAR	0,07	0,13	n.d	n.d	0,20
LAP	0,49	0,20	0,03	n.d	0,72
P1R	0,10	0,18	0,02	n.d	0,30
P1P	0,49	0,20	0,05	n.d	0,75
P2R	0,12	0,17	0,02	n.d	0,32
P2P	0,46	0,22	0,04	n.d	0,72
TXR	0,10	0,13	n.d	n.d	0,23
TXP	0,16	0,15	n.d	n.d	0,31
MONUMENTOS					
	%C	**%H**	**%N**	**%S**	**%Total**
AXR	0,09	0,06	n.d	n.d	0,15
AXDP	0,16	0,08	0,02	n.d	0,26
CAR	0,28	0,45	0,06	n.d	0,80
CAP	0,32	0,22	0,09	n.d	0,62
PXR	0,33	0,27	0,01	n.d	0,61
PXP	0,19	0,13	0,09	n.d	0,41
FJR	0,08	0,12	0,01	0,15	0,36
FJP	0,29	0,16	n.d	0,31	0,76
FR	0,12	0,11	0,10	0,10	0,43
FP	23,21	3,56	0,42	1,06	28,25
HR	0,12	0,13	0,00	0,07	0,33
HP	0,19	0,23	0,07	0,46	0,96
SMR	0,02	0,17	0,04	0,45	0,68
SMP	2,51	0,52	0,44	0,22	3,69
TR	0,08	0,23	0,03	0,91	1,26
TP	0,01	0,23	n.d	1,42	1,66

Tabla 6: Continuación.

MONUMENTOS					
	%C	**%H**	**%N**	**%S**	**%Total**
JR	0,11	0,15	0,00	n.d	0,26
JP	0,37	0,30	0,11	1,29	2,06
MPPR	0,18	0,01	0,05	n.d	0,24
MPP	0,19	0,001	0,10	n.d	0,29
PAR	0,66	0,26	n.d	0,09	1,01
PAP	0,82	0,24	0,03	0,14	1,23
LUR	0,20	0,11	0,12	n.d	0,43
LUP	0,06	0,28	0,14	n.d	0,48

4.3.2 Análisis químico total por fluorescencia de rayos-X

En las tablas 7, 8 y 9 se muestran los resultados del análisis de los elementos químicos mediante la técnica de fluorescencia de rayos-X. En este caso se compararon muestras de las pátinas con las muestras de roca superficial tomadas en un área adyacente. Se han medido los elementos que forman parte de las rocas graníticas, tanto los que aparecen en mayor proporción como los minoritarios. El Si, Al, Fe, K, Mg, Ca, Ti, P y S se expresan como porcentaje de óxidos, mientras que el resto de los elementos se expresan en mg/kg.

En la tabla 7 se puede ver que mientras que en los afloramientos y en los dólmenes el contenido de azufre nunca supera el 0,2%, en los monumentos sin embargo, la cantidad de azufre es en general mucho mayor, salvo en la pátina y en la roca de la plaza de María Pita, y en las rocas de la Iglesia de San Jorge, de la Facultad de Historia y del convento del Carmen de Padrón. Hay tres muestras que destacan por la gran cantidad de azufre que poseen, son las pátinas de Fonseca, de la casa del Toural y de San Jorge donde el contenido de SO_2 supera el 3% del total de la muestra.

La pátina de Fonseca se comporta de forma muy diferente del resto ya que, con respecto de la roca, posee mucho menos silicio y aluminio y sin embargo hay un incremento relativo muy grande de otros elementos como son el calcio y el azufre.

Con este análisis también se aprecia que en la pátina de San Martín Pinario existen unos porcentajes de fósforo y calcio elevados alcanzando un valor de 2,96 % para el P_2O_5 y en el caso del CaO un valor de 8,77 % respecto al total de la muestra.

En los afloramientos lo único destacable es la ganancia de hierro en la pátina negra de Axeitos.

Por otra parte se analizaron otros elementos que pueden aparecer en mucha menor proporción, para ver la relación entre ellos y analizar si tienen alguna relación en la formación de pátinas negras. Estos elementos son: Cl, Cr, Mn, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Br, Rb, Sr, Y, Zr, Ni. In. Cs, Hg y Pb En la tabla 8 se muestran los resultados de este estudio.

Para los afloramientos (tabla 8) lo más destacable es la gran cantidad de cloro que poseen las pátinas negra de Axeitos y la de Corrubedo en comparación con las rocas limpias de esos mismos afloramientos. Además AXNP también contiene mucho más manganeso y zinc que la roca sin pátina (AXR).

Para el caso de los monumentos (tabla 9) lo más destacable es la gran cantidad de plomo de la pátina de Fonseca, hasta el punto que satura el aparato de fluorescencia y no se consigue saber la cantidad (es decir es mucho mayor de 1162 mg/kg que es el límite máximo de cuantificación para este elemento). Además, en esta misma muestra los valores de cloro para la pátina son muy altos alcanzando los 23644 mg/kg. Otros aspectos curiosos son la presencia de

mercurio en la pátina de Historia (en la roca también se detecta pero en mucha menor cantidad) y la presencia de arsénico en la pátina y la roca sin pátina de catedral de Lugo.

Con los datos del análisis de fluorescencia de rayos-X se ha calculado la relación que existe para cada elemento entre la pátina y la roca sin patina recogida en el mismo afloramiento o monumento. Teniendo en cuenta que al encontrarse en un lugar próximo, la pátina y la roca sin pátina están sometidas a condiciones ambientales similares, este índice permite ver en qué elementos está enriquecida la pátina con relación a la roca limpia. Cuando esta relación es igual a 1 indica que no hay variación en la cantidad del elemento analizado, valores mayores de 1 indican que hay una ganancia del elemento estudiado en la pátina y valores menores de 1 indican que hay una pérdida del elemento con respecto de la roca sin pátina.

En la figura 37 se muestra gráficamente ésta relación para los elementos mayoritarios en cada una de las muestras. Analizando por separado cada elemento podemos apreciar variaciones entre las muestras. El aluminio y el silicio, se comportan de la misma forma en todas las muestras exceptuando la pátina negra de Axeitos y la del dolmen de Cabaleiros. El comportamiento paralelo de ambos elementos se ve muy bien en el caso de la pátina de Fonseca donde la cantidad de ambos elementos es mucho menor en la pátina que en la roca.

También el titanio y el hierro presentan el mismo comportamiento, siendo únicamente destacable la ganancia de estos elementos en la pátina negra de Axeitos.

El Potasio presenta la misma proporción en la pátina que en la roca sin pátina. Sin embargo encontramos cierta ganancia de potasio en los afloramientos

de Axeitos , Corrubedo y en los dólmenes de Axeitos y Cabaleiros y ganancias muy importantes de calcio en Fonseca, San Martín Pinario y San Jorge, ya que en todas ellas este índice supera el 3 %. Además en la pátina negra de Axeitos y en el dolmen de Cabaleiros también se observa cierta ganancia de calcio.

Para el azufre y el fósforo también hay ganancia de estos elementos en algunas de las muestras. Con respecto al fósforo, hay una ganancia importante en la muestra negra de Axeitos y en las muestras de los monumentos de San Martín Pinario y San Jorge y en el caso del azufre las ganancias mayores aparece en la muestra de San Jorge.

Esta relación se ha calculado también para los elementos que se encuentran en menor concentración. Los resultados se muestran en la figura 38 donde podemos ver que también en los elementos minoritarios hay ganancias en la pátina con respecto a la roca sin pátina. Así, en el caso de la muestra negra de Axeitos hay una ganancia importante de cloro, en la de Corrubedo hay ganancia de cloro y de bromo y en la de Campo Lameiro de galio. En el resto de los afloramientos no se observan ganancias importantes en ningún elemento.

En las pátinas de los tres dólmenes se observa una ganancia de cloro y en dos de ellos (Cabaleiros y Parxubeira) de Itrio y de zirconio aunque menos importantes que la de cloro.

En los monumentos urbanos es donde se observan los mayores enriquecimientos de estos elementos con respecto de la roca. Así, en la muestra de Fonseca se observa una ganancia importante de cloro, cromo, níquel, cobre, indio y plomo, en San Martín Pinario hay una ganancia importante en zinc y estroncio, en la Facultad de Historia hay una ganancia de mercurio, en la Catedral de Lugo de arsénico y plomo, en la Iglesia de San Jorge de zirconio y en el convento del Carmen de Padrón de itrio.

Tabla 7: Porcentajes de los elementos mayoritarios de las pátinas y rocas sin pátina expresados como óxidos, obtenidos mediante Fluorescencia de rayos-X. (n.d: Por debajo del límite de detección).

		%								
		SiO_2	Al_2O_3	CaO	MgO	K_2O	Fe_2O_3	TiO_2	SO_3	P_2O_5
Afloramietnos	AXR	79,61	11,81	0,39	n.d	4,76	1,67	0,14	n.d	n.d
	AXNP	74,64	17,06	0,94	3,18	4,89	5,93	0,72	0,13	0,12
	CBR	65,66	14,23	1,02	n.d	5,08	3,03	0,75	n.d	0,05
	CBP	74,64	17,06	1,02	3,18	4,55	3,05	0,69	0,13	0,12
	CLR	73,94	16,17	0,29	0,76	4,45	1,43	0,21	0,03	0,10
	CLP	72,91	16,89	0,31	0,88	4,51	0,80	0,29	0,04	0,08
	LAR	70,96	12,57	0,22	n.d	4,16	1,20	0,08	n.d	0,01
	LAP	74,86	14,81	0,17	0,51	4,31	1,44	0,08	0,01	0,02
	P1R	68,61	15,10	0,59	n.d	4,54	2,07	0,50	0,01	0,11
	P1P	67,37	14,61	0,67	0,18	5,76	2,43	0,65	0,03	0,07
	P2R	66,17	14,93	0,64	n.d	5,57	3,09	0,71	n.d	0,08
	P2P	65,79	14,89	0,48	n.d	6,83	2,86	0,66	n.d	0,04
	TXR	70,94	14,19	0,59	n.d	4,85	1,63	0,27	n.d	0,06
	TXP	71,05	13,93	0,43	0,61	4,93	1,70	0,27	0,01	0,07
Monumentos	AXDR	79,61	11,81	0,39	n.d	4,76	1,67	0,14	n.d	n.d
	AXDP	77,92	12,57	0,29	1,04	5,00	2,04	0,15	0,02	0,02
	CAR	58,32	14,66	0,60	0,03	4,47	8,59	1,50	n.d	0,01
	CAP	63,69	12,38	1,78	0,83	3,54	8,08	1,31	0,12	0,05
	PXR	66,75	15,61	0,43	n.d	5,35	1,92	0,32	0,02	0,03
	PXP	68,46	14,04	0,73	n.d	5,12	2,26	0,41	0,04	0,06
	FJR	67,41	13,42	0,76	n.d	4,40	1,63	0,33	0,55	0,05
	FJP	62,73	12,41	1,32	n.d	4,60	1,73	0,39	1,05	0,04
	FR	61,23	13,42	1,93	n.d	4,24	2,82	0,78	1,24	0,11
	FP	13,26	3,06	30,52	0,20	4,64	2,20	0,50	7,53	n.d
	HR	57,21	13,70	1,06	0,13	5,02	3,15	0,89	0,17	0,11
	HP	56,14	14,42	1,57	n.d	4,98	3,39	0,87	1,26	0,13
	SMR	61,19	13,06	1,09	n.d	4,79	1,80	0,38	1,06	0,08
	SMP	48,69	10,34	8,77	n.d	4,23	1,46	0,27	0,56	2,96
	TR	59,58	12,02	2,11	n.d	4,99	1,46	0,30	2,92	0,06
	TP	55,45	12,41	3,02	n.d	5,07	1,83	0,36	4,31	0,09
	JR	66,66	12,83	0,94	0,33	3,78	1,36	0,21	0,02	n.d
	JP	59,62	13,17	3,16	0,33	2,81	0,71	0,02	3,53	0,64
	MPR	98,90	3,00	0,07	0,33	0,40	0,10	0,02	0,02	n.d
	MPP	98,00	3,46	0,08	0,33	0,40	0,14	0,02	0,03	n.d
	PAR	62,47	14,47	0,60	n.d	3,83	1,62	0,35	0,17	0,08
	PAP	59,69	13,66	0,87	n.d	4,04	1,53	0,29	0,27	0,27
	LUR	65,98	14,21	0,73	n.d	4,31	1,04	0,18	0,29	0,18
	LUP	67,24	14,76	0,63	n.d	3,98	1,06	0,17	0,25	0,31

Tabla 8: Elementos químicos que aparecen en menor cantidad en las pátinas y rocas sin pátina de los afloramientos expresados en mg /kg utilizando la técnica de fluorescencia de rayos-X (n.d: por debajo del límite de detección).

		Elementos químicos en mg/kg																	
		Cl	Cr	Mn	Ni	Cu	Zn	Ga	As	Br	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	In	Cs	Hg	Pb
Afloramietnos	AXR	34,46	n.d	120	7,6	n.d	77,36	25,99	n.d	n.d	316,84	12,08	39,52	193,26	12,54	0,42	n.d	n.d	44,6
	AXNP	1649,09	n.d	482	n.d	n.d	289,77	40,65	n.d	n.d	445,81	29,83	33,58	389,3	15,59	0,97	n.d	n.d	52,8
	CBR	190,25	n.d	165	11,04	4,59	105,36	35,05	n.d	0,28	365,42	254,37	20,69	363,84	1,88	0,57	n.d	n.d	42,04
	CBP	1649,09	n.d	177,7	17,32	15,8	107,6	31,65	n.d	8,18	340,95	265,43	21,02	356,04	n.d	0,82	n.d	n.d	51,36
	CLR	141,84	47,41	180,9	8,48	n.d	89,41	25,92	n.d	n.d	480,52	51,28	16,64	80,07	13,16	0,46	n.d	n.d	40,4
	CLP	32,81	51,21	112,7	20,57	5,3	72,51	63,82	n.d	n.d	460,8	29,09	20,69	45,58	27,85	0,42	n.d	n.d	20,46
	LAR	29,52	39,14	197,3	7,55	6,78	55,84	20,5	13,3	n.d	367,06	37,16	27,14	57,93	11,13	0,37	0,04	n.d	20,91
	LAP	15,87	42,58	301,1	7,33	1,51	54,54	24,15	n.d	2,36	442,13	20,98	23,47	57,03	11,02	0,46	0,3	n.d	36,16
	P1R	35,36	50,42	221,5	18,86	0,61	105,78	30,65	12,6	n.d	438,78	85,58	23,67	214,11	9,51	0,67	n.d	n.d	54,36
	P1P	51,7	51,06	248,7	16,9	6,14	121,74	24,27	12,3	n.d	475,39	91,44	23,39	227,67	10,07	0,39	n.d	n.d	76,21
	P2R	37,32	44,46	254,6	17,81	8,83	135,53	28,2	3,51	n.d	428,66	99,48	26,54	239,58	7,87	0,58	n.d	n.d	39,92
	P2P	45,48	4,37	208,4	20,14	6,37	127,08	33,44	4,84	n.d	496,23	117,87	21,05	249,86	6,32	0,48	n.d	n.d	62,42
	TXR	53,2	31,6	142,7	5,95	8,82	83,93	34,2	n.d	n.d	421,04	77,56	20,72	97,43	13,23	0,77	n.d	n.d	46,19
	TXP	40,56	10,39	177,4	11,3	8,16	94,99	26,75	n.d	1,28	438,07	75,08	18,7	90,8	13,14	0,55	n.d	n.d	41,58

Tabla 9: Elementos químicos que aparecen en menor cantidad en las pátinas y rocas sin pátina de los monumentos expresados en mg /kg utilizando la técnica de fluorescencia de rayos-X (n.d:por debajo del límite de detección).

		Elementos químicos medidos en mg/kg																	
		Cl	Cr	Mn	Ni	Cu	Zn	Ga	As	Br	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	In	Cs	Hg	Pb
Monumentos	AXDR	34,46	n.d	120	7,6	n.d	77,36	25,99	n.d	n.d	316,84	12,08	39,52	193,26	12,54	0,42	n.d	n.d	44,6
	AXDP	315,67	17,1	129,4	1,92	0,71	63,09	28,84	n.d	n.d	416,83	9,78	77,26	268,83	17,33	0,49	n.d	n.d	50,8
	CAR	n.d	n.d	449,3	17,05	19,07	106,28	29,05	n.d	3,49	170,91	129,58	32,36	359,75	13,73	1,07	n.d	n.d	81,11
	CAP	140,54	n.d	579,9	27,94	31,94	235,73	17,18	n.d	n.d	165,57	110,2	61,69	528,22	14,32	0,97	n.d	n.d	117,4
	PXR	90,23	n.d	115,4	15,36	n.d	77,42	12,31	n.d	12,9	279,19	179,78	23,37	101,67	8,11	0,5	n.d	n.d	77,57
	PXP	610,14	40,4	275,8	7,57	2,45	88,82	15,8	n.d	1,44	323,67	102,56	26,18	230,54	8,41	0,48	n.d	n.d	116,7
	FJR	340	42,89	153,4	13,02	15,49	136	19,2	n.d	n.d	411,12	72,69	22,92	162,02	8,49	0,44	n.d	n.d	87,48
	FJP	111,47	13,78	202,3	16,53	21,5	230,34	n.d	n.d	n.d	391,81	80,55	30,85	180,47	7,46	0,34	n.d	n.d	558,2
	FR	1048,55	31,88	315,9	10,51	11,16	115,19	26,32	n.d	n.d	363,71	123,15	32	307,6	14,72	0,66	n.d	n.d	47,18
	FP	23644	310,8	260,7	196,7	196,06	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	195,58	3,53	5,53	n.d	n.d	>1162
	HR	846,35	21,59	249,4	24,12	13,3	117,14	22,21	n.d	n.d	415,22	140,01	25,17	369,96	8,68	0,93	n.d	0,76	71,47
	HP	494,28	40,46	311,1	16,96	19,2	198,35	21,83	n.d	n.d	398,54	131,45	25,8	435,71	5,79	0,71	n.d	36	82,41
	SMR	789,38	45,85	143,3	24,84	16,86	109,3	13,07	n.d	0,51	489,36	68,19	20,39	133,64	14,05	0,52	n.d	n.d	110,7
	SMP	1183,45	29,63	368,8	22,27	43,21	654,32	n.d	n.d	n.d	362,57	220,42	33,42	125,84	9,02	0,98	n.d	n.d	556,8
	TR	636,37	11,58	176,2	11,05	6,46	107,08	22,56	n.d	0,59	404,34	76,14	15,49	107,15	6,6	0,42	n.d	n.d	63,4
	TP	232,58	40,95	187,1	9,64	10,86	94,87	20,97	n.d	1,25	401,99	112,19	19,71	123,42	8,88	0,79	n.d	n.d	50,27
	JR	270,82	36,06	293,6	11,79	5,83	53,97	n.d	n.d	n.d	354,17	206,3	36,51	147,87	9,76	0,75	n.d	n.d	300,4
	JP	1132,4	22,23	317,6	8,25	11,21	276,02	15,28	n.d	n.d	878,66	109,19	19,3	27,69	9,64	0,73	n.d	1,49	163,7
	MPR	n.d	n.d	183,5	10,12	5,10	20,01	n.d	n.d	n.d	40,22	8,15	5,00	6,10	2,44	0,27	n.d	n.d	53,44
	MPP	n.d	19,2	184,2	10,15	2,6	22,29	n.d	1,47	n.d	46,81	7,84	5,54	6,15	2,84	0,28	n.	n.d	53,33
	PAR	196,22	41,98	191,3	16,32	11,9	111,15	20,93	n.d	3,36	401,92	158,94	27,45	115,04	6,42	0,72	n.d	n.d	78,96
	PAP	394,1	53,01	274,7	22,79	9,61	149,18	4,39	n.d	2,21	388,56	160,77	182,74	109,66	8,08	0,69	n.d	n.d	154,8
	LUR	288,87	26,89	153,2	1,59	2,65	98,02	24,23	3,89	n.d	370,79	69,81	19,44	97,41	12,73	0,73	n.d	n.d	70,25
	LUP	305,98	18,27	249,1	6,55	17,94	262,08	n.d	11,1	n.d	337,77	66,74	45,6	82,87	14,23	0,5	n.d	n.d	487,7

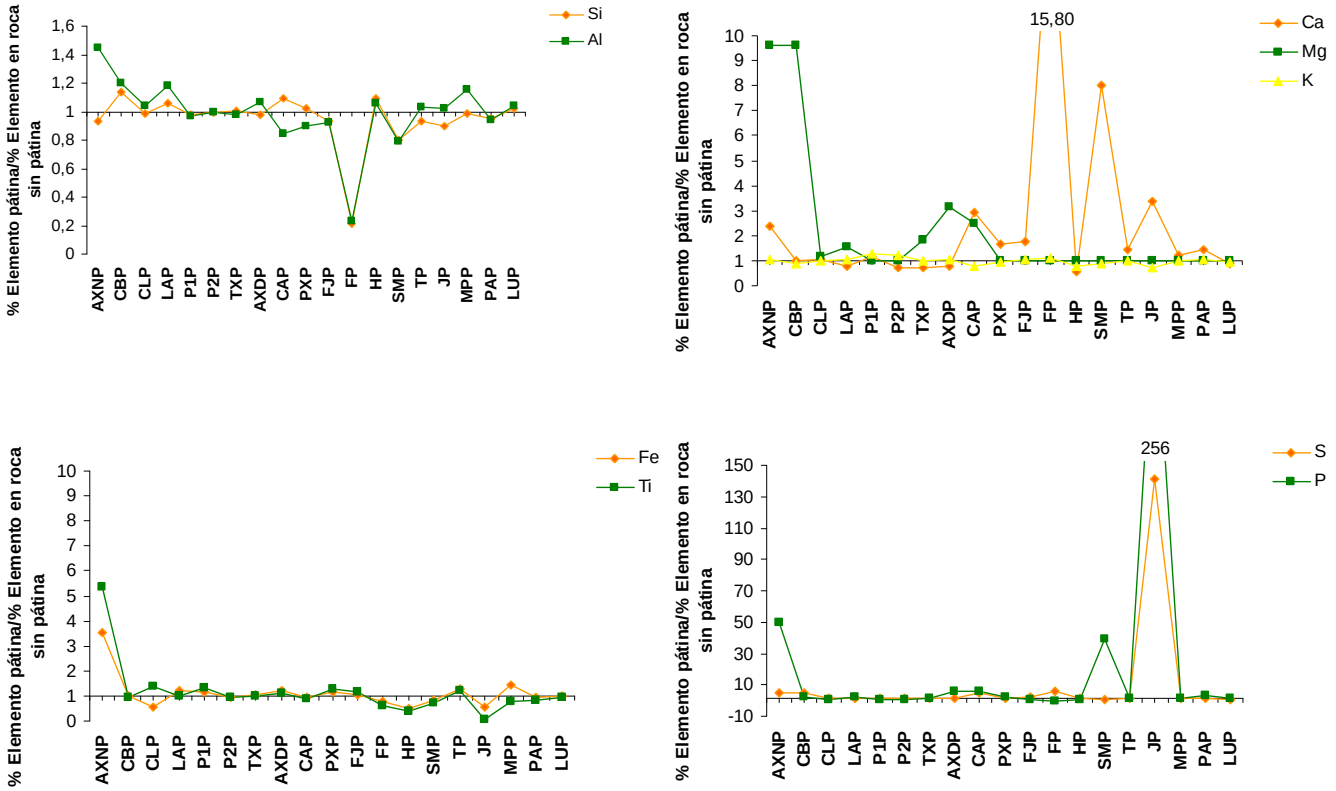


Figura 37: Representación gráfica de la relación % de elemento en la pátina/ % del elemento en la roca sin pátina para los elementos mayoritarios.

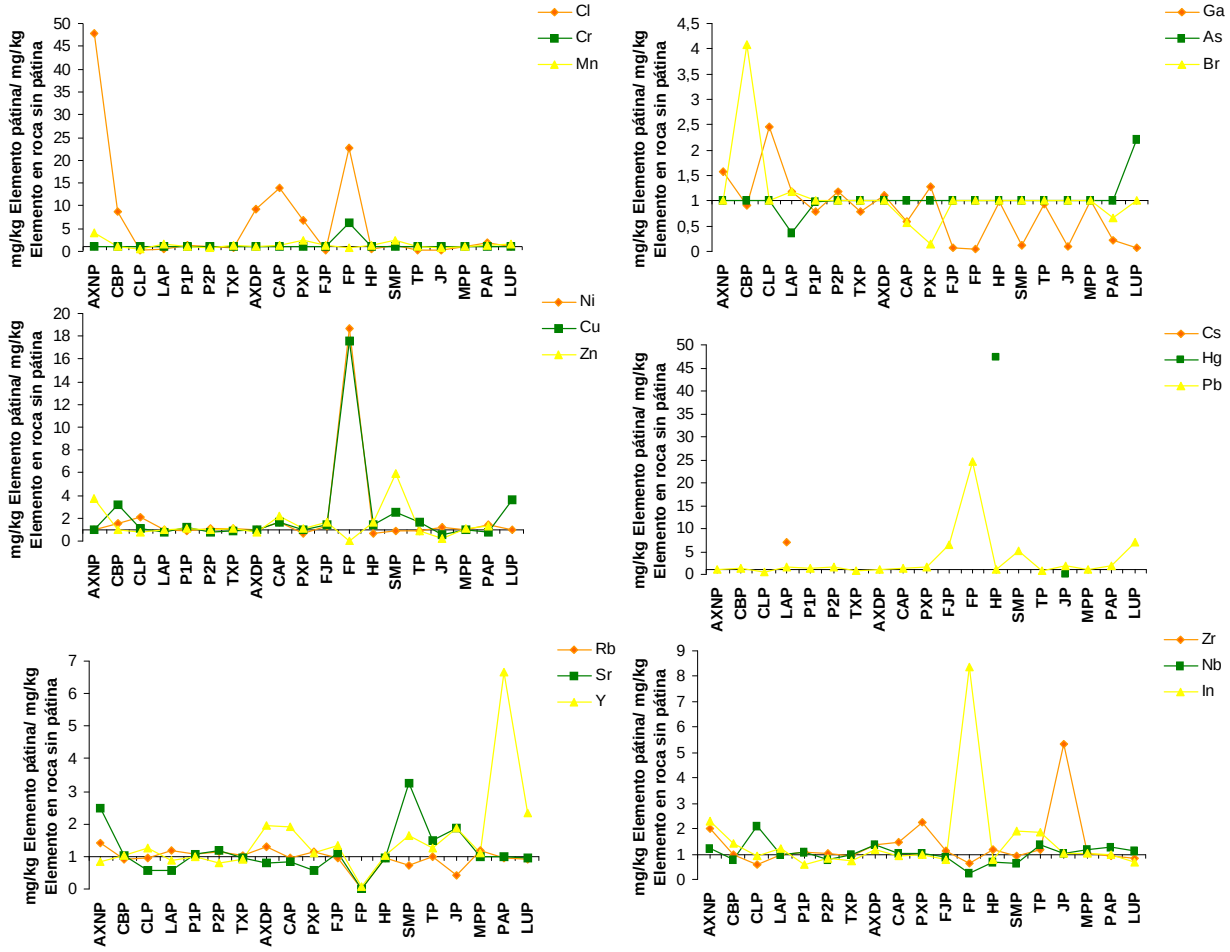


Figura 38: Representación gráfica de la relación de la concentración en mg/kg de elemento en la pátina/ mg/kg del elemento en la roca sin pátina para los elementos minoritario.

4.3.3 Microanálisis (EDAX)

Dado que es prácticamente imposible separar perfectamente la pátina de la roca sobre la que se encuentra, las muestras de las pátinas siempre llevan minerales que realmente no son constituyentes de ellas. Por tanto cuando se analizan elementos tales como carbono, hidrógeno, nitrógeno, propios de sustancias orgánicas y estructuras biológicas, al referir sus porcentajes a peso total de muestra, los granos minerales están ejerciendo un efecto de dilución y aparentemente la cantidad de los mencionados elementos en las pátinas es menor de la real. Debido a esto y como información complementaria se analizaron las pátinas y la roca por el reverso de la pátina, utilizando la microsonda de fluorescencia de rayos-X asociada al microscopio electrónico de barrido (EDAX). Se trató de coger un área suficientemente grande como para tener una composición representativa de ambas caras de la muestra. Además, esta técnica permite también hacer un análisis químico puntual de distintas estructuras o partículas observadas al microscopio electrónico.

En las figuras 39-46 se presentan los espectros obtenidos. En los afloramientos lo más destacable es la mayor cantidad de carbono en la pátina que en la roca subyacente, por lo que solamente se presentan algunas muestras a modo de ejemplo (figuras 39 y 40 a). Además en la pátina roja de Axeitos hay diferencias en el contenido de hierro, siendo éste mayor en la pátina que en la roca subyacente (Figura 39 A).

En los monumentos existe una mayor variedad de situaciones. En los dólmenes (figura 40B y 41) no hay ninguna diferencia importante entre la superficie de la pátina y la roca subyacente, sin embargo en los edificios sí se aprecian diferencias. El contenido de carbono no es en este caso la principal diferencia entre pátina y roca, ya que sólo en la pátina del Palacio de Fonseca

(Figura 44A) hay un contenido considerablemente mayor de carbono en la pátina que en la roca. En esta muestra también se detectaron cantidades grandes de plomo, cloro, y calcio tanto en la pátina como en la roca. La energía que corresponde al plomo se solapa con la del azufre, por lo que el pico que se indica como plomo es una mezcla de ambos elementos.

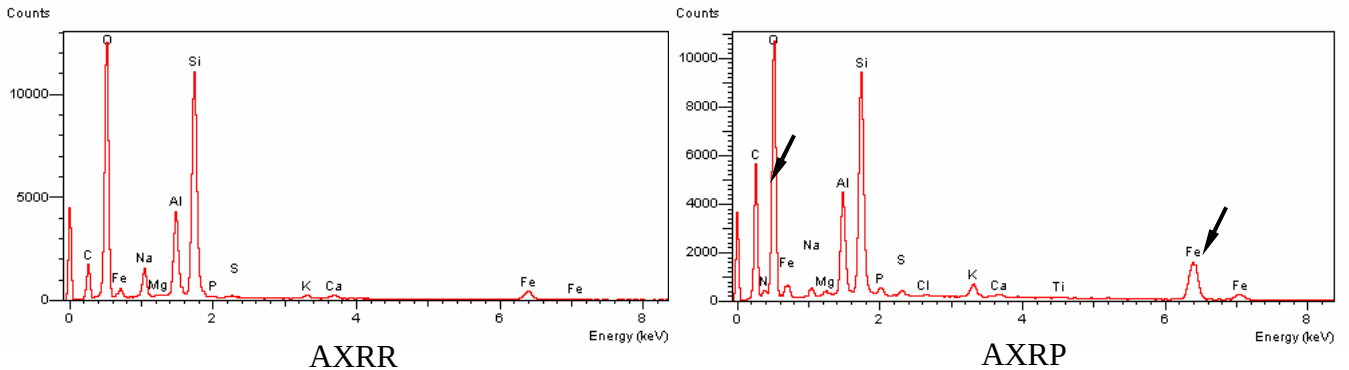
Esta técnica permitió corroborar la presencia de azufre y calcio en las muestras de monumentos urbanos, pero estos elementos aparecen tanto en las pátinas como en las rocas y en el caso de San Martín Pinario (figura 43A) el calcio es incluso mayor en la roca que en la pátina. La cantidad de azufre y calcio es importante sobre todo en las muestras del Toural, San Martín Pinario, Fonseca y San Jorge (figuras 43 y 44).

En las pátinas urbanas de San Jorge, de la Catedral de Lugo y del convento del Carmen de Padrón (figura 44B, 45B y 46) aparece también como formador de las pátinas el fósforo. En San Martín Pinario también hay fósforo, pero está en mayor cantidad en la roca que en la pátina (figura 43A).

En las figuras 47 a la 52 se presentan los espectros correspondientes a los análisis realizados en determinadas estructuras o partículas que se distribuyen en las pátinas y las cuales ya se habían comentado en el apartado del estudio morfológico realizado con el MEB. Así las partículas esféricas observadas en la pátina de Lamas Abade están constituidas por titanio o hierro principalmente (figuras 22 c, e y 47), las que aparecen en los dólmenes, por ejemplo las del Dolmen de Axeitos son principalmente de hierro y potásio (figura 28 b y 48A), y dentro de las encontradas en edificios hay una mayor diversidad. Las encontradas en la pátina del colegio Francisco Javier están formadas por hierro y calcio (Figura 24 d y 48B), las del Palacio de Fonseca que son de color brillante poseen cloro y plomo (figura 26 b y 49A) y las otras son de calcio y azufre (figura 49B). Algunas de las partículas de la iglesia de San

Jorge están formadas principalmente por calcio y otras por plata (figura 25 e y 50), y por último en la plaza María Pita aparecen algunas constituidas principalmente por hierro, otras por calcio, y algunas formadas esencialmente por carbono (figura 27 c, d y 52). Así mismo, se comprobó que los depósitos brillantes (es decir que reflejan los electrones) encontrados en la pátinas del Convento de Padrón (figura 26 c) y en la Catedral de Lugo (figura 26 d) están constituidos por plomo y fósforo principalmente (figura 51)

A



B

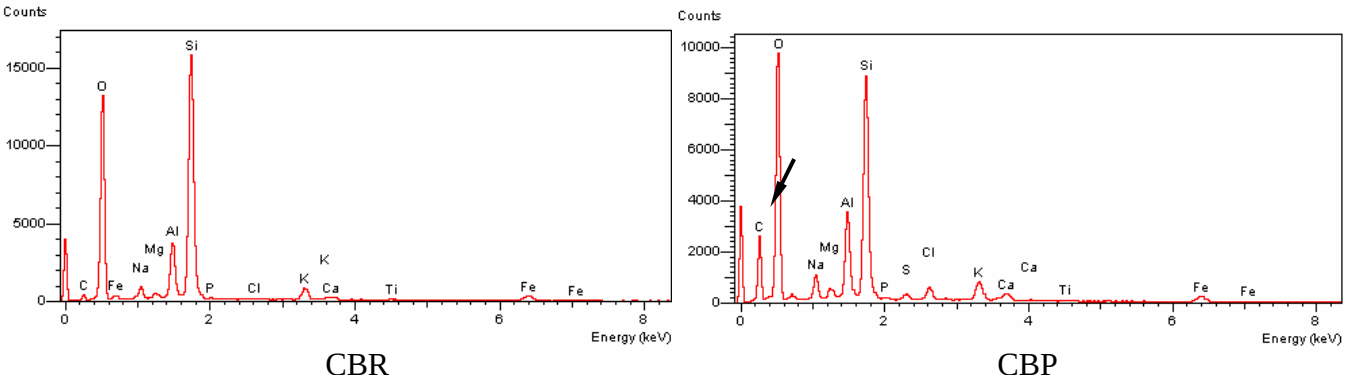


Figura 39: Microanálisis de la parte interna (izquierda) y de la superficie (derecha) de la pátina roja de Axeitos (A) y de la pátina de Corrubedo (B).

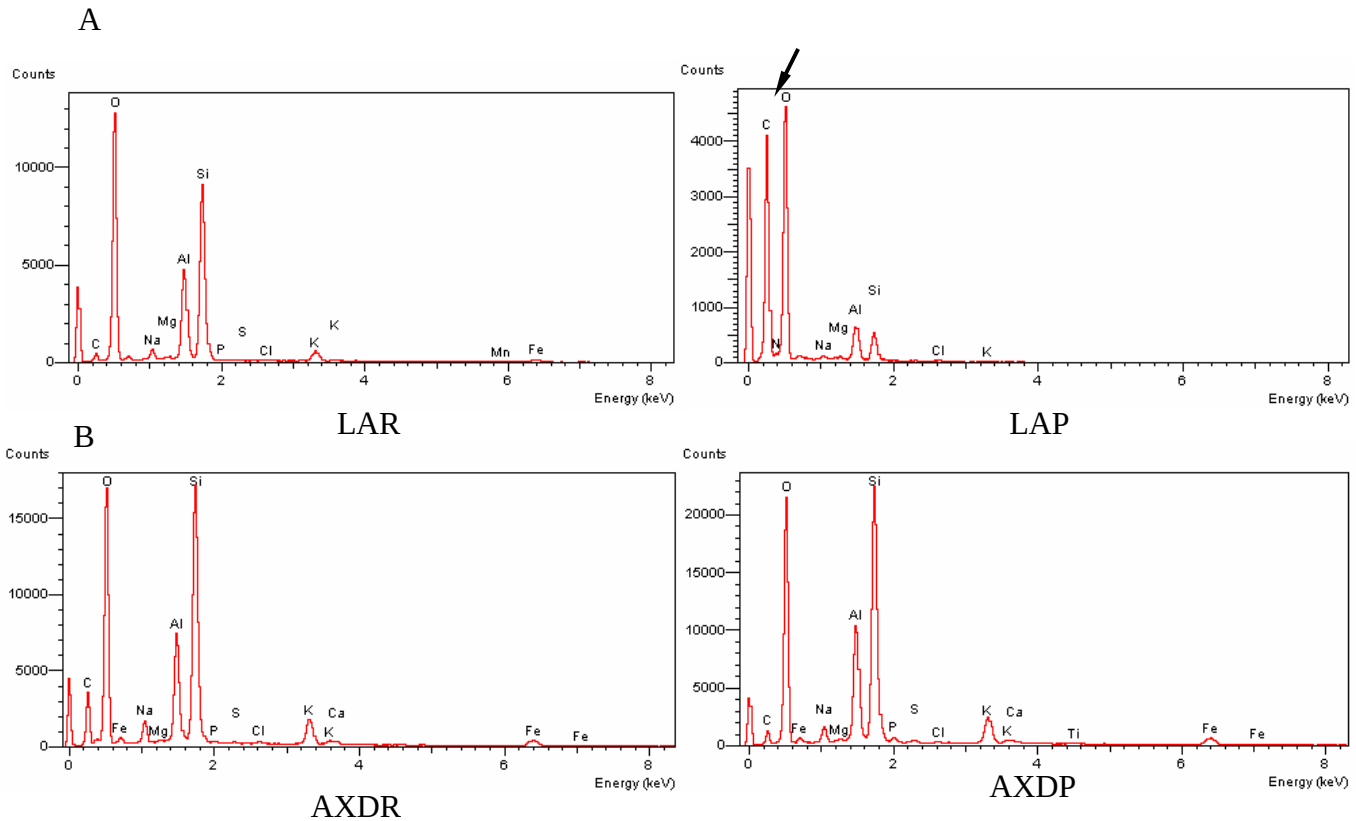


Figura 40: Microanálisis de la parte interna (izquierda) y de la superficie (derecha) de la pátina de Lamas de Abade (A) y de la pátina del dolmen de Axeitos (B).

A

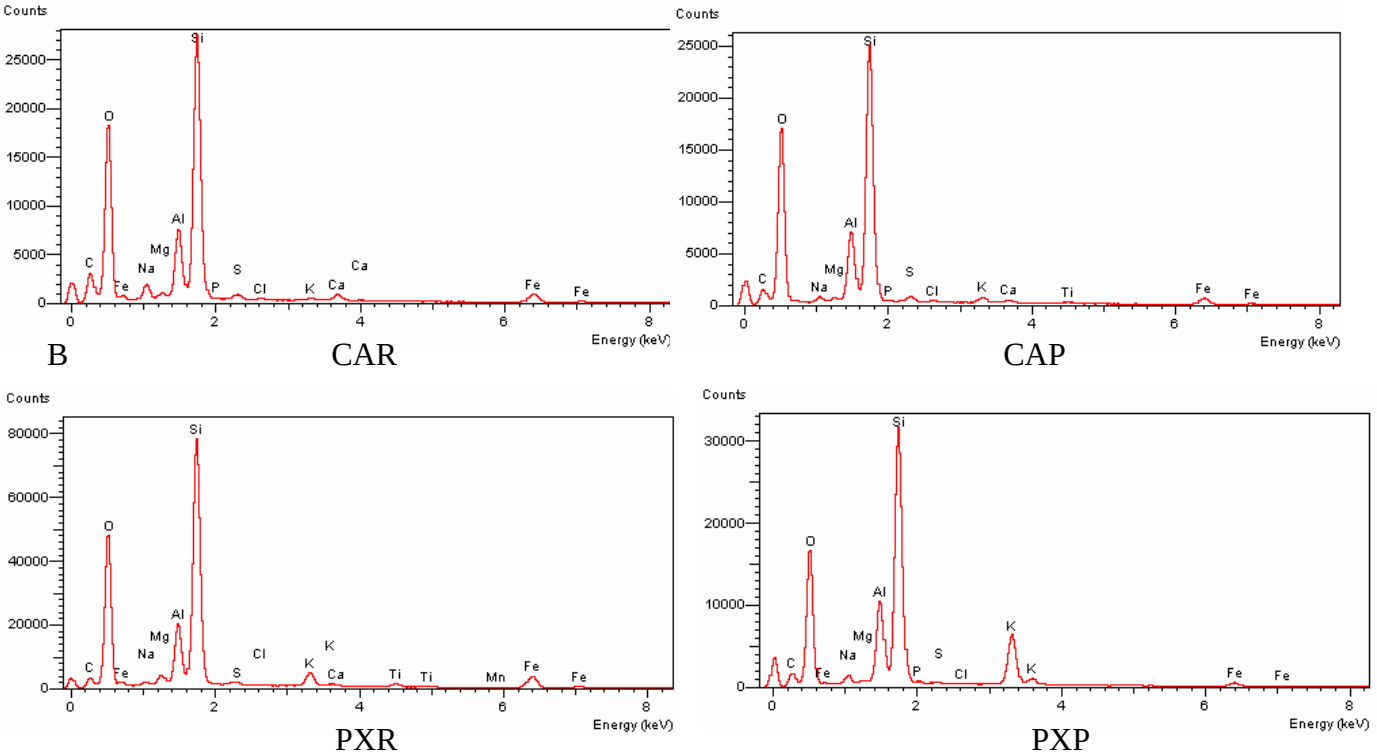


Figura 41: Microanálisis de la parte interna (izquierda) y de la superficie (derecha) de las pátinas de los dólmenes de Cabaleiros (A) y Parxubeira(B).

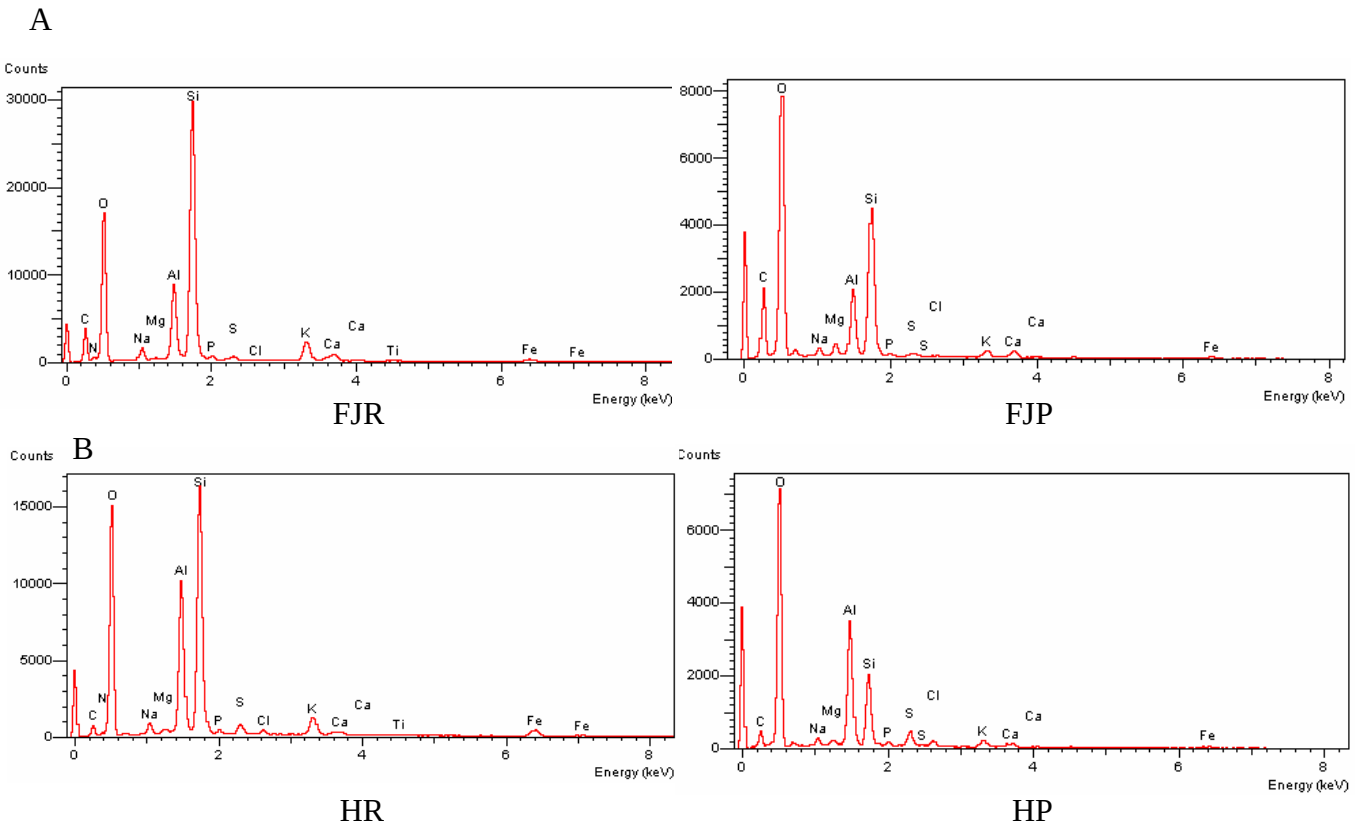


Figura 42: Microanálisis de la parte interna (izquierda) y de la superficie (derecha) de las pátinas del Colegio Francisco Javier (A) y de la Facultad de Historia (B).

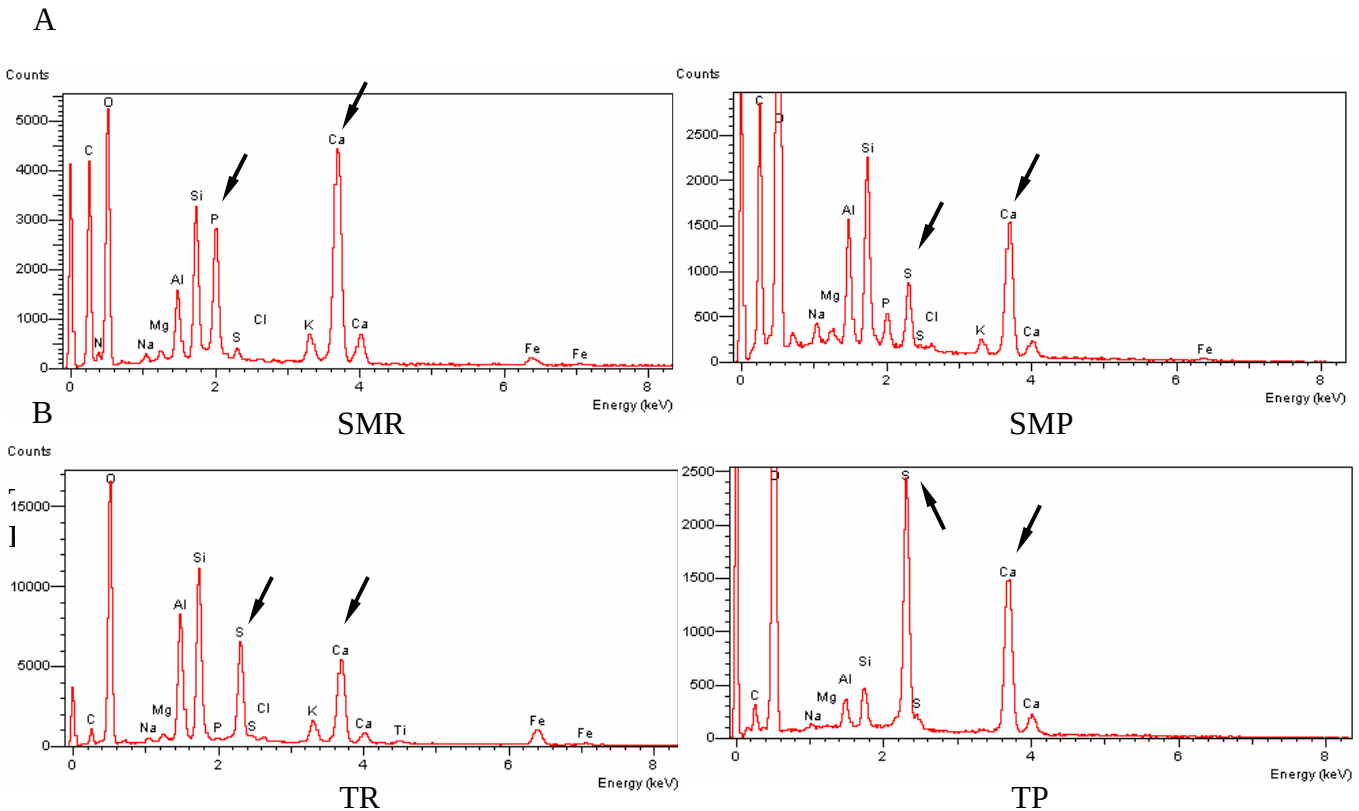


Figura 43: Microanálisis de la parte interna (izquierda) y de la superficie (derecha) de la pátina del Monasterio de San Martín Pinario (A) y de la Casa nº 2 de la plaza del Toural (B)

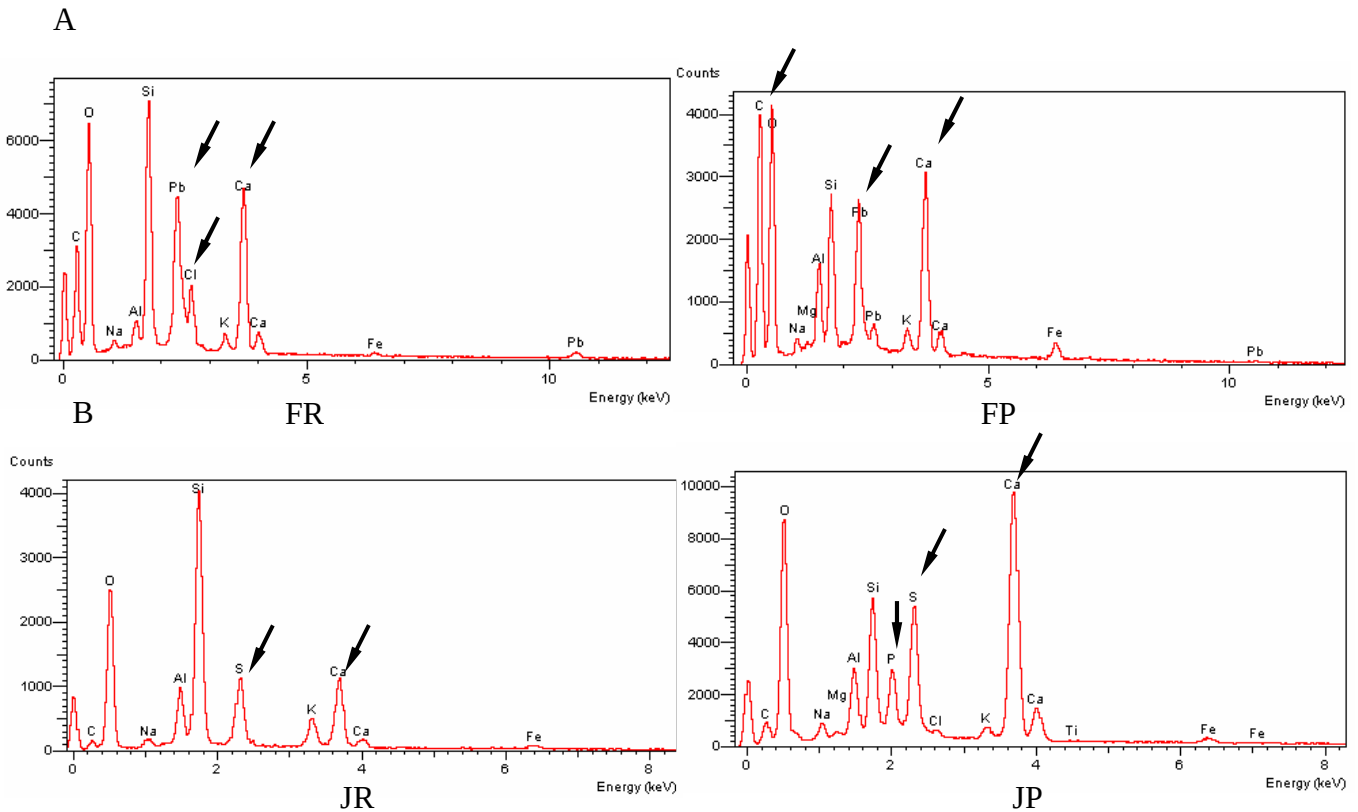


Figura 44: Microanálisis de la parte interna (izquierda) y de la superficie (derecha) de la pátina del Palacio de Fonseca (A) y de la Iglesia de San Jorge de A Coruña(B).

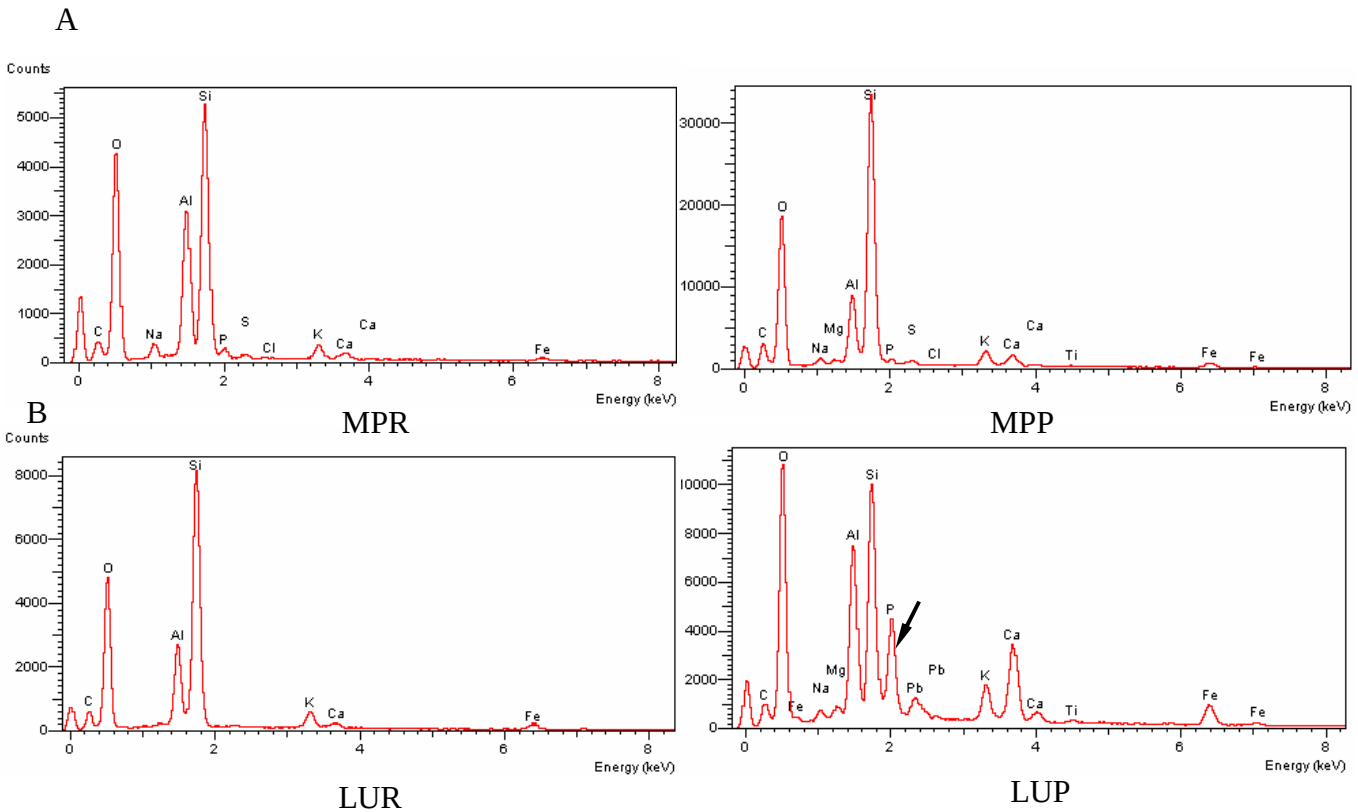


Figura 45: Microanálisis de la parte interna (izquierda) y de la superficie (derecha) de la pátina de la plaza de María Pita (A) y de la Catedral de Lugo (B)

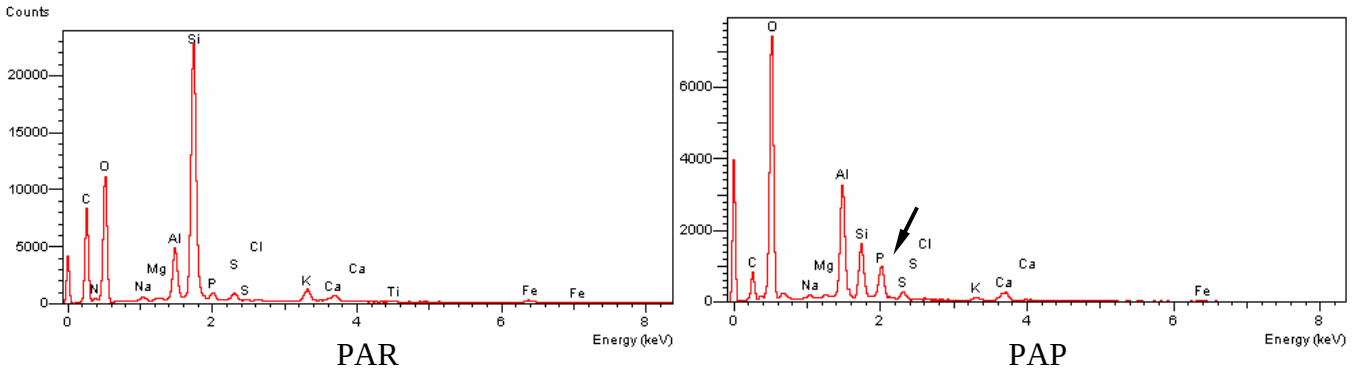


Figura 46: Microanálisis de la parte interna (izquierda) y de la superficie (derecha) de la pátina del convento del Carmen de Padrón.

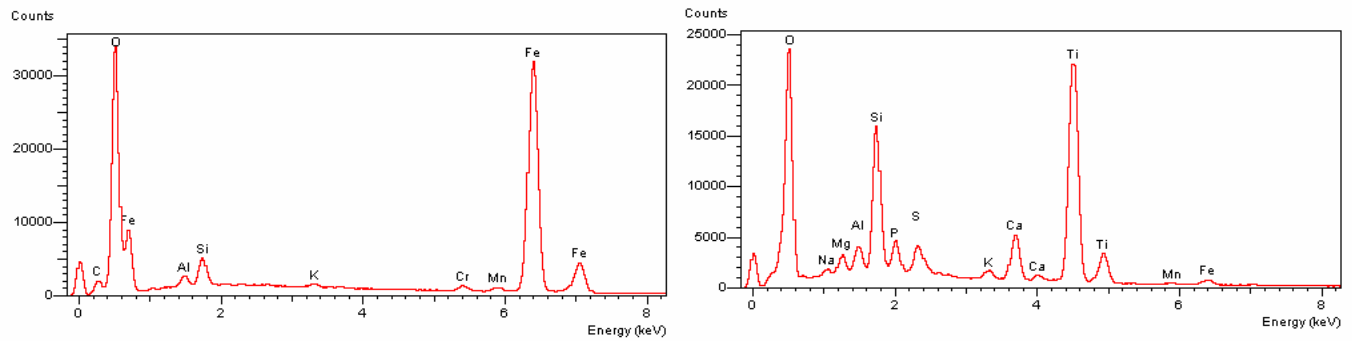


Figura 47: Microanálisis de las partículas encontradas en la pátina del afloramiento de Lamas de Abade.

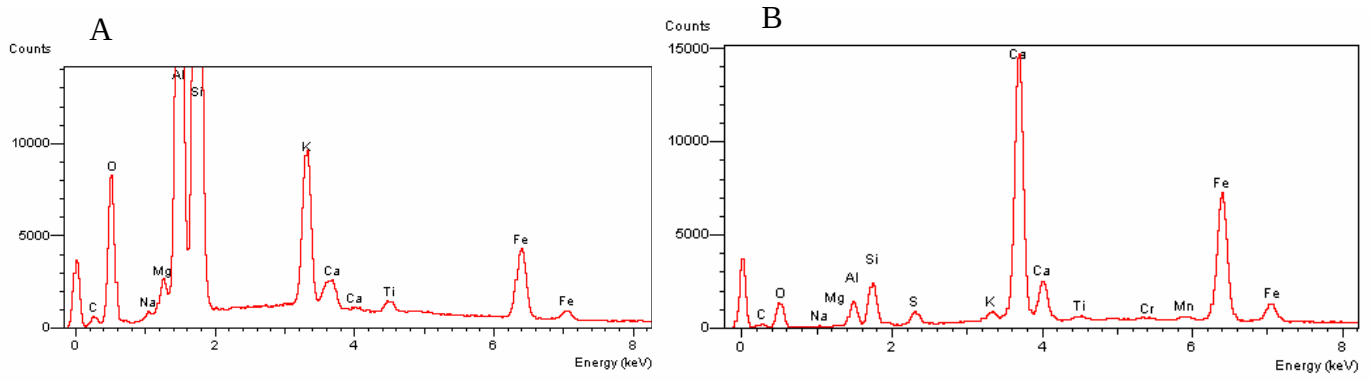


Figura 48: Microanálisis de las partículas esféricas encontradas en el dolmen de Axeitos (A) y en Colegio Francisco Javier (B)

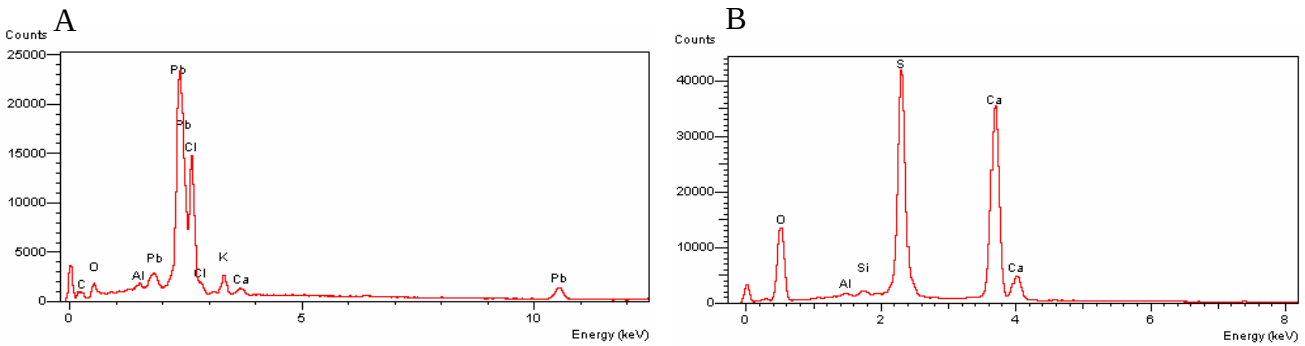


Figura 49: Microanálisis de dos partículas encontradas en la pátina del Palacio de Fonseca. Partícula brillante (A) y partícula de color blanquecino (B).

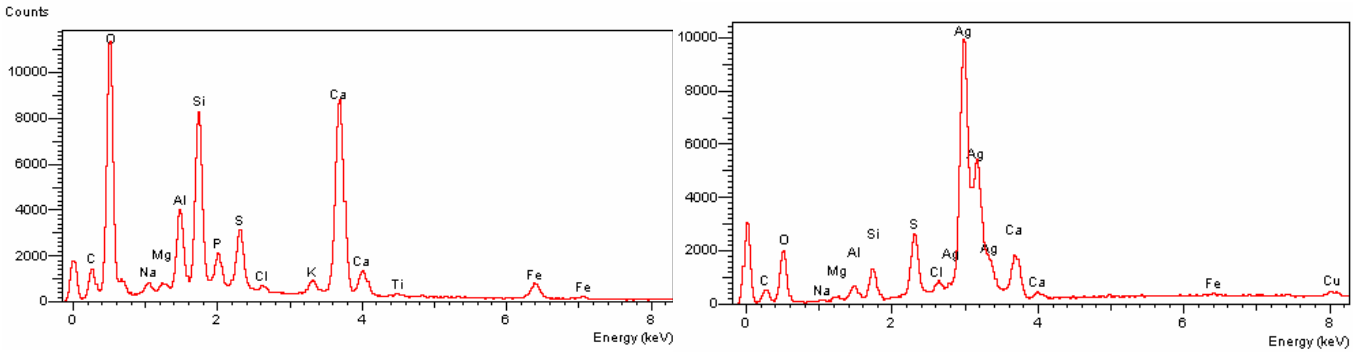


Figura 50: Microanálisis de partículas brillantes encontradas en la pátina de la Iglesia de San Jorge.

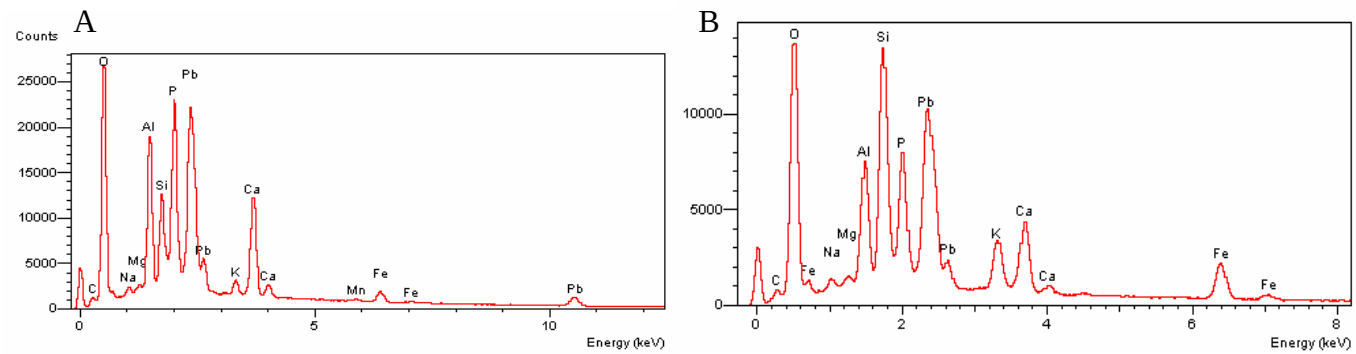


Figura 51: Microanálisis del depósito brillante encontrado sobre la pátina del convento de Padrón (A) y del encontrado en la pátina de la Catedral de Lugo (B).

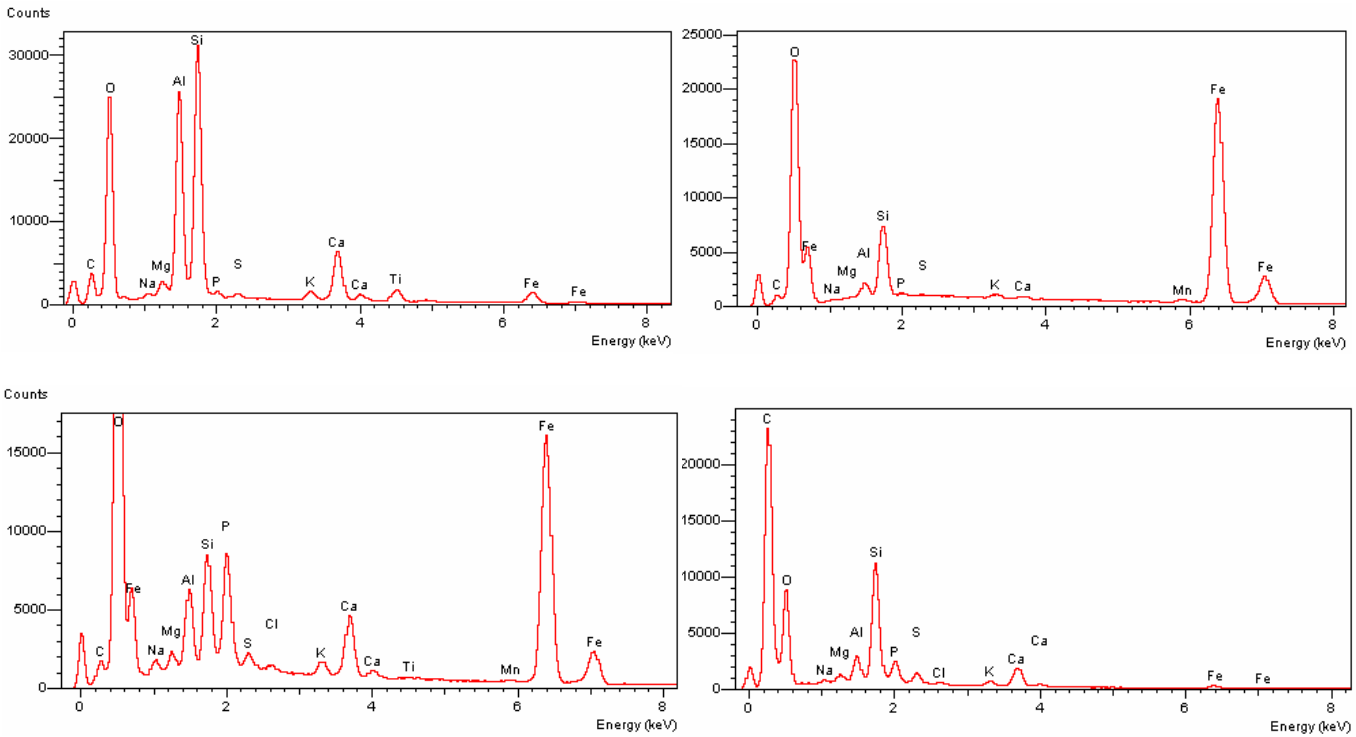


Figura 52: Microanálisis de las partículas que aparecen en la pátina de la plaza de María Pita.

4.3.4 Estudio de la distribución de elementos químicos

El estudio de las muestras preparadas en forma de probeta pulida ha sido de gran utilidad para conocer los elementos químicos que diferencian las pátinas de las rocas subyacentes, para ello se ha empleado la microsonda de fluorescencia de rayos-X asociada al MEB. Este tipo de estudio permite observar importantes rasgos morfológicos de las pátinas y su interacción con la roca sobre la que se asienta, así como analizar los elementos químicos que componen la muestra y su distribución espacial, en comparación con la roca.

Una consideración a tener en cuenta es que las muestras para la preparación de probetas pulidas es necesario incluir las muestras en una resina de poliester y por tanto formada sobre todo por carbono, por lo que al realizar el estudio de distribución de elementos el carbono de la resina se solapa con el que puede aparecer en la muestra y esto supone un inconveniente a la hora de observar la distribución del carbono en la muestra.

En las muestras analizadas, los elementos principales son el silicio y el aluminio. Los elementos que se encuentran en menor cantidad son precisamente los más interesantes, ya que son los que permiten diferenciar la pátina de la roca. El elemento o elementos diferenciadores varían de una pátina a otra, pero en general son, coincidiendo con los resultados anteriores, hierro, fósforo, azufre y calcio.

En las pátinas de afloramientos este análisis corroboró la naturaleza orgánica de la pátina ya que la cantidad de carbono es muy alta (figuras 53-56). Esta capa orgánica es bastante ancha sobre todo en las muestras de Corrubedo (CBP) y Campo Lameiro (CLP) (figuras 53 a y b y 53 c y d) donde al realizar el análisis de distribución se puede visualizar una zona con alta cantidad de

carbono que se diferencia bien de la resina. Son destacables también la pátina roja de Axeitos (AXRP) ya que en esta pátina hay mucho más hierro que en la roca (figura 54 a, b y c) y la pátina negra de Axeitos (AXNP) ya que aunque no tiene ningún elemento químico en la pátina diferente a la roca, las diferentes cantidades de silicio y aluminio establecen un claro límite entre pátina y roca (figura 54 d, e y f).

En las muestras de pátinas tomadas en los dólmenes la pátina negra es también de naturaleza fundamentalmente orgánica. En los dólmenes de Axeitos (DAXP) y Cabaleiros (CAP) la pátina es muy delgada y la única diferencia con la roca es la mayor cantidad de carbono que posee (figuras 56 d, e y f y 57 a, b y c). La pátina del Dólmen de Parxubeira (PXP) es de mayor espesor que las anteriores y está formada por una mezcla de partículas inorgánicas con la matriz orgánica (figura 57 d, e y f).

En los monumentos urbanos la casuística es mayor.

En la pátina del Colegio Francisco Javier (FJP) la única diferencia con la roca subyacente es la existencia de una mayor cantidad de carbono formando una capa muy delgada (figura 58 a, b y c). Esto mismo ocurre en la pátina de la Facultad de Historia (HP), donde tampoco se ven otras diferencias con la roca subyacente (figura 58 d, e y f). Podemos destacar que esta muestra posee S, aunque éste no se deposita formando una capa, sino que se encuentra repartido tanto por la pátina como por la roca (figura 58 f).

La pátina de Fonseca (FP) es una pátina muy diferente a cualquiera de las analizadas. Como se puede observar en la figura 59 está constituida por una gran cantidad de carbono, y presenta también como elementos mayoritarios azufre y plomo. Otros elemento que aparecen en gran cantidad son calcio, que aparece asociado al S/Pb, y cloro, que parece estar asociado al plomo. Esta

muestra era muy delgada y se separó muy bien de la roca, por lo que casi la totalidad de la muestra analizada corresponde a la pátina y por tanto la cantidad de aluminio y silicio es muy pequeña.

Las pátinas del Toural (TP) y San Jorge (JP) son capas de naturaleza muy diferente a la de la roca. En el caso de TP, la pátina está formada principalmente por calcio y azufre que penetran entre los granos minerales por fisuras y huecos (figura 60 d, e y f). JP al igual que en la pátina anterior está formada principalmente por azufre y calcio pero no penetra en la roca, existiendo una separación neta entre la pátina y la roca (figura 61 a, b y c).

Las pátinas de San Martín Pinario (SMP), la Catedral de Lugo (LUP) y el Convento del Carmen de Padrón (PAP) son muy similares, en las tres aparece como elemento diferenciador entre la pátina y la roca el fósforo, que aparece en la pátina y no en la roca. La pátina SMP es una pátina muy continua y bastante grande, constituida principalmente por fósforo y calcio, la parte más externa de la pátina presenta una coloración más oscura debido a su mayor contenido en carbono (figura 60 a, b y c). La pátina LUP es de menor espesor que la anterior; en este caso la cantidad de calcio no es claramente mayor en la pátina ya que el calcio aparece distribuido por toda la muestra, sin embargo el fósforo es el elemento diferenciador entre la roca y la pátina (figura 62 a, b y c). En la pátina PAP al igual que en la LUP, el calcio aparece distribuido por toda la muestra y es el fósforo el diferenciador entre pátina y roca (figura 62, d, e y f).

Por último la pátina recogida en el muro de la Plaza María Pita (MPP) es más parecida a las pátinas de afloramientos que a las de monumentos ya que lo único destacable es el mayor contenido de carbono en la pátina (figura 61 d, e y f).

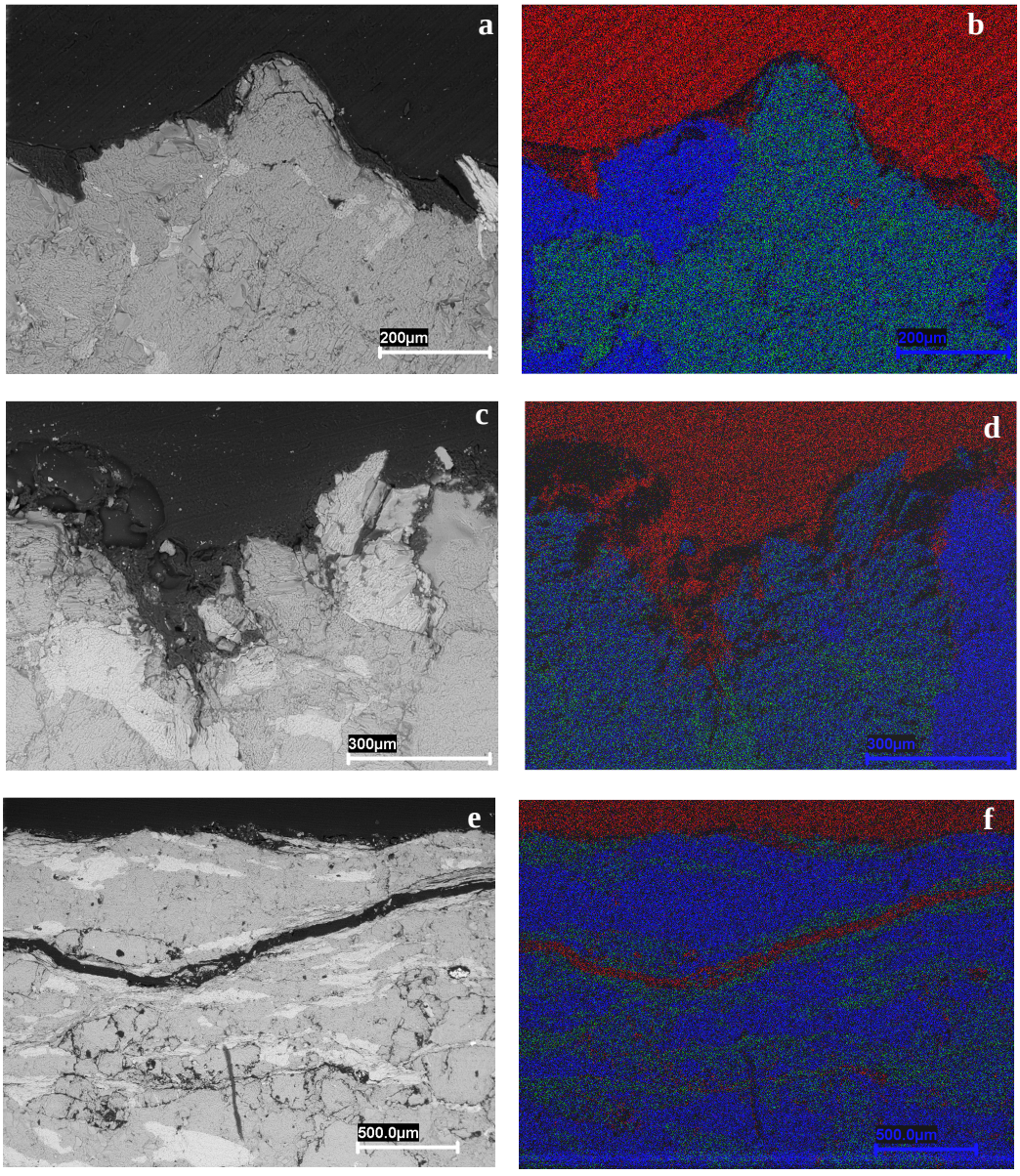


Figura 53: Fotografías y "maping" realizados con el microscopio electrónico de barrido en las pátinas de Corrubedo (a y b), Campo Lameiro (c y d) y Lamas de Abade (e y f). Las muestras fueron incluidas en resina y cortadas perpendicularmente a la superficie. C Al Si .

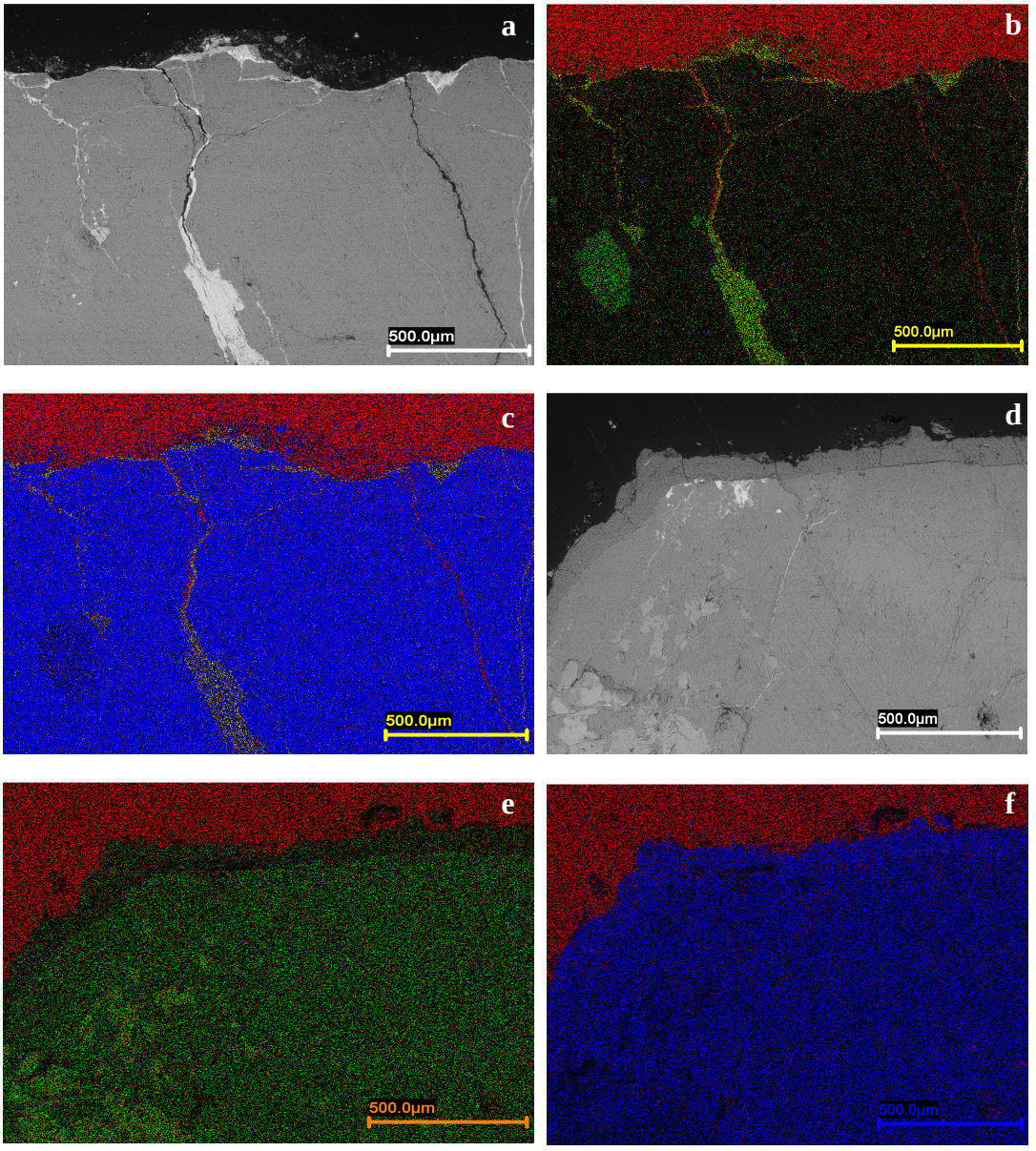


Figura 54: Fotografías y "maping" realizados con el microscopio electrónico de barrido de las pátinas roja (a, b y c) y negra (d, e y f) de Axeitos. Las muestras fueron incluidas en resina y cortadas perpendicularmente a la superficie.

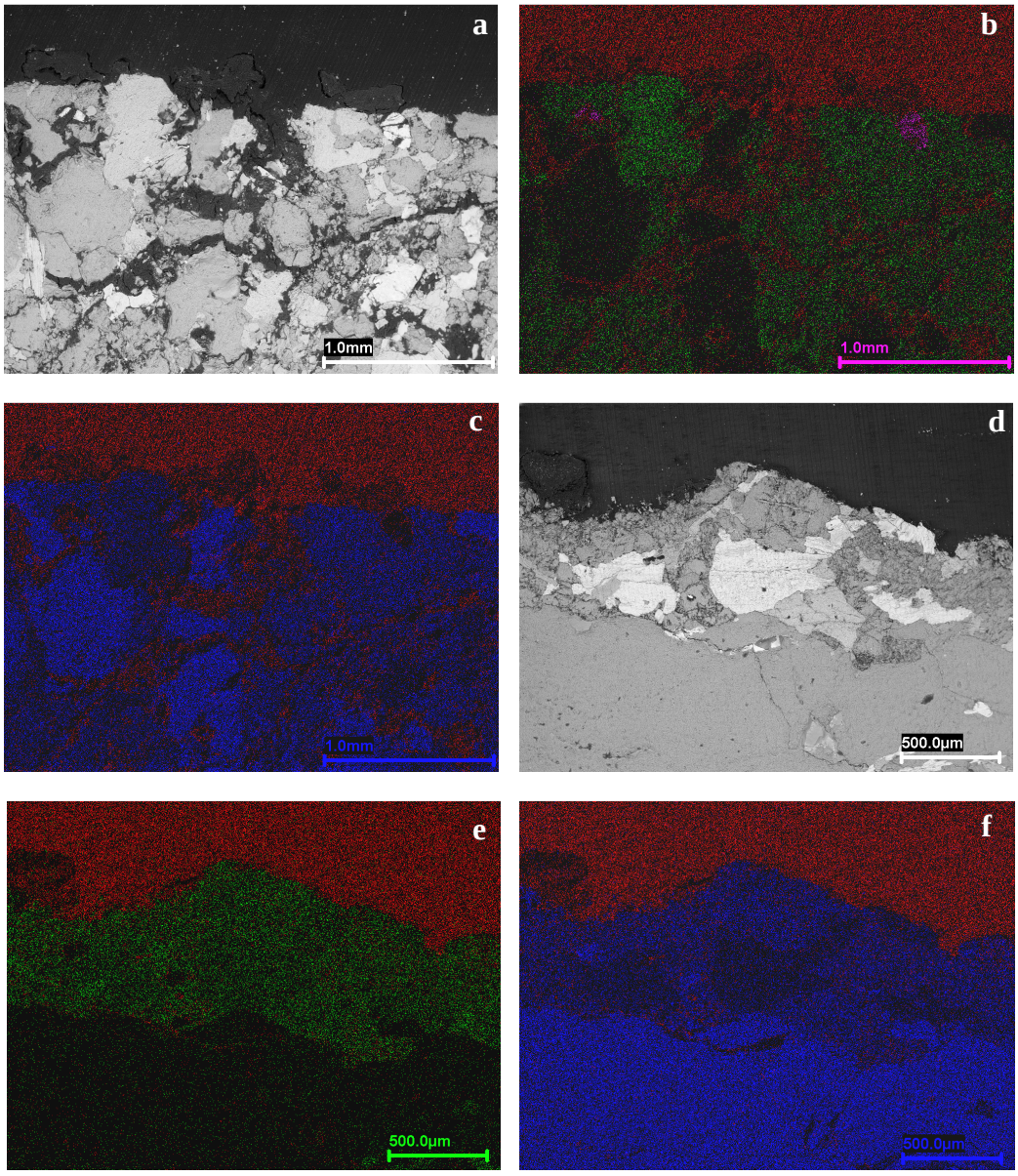


Figura 55: Fotografías y "maping" realizados con el microscopio electrónico de barrido en las pátinas del afloramiento 1 (a, b y c), y del afloramiento 2 del monte pedroso (d, e y f). Las muestras fueron incluidas en resina y cortadas perpendicularmente a la superficie. C Al Si Ca

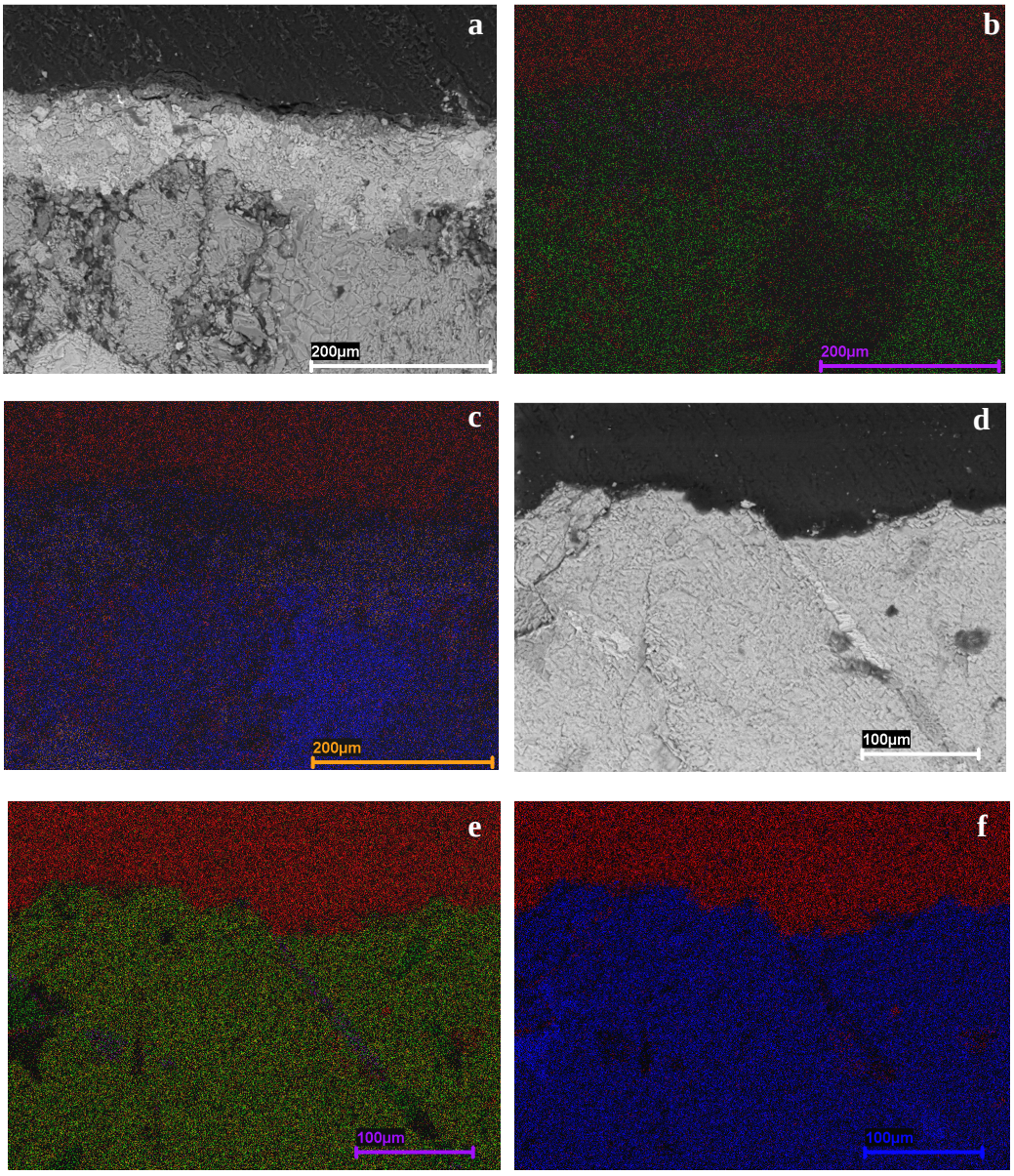


Figura 56: Fotografías y "maping" realizados con el microscopio electrónico de barrido en las pátinas de Toxosoutos (a, b y c), y del dolmen de Axeitos(d, e y f). Las muestras fueron incluidas en resina y cortadas perpendicularmente a la superficie

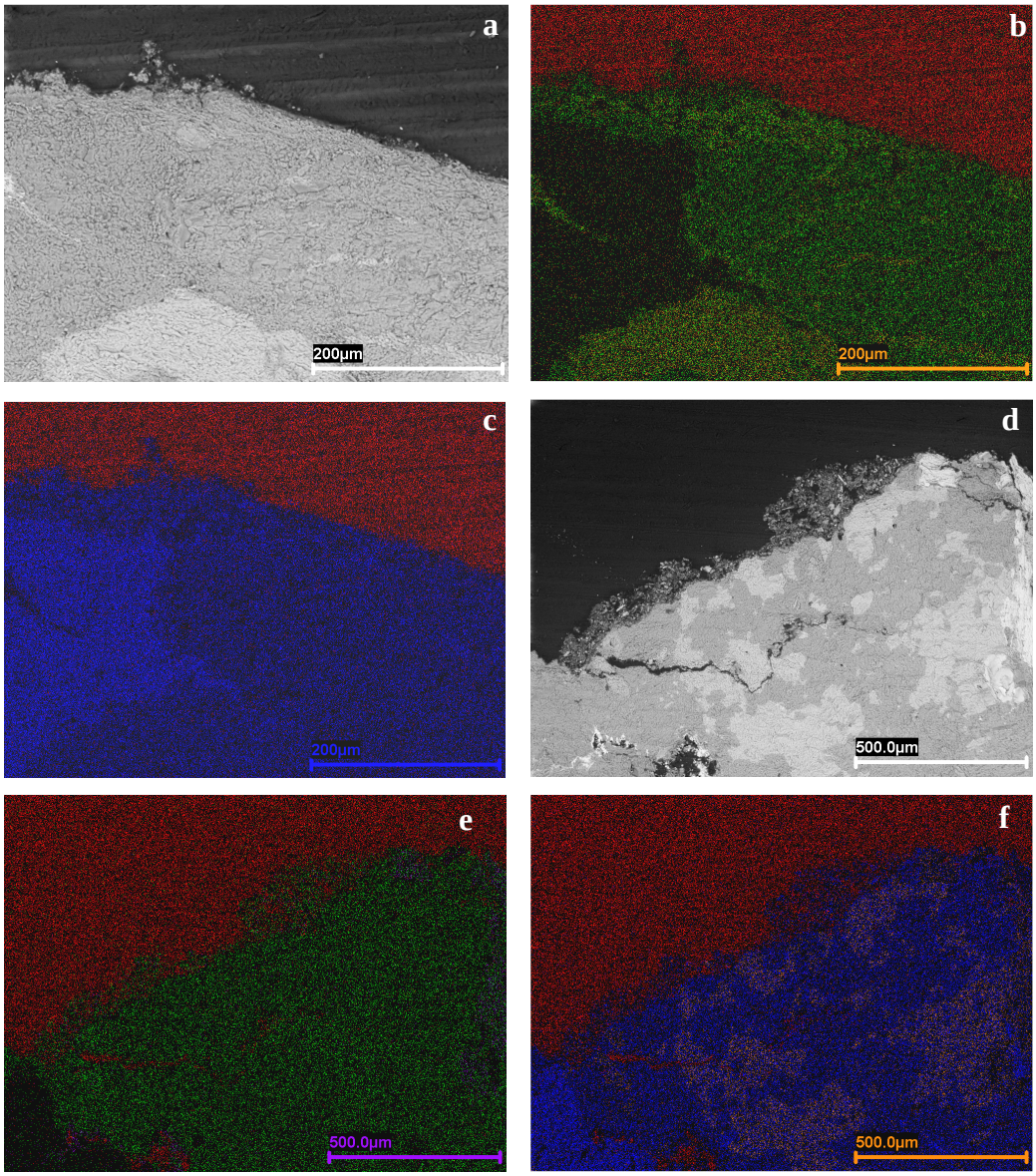


Figura 57: Fotografías y "maping" realizados con el microscopio electrónico de barrido en las pátinas de los dólmenes de Cabaleiros(a, b y c), y Parxubeira (d, e y f). Las muestras fueron incluidas en resina y cortadas perpendicularmente a la superficie. C Al Si K Fe

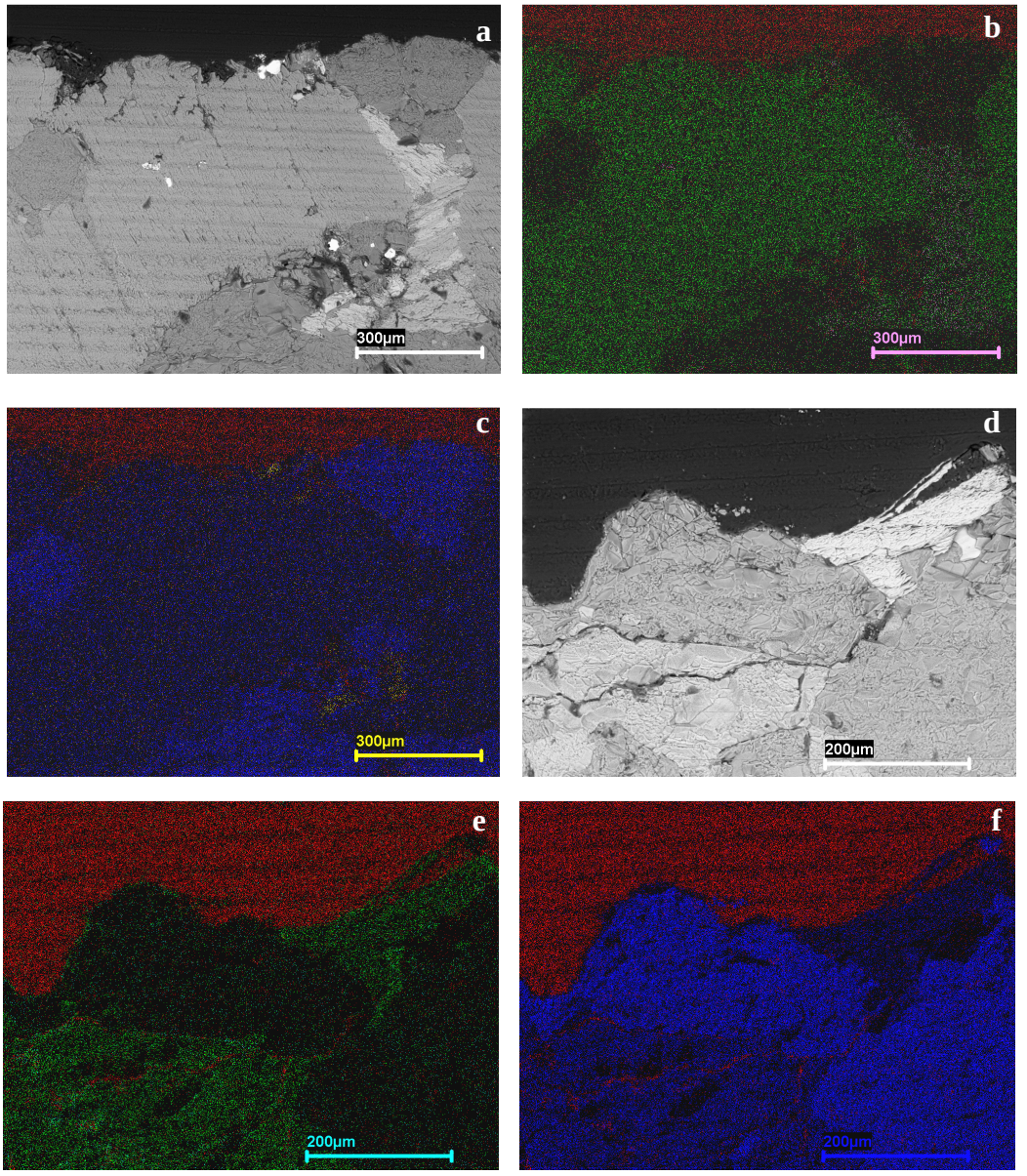


Figura 58: Fotografías y "maping" realizados con el microscopio electrónico de barrido en las pátinas del colegio Francisco Javier(a, b y c) y de la Facultad de Historia (d, e y f). Las muestras fueron incluidas en resina y cortadas perpendicularmente a la superficie. C Al Si S P Ca

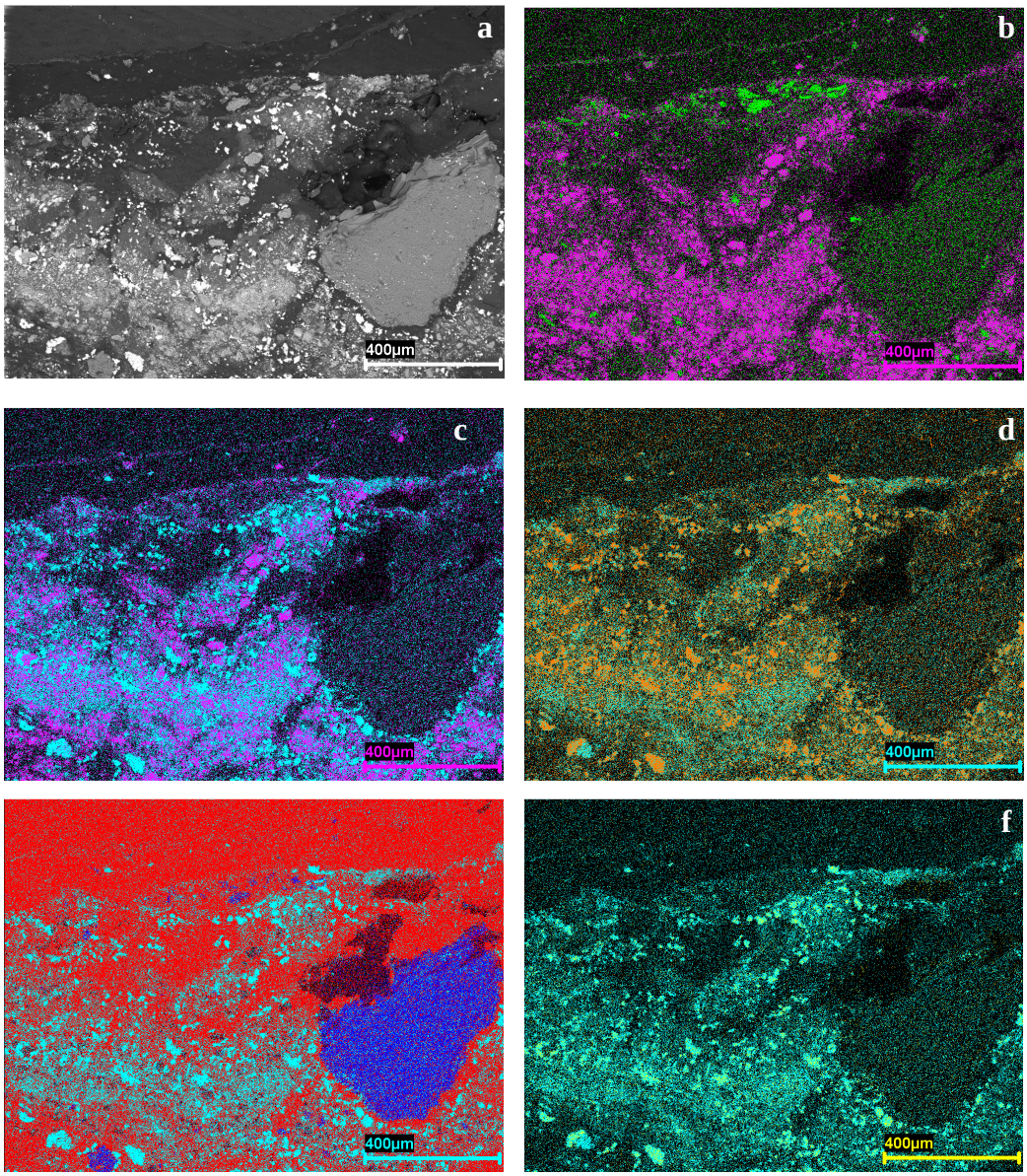


Figura 59: Fotografías y "maping" realizados con el microscopio electrónico de barrido en la pátina del palacio de Fonseca. La muestra fue incluida en resina y cortada perpendicularmente a la superficie.

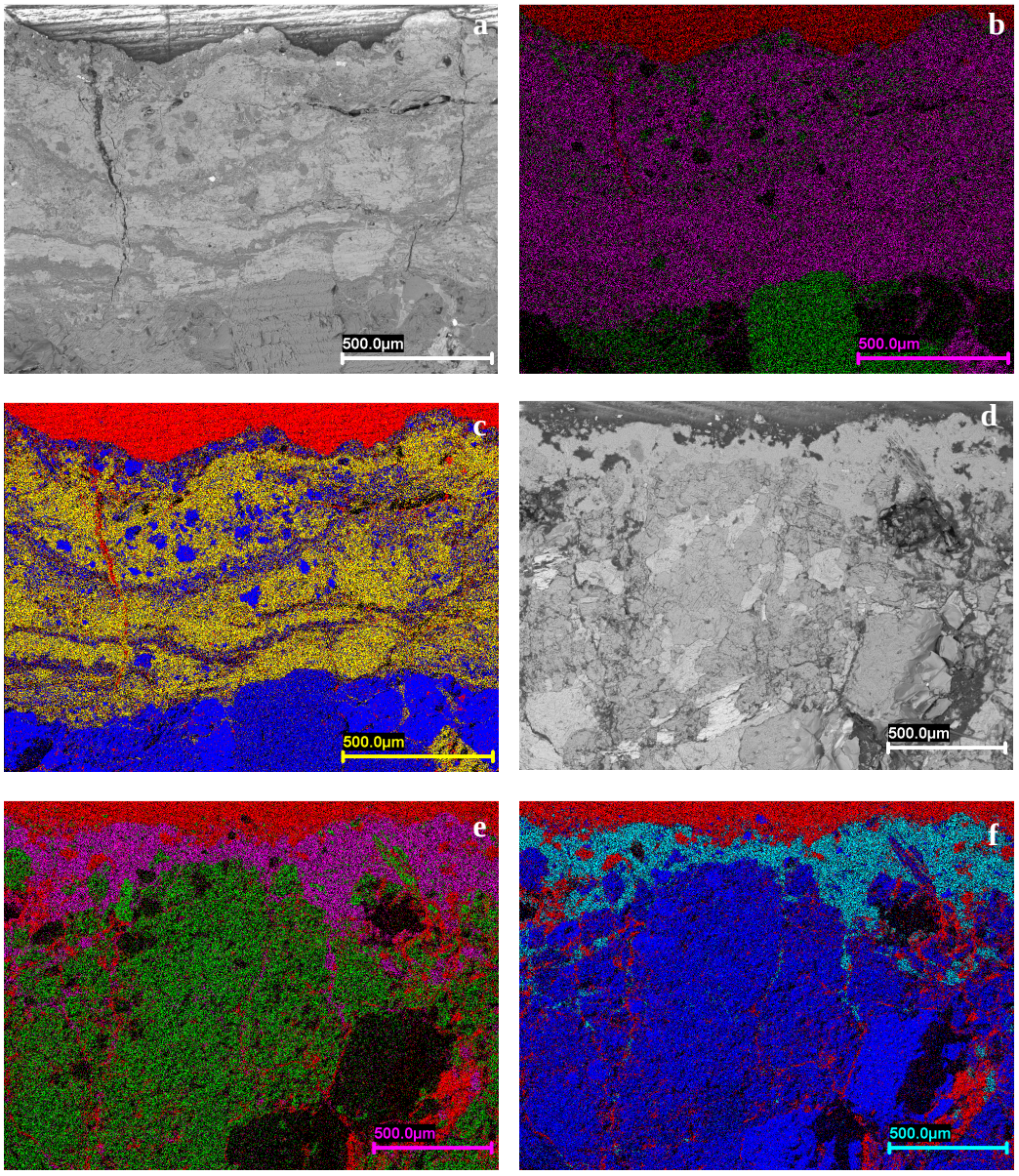


Figura 60: Fotografías y "maping" realizados con el microscopio electrónico de barrido en las pátinas de San Martín Pinario (a, b y c) y de la Fachada del Toural (d, e y f). Las muestras fueron incluidas en resina y cortadas perpendicularmente a la superficie.

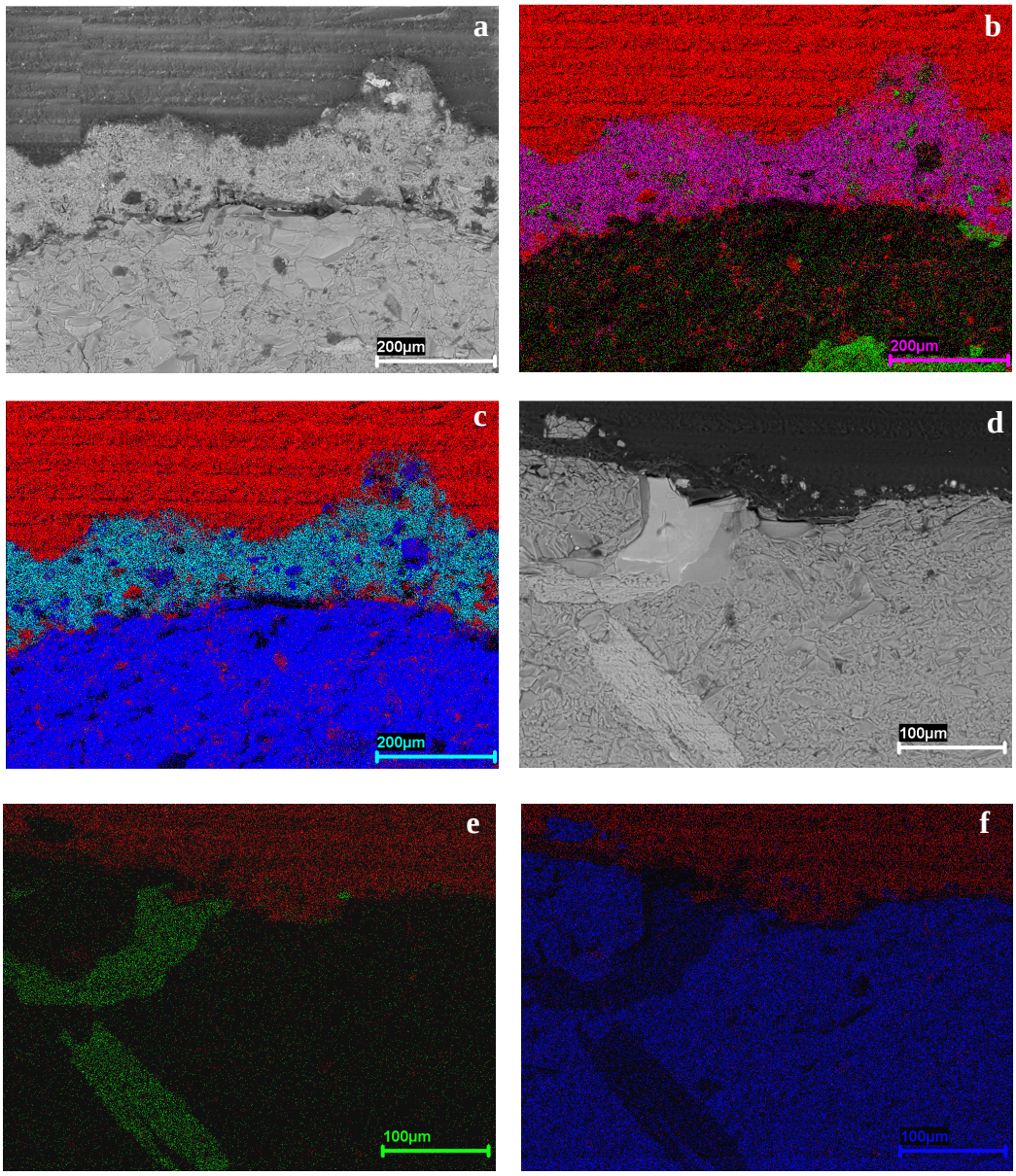


Figura 61: Fotografías y "maping" realizados con el microscopio electrónico de barrido en las pátinas de San Jorge (a, b y c) y de la plaza María Pita (d, e y f). Las muestras fueron incluidas en resina y cortadas perpendicularmente a la superficie.

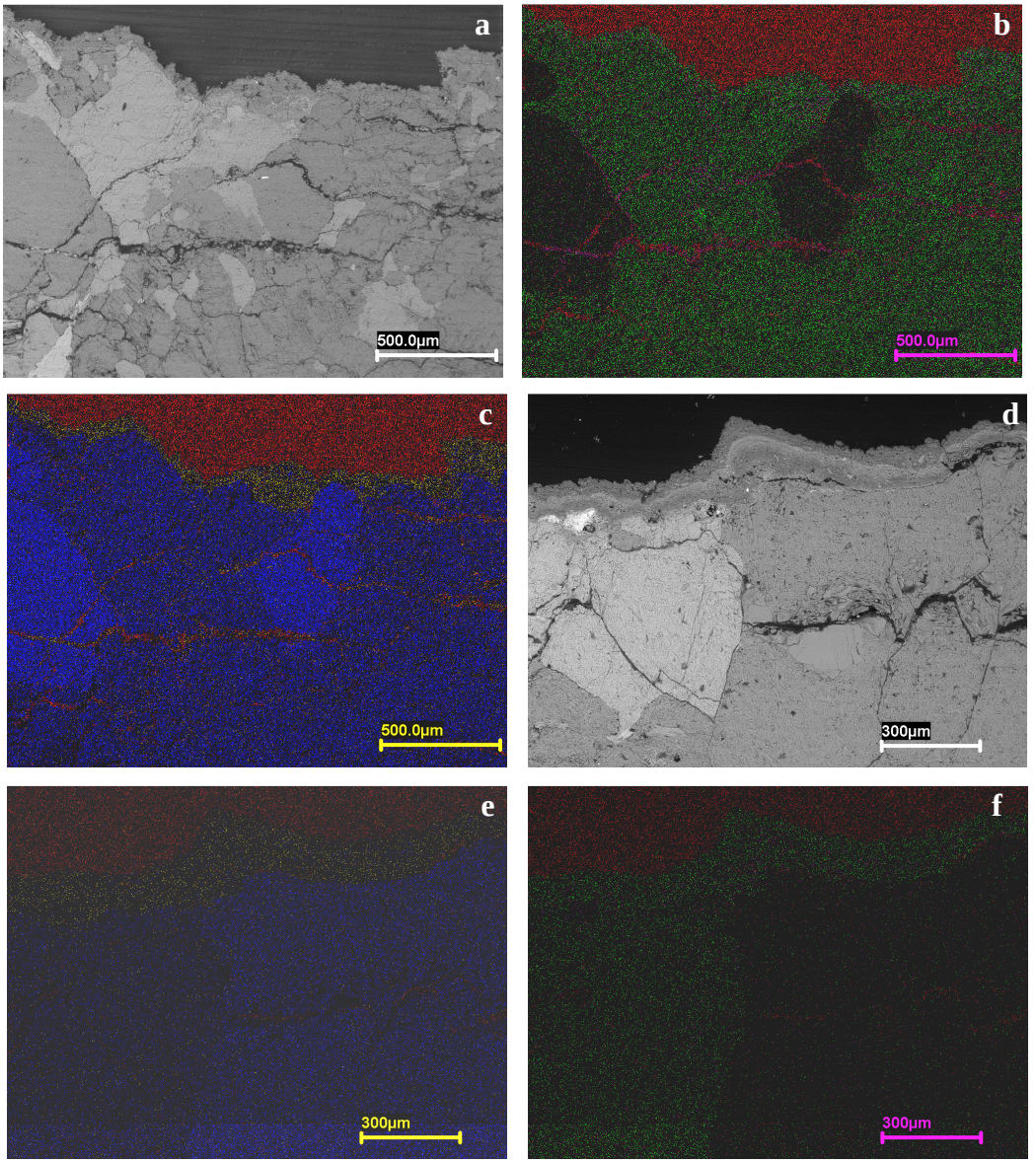


Figura 62: Fotografías y "maping" realizados con el microscopio electrónico de barrido en las pátinas de la Catedral de Lugo (a, b y c) y del Convento del Carmen en Padrón (d, e y f). Las muestras fueron incluidas en resina y cortadas perpendicularmente a la superficie. C Al Si Ca P

4.3.5 Espectroscopia IR-Raman

Las muestras se estudiaron mediante espectroscopia de infrarrojo Raman, analizando tanto la pátina, como la parte interna de la pátina, que corresponde a la roca sin pátina.

Uno de los principales problemas de los espectros es la baja resolución de las bandas, ya que la señal posee una cantidad de ruido de fondo muy alto por lo que algunas bandas pueden quedar enmascaradas.

Analizando los espectros obtenidos para las muestras de afloramientos (figuras 63 y 64) se puede ver que las principales bandas se encuentran en el rango de 1000 cm^{-1} a 1700 cm^{-1} y el número de bandas difiere entre unas muestras y otras. En todas las muestras exceptuando la pátina roja de Axeitos, Lamas de Abade y Toxosoutos, hay diferencias entre los espectros obtenidos para las pátinas y los obtenidos para la roca. Estas diferencias se hacen patentes en el número de bandas y en la absorción, mucho más alta en las pátinas.

La principal diferencia entre los espectros de la pátina y los de la roca es la existencia de dos bandas en la pátina alrededor de 1600 cm^{-1} y a 1332 cm^{-1}. Ambas bandas se encuentran en la zona de vibración de los enlaces ν(C-C) y ν(C=O), y se corresponden con compuestos aromáticos y ácidos carboxílicos. En la banda 1332 cm^{-1} además de estos compuestos aromáticos aparece englobada la banda principal de la clorofila (1323 cm^{-1}). Dependiendo de la muestra estas bandas pueden aparecer un poco desplazadas, así en la pátina gris de axeitos la banda 1332 cm^{-1} aparece a 1367 cm^{-1}; en Campo Lameiro aparece en 1365 (en este caso el pico de la clorofila aparece a 1326 cm^{-1} separado de la banda principal); en la muestra de Corruelo aparece a 1323 cm^{-1} y en la muestra del Pedroso aparece a 1313 cm^{-1}.

Además de estas dos bandas principales que aparecen en todas las muestras, en algunas de las pátinas hay otras diferencias con la roca subyacente. Así, en la pátina de Campo Lameiro aparecen bandas a 1158 cm^{-1} y 1523 cm^{-1} que son características de enlaces C=C y que corresponden a las bandas principales de los β-carotenos; estas mismas bandas aparecen también en la pátina del Pedroso un poco desplazadas (1558 cm^{-1} y a 1515 cm^{-1}). En la pátina de Corrubedo hay también tres bandas, una a 574 cm^{-1}, otra a 1097 cm^{-1} que pertenece al ácido oxalico y otra a 1174 cm^{-1} que pertenece a los β-carotenos. En la pátina del Pedroso además de lo comentado anteriormente aparecen otras cuatro bandas que la diferencian de la roca, una a 508 cm^{-1}, otra a 1185cm^{-1} y otras dos a 1646cm^{-1}y a 1676 cm^{-1} que también se encuentran en la zona de los compuestos aromáticos.

En los espectros Raman de los dólmenes solamente en la pátina del dolmen de Parxubeira (PXP) se pueden apreciar diferencias entre la pátina y la roca sin pátina (figura 65 A). En este dolmen, al igual que para el caso de los afloramientos, aparecen las bandas que corresponden a los compuestos aromáticos y a la clorofila (1345 cm^{-1} y 1614 cm^{-1}).

En las muestras de monumentos urbanos (figuras 65B-69) hay una mayor variabilidad que en las anteriores y la principal diferencia es que el nivel de fondo en las pátina es mas bajo que en los afloramientos o en los dólmenes lo que indica una menor fluorescencia de la pátina. Una excepción es la pátina de María Pita ya que el nivel de absorción de fondo es alto, similar al de los afloramientos.

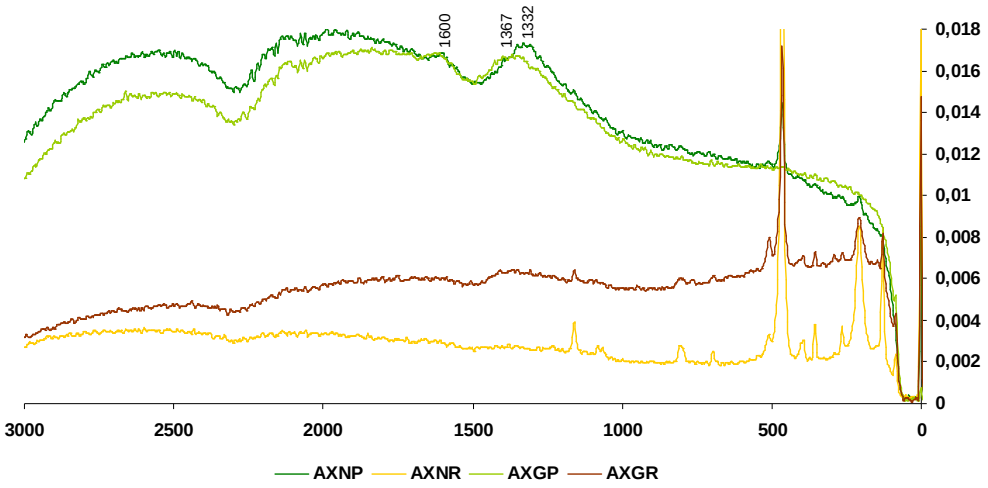
En todas las muestras de monumentos se aprecian diferencias entre las pátinas y la roca subyacente salvo en las muestras de María Pita y de San Martín Pinario.

Una de las principales diferencias de las pátinas de la catedral de Lugo, del convento del Carmen de Padrón, del colegio San Francisco Javier, de la facultad de Historia, de la casa del Toural y de la iglesia de San Jorge con la roca subyacente en la presencia de dos bandas de absorción en la pátina a 1308 cm^{-1} y otra a 1604 cm^{-1}, estas bandas son similares a las encontradas en afloramientos y en ellas se engloban los compuestos aromáticos y ácidos carboxílicos, sin embargo la banda que en afloramientos aparece alrededor de 1355 en estos monumentos aparece un poco desplazada y se encuentra a 1300, por lo que en este caso no aparece la clorofila englobada. Estas bandas corresponden a compuestos de carbono de tipo aromático. La pátina de Fonseca también posee una banda a 1302 cm^{-1}, pero en este caso no aparece la banda a 1600 cm^{-1}.

Hay otras diferencias entre pátina y roca que dependen de la muestra. Así en Fonseca hay además dos bandas que sólo aparecen en la pátina, una a 1084 cm^{-1} que se corresponde con la banda principal de la calcita y otra a 800 cm^{-1}; en la pátina del Toural se detecta también una banda a 757 cm^{-1} que no se observa en la roca.

En el palacio de Fonseca y en la plaza del Toural además de bandas diferentes en la pátina y la roca, también hay bandas que aparecen en ambas zonas pero que mayor intensidad en la pátina. Así en FP aparecen tres bandas que indican la presencia de cera de abejas, dos a 2851 cm^{-1} y 2892 cm^{-1} que corresponderían a la vibración de los enlaces CH_3 y una a 1440 cm^{-1} que corresponde a los grupos funcionales C=O. En TP el compuesto que se detecta es yeso con bandas a 1134 cm^{-1} y 1007 cm^{-1} y calcita con una banda a 1085 cm^{-1}. También destacar la presencia de yeso en San Jorge aunque en este caso la banda es mayor en la roca que en la pátina.

A



B

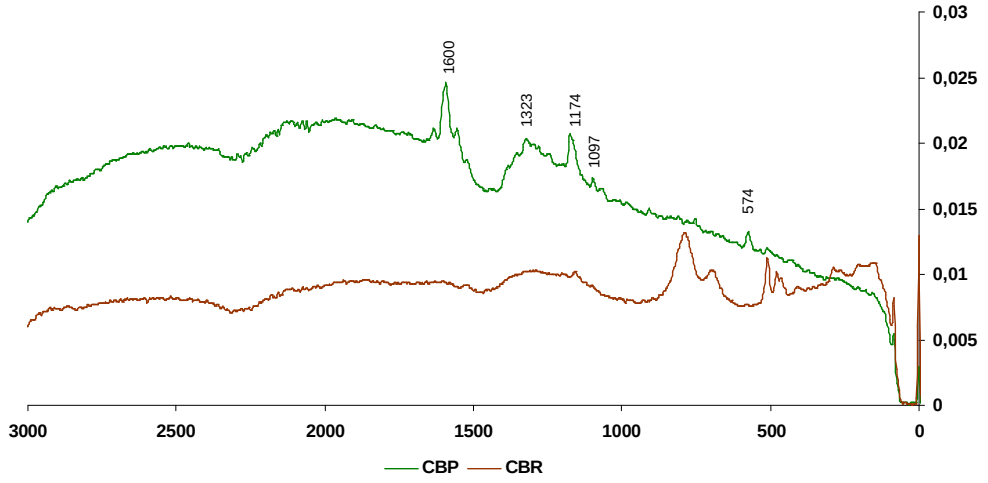
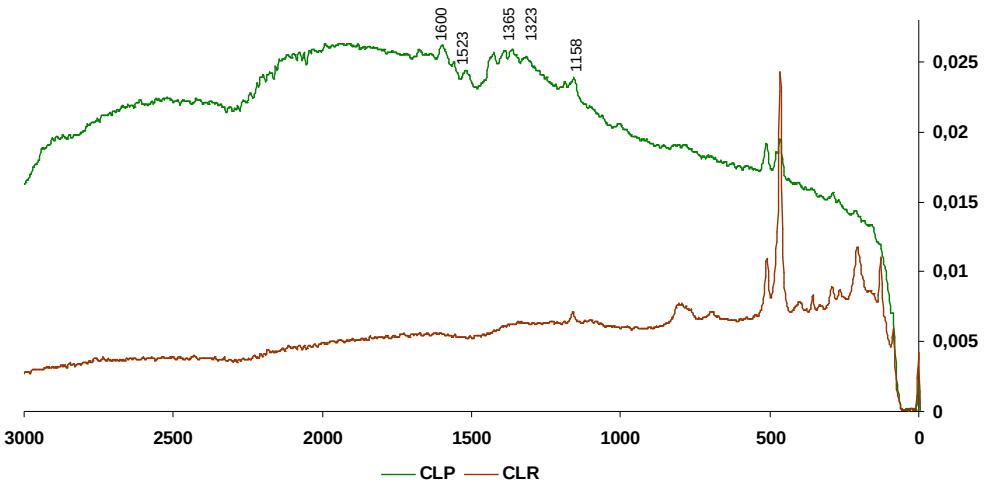


Figura 63: Espectros de IR-Raman de A: las muestras de axeitos (AXGR, AXGP, AXNR y AXNP) y B: la muestra de Corrubedo (CBP yCBR).

A



B

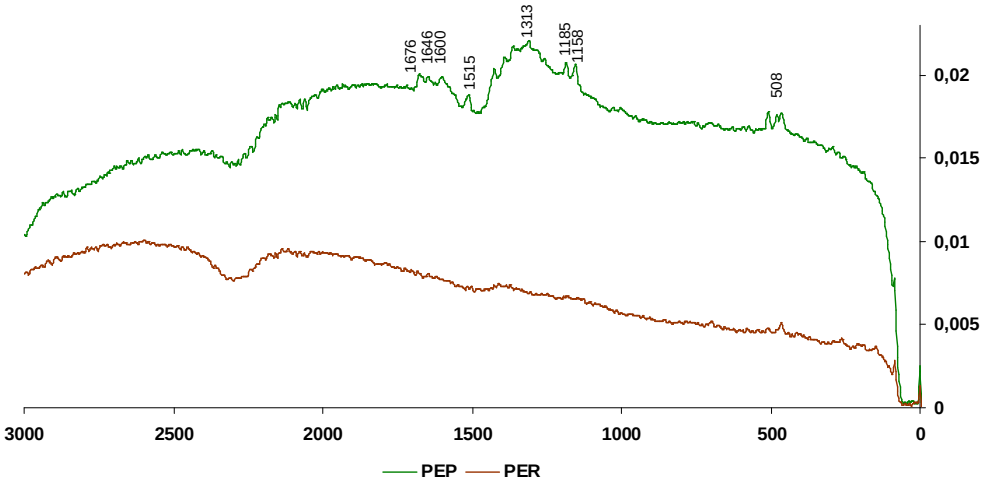
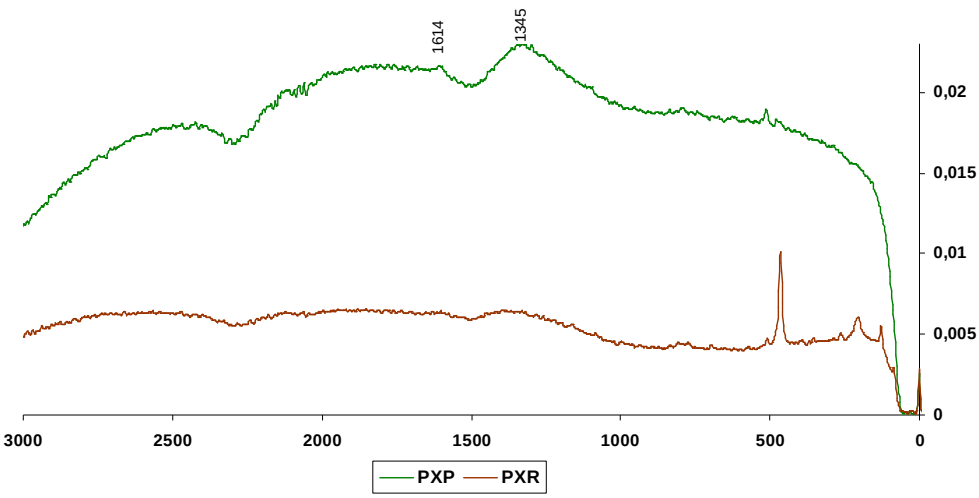


Figura 64: Espectros de IR-Raman de A: las muestras de Campo Lameiro (CLP y CLR) y B: la muestra del Pedroso (PEP y PER).

A



B

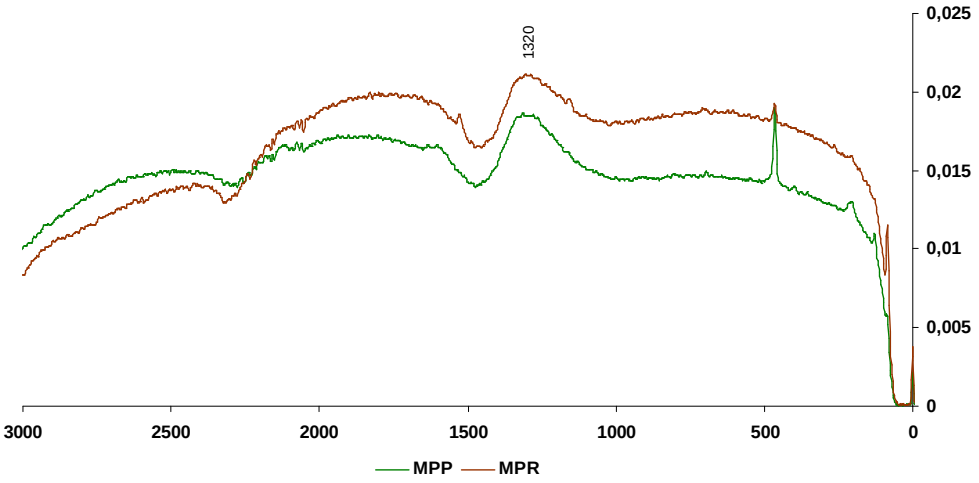
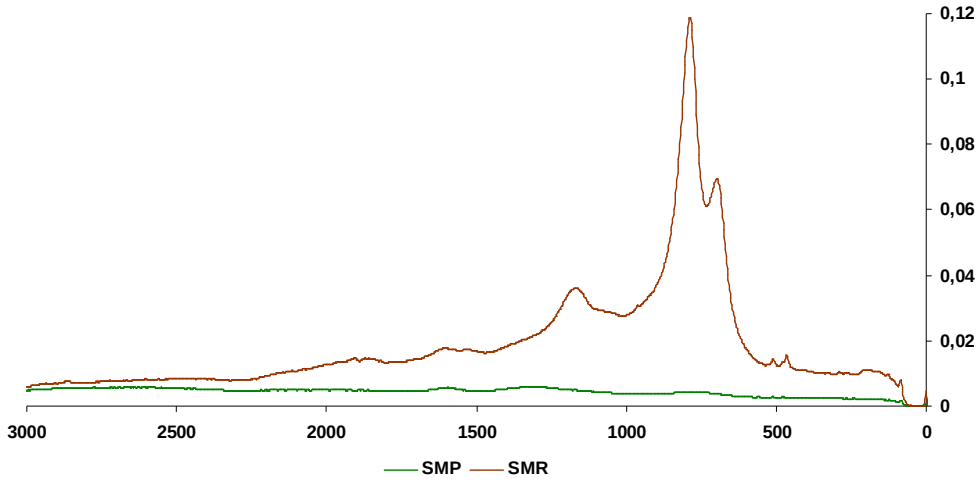


Figura 65: Espectros de IR-Raman de A: la muestra del dolmen de Parxubeira (PXP y PXR) y B: la muestra de la. plaza de María Pita (MPP y MPR).

A



B

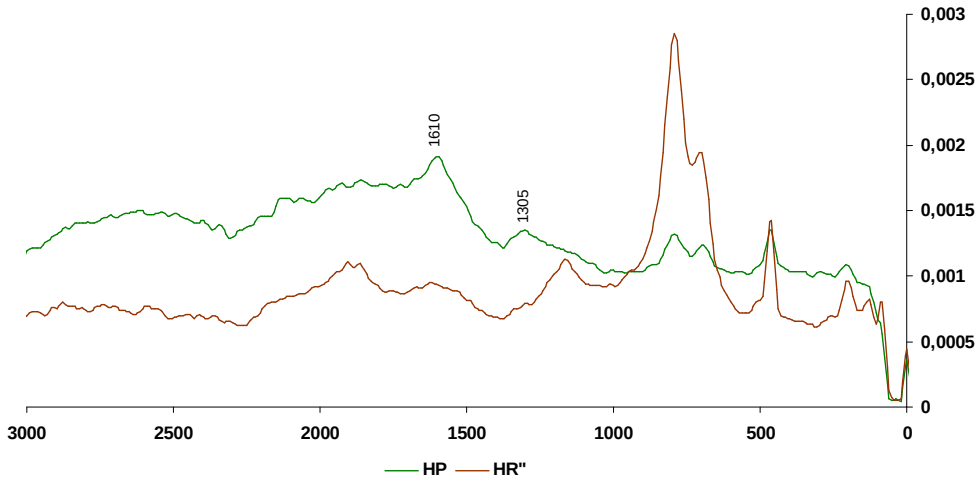
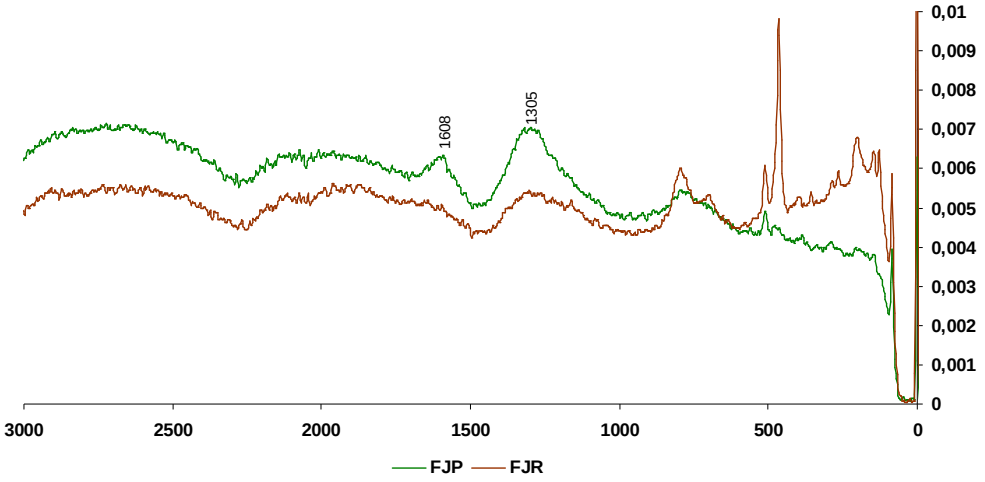


Figura 66: Espectros de IR-Raman de A: las muestras del monasterio de San Martín Pinario (SMP y SMR) y B: la facultad de Historia (HP y HR).

A



B

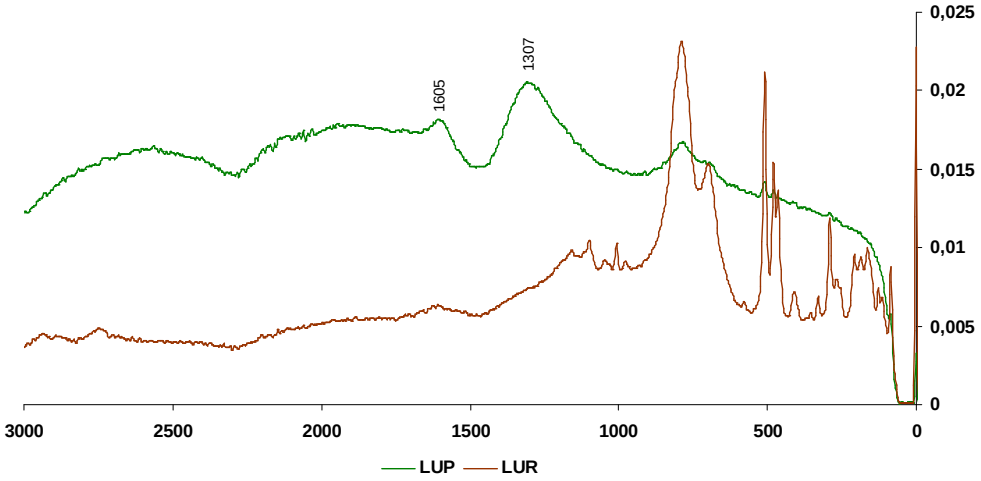
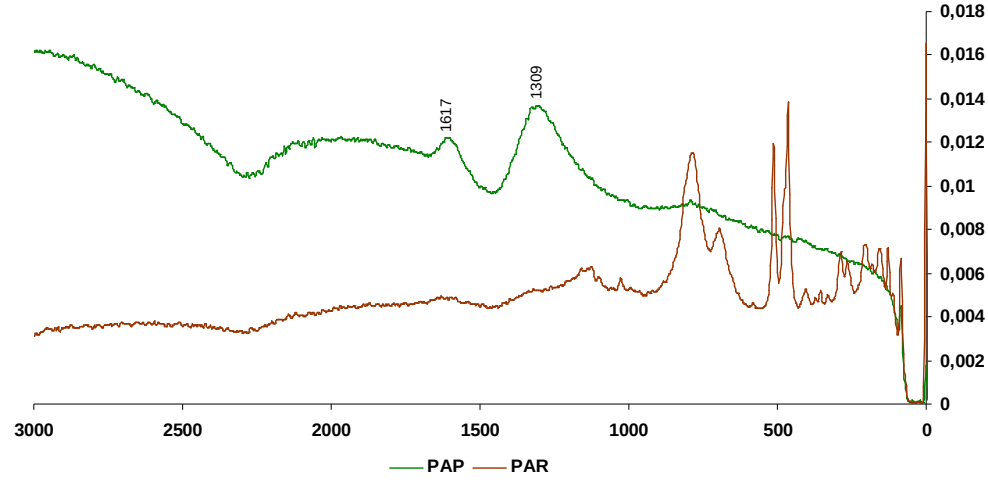


Figura 67: Espectros de IR-Raman de A: las muestras del colegio Francisco Javier (FJP y FJR) y B: la Catedral de Lugo (LUP y LUR).

A



B

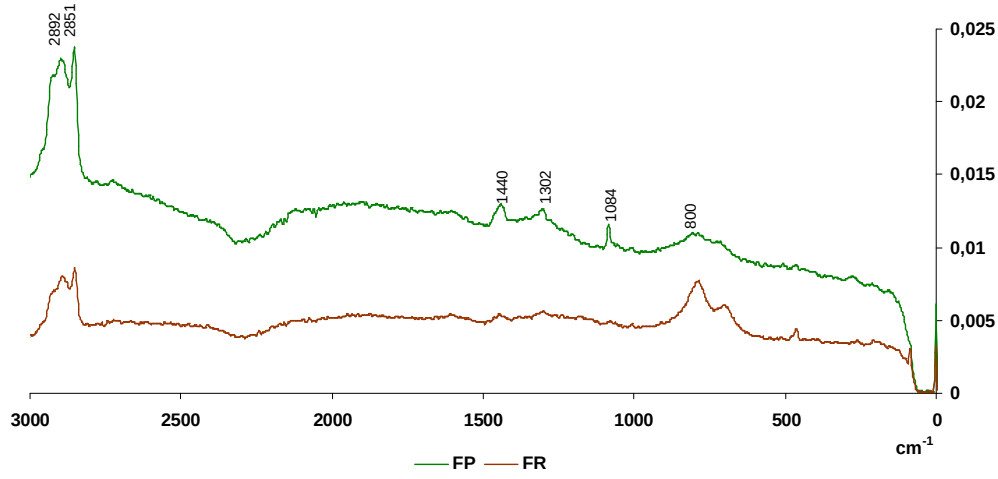
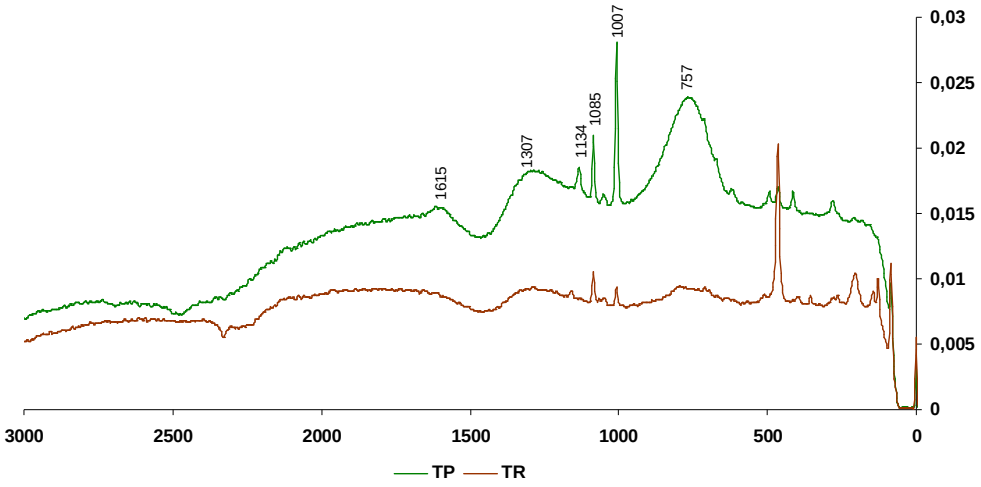


Figura 68: Espectros de IR-Raman de A: las muestras del convento del Carmen de Padrón (PAP y PAR) y B: del Palacio de Fonseca (FP y FR).

A



B

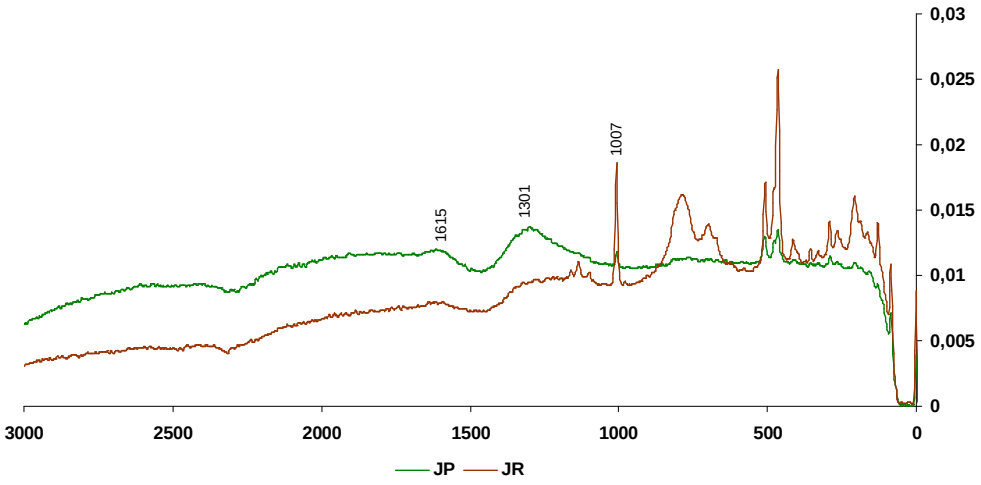


Figura 69: Espectros de IR-Raman de A: las muestras de la Plaza del Toural (TP y TR) y B: la iglesia de San Jorge de A Coruña (JP y JR).

4.4. Caracterización biológica

4.4.1. Determinación de proteínas y clorofila

Para la caracterización biológica de las muestras se determinó su contenido en proteínas y clorofila, tanto en la pátina como en muestras de roca superficial sin pátina. Se considera que la presencia de estos compuestos es indicativa de la existencia de organismos que podrían ser responsables de la formación de las pátinas. Por lo tanto, su cuantificación puede dar una idea sobre la importancia del factor biológico en la formación de las pátinas.

En la tabla 10 se muestran los datos de clorofila *a* y de proteínas por unidad de superficie de la muestra (pátina o roca sin pátina analizados). En los afloramientos tanto las proteínas como la clorofila están en mayor cantidad en las pátinas que en la roca sin pátina, lo cual indica que en las pátinas hay organismos y que la mayoría de ellos son fotosintéticos. En los monumentos, no ocurre esto ya que hay pátinas que poseen menos proteínas que la roca sin pátina (Francisco Javier y Padrón). Además la cantidad de clorofila es muy baja, tanto en la pátina como en la roca sin pátna. Al igual que ocurre con las proteínas hay pátinas donde la cantidad de clorofila es menor que en las rocas sin pátina (dolmen de Cabaleiros, iglesia de San Jorge, Plaza de María Pita y Padrón) y sólo en el caso de Francisco Javier hay mucha más clorofila en la pátina que en la roca sin pátina.

Tabla 10: Cantidades de clorofila a y de proteínas (µg /cm^2) para las muestras de afloramientos naturales y monumentos

	Muestra	µg clorofila a /cm^2	µg proteínas /cm^2
Afloramientos	AXR	0,02	73,02
	AXGP	0,83	264,16
	AXNP	0,84	493,78
	AXRP	0,72	1761,16
	CBR	0,01	37,31
	CBP	0,90	1077,86
	CLR	2,69	2299,36
	CLP	14,95	2570,41
	LAR	0,05	97,61
	LAP	3,53	510,17
	P1R	0,07	69,72
	P1P	14,33	2886,53
	P2R	0,01	203,00
	P2P	3,98	1243,31
	TXR	0,10	45,20
	TXP	1,23	380,11
Monumentos	AXDR	0,02	73,02
	AXDP	0,23	351,25
	CAR	8,28	58,70
	CAP	6,99	156,75
	FJR	0,06	863,34
	FJP	2,64	282,30
	FR	1,77	7,27
	FP	2,13	61,75
	HR	0,15	863,40
	HP	0,14	1128,69
	SMR	0,20	389,39
	SMP	0,44	673,53
	TR	0,05	457,82
	TP	0,07	624,66
	JR	1,92	9,72
	JP	1,33	41,56
	MPR	15,33	28,65
	MPP	2,76	107,99
	LUR	0,31	150,12
	LUP	2,07	300,03
	PAR	23,19	2740,69
	PAP	8,14	787,67

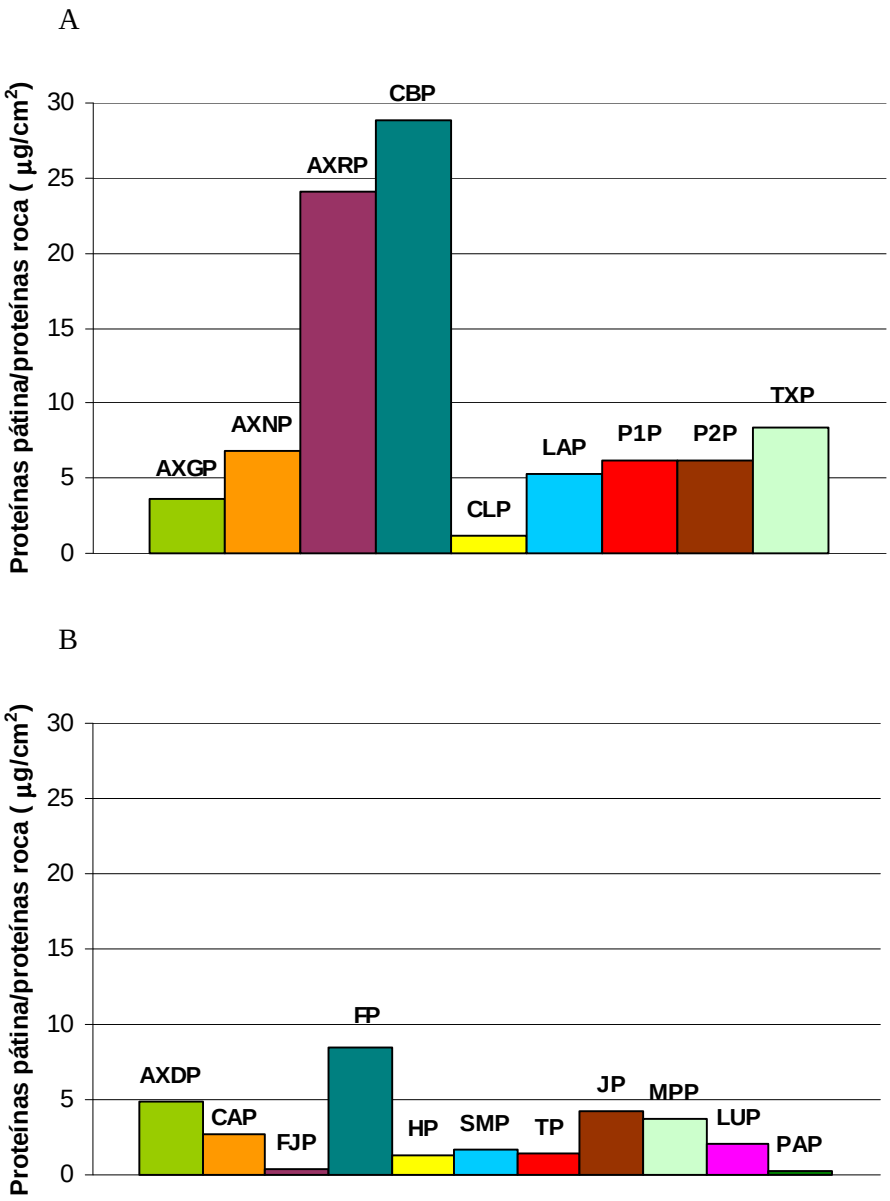


Figura 70: Relación entre la cantidad de proteínas por cm^2 que hay en la pátina y la la roca sin pátina en las muestras de afloramientos naturales (A) y en monumentos (B)

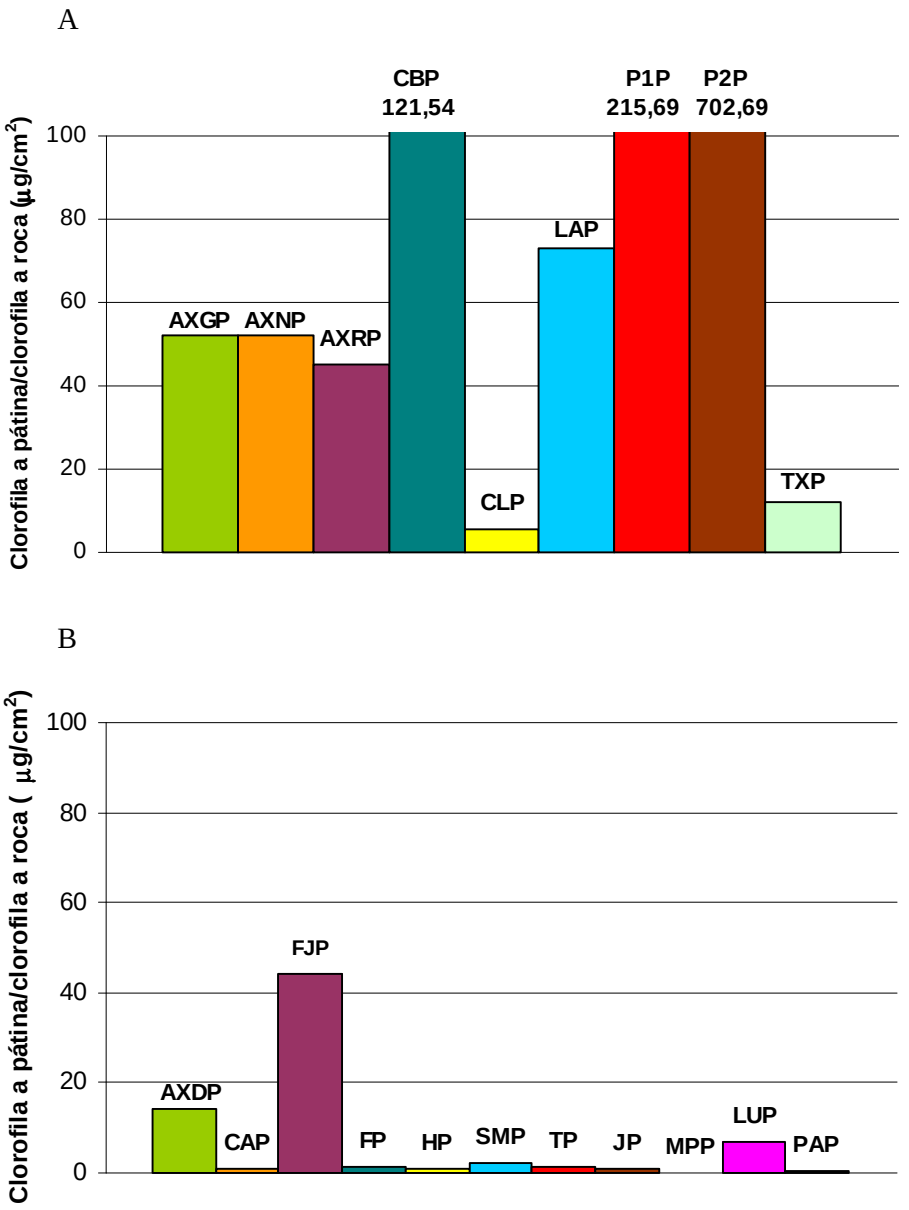


Figura 71: Relación entre la cantidad de clorofila *a* por cm^2 que hay en pátina y en la roca sin pátina en las pátinas de afloramientos naturales (A) y en monumentos (B).

En las figuras 70 y 71 se muestran las relaciones entre la cantidad de proteínas y clorofila en la pátina y en la roca. Lo más destacable son las diferencias claras entre monumentos y afloramientos. En los afloramientos estas relaciones son mucho mayores, es decir hay una mayor diferencia en la cantidad de estos dos compuestos entre las pátinas y las rocas sin pátina. En el caso de los monumentos aunque existen diferencias entre la pátina y la roca sin pátina estas relaciones no son tan grandes. Además de estas claras diferencias entre monumentos y afloramientos también se puede destacar, que dentro de los afloramientos las mayores relaciones se dan en el contenidos de clorofila, aunque esto depende mucho de la muestra, ya que hay muestras como Campo Lameiro donde la relación entre pátina y roca sin pátina es pequeña y muestras como las de Corrubedo o los afloramiento del Pedroso donde esta relación es muy grandes. En los monumentos las relaciones entre pátina y roca sin pátina son mucho menores, en la cantidad de proteínas solamente destaca la pátina de Fonseca y en la clorofila la pátina que destaca es la del colegio San Francisco Javier.

4.4.2. Análisis de ácidos grasos de cadena corta

Para este estudio se analizaron un total de 17 muestras, ya que en este caso las tres pátinas del afloramiento de Axeitos se agruparon en una (AXP) al igual que las dos del Pedroso (PEP). Se identificaron ácidos grasos en todas las muestras salvo en las seis siguietes: las tres de los dólmenes (DAXP, PXP, CAP), las dos muestras recogida en la ciudad de A Coruña (JP y MPP) y dos de las muestra tomadas en la ciudad de Santiago (HP y TP).

En las tablas 11 y12 se enumeran los ácidos grasos identificados por el sistema MIDI y por lo tanto los que provienen de microorganismos (ya que este sistema utiliza para la identificación una base de datos para microorganismos

aerobios) y en la tabla 14 se muestra el porcentaje de ácidos grasos no identificados por este sistema, junto con sus tiempos de retención (Rt). En negrita están indicados todos los ácidos grasos con un porcentaje mayor del 10 % del total de la muestra y un asterisco indica que el contenido de ácido graso es menor del 1 %. Los ácidos grasos con un porcentaje menor del 1 % para todas las muestras no son incluidos en estas tablas.

Se detectaron ácidos grasos saturados, insaturados y ramificados de entre 12 y 18 átomos de carbono. En las pátinas de afloramientos se pudo identificar prácticamente la totalidad de los ácidos grasos presentes (tabla 13); así en la muestra del pedroso se identificó el 100 % y en el resto de los afloramientos el porcentaje de ácidos grasos identificados varió entre un 97,65 % en la pátina de Lamas de Abade un 94,35 % en la de Corrubedo (CBP).

En algunos monumentos el porcentaje de identificación también fue alto, como es el caso de Padrón con un 98,93% de ácidos grasos identificados respecto al total de ácidos grasos presentes en la muestra, las pátinas de San Martín Pinario (SMP) con un 97,98 % y San Francisco Javier (FJP) con un 91,90 %. En la muestra de la Catedral de Lugo (LUP) también el porcentaje de ácidos grasos identificados fue alto (82,77 %), aunque no tanto como los anteriores, en la muestra de Fonseca (FP), sin embargo, el porcentaje de identificación fue muy bajo, del 27,07 %.

En lo que concierne a los ácidos grasos identificados en afloramientos (tablas 11 y 12), la mayoría de ellos son no saturados (60.4 al 43.44% del total), principalmente los ácidos oleico y linoleico, la suma de los cuales abarca entre un 57,15 % en Lamas de Abade y un 36,25% en Corrubedo. El siguiente grupo en abundancia lo constituyen los ácidos grasos de cadena ramificada (27.68 al 18.25 % del total), con el 10:0 Anteiso como ácido graso predominante (20.92 al 11.56 % del total). Los ácidos grasos saturados se corresponden con el 12.55 %

y 17.43 % del total de la muestra, siendo el palmítico el predominante (13.84-10.99%).

En general el tipo de ácidos grasos identificados en las muestras de monumentos es diferente al de los afloramientos (tablas 11 y 12), con dos excepciones en Lugo y Padrón donde los ácidos grasos predominantes son los mismos que en los afloramientos. En las muestras de San Martín Pinario (SMP) y Francisco Javier (FJP) el ácido graso mayoritario es el ácido palmítico, y en el caso de SMP, también el 15:0 anteiso es mayoritario. En la muestra del palacio de Fonseca (FP) no se identificó ninguno de los ácidos grasos que aparecen como mayoritarios en los afloramientos, ya que en este caso la mayoría de los ácidos grasos que aparecen no se han podido identificar con el sistema MIDI (tabla 14). En esta muestra aparecen dos picos que non han podido ser identificados, por lo que deben de corresponder con ácidos grasos de origen no biológico y que se corresponden con el 69.95 % del total de ácidos grasos presentes.

Tabla 11: Porcentaje de los principales ácidos grasos saturados e insaturados que aparecen en las muestras y su desviación estándar (* <1%). En negrita los ácidos grasos con un porcentaje >10%.

	Monumentos					Afloramientos					
Acidos grasos	**SMP**	**FP**	**FJP**	**LUP**	**PAP**	**TXP**	**CBP**	**AXP**	**PEP**	**CLP**	**LAP**
Saturados (%)											
12:0 (Laurico)	*	*	1.04 (±0.11)	*	*	*	*	*	-	*	*
14:0 (Myristico)	1.19 (±0.03)	*	2.40 (±0.02)	*	1.02 (±0.02)	*	*	*	*	*	1.06 (±0.01)
16:0 (Palmitico)	**13.03 (±0.15)**	*	**25.79 (±0.13)**	8.89 (±0.54)	**17.59 (±0.53)**	**10.99 (±0.05)**	**13.84 (±0.43)**	**12.98 (±0.33)**	**12.11 (±0.11)**	**11.12 (±0.14)**	**11.48 (±0.32)**
18:0 (Estearico)	3.51 (±0.03)	*	8.75 (±0.06)	3.42 (±0.30)	2.76 (±0.23)	1.69 (±0.03)	3.59 (±0.14)	4.15 (±0.06)	1.92 (±0.04)	1.43 (±0.02)	2.45 (±0.08)
Insaturados (%)											
16:1 w9c	-	-	1.45 (±0.07)	-	8.73 (±0.17)	1.32 (±0.03)	*	1.42 (±0.00)	1.85 (±0.04)	1.30 (±0.03)	*
16:1 w7c palmitoleico	3.02 (±0.33)	-	1.88 (±0.03)	*	1.54 (±0.05)	1.39 (±0.03)	4.33 (±0.65)	1.42 (±0.05)	3.38 (±0.04)	11.52 (±0.20)	*
Iso 17:1 w9c	2.33 (±0.05)	-	-	-	-	-	-	2.91 (±0.07)	-	-	-
17:1 w8c	1.11 (±0.04)	-	*	-	*	*	*	-	*	*-	*
18:2 w6,9c (Linoleico)	1.82 (±0.11)	5.35 (±0.02)	5.17 (±0.05)	**20.92 (±1,38)**	**11.56 (±0.39)**	**21.60 (±0.06)**	**19.73 (±0.83)**	**13.03 (±0.08)**	**17.88 (±0.08)**	**14.68 (±0.32)**	**18.25 (±0.32)**
18:1 w9c (Oleico)	4.15 (±0.11)	-	9.69 (±0.06)	**15.69 (±0.96)**	**26.57 (±0.92)**	**24.95 (±0.06)**	**16.52 (±0.78)**	**24.66 (±0.14)**	**37.29 (±0.17)**	**22.82 (±0.74)**	**38.90 (±0.74)**
18:1 w7c	6.86 (±0.18)	-	6.33 (±0.10)	-	-	6.42 (±0.08)	4.47 (±0.20)	-	-	-	-
11 methyl 18:1w7c	1.33 (±0.02)	8.39 (±0.04)	1.50 (±0.03)	-	*	*	-	-	-	-	*

Tabla 12: Porcentaje de los principales ácidos grasos de cadena ramificada que aparecen en las muestra y su desviación estándar (* <1%). En negrita los ácidos grasos con un porcentaje >10%.

	Monumentos					Afloramientos					
Acidos grasos	**SMP**	**FP**	**FJP**	**LUP**	**PAP**	**TXP**	**CBP**	**AXP**	**PEP**	**CLP**	**LAP**
Ramificados (%)											
14:0 Iso	1.38 (±0.07)	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-
15:1 AnteisoA	2.02 (±0.06)	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15:0 Iso	5.85 (±0.06)	-	1.61 (±0.04)	*	2.05 (±0.02)	*	*	1.21 (±0.04)	*	*	*
15:0 Anteiso	**18.50 (±0.21)**	-	2.40 (±0.02)	*	1.59 (±0.03)	*	*	*	-	*	*
16:0 N alcohol	*	*	1.56 (±0.04)	1.63 (±0.07)	*	*	*	-	-	-	-
16:1 Iso H	*	-	-	-	-	-	-	1.61 (±0.01)	-	-	-
16:0 Iso	4.40 (±0.08)	-	2.43 (±0.05)	*	2.16 (±0.02)	-	-	2.47 (±0.12)	-	-	-
16:0 Anteiso	*	-	1.08 (±0.07)	*	1.76 (±0.01)	1.31 (±0.02)	1.14 (±0.03)	*	*	*	*
15:0 Iso 2OH	-	-	-	-	-	-	1.24 (±0.06)	-	-	-	-
16:0 10 methyl	4.31 (±0.20)	-	1.22 (±0.07)	*	1.06 (±0.09)	*	-	-	*	1.06 (±0.05)	-
17:0 Iso	1.08 (±0.08)	-	*	-	-	-	-	1.01 (±0.30)	*	*	-
17:0 Anteiso	2.45 (±0.04)	*	*	*	*	*	*	*	-	-	*
17:0 Cyclo	2.05 (±0.33)	-	1.25 (±0.13)	-	*	-	-	*	-	-	-
16:1 2OH	2.31 (±0.57)	-	-	-	-	-	-	1.70 (±0.23)	-	-	-
16:0 2OH	-	-	-	3.29 (±0.13)	-	-	-	-	-	-	-
17:0 10 methyl	1.10 (±0.01)	-	1.20 (±0.08)	*	1.98 (±0.02)	*	*	1.10 (±0.05)	*	*	*
15:0 Iso 2OH	3.02 (±0.33)	-	1.88 (±0.03)	*	1.54 (±0.05)	1.39 (±0.03)	5.57 (±0.06)	1.42 (±0.04)	3.38 (±0.04)	11.52 (±0.20)	*
18:0 Anteiso	1.86 (±0.13)	5.35 (±0.02)	5.08 (±0.55)	**20.92 (±0.89)**	**11.56 (±0.39)**	**21.60 (±0.06)**	**19.73 (±0.83)**	**13.03 (±0.08)**	**17,88 (±0.08)**	**14.68 (±0.31)**	**18.25 (±0.32)**

Tabla 13: Porcentaje de ácidos grasos identificados y no identificados en las muestras

			% Identificados	% No identificados
Muestras	Monumentos	SMP	97.98	2.02
		FP	27.07	72.93
		FJP	91.90	8.10
		LUP	82.77	17.23
		PAP	98.93	1.07
	Afloramientos	TXP	97.30	2.70
		CBP	95.94	4.06
		AXP	94.35	5.65
		PEP	100.00	-
		CLP	95.89	4.11
		LAP	97.65	2.35

Tabla 14: Porcentaje de ácidos grasos no identificados en las muestras (con su desviación estándar) y su tiempo de retención; (*<1%). En negrita los ácidos grasos con un porcentaje >10%.

Muestras											
	Monumentos					Afloramientos					
Tiempo de Retención (min)	SMP	FP	FJP	LUP	PAP	TXP	CBP	AXP	PEP	CLP	LAP
t_r: 5.046	-	*	3.02 (±0.03)	-	-	-	-	-	-	-	*
t_r: 6.970	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.03 (±0.11)	-
t_r: 15.260	-	-	-	**10.36 (±0.19)**	-	-	-	-	-	-	-
t_r: 15.289		**22.35 (±0.03)**	-	-	-	*	*	-	-	-	-
t_r: 15.926	-	-	1.38 (±0.12)	-	-	-	-	-	-	-	*
t_r: 16.341	-	-	-	-	-	-	-	5.65 (±0.63)	-	-	-
t_r: 16.986	-	-	-	6.87 (±0.69)	-	-	-	-	-	-	-
t_r: 17.014	-	-	-	-	-	*	1.53 (±0.07)	-	-	-	-
t_r: 17.019	-	**47.60 (±0.04)**	-3.70 (±0.05)	-	-	-	-	-	-	-	-
t_r: 17.704	*	-	-	-	1.07 (±0.10)	-	-	-	-	-	-
t_r: 18.080	2.02 (±0.19)	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.4.3. Identificación de los organismos mediante técnicas de biología molecular

Las técnicas de biología molecular permiten identificar los organismos presentes en las muestras mediante el estudio de la secuencia de ADN que codifica para el ARN ribosómico 16 S, ya que es una secuencia muy conservada pero en la cual hay pequeñas diferencias entre especies.

Después de la extracción de ADN se realizaron dos PCR, una para la identificación de bacterias y otra para la identificación de cianobacterias, ambas con cebadores específicos para cada grupo.

La primera PCR (figuras 72 y 73) indica que existen bacterias en todas las pátinas de afloramientos, pero no en todas las pátinas de monumentos. Se observó la presencia de bacterias en la pátina del dolmen de Axeitos (DAXP), pero no en la del dolmen Parxubeira (PXP), ni en la del dolmen de Cabaleiros (CAP). En las pátinas de edificios de Santiago se detectó la presencia de bacterias solamente en el Monasterio de San Martín Pinario (SMP). En las pátinas correspondientes a la ciudad de A Coruña aparecen solamente en la de la Plaza de María Pita (MPP), pero no en la iglesia de San Jorge. También se detectó la presencia de bacterias en las pátinas del convento del Carmen en Padrón (PAP) y de la Catedral de Lugo (LUP).

En cuanto a las muestras de roca superficial sin pátina, sólo se pudo realizar la extracción de ADN para las muestras de monumentos y en el afloramiento de Lamas de Abade, en los demás casos no se disponía de suficiente cantidad de muestra. La presencia de bacterias se detectó solamente en las rocas sin pátina de Lamas de Abade, en el Dolmen de Parxubeira, en el Convento del Carmen de Padrón y en la Catedral de Lugo.

Con la PCR específica para detectar la presencia de cianobacterias (Figuras 74 y 75) se pone de manifiesto que estos organismos son menos comunes que las bacterias en las muestras analizadas. En las pátinas de afloramientos aparecen en todas salvo en los casos de Toxosoutos (TXP) y Axeitos (AXP). En las pátinas de los monumentos aparecen solamente en el dolmen de Axeitos (DAXP), en el Convento del Carmen de Padrón (PAP) y en la Catedral de Lugo (LUP). No se identificaron cianobacterias en ninguno de los edificios de Santiago ni en los de A Coruña. Tampoco hay cianobacterias en ninguna de las muestras de roca superficial sin pátina analizadas.

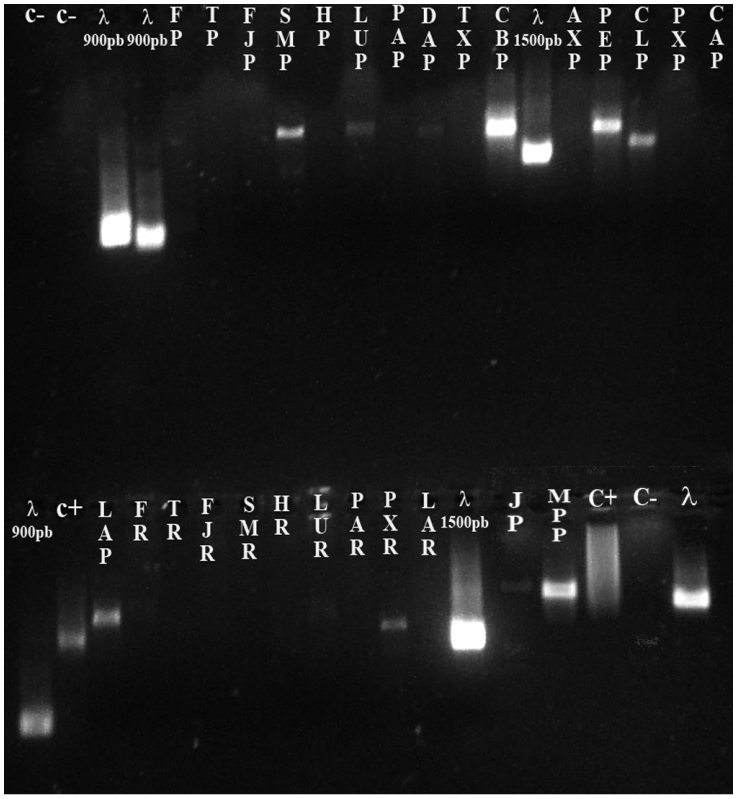


Figura 72: Resultados de la 1ª PCR de las muestras con cebadores específicos para bacterias.

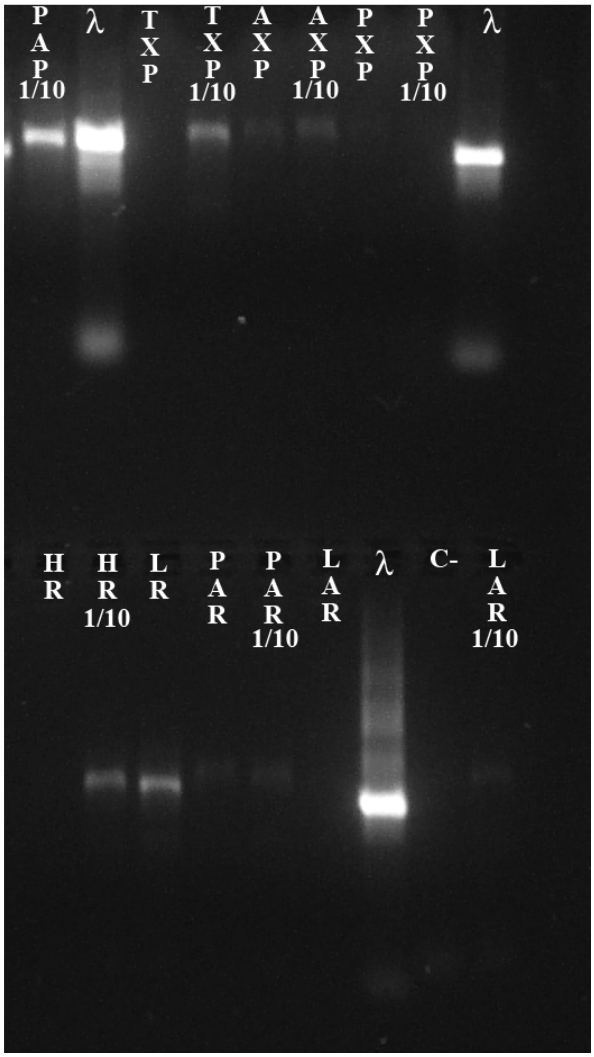


Figura 73: Resultados de la repetición de la 1ª PCR de las muestras con cebadores específicos para bacterias (muestra total y muestra diluida 1/10).

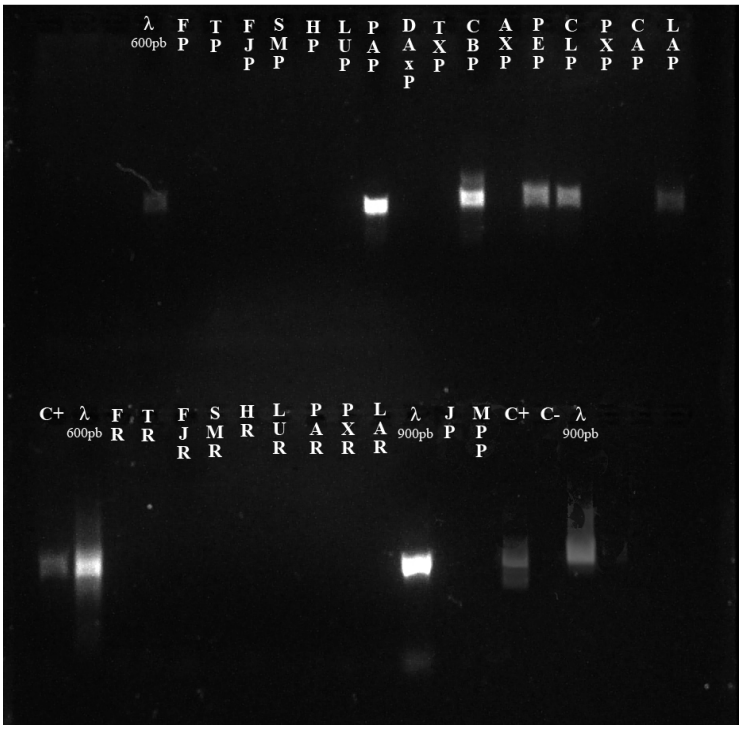


Figura 74: R**esultados de la 1ª PCR de las muestras con cebadores específicos para cianobacterias.**

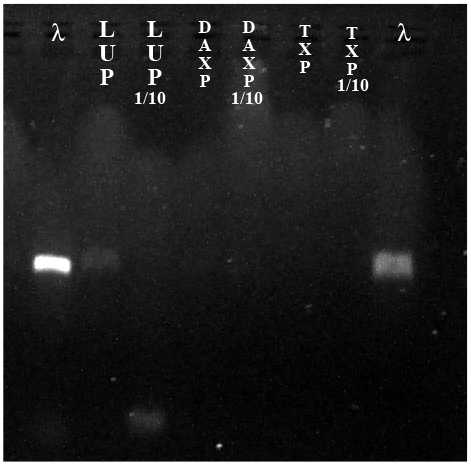


Figura 75: Resultados de la repetición de la 1ª PCR de las muestras con cebadores específicos para cianobacterias (muestra total y muestra diluida 1/10)

Con las muestras que dieron resultados positivos se realizó una Electroforesis en gel en gradiente desnaturalizante (DGGE), lo que permite observar el número de organismos diferentes que hay en cada una de las muestras y poder realizar la clonación.

En la figura 76 se muestra el gel de la DGGE para la identificación de las bacterias, en el podemos ver una serie de bandas que corresponden a organismos distintos, ya que cada secuencia de ADN diferente migra a una longitud distinta en el gel. Lo primero destacable en este gel es que en las muestras de las pátinas de San Martín Pinario, Lugo y Toxosoutos y la roca de Lugo no se observa ninguna banda, por lo que no se puede saber cuantos organismos diferentes hay. Por otro lado las muestras que presentan bandas comunes son las siguientes: la muestra del dolmen de Axeitos presenta una banda igual a la pátina de Padrón y la otra banda de la pátina de Padrón es igual a una de las que aparece en Lamas de Abade. Las pátinas de Lamas de Abade, Padrón y la roca del dolmen de Parxubeira también tienen una banda común.

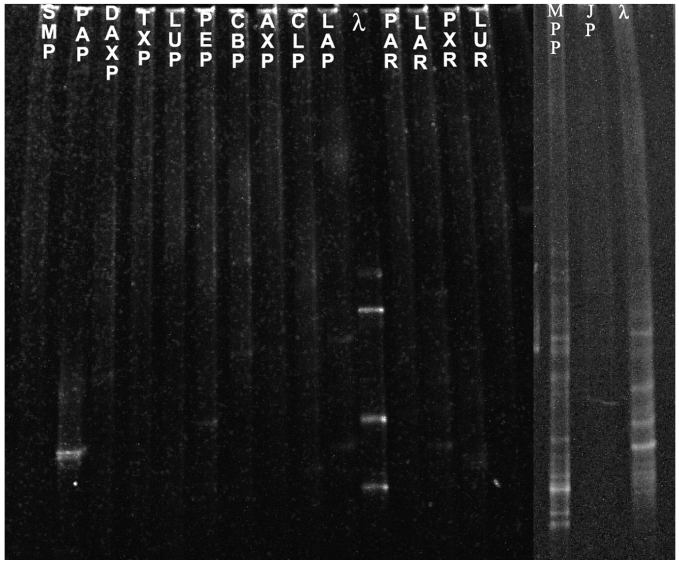


Figura 76: Geles de arcrilamida para la DGGE de las muestras de bacterias.

Atendiendo a todos los datos anteriores se hizo clonación para identificar las bandas en las pátinas de PAP, MPP, LAP, PEP, CBP, CLP y MPP y de las rocas de PXR y LAR. Se escogieron estas pátinas por ser las que presentan un mayor número de bandas distintas. Los datos de la clonación se muestran en las tablas 15 y 16.

Aún utilizando cebadores propios para bacterias, como las cianobacterias se encuentran englobadas dentro del grupo bacteria también se identificaron algunas especies. En algunos casos también identificamos otros organismos como organismos eucariotas (algas), ya que al estar todos los organismos muy próximos entre si, podemos amplificar fragmentos que no sean específicamente de bacterias.

Al introducir los datos de la secuenciación en la base de datos del NCBI para identificar los organismos presentes en las muestras, los resultados que se obtienen son resultados de similitud. Ésta puede ser similitud con una especie o similitud con un clon encontrado por otro investigador, por lo tanto además del nombre de la especie o clon identificado se muestra el porcentaje de similitud.

Los resultados de la secuenciación de los diferentes clones aislados de las muestras nos permiten diferenciar claramente unas muestras de otras. En las muestras de afloramientos se observa una mayor diversidad de organismos que en los monumentos y un predominio de las especies del grupo de las cianobacteria.

En las muestras de afloramientos (tablas 15 y 16) se identificó una gran variedad de organismos siendo en general diferentes de una muestra a otra. Así en la pátina de Lamas de Abade se identificó un organismo eucariota (*Chlorella saccharophyla*) con un 99 % de similitud y un clon bacteriano (JSC8-C10) con una similitud de 98 %. El género *Chlorella* es un género bastante frecuente en

las muestras de afloramientos, aparece en las pátinas del Pedroso, en Corrubedo y en la muestra del Convento del Carmen de Padrón.

Las muestras de pátinas recogidas en el monte Pedroso fueron agrupadas en una sola (PEP) ya que ambas eran muy similares entre sí. En ella se identificaron ocho organismos diferentes: una eucariota (*Chlorella saccharophyla*), dos clones de cianobacterias (clon 1973C – 47 y Cianobacteria antartica clon GL2-21), un clon de Proteobacteria (**α**-Proteobacteria clon no cultivado GASP-WC1S2_A07), un clon de Bacteroidetes (*Bacteroidetes bacterium* clon no cultivado JG35-K1-AG26), dos clones bacterianos (JSC8-C10 y TAa-48) y un organismo eucariota y fotótrofo (clon no cultivado 1790-8).

En la pátina de Campo Lameiro con cebadores específicos para bacterias se identificaron ocho organismos diferentes: cinco son clones bacterianos (clon JSC8-C10, Clon B37, Clon JordanB10 16S, clon JSC7-30 y clon 1790-3), dos cianobacterias (*Stigonema ocellatum* y el clon no cultivado FAC34) y un clon de Bacteroidetes (*Bacteroidetes bacterium* MH2-1 16S).

En la pátina de Corrubedo (CBP) se identificaron seis organismos: cuatro cianobacterias (*Xenococus sp.* Clone no cultivado SC47, el Clon no cultivado GL2-21, *Pseudophormidium sp* y el clon bacteriano no cultivado 1973C–47) y dos organismos eucariotas (*Chlorella sp*. y una eucariota fototrofica clon no cultivado 1790-8).

En las muestras de monumentos (Convento del Carmen de Padrón y Plaza de María Pita), así como en las muestras de roca no aparecen cianobacterias. En el convento de Carmen de Padrón (PAP) además de *Clorella saccharophila,* hay también un clon bacteriano (Clon bacteriano no cultivado JSC8-C10) y un bacteroidetes (*Bacteroidetes bacterium* clon no cultivado Crystal Bog 2F6). En la muestra de la Plaza de María Pita se identificaron 6

organismos diferentes, 4 de ellos del grupo de los bacteroidetes (Grupo bacteriano no cultivado CBF Clon SM1G04, *Spirosoma scanalatus, Flexibacteraceae bacterium* clon no cultivado LR2-77 y *Spirosoma-like sp.* PC5.1A) y dos Actinobacterias del género *Friedmaniella* (*Friedmanniella sp* Hellín 163 y *Friedmanniella spumicola*).

En las muestras de roca sin pátina (PXR y LAR) los organismos identificados son diferentes a los encontrados en las pátinas, no aparecen cianobacterias ni el género *Chlorella*. En la muestra LAR se identificaron tres organismos diferentes, un clon bacteriano (Clon bacteriano no cultivado JSC9-A), una actinobacteria (Clon bacteriano no cultivado Ellin 347) y un bacteroidetes (*Bacteroidetes bacterium* clon no cultivado Crystal Bog 2F6). En la muestra PXR se identificaron 8 organismos diferentes, cuatro clones bacterianos (Clon bacteriano no cultivado JSC9-A, Clon bacteriano no cultivado JSC7-30, Eubacterium clon no cultivado WD271 y Clon bacteriano no cultivado MIZ19) una actinobacteria (*Friedmanniella sp* Bacterium Ellin 347), una proteobacteria (*Burkhlderia sp.*), un firmicutes (*Staphylococus epidermidis*) y un organismo eucariota (*Chlamydomonas reinhardtii*).

Tabla 15: Resultados de la clonación para muestras de bacterias.

Bacterias			
Muestra	**Organismo**	**% de Similitud**	**Grupo**
CBP	*Xenococus sp.* Clone no cultivado SC47	94	Cianobacteria
	Chlorella sp. no cultivada.	99	Eucariota
	Eucariota fototrofica clon no cultivado 1790-8	97	Eucariota
	Clon no cultivado GL2-21	96	Cianobacteria
	Pseudophormidium sp.	98	Cianobacteria
	Clon bacteriano no cultivado 1973C – 47	99	Cianobacteria
CLP	Clon bacteriano no cultivado JSC8-C10	98	Bacteria
	Stigonema ocellatum	96	Cianobacteria
	Clon bacteriano no cultivado JordanB10	94	Bacteria
	Cianobacteria clon no cultivado FAC34	94	Cianobacteria
	Clon Bacteriano no cultivado B37	92	Bacteria
	Clon Bacteriano no cultivado JSC7-30	91	Bacteria
	Clon bacteriano no cultivado 1790-3	90	Bacteria
	Bacteroidetes bacterium MH2-1 16S	90	Bacteroidetes
	Clon bacteriano no cultivado 1790-3	95	Bacteria
LAP	*Clorella saccharophila*	99	Eucariota
	Chlorella saccharophila	94	Eucariota
	Clon bacteriano no cultivado JSC8-C10	98	Bacteria
PEP	Chlorella sp. no cultivada	99	Eucariota
	Clon bacteriano no cultivado JSC8-C10	98	Bacteria
	Clon bacteriano no cultivado 1973C – 47	99	Cianobacteria
	α-Proteobacteria clon no cultivado GASPWC1S2_A07	93	Proteobacteria
	Bacteroidetes bacterium clon no cultivado JG35-K1-AG26	89	Bacteroidetes
	Cianobacteria antartica clon no cultivado GL2-21	96	Cianobacteria
	Eucariota fototrofica clon no cultivado 1790-8	97	Eucariota
	Clon bacteriano no cultivado TAa-48	92	Bacteria

Tabla 15: Continuación

Bacterias			
Muestra	**Organismo**	**% de Similitud**	**Grupo**
PAP	*Bacteroidetes bacterium* clon no cultivado Crystal Bog 2F6	94	Bacteroidetes
	Clorella saccharophila	99	Eucariota
	Clon bacteriano no cultivado JSC8-C10	98	Bacteria
MPP	Grupo bacteriano no cultivado CBF Clon SM1G04	96	Bacteroidete
	Friedmanniella sp Hellín 163	96	Actinobacteria
	Spirosoma scanalatus	95	Bacteroidetes
	Flexibacteraceae bacterium clon no cultivadoLR2-77	89	Bacteroidetes
	Friedmanniella spumicola	98	Actinobacteria
	*Spirosoma-like sp.*PC5.1A	91	Bacteroidetes
LAR	*Bacteroidetes bacterium* clon no cultivado Crystal Bog 2F6	94	Bacteroidetes
	Clon bacteriano no cultivado Ellin 347	96	Actinobacteria
	Clon bacteriano no cultivado JSC9-A3	94	Bacteria
PXR	Clon bacteriano no cultivado JSC7-30	91	Bacteria
	Clon bacteriano no cultivado JSC9-A3	94	Bacteria
	Eubacterium clon no cultivado WD271	98	Bacteria
	Burkhlderia sp.	95	βProteobacteria
	Staphylococus epidermidis	99	Firmicutes
	Friedmanniella sp Bacterium Ellin 347	96	Actinobacteria
	Clon bacteriano no cultivado MIZ19	98	Bacteria
	Chlamydomonas reinhardtii	90	Eucariota

Los resultados de la DGGE para la amplificación utilizando cebadores específicos para cianobacterias se muestra en la figura 77 lo más destacable es al igual que en el caso de las bacterias, la presencia de muy pocas bandas. Las muestras de las pátinas de Lugo y Padrón son muy similares ya que tienen las mismas bandas y coinciden en una de sus bandas con la pátina del Pedroso;

además la pátina del Pedroso tiene también una banda común con la de Corrubedo. Teniendo en cuenta los datos de la DGGE se utilizaron las muestras de LAP, CLP, DAXP y PAP para hacer clonación ya que son las poseen bandas diferentes.

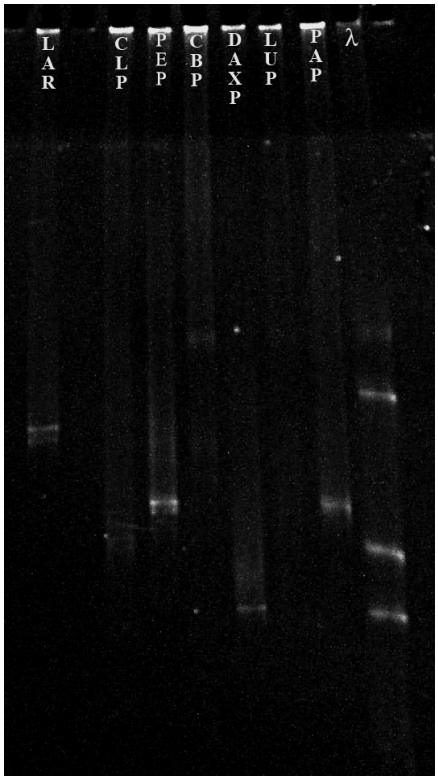


Figura 77: Gel de acrilamida para la DGGE de muestras de cianobacterias

Los datos de la clonación se muestran en la tabla 16. El principal organismo identificado es *Clorella sacharophilla* que aparece en LAP, PEP, CBP y en PAP, coincidiendo esto con los datos obtenidos para la identificación de bacterias. Otro de los organismos que aparece también en muchas de las muestras (LAP, CLP, PAP y DAXP) es el Clon bacteriano no cultivado AYRV2-144 (cianobacteria). El resto de los organismos que aparecen depende de la muestra. Así, en LAP aparece además una cianobacteria (Clon bacteriano no cultivado 1959a-08), en CLP aparecen también *Stigonema ocellatum* y el

Clon bacteriano no cultivado 1959a-38, en PAP se identificaron además *Pseudophormidium sp* y un Clon bacteriano no cultivado 1790-2, y por último, en DAX se identificó *Synechococcus sp* CIBNOR 42.

Tabla 16: Resultados de la clonación para cianobacterias

Cianobacterias			
Muestra	**Organismo**	**% de Similitud**	**Grupo**
LAP	*Clorella sacharophilla*	99	Eucariota
	Clon bacteriano no cultivado 1959a-08	97	Cianobacteria
	Clon bacteriano no cultivado AYRV2-144	94	Cianobacteria
CLP	Clon bacteriano no cultivado AYRV2-144	93	Cianobacterias
	Stigonema ocellatum	96	Cianobacteria
	Clon bacteriano no cultivado 1959a-38	92	Cianobacteria
PEP	*Chlorella sacharophilla*	99	Eucariota
CBP	*Chlorella sacharophilla*	99	Eucariota
PAP	*Chlorella sacharophilla*	99, 96	Eucariota
	Clon bacteriano no cultivado AYRV2-144	93	Cianobacteria
	Clon bacteriano no cultivado 1790-2	94	Cianobacteria
	Pseudophormidium sp	98	Cianobacteria
DAXP	Clon bacteriano no cultivado AYRV2-144	93	Cianobacteria
	Synechococcus sp CIBNOR 42	97	Cianobacteria

Como resumen final de todos los resultados en la tabla 17 se muestra un compendio de los datos más interesantes obtenidos en el estudio de las pátinas negras analizadas

Tabla 17: resumen de los resultados obtenidos en este estudio

	AFLORAMIENTOS								MONUMENTOS											
Muestra	**AXNP**	**AXG**	**AXR**	**CBP**	**CLP**	**LAP**	**PEP**	**TXP**	**DAX**	**CAP**	**PXP**	**FJP**	**FP**	**HP**	**SMP**	**TP**	**MPP**	**JP**	**LUP**	**PAP**
Matriz orgánica	X	X		X	X	X	X	X									X			
Matriz Inorgánica			X						X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Carbono	X	X	X	X	X	X	X	X					X		X					
Azufre												X	X	X	X	X		X		X
Fósforo	X														X			X	X	X
Yeso													X	X	X	X		X		
Clorofila	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X								
Proteínas	X	X	X	X	X	X	X	X	X				X							
Partículas metálica de contaminacion						X			X	X		X	X							
Presencia de ácidos grasos	X	X	X	X	X	X	X	X				X	X		X				X	X
Bacterias	X	X	X	X	X	X	X	X	X						X		X		X	X
Cianobacterias				X	X	X	X												X	X
Algas				X		X	X													X

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

El estudio morfológico de las muestras pone de manifiesto que las pátinas desarrolladas sobre los afloramientos naturales son muy diferentes de las que aparecen en los monumentos. Si bien todas ellas consisten en un material fino predominante (matriz) que engloba partículas diferenciadas, la naturaleza de dicho material y de las partículas varía según se trate de muestras tomadas en afloramientos o en monumentos. Así, mediante la observación con el microscopio electrónico de barrido (MEB) se ha comprobado que en todas las pátinas de afloramientos, el componente principal es de naturaleza orgánica mientras que en las pátinas tomadas en monumentos el componente principal es inorgánico.

Así, las pátinas pertenecientes al afloramiento de Axeitos aunque difieren en color (negro, gris y rojo), están formadas por un depósito biológico continuo, es decir que cubre el sustrato rocoso totalmente (Figura 20). Las pátinas roja. y negra poseen además partículas inorgánicas que parecen haber quedado atrapadas entre las estructuras biológicas (Figura 20 c, d, e y f); la pátina roja es un caso especial ya que posee un espesor menor que la pátina negra (tabla 5) y, aunque superficialmente se observan algunas estructuras biológicas formando parte de la pátina, se ve también que esta compuesta principalmente por hierro (figura 54 a), elemento que le proporciona el color que la caracteriza (27,12 L*, 6,03 a* y 9,67 b*). Tal y como se observa en la figura 29 es la pátina de afloramientos que posee un mayor valor de a*, es decir es la más rojiza. Una ganancia de hierro fue encontrada sobre pátinas desarrolladas en superficies graníticas por otros autores (Schiavon *et al*., 1994).

La pátina recogida en el afloramiento de Lamas de Abade (figura 22) constituye un caso especial respecto a los demás afloramientos. Al observarla al MEB se encontraron, aparte de una matriz orgánica, partículas esféricas de diferente composición (hierro, titanio y silicio), pero siempre de naturaleza mineral (figura 47). Partículas esféricas de similar composición encontradas por otros autores en muestras de monumentos, fueron atribuidas a la contaminación ambiental (Sabbioni, 1995). Hay que tener en cuenta que aunque se trata de un afloramiento natural, éste se encuentra en una cantera situada en las afueras de la ciudad de Santiago de Compostela, es decir en una zona urbana y que la cantera está actualmente en explotación, por lo tanto, la presencia de estas partículas podría estar relacionada con el tráfico y las actividades industriales.

En el resto de las muestras tomadas en afloramientos naturales, la matriz de la pátina es de naturaleza orgánica con numerosos restos biológicos; las principales diferencias entre las pátinas radican en su espesor, la profundidad de penetración dentro de la roca y la morfología de la parte orgánica que forma dicha matriz. Así, en algunos casos es difícil establecer en qué punto acaba la pátina y empieza la roca, como ocurre en la pátina de Corrubedo (Figura 21 c, d y e), formada por un matriz de aspecto mucilaginoso, en la pátina de Campo Lameiro (Figura 21 a y b), formada por un acúmulo de células alargadas, y en una de las pátinas del Pedroso (Figura 23 a), formada por estructuras filamentosas con apariencia de hifas; todas ellas presentan límite difuso con la roca subyacente. Otras pátinas de afloramientos presentan un límite neto con la roca, es decir no penetran dentro de ella, como son la pátina 2 del Pedroso y la de Toxosoutos (tabla 5); ambas se encuentran formadas por estructuras filamentosas con aspecto de hifas.

En cuanto a las pátinas tomadas en monumentos, a partir de su estudio morfológico podemos decir que su componente fundamental es de naturaleza inorgánica.

En el caso de los dólmenes (figuras 24 a, b y c y 28), el hecho de que éstos sean construcciones muy simples constituidas solamente por piedra y sin ningún material extraño a ellas puede hacer pensar en un comportamiento similar al de los afloramientos, sin embargo las pátinas de estos monumentos son muy diferentes ya que su naturaleza es fundamentalmente inorgánica. Esta diferencia se ve claramente en el caso del dolmen de Axeitos, situado en una zona muy próxima al afloramiento del mismo nombre, ya que, a diferencia de lo que ocurre en el afloramiento donde el componente biológico es el responsable de la formación de las pátinas negras, en el caso del dolmen la contribución biológica no es muy importante y son partículas inorgánicas las que las forman .

Las pátinas de los dólmenes de Axeitos y de Cabaleiros están formadas por una película inorgánica, continua, con un espesor entre 5 y 15 μm (tabla 5) y que contiene numerosas partículas esféricas. Al analizarlas por EDAX han resultado ser fundamentalmente de hierro y potasio (Figura 48 A). Por el contrario, las estructuras biológicas en estas pátinas son escasas. Puesto que estos monumentos están situados en una zona forestal, en un área rural donde la contaminación atmosférica es inapreciable, lo más probable es que estas pátinas tengan su origen en las hogueras hechas en el interior de los dolmenes, práctica muy frecuente en el pasado, utilizando como combustible, con toda probabilidad, leña o carbón vegetal. Esta teoría se fundamenta en que las partículas esféricas que se detectan por MEB son de morfología similar a las partículas metálicas que Sabbioni (1995) y Sabbioni *et al*. (1995) atribuyen a la combustión de carbón.

La pátina del dolmen de Parxubeira es sin embargo morfológicamente un poco diferente a las de los anteriores (tabla 5), ya que es un poco más gruesa (20-200 μm) y contiene además bastantes rasgos biológicos, aunque se encuentran entremezclados con partículas de naturaleza mineral (figura 24 b y c). En este caso parece que existe una cierta contribución biológica en la formación de esta pátina.

En los monumentos urbanos no se detectan estructuras que puedan hacer pensar en una contribución biológica importante (figuras 24 d, e y f, 25, 26 y 27) salvo en las pátinas tomadas en la fachada del colegio Francisco Javier (Figura 24 d) y en la plaza de María Pita (figura 27), donde sí se pueden ver rasgos claramente biológicos mezclados con partículas esféricas de naturaleza mineral. Las partículas esféricas de la pátina del colegio Francisco Javier están formadas principalmente por hierro y calcio (figura 48B) y las de la pátina de María Pita poseen muy diversa composición (figura 52), ya que algunas están formadas principalmente por hierro, otras por calcio y silicio, otras con abundante fósforo, calcio e hierro y algunas por carbono. La presencia de partículas esféricas en las muestras se ha asociado a la contaminación ambiental producida por la quema de combustibles fósiles. Partículas de este tipo han sido encontradas también en la superficie de edificios en otros estudios (Sabbioni., 1995; García-Valles *et al*., 1996, 1998; Ghedini *et al*., 2003; Bonazza *et al*., 2004; Jiménez de Aro *et al*., 2004; Sabbioni *et al*., 2004; Pérez-Rodríguez *et al*., 2004) atribuyendose siempre su origen a la contaminación atmosférica.

Esta diferenciación, en cuanto a la morfología de las pátinas en orgánicas e inorgánicas, ha sido realizada también por otros autores pero siempre en pátinas desarrolladas en monumentos, ya que apenas existen trabajos de este tipo sobre pátinas desarrolladas en afloramientos naturales.

Schiavon *et al* (1994), en uno de los pocos estudios sobre pátinas formadas en edificios graníticos, encontraron que todas ellas tenían naturaleza eminentemente inorgánica, aunque detectaron la presencia de algunos organismos en algunas de ellas, y las clasificaron en costras ricas en yeso y costras ricas en hierro. Atendiendo a esta clasificación, las pátinas de San Martín Pinario, Toural, San Jorge, Fonseca e Historia podríamos denominarlas como ricas en yeso, puesto que éste es uno de sus principales componentes (figuras 24 e y f, 25 y 26 a). Además, coincidiendo con lo encontrado por estos mismos autores, estas muestras son aquellas en las que el granito subyacente a las pátinas presenta un mayor grado de alteración. Esta alteración parece derivar de la precipitación de yeso en los huecos de la roca, mecanismo de alteración que ya se puso en evidencia en otros estudios sobre rocas graníticas (Rivas *et al.*, 1997). Así, al MEB se observa este mineral cristalizado entre las láminas de mica provocando la apertura de sus planos de exfoliación (Figura 25 a). Salvo en Fonseca, las pátinas negras de estos monumentos se encuentran sobre placas, esto es separaciones de la capa superficial de los sillares cuyo desarrollo, según Silva *et al.* (1996b) está relacionado con la presencia de yeso. En los análisis por difracción de rayos-X (figura 34 y 35 A y B) de las muestras de estos edificios no se detectó ninguno de los minerales indicativos de la meteorización del granito, como son la caolinita o la vermiculita (Silva *et al.*, 1993; Rivas *et al.*, 1994), que pudieran explicar la desagregación del granito, ni ningún mineral de los que se suelen asociar con el biodeterioro, como son los oxalatos (Prieto *et al*., 1999; Rampazzi *et al*., 2004).

Las costras o pátinas ricas en yeso son frecuentes en monumentos construidos con rocas de naturaleza calcárea (Garcia-Vallés *et al*., 1996; Galleti *et al*., 1997; Sainz-Jimenez *et al.*, 2004; Maravelaki-Kalaitzaki, 2005). En monumentos construidos con rocas graníticas los estudios son menos numerosos, y en algunos casos, la presencia de las pátinas o costras de yeso se ha atribuido a antiguos revestimientos hechos con este material o a

revestimientos de cal que sufrieron el proceso de sulfatación (Sanjurjo-Sanchez. *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003). Este último podría ser el caso de la fachada del edificio de la plaza del Toural, que con toda probabilidad antiguamente estaba revestida de cal, como se deduce de los restos que todavía existen y de las fotografías antiguas que se conservan de otras casas de esta misma plaza.

La pátina del Palacio de Fonseca es un caso especial ya que, aunque es una pátina rica en yeso, este mineral está entremezclado con abundantes partículas formadas por Pb y Cl (figura 49). Esta pátina se encuentra recubriendo unas estatuas en la puerta principal del Palacio de Fonseca, por lo que en este caso es muy probable que estas estatuas hayan estado pintadas y que el yeso provenga de la base o preparación de la pintura y las partículas que aparecen sean componentes de la propia pintura.

El origen del yeso que se encontró en las pátinas de San Martín Pinario, de la Facultad de Historia y de la Iglesia de San Jorge no está tan claro, ya que no hay evidencias de la existencia de ningún revestimiento de cal o yeso en la superficie de esos monumentos.

El yeso fue encontrado muchas veces en los monumentos de Santiago y su origen fue discutido en varios trabajos (Rivas *et al*., 1997; Prieto *et al*., 1999; Silva *et al*., 2005). La hipótesis más factible es que proceda de los morteros de juntas, bien porque se hubiera usado como un aditivo de la cal, o bien que se hubiera formado a partir de la sulfatación de la misma. En cualquier caso, al disolverse el sulfato cálcico de las juntas, los iones penetran en disolución dentro de la masa rocosa, y al evaporarse el agua, precipitan. Frecuentemente lo hacen a cierta profundidad por debajo de la superficie, dando lugar a desplacaciones y escamas, pero en otros casos, como ocurre en las muestras estudiadas en este trabajo, puede precipitar encima de la superficie dando lugar a la formación de pátinas negras.

En estudios anteriores realizados sobre rocas graníticas colonizadas por líquenes (Prieto *et al*., 1999) se ha puesto de manifiesto la importancia de emplear diferentes técnicas analíticas para detectar yeso. En dicho trabajo, el empleo de espectroscopia Raman y MEB permitió evidenciar la presencia de yeso en muestras en las que por otras técnicas, como la difracción de rayos-X, se había descartado la presencia de dicho mineral. En el presente estudio también ha sido necesario emplear diferentes técnicas para asegurar o descartar su presencia. Esto es el caso de la pátina de San Martín Pinario en la que el yeso sólo fue detectado empleando MEB (figura 25 a y b), pero no por DRX (figura 34 C) ni por IR-Raman (figura 66 A). Sin embargo, en la pátina de la Facultad de Historia este mineral se identificó mediante la técnica de DRX (figura 34 B), pero no se pudo detectar con el estudio morfológico utilizando el MEB (figura 24 e y f), ni con IR-Raman (figura 66 B).

Como ya se comentó anteriormente, en las pátinas del Toural, San Jorge e Historia el yeso es el principal componente. Sin embargo, en las pátinas de Fonseca y del monasterio de San Martín Pinario este mineral no es el compuesto mayoritario ya que, tal y como se evidenció en el análisis de distribución de elementos utilizando microscopía electrónica (figura 59 y 60 a, b y c) y en el análisis químico por fluorescencia de rayos-X (tabla 7), hay otros elementos que se encuentran en mayor porcentaje que el azufre y el calcio.

En el resto de las muestras de monumentos urbanos, aunque no se detectó la presencia de yeso, sí existen diferencias notables en el contenido de azufre con respecto a las pátinas de afloramientos y de dólmenes. Este elemento, cuantificado mediante análisis elemental (CHNS) sólo aparece en las pátinas de los monumentos urbanos mientras que en las de afloramientos y de dólmenes no hay constancia de su presencia, a excepción de la pátina de Campo Lameiro, donde sí se detecta, pero en muy pequeña cantidad (Tabla 6). En los monumentos urbanos, el azufre aparece en la mayoría de ellos, sin embargo hay

algunas muestras en las que este elemento no ha podido ser detectado utilizando la técnica del análisis elemental como son las muestras de María Pita y de la Catedral de Lugo. Empleando la fluorescencia de rayos-X (tabla 7), técnica que posee una sensibilidad mayor, se detecta también azufre en los afloramientos y en las muestras de María Pita y de la catedral de Lugo, pero siempre en cantidades muchísimo menores que en el resto de monumentos; se pone así de nuevo de manifiesto la importancia de emplear diversas técnicas en el estudio de pátinas negras. Por tanto, el azufre puede considerarse como el elemento diferenciador entre pátinas formadas en ambientes rurales y pátinas urbanas, ya que este elemento solo aparece en estas últimas en cantidades mayores del 0,2 % del total de la pátina.

La importancia del azufre como elemento constituyente de pátinas negras, bien en forma de yeso o como otros compuestos, fue descrita, entre otros, por Saiz-Jiménez *et al.* (2004). Este autor concluye que las pátinas y costras negras existentes sobre diversos monumentos urbanos construidos con rocas calcáreas, tienen su origen en el SO_2 atmosférico que produce la sulfatación de las calizas dando lugar al yeso, según un proceso bien conocido.

En el caso de rocas graníticas la sulfatación no parece factible, ya que estas rocas son muy pobres en calcio, siendo el principal mineral que posee este elemento la plagioclasa, pero precisamente, en el caso de los granitos gallegos, ésta es más rica en sodio que en calcio. Sin descartar que puntualmente se pueda dar la formación de yeso a partir del calcio de la plagioclasa, tal y como propone Schiavon (2000), parece claro que el proceso de sulfatación en granito solo podría tener lugar si existe un aporte adicional de calcio suministrado por la cal de revestimientos o juntas. En dicho caso, la cuestión es si en una ciudad como Santiago de Compostela, con un nivel de contaminación atmosférica bajo, se puede dar el proceso de sulfatación. Rivas *et al* (1997) demostraron que efectivamente esto es posible, pues en un experimento realizado con probetas

graníticas unidas con mortero de cal e introducidas en una cámara de SO_2 con una concentración de este gas similar a la que existe en Santiago (10 mg/l), se produjo de forma rápida la sulfatación de la cal y la cristalización de yeso dentro de los huecos del granito.

El siguiente elemento químico en importancia en la composición de las pátinas estudiadas es el fósforo. Se vio que este elemento forma parte de muchas pátinas de monumentos, sobre todo asociado al calcio. Mediante el estudio de distribución de elementos empleando microscopía electrónica se observó que en las pátinas de San Martín Pinario, Lugo y Padrón (figuras 60 a, b y c y 62) no es el yeso el componente mayoritario de la pátina sino que es un compuesto formado por fósforo y calcio y que son estos elementos los que diferencian estas pátinas de la roca subyacente. El incremento en fósforo también ha sido comprobado con fluorescencia de rayos-X (tabla 7), siendo de especial relevancia en las muestras de San Martín Pinario y de la iglesia de San Jorge. En la pátina negra del afloramiento de Axeitos, aunque con el estudio de distribución de elementos empleando microscopía electrónica no se detecta diferencia en el contenido de fósforo entre pátina y roca subyacente (figura 54 d, e y f), con el estudio químico sí que se observa una ganancia de fósforo en la pátina con respecto de la roca (figura 37).

Pátinas negras ricas en fósforo han sido también encontradas en otros estudios en los que la presencia de este elemento se asoció a acumulaciones de apatito, carbonato-apatito e hidroxiapatito (Alvarez y Fort, 2002; Moropoulou *et al*., 2003; Polikreti y Maniatis., 2003; Rampazzi *et al*., 2004; Malaveraki-Kalaitzaki, 2005). Su acumulación en las pátinas se pensó que podría deberse a varios factores: al depósito de partículas atmosféricas, a los residuos dejados por jabones utilizados en la limpieza de zonas próximas, a residuos de posibles tratamientos de conservación de la piedra basados en mezclas de fosfatos y silicatos solubles, o a la mineralización de protectores orgánicos utilizados en

conservación que contienen compuestos de fósforo, sobre todo derivados de la leche y sales de caseína (Alvarez y Fort, 2002). Otros autores como García Vallés *et al.* (1996), encontraron fósforo en pátinas de edificios en forma de hidroxiapatito, pero lo relacionan con un origen biológico, ya que autores como Lucas y Prévôt (1984) y Soundry y Lewy (1988) consideran que algunas colonias de bacterias aumentan el fosfato en la disolución presente en los poros de la roca provocando la precipitación local del apatito. Los fosfatos pueden provenir también de excrementos de animales, muy ricos en estos compuestos.

En los monumentos estudiados en este trabajo no hay constancia de que se haya aplicado ningún tratamiento de conservación, sin embargo la zona donde se recogieron las pátinas negras está próxima al suelo, por lo que se puede pensar en cierto aporte de fosfatos a partir de restos de jabones utilizados en la limpieza de los suelos y de zonas próximas. Tampoco se puede descartar el aporte debido a excrementos de aves. De todos modos, el posible origen biológico de estos compuestos es otra posibilidad, ya que en las pátinas en las que aparece fósforo hay un cierto componente biológico y en el caso de la pátina negra del afloramiento de Axeitos el componente biológico es el mayoritario. Aunque el fósforo y el calcio han sido detectados utilizando diferentes técnicas de análisis químico, no se ha podido determinar el compuesto que forman estos dos elementos. Una de las posibles explicaciones es que estos compuestos de calcio y fósforo se encuentren en un estado poco cristalino y por lo tanto no puedan ser detectados por métodos como la DRX.

Por otra parte, en todos los casos estudiados se observó también un incremento en las pátinas con respecto a la roca sin pátina en el contenido de carbono e hidrógeno y, en la mayoría, también de nitrógeno, elementos constituyentes esenciales de los compuestos orgánicos (Tabla 6). Esto, sin embargo, no acredita la contribución de los organismos a la formación de la pátina, ya que estos elementos pueden proceder de procesos de combustión de

carbones e hidrocarburos.

A este respecto, Hermosin *et al.* (2004) analizaron los compuestos orgánicos presentes en costras negras de diferentes monumentos europeos e identificaron moléculas indicadoras de los derivados del petróleo, de maderas de coníferas y de lignitos. Con este estudio demostraron que la composición de las costras dependía sobre todo de las partículas de contaminación atmosférica de cada área.

Además de este estudio, hay otros que confirman que la existencia de compuestos orgánicos en las pátinas no certifica su origen biológico, ya que la mayoría de estos compuestos proceden de la contaminación atmosférica, de modo que su presencia indicaría que el origen de la pátina es antrópico (Hamilton *et al.*,1995; Ghedini *et al.*, 2003; Cachier *et al*., 2004; Gaviño *et al*., 2004; Reyes *et al*., 2004; Bonazza *et al.*, 2004, 2005).

En el caso de los afloramientos, con la técnica de análisis elemental (tabla 6) y con la microsonda de fluorescencia de rayos-X asociada al MEB (figuras 39 y 40 A), se aprecia una diferencia importante en cuanto a la cantidad de carbono presente en las pátinas y en la roca aparentemente limpia, siendo muchísimo mayor en las pátinas. Los posteriores análisis biológicos realizados confirman que este carbono en las pátinas de afloramientos es de origen biológico y no de contaminación.

En cuanto a la presencia de carbono en las pátinas de monumentos (tabla 6 y figuras de la 40B a la 46), sólo se observan diferencias importantes entre la pátina y la roca en las muestras del colegio Francisco Javier, del palacio de Fonseca, del monasterio de San Martín Pinario, la iglesia de San Jorge y el convento del Carmen de Padrón. En este caso, es difícil establecer comparaciones con otros estudios ya que la mayoría se refieren a pátinas

desarrolladas sobre monumentos construídos con rocas que tienen carbono en su composición. La cantidad de carbono exógeno sólo puede compararse disponiendo de datos de carbono no carbonatado. A este respecto, Ghedinni *et al*. (2003) y Sabbioni *et al*. (2004) en estudios sobre carbono total de las pátinas negras desarrolladas sobre roca caliza, distinguieron el carbono procedente del carbonato y el carbono no carbonatado, englobando en este último el carbono orgánico y el elemental. Estos autores encontraron cantidades de carbono no carbonatado en las pátinas estudiadas del orden de 1,03-2,51 % (Ghedinni *et al*., 2003) y 1,04-2,04% (Sabbioni *et al*., 2004). En las muestras de monumentos estudiadas en este trabajo el rango va desde 0,01% a 0,82% (tabla 7) a excepción de las pátinas de Fonseca y San Martín Pinario que superan este rango, mientras que para los afloramientos el rango va desde 0,16% a 0,49%.

La pátina de Fonseca es la que posee un mayor contenido de carbono de todas las estudiadas (tabla 6) superando el 20%, sin embargo su contenido en clorofila (figura 71) es muy bajo y no se reconocen organismos formando parte de la pátina, por lo que el carbono presente en la pátina proviene de una fuente diferente de la biológica. Esta pátina, que recubre unas estatuas en la portada del Palacio de Fonseca es muy compleja, ya que además de carbono hay otros compuestos como el yeso, detectado por MEB (figura 26 b) y DRX (figura 34 A), y un compuesto de potasio, plomo y cloro llamado pseudocotumnita ($KPb_2Cl5/KCl2PbCl_5$) que fue detectado por DRX (figura 34 A) y visto al MEB (figura 26 b).

Estas estatuas han estado pintadas y por ello se identifica calcita, mineral utilizado como base de la pintura, por DRX (figura 34 A) y por IR-Raman (figura 68 B); la sulfatación de la calcita ha dado lugar al yeso. Sobre esta calcita utilizada como base aparecen en algunas zonas restos de una pintura rojiza que ha sido identificada por DRX como gohetita (figura 34 A) y partículas compuestas de potasio, cloro y plomo, que también forman parte de la pintura.

Las sales de plomo como la cerusita (carbonato de plomo), de color blanquecino, y el óxido de plomo (minio) se han empleado en múltiples ocasiones como base de muchas pinturas antiguas, por lo que se cree que el compuesto que aparece en esta pátina puede provenir de la degradación de algún compuesto de plomo utilizado como pintura.

Por otra parte, en los años 60, estas estatuas, al igual que otros grupos escultóricos de la ciudad de Santiago, fueron tratadas con cera de abeja con el objeto de impermeabilizarlas y protegerlas; ésta puede ser la razón de que la pátina presente enormes cantidades de carbono. La presencia de esta cera se confirmó mediante espectroscopia Raman (figura 68 B), ya que se encontraron dos bandas muy grandes a 2851 cm^{-1} y a 2892 cm^{-1} y otra a 1440 cm^{-1}, que corresponden con la cera de abejas similar a la encontrada por Regert *et al*. (2006) en el estudio de la composición de los productos de protección aplicados a varias estatuas que se encuentran en diferentes museos de Francia. La presencia de cera justifica también la existencia de ácidos grasos no identificados por el sistema MIDI (tabla 14), que se corresponderían con productos derivados de la degradación de la cera.

Otra de las pátinas que presenta un alto porcentaje de carbono con respecto a la roca limpia (tabla 6) y en la que el contenido en clorofila y proteínas no es muy alto (Figuras 70 y 71), es la de San Martín Pinario. Además, esta pátina contiene yeso (Figura 25 a y b), aunque este compuesto se encuentra en mayor cantidad en la roca superficial sin pátina que en la propia pátina; hay que señalar que ambas muestras corresponden con sendas placas y que probablemente el yeso tuvo que ver en su formación. Todo ello nos lleva a pensar que en el caso de San Martín Pinario estamos ante una pátina de contaminación atmosférica y composición carbonosa, pátinas que en la bibliografía se citan sobre todo en zonas urbanas, y su origen se atribuye fundamentalmente a la contaminación producida por el tráfico y las

calefacciones. Cachier *et al* (2004) estudiaron la contaminación atmosférica que afecta a cuatro importantes edificios europeos, destacando sobre todo la importancia en el deterioro de estos edificios de las partículas finas o muy finas de naturaleza carbonosa procedentes de la contaminación provocada por el trafico. Sugieren que el aumento de partículas de naturaleza carbonosa en los edificios es debido, por un lado, a la disminución del azufre en las gasolinas que provocó una aumento relativo de los óxidos de nitrógeno y de las partículas de carbono y, por otro lado, al aumento de automóviles diesel que emiten mayor cantidad de carbono a la atmósfera. Hay que tener en cuenta que la pátina de San Martín Pinario fue tomada en una zona del monasterio en la que hasta hace un par de años discurría el tráfico e incluso era utilizada habitualmente como aparcamiento.

Como acabamos de ver, las patinas negras presentan con respecto de la roca sin pátina una ganancia de calcio, fósforo, azufre, hierro y carbono, según sea su procedencia. Pero además de éstos, hay otros elementos que presentan incrementos en la pátina con respecto a la roca. Observando las figuras 37 y 38 donde se muestran las relaciones patina/roca para cada una de las muestras de los afloramientos, lo más destacado ocurre en la muestra de Axeitos, donde en la pátina se aprecia una pérdida de aluminio y un enriquecimiento en silicio; esto mismo se pudo comprobar con el estudio de distribución de elementos mediante microscopía electrónica (figura 54 d, e y f). Además, en esta pátina hay también una ganancia de magnesio, hierro, titanio y cloro. Un enriquecimiento de hierro se ha encontrado también en la pátina roja de este mismo afloramiento, lo que se atribuye a la oxidación de algunos minerales de la roca como la biotita muy rica en hierro (el titanio tiene un comportamiento geoquímico similar al hierro y puede sustituirlo en algunos minerales). El cloro, lo más probable es que provenga de los aerosoles marinos, dado que este afloramiento esta muy próximo al mar.

En la pátina de Corrubedo hay una ganancia de magnesio, bromo y cloro, todos ellos elementos que provienen de los aerosoles marinos, lo cual es lógico ya que este afloramiento se encuentra muy próximo al mar. En la pátina de Lamas de Abade hay una ganancia de galio y niobio.

En las pátinas de los dólmenes se aprecia una ganancia en magnesio, galio y niobio. En los monumentos urbanos destaca sobre todo la pátina de Fonseca donde hay una ganancia en cloro, cromo, niquel, indio, plomo y también una disminución relativa muy grande de silicio y aluminio respecto a la roca sin pátina. Las importantes ganancias en cloro y plomo se explican por la presencia de la pseudocotumnita que aparece en la pátina; el níquel y también parte del plomo, pueden provenir de la contaminación provocada por el trafico, tal y como demuestran McAlister *et al*. (2006) en un estudio en el que realizaron extracciones selectivas de elementos como el hierro, zinc, cromo, níquel, magnesio, cobre y plomo en muestras de costras negras de dos edificios de Budapest y analizaron cuáles eran los compuestos mayoritarios en los que aparecía cada elemento y si había cantidades importantes de estos elementos en la pátina. Estos autores destacan la importancia del zinc, níquel, cobre y plomo ya que todos ellos son elementos procedentes de la contaminación; el zinc, el níquel y el plomo son componentes de las gasolinas y el cobre procede de los fungicidas utilizados en la limpieza de muchas fachadas. El indio es un elemento con un comportamiento geoquímico muy similar al plomo por lo que puede sustituirlo, y ya que en esta pátina las cantidades de plomo son muy altas no es de extrañar que también haya ganancia de este elemento.

En el resto de monumentos también se observaron ganancias relativas de algunos elementos. Así en San Martín Pinario hay una ganancia en plomo, en Historia hay una ganancia en mercurio, en Lugo hay ganancia de plomo y arsénico y en Padrón de itrio. Bityukova (2006) en un estudio sobre edificios de Tallin (Estonia) analizó los elementos traza presentes en costras negras,

encontrando que para los elementos arsénico, bario, cobre, plomo, estaño, antimonio y zinc, la costra negra tiene en algunos casos entre 2 y 3 veces más cantidad que la roca. Considera que estos elementos provienen de la contaminación atmosférica y que se acumulan en las costras negras ya que quedan retenidos por el yeso. Comparando los datos de Bityukova (2005) con los obtenidos en este trabajos se observa que en el caso de las pátinas de Tallin los valores para el zinc van desde 4 a 139 mg/kg , para el cobre desde 3 a 256 mg/kg y para el plomo desde 5 a 133 mg/kg, mientras que en este trabajo los valores de zinc (20 a 654 mg/kg) y de plomo (44,6 a >1162 mg/kg) son bastante mayores y sin embargo los valores del cobre son un poco menores (0,71 a 196 mg/kg).

Una vez caracterizadas químicamente las pátinas y después de hacer un primer apunte sobre la presencia de organismos en ellas gracias al estudio morfológico, fue necesario comprobar con análisis biológicos la existencia de estos organismos. La presencia de compuestos de carbono no implica necesariamente una contribución biológica puesto que, como ya se ha comentado, en las pátinas puede haber hidrocarburos y/o lípidos que tienen su origen en la combustión de derivados del petróleo o en actividades industriales. En este trabajo se realizaron diversos estudios biológicos para determinar si existen o no organismos colonizando las pátinas: se realizó un análisis de la cantidad de proteínas y clorofila, un estudio del perfil de ácidos grasos y una identificación de los organismos presentes en las pátinas utilizando técnicas de biología molecular. Cada una estas de técnicas proporciona una información diferente y es el análisis de toda la información en conjunto lo que nos permite afirmar o negar el origen biológico de las pátinas.

El primero de los análisis biológicos realizados fue el estudio de las proteínas y de la clorofila, compuestos presentes en la mayoría de los organismos colonizadores de rocas. Se determinó el contenido de clorofila y

proteínas en muestras de pátina y en muestras tomadas en la superficie de la misma roca en un área donde no existía pátina (Figuras 70 y 71). Con esta comparación se pretende establecer hasta qué punto la contribución biológica tiene importancia en la formación de las pátinas. La mayor cantidad de proteínas en la pátina que en la roca sin pátina indicaría la importancia de organismos en general en la formación de las pátinas, y la mayor cantidad de clorofila indicaría la importancia de los organismos fotosintéticos.

A partir del estudio de las proteínas y la clorofila se conoce si sobre las pátinas hay organismos y si son o no fotosintéticos, pero no se sabe nada sobre las poblaciones que colonizan estas pátinas (si son las mismas en todas las pátinas, que tipos de organismos hay, etc.). Para ello se realizó un estudio del perfil de ácidos grasos y una identificación de los organismos utilizando técnicas moleculares de estudio del ADN.

El estudio de los ácidos grasos proporciona una idea general de las poblaciones de organismos que colonizan una muestra; en cultivos celulares puede incluso llegar a identificarse la especie, por ello es una técnica que ha sido empleada en algunas ocasiones para la identificación de bacterias (Müller *et al*., 1998; Laiz *et al*., 2000). Sin embargo, en muestras complejas como es el caso de las pátinas negras esto no es posible, ya que existe una gran variedad de organismos que comparten los mismos tipos de ácidos grasos, por lo que este método no permite identificar los organismos presentes en ellas y por tanto no ha sido muy utilizado en este tipo de muestras. Aún siendo una técnica novedosa y poco aplicada hay algunos estudios como los de Galletti *et al*. (1997), que identificaron 15 ácidos grasos de cadena corta en una pátina negra de la portada de la Abadía de San Denis (Francia) y Heirman *et al*. (1999) que utilizaron la caracterización de ácidos grasos para identificar la población bacteriana que coloniza muestras de pinturas murales de diferentes partes de Europa.

Puesto que el estudio del perfil de ácidos grasos en este tipo de muestras no permite la identificación de organismos, el siguiente paso fue un estudio más concreto de identificación de organismos utilizando técnicas de biología molécular, que proporcionan una información muy precisa sobre las poblaciones que constituyen las pátinas.

Todos estos análisis permitieron establecer claras diferencias entre las pátinas de afloramientos y las de monumentos. En lo que se refiere a las primeras, cuyo origen tal y como se supuso en principio y como se comprobó con el estudio por MEB, es biológico, las cantidades de clorofila y proteínas siempre son mayores en las pátinas que en la roca sin pátina (Tabla 10), y en el caso de las proteínas esta diferencia es muy grande (Tabla 10). De todas maneras, lo que queda claro es que en la roca limpia también se detectó tanto clorofila como proteínas en todos los casos, por lo que desde el punto de vista analítico, la simple presencia de estas sustancias en las pátinas no podemos tomarla como indicativa de un origen biológico. Lo que sí puede ser significativo es la diferencia, es decir el hecho de que en las pátinas haya una cantidad de estas sustancias considerablemente mayor que en las áreas sin pátinas, pues esto indicará que hay una acumulación de organismos suficiente para originar una coloración oscura, que es el rasgo por el que se identifican las pátinas. En este sentido se calcularon relaciones pátina/roca de estos compuestos biológicos; estas relaciones son mucho mayores en el caso de los afloramientos que en los monumentos (figuras 70 y 71) lo que pone de manifiesto el carácter biológico de las pátinas de afloramientos. A este respecto es más significativa la mayor relación pátina/roca para el caso de la clorofila (figura 71), indicando la existencia de organismos fotosintéticos en las pátinas que pueden haber contribuido a su formación.

Aunque las relaciones pátina/roca sean mayores en el caso de la clorofila (figura 71) estas relaciones también son importantes en el caso de las proteínas (figura 70), lo que estaría indicando la existencia de organismos no

fotosintéticos, probablemente hongos que, según pusieron de manifiesto diversos autores (Gorbushina *et al.*, 1993; Diakumaku, 1995;Gomez-Alarcon *et al*., 1995a, 1995b; Sainz-Jimenez *et al.*, 1995; Wollenzien *et al*., 1995; Valero, 2000; Gorbushina *et al*., 2004), confieren a los materiales coloraciones oscuras debido a las melaninas que contienen. Las proteínas pueden proceder también de otros organismos como insectos, arácnidos y otros animales microscópicos, pero que no darían una coloración oscura.

El origen biológico de las pátinas de afloramientos también se evidenció con el estudio de los ácidos grasos, ya que en todas las muestras se encontraron estos compuestos y de todos los ácidos grasos presentes se identificaron más del 90% (tabla 13). El sistema utilizado para el análisis e identificación de ácidos grasos es el sistema MIDI; se trata de un método que identifica los ácidos grasos de cadena corta y de naturaleza biológica. Por lo tanto la existencia de un alto porcentaje de ácidos grasos identificados indica que la mayoría de estos ácidos grasos son de origen biológico. Un ejemplo representativo de esto es la muestra del monte Pedroso donde todos los ácidos grasos han sido identificados (tabla 13).

Los principales ácidos grasos identificados en las pátinas de los afloramientos (tablas 11 y 12) son ácidos grasos insaturados, principalmente el oleico y el linoleico. El siguiente grupo de ácidos grasos de mayor importancia en las muestras son los ácidos grasos ramificados, principalmente el 18:0 anteiso. Por último, los ácidos grasos saturados representan un porcentaje del 12 al 17 % destacando sobre todo el ácido palmítico como principal dentro de este grupo. El ácido palmítico se encontró como ácido predominante en el cultivo de microalgas verdes (Zarnowsqui, 2002); además, en un estudio de Galletti *et al*. (1997), este ácido fue considerado como biomarcador, ya que es el producto de degradación de muchas sustancias grasas y además es muy estable. Por otro lado, algunos autores (Zarnowsqui, 2002; Heyrman *et al*., 1999) consideran la

presencia de ácidos grasos ramificados como indicadores biológicos de la existencia de bacterias gram-positivas.

El análisis de las muestras de afloramientos utilizando técnicas de amplificación de ADN también confirmó el origen biológico de estas pátinas, ya que se han detectado organismos en todas ellas (figuras 72, 73, 74 y 75), siendo los principales las algas y las cianobacterias.

Las cianobacterias constituyen el grupo de organismos más numeroso; aparecen en todas las muestras de afloramientos, salvo en Toxosoutos y Axeitos (figura 74 y 75). En la pátina del afloramiento de Corrubedo (tabla 16) se encuentra un clon similar al encontrado por Dang *et al*. (2007), que se considera uno de los organismos pioneros en colonizar superficies sumergidas en el mar; uno similar a éste ha sido encontrado también en la muestra del Pedroso. Además de esta cianobacteria, las muestras del Pedroso y de Corrubedo también comparten otro clon similar al clon 1793C-47, encontrado por Gomez-Alvarez *et al*. (2003), que está implicado en la colonización biológica de depósitos volcánicos de Hawai.

En Corrubedo se identificarón otros dos géneros de cianobacterias, además de los mencionados. Uno de ellos es el género *Xenococcus* del orden de las Pleurocapsales, de morfología cocoide, que Ortega-Morales *et al.* (2000) identifican en antiguos edificios Mayas en México como el principal género en biomasa de organismos que aparecen en estas ruinas; en este trabajo también se comenta que predominan los organismos de tipo cocoide entre las algas y las cianobacterias, ya que aparecen embebidas en una matriz mucilaginosa que les permite recubrir las superficies. Este tipo de morfología se vio claramente al MEB en la muestra de Corrubedo, observándose células esféricas (colapsadas por el vacío) embebidas en un entramado mucilaginoso (figura 21 e). El otro género que aparece es *Pseudophormidium* que pertenece al orden de las

Oscillatoriales; en este caso se trata de cianobacterias filamentosas que también han sido encontradas como predominantes en la Pirámide Tikal, en Guatemala por García de Miguel *et al*. (1995). Estos autores, al igual que Albertano y Urzi (1999), consideran que las cianobacterias filamentosas son los principales organismos colonizadores de las superficies pétreas, ya que estos organismos poseen una mayor capacidad para recubrir y penetrar en este tipo de sustratos.

Como ya se ha comentado anteriormente, algunas de las cianobacterias presentes en Corrubedo también aparecen en las muestras del monte Pedroso (tabla 16). Ambas pátinas poseen algunas cianobacterias en común, pero sin embargo al MEB se ven claras diferencias entre ellas, la principal radica en que en el monte Pedroso no hay cianobacterias del género *Xenococcus* ni *Pseudophormidium* que serían las principales en la muestra de Corrubedo.

En la pátina de Campo Lameiro (tabla 16) se identificaron cinco cianobacterias diferentes. Cuatro de ellas corresponden a clones similares a los encontrados por otros investigadores en situaciones muy diversas. Uno de ellos es similar al clon FAC34 que encontró Tsai *et al*. (2006) en suelos de Taiwan; otro es similar al clon AYRV2-144 encontrado por Venkat *et al*. (2006) en rocas del desierto de Chile (también se identificó en las pátinas de Lamas de Abade); un tercero es similar al clon 1959a-38 identificado por Gomez-Alvarez y Nuesslein (2005) entre los organismos que colonizan recientes depósitos volcánicos en Hawai, y el último es similar al Jordan B10 aislado por Dong *et al*. (2006) en suelos de ambientes hiperácidos. Por otra parte se identificó la especie *Stigonema ocellatum*, que es una cianobacteria filamentosa que pertenece al orden de las Nostocales, orden en el que se sitúan cianobacterias que colonizan hábitats muy diversos, entre los que se encuentran las rocas (Hoffman, 1989; Gaylarde *et al*, 2004).

Dentro del grupo de las algas las más comunes en las pátinas de los afloramientos son las del género *Chlorella* (tabla 15); este género aparece representando en las muestras de Corrubedo, Lamas de Abade y del monte Pedroso. Las algas del género *Chlorella* son algas verdes de morfología esférica que han sido encontradas en muchas ocasiones colonizando la superficie de edificios. En un estudio sobre colonización biológica de algas verdes (Clorophyta) en edificios graníticos de Galicia, Rifon-Lastra y Noguerol-Seoane (2000) encontraron que el principal grupo de algas identificado en las muestras era el orden Chlorellales, representando el 48% del total de órdenes identificados, orden al que pertenece el género *Chlorella.* En estudios realizados en otros lugares, como el de Ortega-Morales *et al.* (2000) en edificios Mayas de México, el género *Chlorella* es uno de los principales géneros identificados dentro de las algas de morfológica esférica. También Crispin *et al*. (2003) encontraron algas del orden Chlorellales en diferentes biofilms de edificios de Europa y Sudamerica.

Además del género Chlorella, en las muestras de Corrubedo y del Pedroso (tabla 15) también se identificó un alga eucariota, similar en un 97% al clon no cultivado 1790-8 aislado de depósitos volcánicos en Hawai por Gomez-Alvarez *et al*. (2003).

La presencia de algas y cianobacterias como principales formadoras de pátinas oscuras en el medio natural ha sido citada por otros autores, aunque siempre en el estudio de rocas de naturaleza carbonatada. Así, García- Valles (2000), en el estudio de muestras de mármol de una cantera de Turquía, concluye que en el medio natural las algas y cianobacterias son las responsables de la formación de pátinas negras, ya que algunas son capaces de inducir la precipitación de calcita y que esta calcita neoformada es el principal componente mineral de las pátinas; es decir, encontraron que a diferencia de las pátinas de monumentos, en las muestra de canteras (al no haber sulfatación) es la

recristalización de calcita, y no de yeso, la que favorece la formación de las pátinas negras. Esto también fue observado por Urzi y Realini (1998) en una cantera de roca caliza, dónde llegó a la conclusión de que eran los organismos los que al comenzar a colonizar la roca formaban las pátinas y que el color de éstas se iba oscureciendo a medida que se producía la sucesión biológica.

Además de algas y cianobacterias en las muestras de afloramientos también se han identificado bacterias como organismos formadores de las pátinas. En la mayoría de los casos, al igual que para el resto de organismos, lo que se identificó es un clon bacteriano similar al encontrado por otros investigadores en trabajos todavía no publicados, por lo que la información que poseemos de ese clon puede ser muy escasa.

En la muestra de pátina de Corrubedo, aunque se sabe que existen bacterias, ya que la amplificación con cebadores específicos para bacterias ha dado positiva (figura 72), no se ha podido identificar ninguna, pero en el resto de las muestras si que se han identificado bacterias formando parte de las pátinas.

En la muestra de Campo Lameiro (tabla 15) se han identificado seis clones bacterianos. Dos de ellos (clon no cultivado JSC8-C9 y clon no cultivado JSC8-C10) han sido aislados por Dekas *et al*. (2006). El clon JSC8- C10 aparece también en las pátinas de Lamas de Abade y del Pedroso. Otro de los encontrados es muy similar al clon no cultivado B37 encontrado por Spanevello y Patel (2001) en comunidades microbianas australianas, y el último encontrado es uno similar al clon 1790-3 encontrado por Gomez-Alvarez *et al.* (2003) entre los organismos que colonizan depósitos volcánicos en Hawai.

En la muestra de Campo Lameiro además de los clones bacterianos ya comentados, se ha identificado también el clon MH2-1 de la especie *Bacteroidetes bacterium*. Éste ha sido encontrado por Hansen *et al* (2004) entre

los organismos que viven en el permafrost del suelo. Esta especie de bacterias también ha sido identificada en la muestra del Pedroso, aunque en este caso el identificado es el clon JG35-K1-AG26, encontrado por Geissler y Selenska-Pobell (2005) en minas de uranio.

El orden Bacteroidetes es un orden de bacterias muy ubicuas en el ambiente y que incluye tres clases: una de ellas es la clase Bacteroidetes donde se incluye el género *Bacteroidetes*, que se encuentra como parásito en excrementos de todos los animales homeotermos. Éste género se identificó en las pátinas lo que parece indicar la presencia de excrementos de animales formando parte de ellas.

En la muestra del Pedroso además del género *Bacteroidetes* se encontró también un clon de α-Proteobacteria (clon no cultivado GASP-WC1S2-A07) que ha sido encontrado por Jangid *et al.* (2006) en la comunidad de bacterias del suelo, y además hay otro organismo bacteriano similar al clon TAa-48 encontrado en muestras de suelo del parque volcánico de Hawai por Gomez-Alvarez y Nusslein (2006).

Las Proetobacterias han sido identificadas en otras pátinas negras sobre diferentes sustratos pétreos. Así, Sarró *et al.* (2006) encontraron entre otros organismos bacterias del orden Proteobacterias como las principales bacterias que colonizan la fuente de los leones de la Alhambra. McNamara *et al*. (2006) consideran también que las Proteobacterias junto con las Actinobacterias son los principales grupos que colonizan la superficie pétrea en antiguas ruinas Mayas.

Por lo tanto, de todos los datos biológicos obtenidos, se puede concluir que en el caso de los afloramientos las pátinas son claramente biológicas y que están formadas principalmente por algas del género *Chlorella* y cianobacterias de diversos géneros.

Otra consideración importante a la hora de analizar los organismos que forman las pátinas es compararlos con los que aparecen en la roca sin pátina de una zona cercana. En el caso del afloramiento de Lamas de Abade (tablas 15 y 16) se dispone de datos de organismos presentes en la pátina y organismos presentes en la roca superficial adyacente. Estos datos ponen de manifiesto que, aunque en la roca sin pátina aparecen también organismos, las poblaciones presentes son muy diferentes, ya que en la pátina predominan las cianobacterias y algas del género *Chlorella*, mientras que en la roca predominan las bacterias de las clases de los Bacteroidetes y las Actinobacterias. Estas diferencias poblacionales pueden explicar las tonalidades oscuras en la pátina.

En los monumentos la situación es bastante diferente, ya que todos los estudios biológicos llevan a descartan la biogénesis como un factor importante en la mayoría de las pátinas. Así, en el análisis de proteínas y de clorofila en monumentos urbanos (Figuras 70 y 71), hay casos en los que la cantidad de clorofila y proteínas es mayor en la roca sin pátina que en la propia pátina, como ocurre en el convento de Padrón, lo que nos permite descartar su origen biológico. Además, en los casos en los que es mayor la cantidad de estas sustancias en la pátina que en la roca, la relación no es tan grande como en los afloramientos, a excepción de la muestra del colegio Francisco Javier en la que la cantidad de clorofila en las pátinas es mucho mayor que en la roca. Por tanto, queda claro que en la mayoría de las pátinas de los monumentos tiene que haber otros componentes y factores no biológicos implicados en su formación.

En las muestras de Historia, San Martín Pinario, Toural, María Pita, San Jorge y Lugo, los datos de clorofila y proteínas no aportan información acerca de su origen, ya que la cantidad de ambas sustancias es similar en la pátina y en la roca limpia. En la pátina de Fonseca, aunque se descarta la existencia de organismos fotosintéticos ya que la relación pátina/roca para la clorofila es muy baja, sí hay una relación más alta para las proteínas que en el resto de

monumentos, de lo que se deduce que en esta pátina puede haber organismos no fotosintéticos.

En el caso del dolmen de Axeitos, los datos de clorofila y proteínas (figuras 70 y 71) indican cierta contribución biológica, ya que las cantidades de estas sustancias en la pátina son mayores que en la roca sin pátina; de hecho, las relaciones pátina/roca para estas dos sustancias son similares a las encontradas en afloramientos. Sin embargo, en el dolmen de Cabaleiros, aunque las cantidades de clorofila y proteínas son importantes, las relaciones pátina/roca para estas dos sustancias son similares a las encontradas en monumentos urbanos (figuras 70 y 71), por lo que aunque existen organismos, éstos no son los formadores de la pátina negra ya que también aparecen en la roca sin pátina.

Después de estudiar las proteínas y la clorofila se estudió el perfil de ácidos grasos para poder aclarar los resultados obtenidos con los análisis anteriores. Solamente se detectó la presencia de ácidos grasos en cinco de los once monumentos muestreados (San Martín Pinario, Fonseca, colegio Francisco Javier, Catedral de Lugo y convento del Carmen en Padrón) y, dentro de éstos, solamente en tres el porcentaje de ácidos grasos identificados supera el 90% (tabla 13). Estas son las pátinas de San Martín Pinario y Francisco Javier de Santiago de Compostela y el convento del Carmen de Padrón. Además las pátinas de Padrón y Lugo poseen los mismos tipos de ácidos grasos que los afloramientos (tablas 11 y 12), por lo que según este estudio las poblaciones de organismos que aparecen en estas pátinas son similares a las que aparecen en afloramientos.

En las muestras de San Martín Pinario y Francisco Javier el ácido palmítico es el que aparece en mayor porcentaje (taba 11) y, al igual que en los afloramientos, el ácido graso ramificado predominante es el 18:0 anteiso, salvo en la muestra de San Martín Pinario, donde es el 15:0 anteiso junto con otros

muchos ácidos grasos de cadena ramificada (tabla 12). Podemos decir entonces que en estas muestras hay cierto componente biológico, aunque los organismos presentes difieren de los que aparecen en afloramientos.

Por último, en la pátina de Fonseca (tabla 13) solamente son de origen biológico el 27% de los ácidos grasos que aparecen en la muestra, y no coinciden con los presentes en afloramientos (tabla 11 y 12).

Las siete pátinas en las que no se han identificado ácidos grasos son: San Jorge, María Pita, Toural, Historia, el Dolmen de Axeitos, el Dolmen de Parxubeira y el Dolmen de Cabaleiros. En las pátinas de San Jorge, Toural, Historia y de los dólmenes de Parxubeira y Cabaleiros, este estudio corrobora todos los análisis anteriores y confirma que estas pátinas claramente no son de origen biológico. Sin embargo en las pátinas de la plaza de María Pita y en el dolmen de Axeitos, este análisis no concuerda con algunos de los anteriores, ya que al MEB se observaron ciertos rasgos biológicos (figuras 28 b y 27) y además existe cierta cantidad de proteínas y de clorofila (figura 70 y 71), lo que en principio haría pensar en una contribución biológica. La pátina de Fonseca tampoco es de origen biológico, ya que aunque posee un porcentaje de ácidos grasos elevado, estos no se han identificado con el sistema MIDI (tabla 14) y por lo tanto su origen no es biológico. Esta pátina corresponde a dos esculturas que como ya se comentó anteriormente fueron tratadas con cera de abeja, por lo que los ácidos grasos pueden provenir de ese revestimiento.

La identificación de los organismos por técnicas de biología molecular confirma que en las muestras del Palacio de Fonseca, de la casa del Toural y de la Facultad de Historia no hay ningún organismo, es decir, no se han podido detectar ni bacterias, ni cianobacterias ni organismos eucariotas (figuras 72, 73, 74 y 75). Por lo tanto se deduce que estas pátinas son de origen antropogénico, formadas por otros procesos diferentes a la colonización biológica.

En las pátinas del convento del Carmen de Padrón y de la Catedral de Lugo se identifican tanto bacterias como cianobacterias (figuras 72, 73, 74 y 75). En estas dos muestras solamente con el estudio al MEB y con los análisis de proteínas y clorofila no se había podido llegar a una conclusión definitiva acerca de su origen y fueron las técnicas de biología molecular junto con el análisis de ácidos grasos los que permiten decir que en estas dos muestras hay contribución biológica en la formación de las pátinas, pero también hay un componente no biológico importante.

En las muestras de San Martín Pinario, María Pita y San Jorge también se detecta la presencia de bacterias pero no de cianobacterias (figuras 72, 73, 74 y 75). Con el resto de los análisis no se había podido confirmar la presencia de organismos en estas tres pátinas, al no aparecer rasgos biológicos en el estudio al MEB, ni encontrar relaciones altas de la cantidad de clorofila y de proteínas en pátina/roca, y solamente en San Martín Pinario se detectaron ácidos grasos. Por tanto podemos considerar que aunque hay algunos organismos en las muestras, son muy pocos y no son los responsables de la formación de las pátinas negras.

En la muestra de Francisco Javier no se identificaron organismos por biología molecular (figuras 72, 73, 74 y 75), sin embargo si se demostró su presencia por el MEB (figura 24 d), por los resultados de proteínas y clorofila (figuras 70 y 71) y por los análisis de ácidos grasos (tabla 13). Una de las posibles explicaciones es la heterogeneidad de las pátinas. Puede ocurrir que el fragmento utilizado para el estudio de biología molecular no contenga organismos, pero en otras partes de la muestra sí los haya, de todas formas la cantidad de organismos presentes es muy baja, por lo que con toda seguridad no son los principales responsables de la formación de ésta pátina.

Por último en los dólmenes (figuras 72, 73, 74 y 75), solamente se detectan organismos en la pátina del dolmen de Axeitos, donde aparecen tanto

bacterias como cianobacterias, coincidiendo con el hecho de ser ésta la única pátina de dólmenes donde las relaciones pátina/roca para clorofila y proteínas son similares a las encontradas en algunos afloramientos (figuras 70 y 71). En el dolmen de Parxubeira donde el MEB revelaba ciertas características biológicas (figura 24 a, b y c), no se ha podido detectar la presencia de organismos mediante biología molecular y, al igual que ocurría en las muestras de Francisco Javier, puede que la contribución biológica sea muy escasa o esté muy localizada.

En los monumentos, a diferencia de los afloramientos la mayoría de los organismos presentes son bacterias y en este caso la cantidad de cianobacterias y de algas es mucho menor. Solamente se identifica la presencia de Chlorella en la muestra de Padrón (tabla 15) y es en esta muestra también donde se han identificado tres cianobacterias (tabla 16); una de ellas similar al clon AYRV2-144, que se había encontrado también en los afloramientos de Campo Lameiro, Lamas de Abade y en el dolmen de Axeitos, y las otras dos cianobacterias se corresponden con un clon similar al 1790-2 encontrado por Gómez-Álvarez (2003) en depósitos volcánicos de Hawai y con *Pseudophormidium sp* que es una cianobacteria filamentosa que también se encontró en la pátina de Corrubedo. Dentro del grupo de las cianobacterias (tabla 16) también se identificó en el dolmen de Axeitos la especie *Synechococcus sp*. que es una cianobacteria esférica del orden de las Chlorococcales. Crispin *et al* (2004) encuentran que el orden Chloroococcales, junto con Pleurocapsales son los que componen la mayor parte de la biomasa de pátinas negras de iglesias donde la piedra se encuentra muy deteriorada, considerándolos responsables de dicho deterioro.

Las bacterias presentes en las pátinas de monumentos (tabla 15) pertenecen sobre todo a los órdenes Bacteroidetes y Actinobacterias. Como ya se ha comentado para el caso de los afloramientos, el orden Bacteroidetes es un

orden muy ubicuo y aparece asociado a la presencia de excrementos de animales. Organismos de este tipo aparecen en la muestra de Padrón que es una de las que posee fósforo y podría indicar que este fósforo proviene de las deyecciones de animales. Así, en la pátina de Padrón se identificaron dentro del orden de los Bacteroidetes organismos de la especie *Bacteroidetes bacterium* , similar al clon Cristal Bog 2F6 que Newton *et al.* (2006) encontraron en muestras de agua de un lago. En la muestra de María Pita también hay cuatro tipos de organismos del orden Bacteroidetes, uno es un clon similar al SM1G04 encontrado por Bonheyo *et al.* (2001) en depósitos travertínicos del parque nacional de Yellowstone, otro de ellos pertenece a la especie *Flexibacteriaceae bacterium*, un clon muy similar al LR2-77 encontrado por Gao *et al*. (2007) como una de las bacterias que coloniza la piel del ser humano; los otros tipos de organismos que aparecen son del género *Spirosoma*, uno es de la especie *Spirosoma scanalatus* y el otro pertenece a la especie *Spirosoma-like sp*.

Además, en la muestra de Padrón se ha identificado un clon bacteriano similar al JSC8-C10 encontrado por Dekas *et al*. (2006), que también aparecía en el monte Pedroso y en Campo Lameiro.

En la pátina de María Pita además del orden Bacteroidetes también hay bacterias del orden de las Actinobacterias, como las especies *Friedmaniella sp.* y *Friedmaniella spumicola*, ambas del género *Friedmaniella*. Gurtner *et al.* (2000) en estudios de pinturas deterioradas de dos iglesias europeas, utilizando métodos de biología molecular, también identificaron bacterias del orden Actinobacteria aunque de especies diferentes a las identificadas en este trabajo.

La importancia de las bacterias en las pátinas de monumentos ha sido puesta de manifiesto en muchos trabajos. Así, Mansch y Bock (1998), que se centran en el estudio de las bacterias nitrificantes, concluyen que la contaminación provoca el aumento de sustancias orgánicas sobre los edificios

favoreciendo la colonización biológica y fomentando así los procesos de biodeterioro y formación de costras negras. Otros estudios como los de Kiel *et al*. (2005) que aislaron un total de 71 bacterias en edificios de Porto Alegre (Brasil), también destacan el gran número de bacterias que aparecen en las pátinas y el importante papel que tienen en su formación.

Atendiendo a los análisis biológicos, en el caso de los monumentos podemos concluir que la mayoría de las pátinas son de naturaleza inorgánica, y aunque en algunas de ellas pueden poseer organismos, éstos son muy diferentes a los que aparecen en afloramientos, ya que en los monumentos dominan las bacterias mientras que en los afloramientos son predominantes las cianobacterias y las algas.

La composición de la población microbiana de las pátinas y de las correspondientes muestras de roca sin pátina resultó interesante para esclarecer cuales son los organismos responsables de la formación de las pátinas oscuras. A este respecto hay que indicar que en las muestras de roca sin pátina solo se detectó la presencia de organismos en tres casos (figuras 72, 73, 74 y75): dolmen de Parxubeira, Convento del Carmen de Padrón y Catedral de Lugo, y en los tres casos los organismos identificados fueron bacterias (tabla 15). Sin embargo en las pátinas de estos tres monumentos aparecen además algas y cianobacterias. Parece pues bastante claro que son estas dos últimas, es decir las algas y las cianobacterias, son los principales organismos formadores de las pátinas.

En el resto de los monumentos aparecen también bacterias en las pátinas y ningún tipo de organismos en las muestras de roca sin pátina. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por otras técnicas, se puede concluir por tanto que aunque hay una cierta actividad biológica en las pátinas, en concreto actividad bacteriana que puede estar relacionada con procesos de degradación,

no son estos organismos los responsables de la formación de las pátinas oscuras.

Esta diferencia entre pátinas de monumentos y de afloramientos, en relación a la composición biológica, también se puso en cierto modo de manifiesto con los análisis de IR-Raman (figuras de la 63 a la 69). Este método, aunque no es un análisis puramente biológico, permite identificar compuestos orgánicos. Así podemos ver que en todas las pátinas de afloramientos hay bandas a 1600 cm^{-1} y a 1332 cm^{-1}. Ambas bandas se encuentran en la zona de vibración de los enlaces v(C-C) y v(C=O), y se corresponden con compuestos aromáticos y ácidos carboxílicos. En la banda 1332 cm^{-1}, además de estos compuestos aromáticos aparece englobada la banda principal de la clorofila (1323 cm^{-1}). Por lo tanto esto confirmaría la presencia de organismos fotosintéticos en todas las muestras de afloramientos. Sin embargo en los monumentos urbanos sólamente en las pátinas de Lugo, Padrón, Francisco Javier, Historia, Toural y San Jorge aparecen estas dos bandas aunque se encuentran un poco desplazadas (una a 1308 cm^{-1} y otra a 1604 cm^{-1}) y no aparece la banda característica de la clorofila. Esto diferencia claramente estas pátinas de las de los afloramientos que poseen clorofila, coincidiendo con el hecho probado por biología molecular de que en afloramientos, predominan organismos fotosintéticos, que se encuentran prácticamente ausentes en monumentos. Otra clara diferencia entre las pátinas de afloramientos y de monumentos que se aprecia con esta técnica es el nivel de fondo de las bandas, mucho mayor en afloramientos, lo que indica una alta fluorescencia de las muestras; sin embargo, en monumentos urbanos es mucho menor excepto en la plaza de María Pita. Esto indica la presencia de compuestos que emiten fluorescencia como por ejemplo la clorofila, en los afloramientos, en los dólmenes y en la pátina de la plaza de María Pita.

En general, en los afloramientos aparecen además bandas que corresponden a otros compuestos orgánicos; así, en las pátinas de los afloramientos del Pedroso, Lamas de Abade y Corrubedo aparecen bandas que

indican la presencia de β-carotenos, similares a las identificadas por Prieto *et al.* (1998, 2000) en estudios sobre monumentos graníticos colonizados por líquenes. En Corrubedo aparece ácido oxálico, aunque, como ya se vio también con otras técnicas en ninguna de las pátinas hay presencia de oxalatos.

En cuanto al color de las pátinas, a partir de las mediciones realizadas con el colorímetro para sólidos, quedó patente que existe una diferencia importante entre la pátina y la roca superficial sin pátina, siendo mayor esta diferencia en los afloramientos.

Si analizamos cada uno de los componentes del color (Figuras 29 y 30) vemos que la formación de pátinas implica un oscurecimiento de la superficie ya que en todos los casos se aprecia una disminución en el parámetro L*. La tonalidad del color de cada pátina viene dada por los parámetros a* y b*. A este respecto el comportamiento es diferente para las pátinas de los afloramientos y para los monumentos; en los primeros (Figura 29), el tono varía bastante en relación al tono de la roca ya que, excepto algún caso, ocurre una disminución de ambos parámetros originando un incremento de la tonalidad verde de la superficie (la tendencia es a desplazarse del cuadrante 0º-90º al cuadrante 90º-180º). En el caso de los monumentos (figura 30), la tonalidad de las pátinas no parece variar mucho con respecto a la superficie de la roca, si acaso, hay una tendencia al incremento del rojo (nótese que disminuye el parámetro b, manteniéndose el parámetro a).

Así, la coloración de las pátinas parece también guardar relación con su origen, de manera que aquellas en las que todos los parámetros determinados apuntan hacia un origen biológico son más verdes que las que tienen un origen antrópico.

Como resumen de todo lo anterior, podemos decir que los procesos de formación de las pátinas negras son muy diferentes en afloramientos y en monumentos. En afloramientos, las pátinas son acumulaciones de material biológico, formados por la acumulación principalmente de algas y cianobacterias. En monumentos, las pátinas son acumulaciones de componentes inorgánicos y orgánicos derivados de procesos de contaminación; en estas pátinas los organismos pueden estar presentes, pero en menor proporción que en los afloramientos y solamente en algunos casos parecen tener un papel en la formación de las pátinas negras.

Así, siguiendo la terminología más utilizada para referirse a las alteraciones cromáticas (Ordaz y Esbert, 1988) todas las pátinas analizadas pueden considerarse como depósitos, ya que son acumulaciones sobre la superficie de la roca de material orgánico y/o inorgánico, poco enconstrado y ajeno totalmente al material granítico sobre el que se deposita. En el caso de afloramientos se trata de depósitos biológicos y en el caso de los monumentos los depósitos son fundamentalmente de material inorgánico (en algunos casos también orgánico pero no de naturaleza biológica).

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

El análisis de los resultados ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

1ª.- Si bien todas las pátinas estudiadas debido a su color oscuro presentan un aspecto similar a simple vista, todos los análisis revelan que las pátinas de afloramientos y las pátinas de monumentos son muy diferentes. Las primeras forman un grupo bastante homogéneo mientras que las de monumentos son más variadas.

2ª.- El estudio morfológico puso de manifiesto que las pátinas de afloramientos están formadas por la acumulación de estructuras biológicas, células o hifas, mientras que las pátinas de edificios y monumentos están constituidas por un material inorgánico con numerosas partículas metálicas de composición variada, siendo los rasgos biológicos visibles escasos o nulos.

3ª.- En general todas las pátinas son de pequeño espesor, están bien adheridas al sustrato granítico y presentan un límite muy claro con él. Sin embargo hay algunas pátinas que presentan un límite inferior difuso debido bien a que algunas estructuras biológicas penetran a través de las fisuras de la roca, como sucede en algunas pátinas de afloramientos, o bien a la cristalización de compuestos propios de la pátina dentro de los minerales del granito, lo que se observó en cuatro monumentos urbanos.

4ª.- En todas las pátinas se encontró un enriquecimiento de carbono, hidrógeno y generalmente también de nitrógeno, con respecto a las muestras de roca superficial sin pátina. De esta composición se deduce que el elemento que confiere color oscuro a las pátinas es el carbono.

5ª.- El análisis y cuantificación de ácidos grasos por el sistema MIDI resultó de gran utilidad para determinar el grado de contribución biológica en la génesis de las pátinas. En las pátinas de afloramientos se identificó prácticamente la totalidad de los ácidos grasos presentes, lo cual indica que son esencialmente biológicas. En las pátinas de monumentos el porcentaje de identificación fue menor y variable lo que significa que si bien hay una cierta contribución biológica existen otros factores implicados.

6ª.- A partir de las relaciones del contenido de clorofila y de proteínas en las pátinas con respecto a las muestras de roca superficial sin pátina, se deduce que en las pátinas de afloramientos son abundantes los organismos y que éstos son predominantemente fotosintéticos, mientras que en las pátinas de monumentos los organismos son escasos predominando los no fotosintéticos.

7ª.- La medida del color de las pátinas también aporta información acerca de su génesis, pues aquellas en las que todos los parámetros determinados apuntan un origen biológico tienen una tonalidad más verdosa que las de origen antrópico.

8ª.- Las técnicas analíticas basadas en la biología molecular permitieron identificar los principales organismos implicados en la formación de las pátinas lo que establece también diferencias entre las pátinas de afloramientos y de monumentos. En los afloramientos aparecen sobre todo algas del género Chllorella y cianobacterias de diversos géneros; en las de monumentos los organismos son escasos y son fundamentalmente bacterias de los órdenes Bacteroidetes y Proteobacterias.

9ª.- De los análisis anteriores se deduce que en las pátinas de afloramientos el carbono es de origen biológico y que en las de afloramientos gran parte del carbono deriva de actividades antrópicas (hogueras,

contaminación debida al tráfico y calefacciones, revestimientos o tratamientos de la piedra, etc.)

10ª.- Se encontró que el azufre es el elementos diferenciador entre unas y otras pátinas: no se detectó en las pátinas de afloramientos (con una única excepción donde aparece en una cantidad muy pequeña) y por el contrario se encontró en todas las pátinas de edificios y monumentos aunque en algunos casos en una proporción muy pequeña de modo que sólo se pudo identificar con las técnicas analíticas más sensibles.

11ª.- El fósforo es otro de los elementos implicados en la formación de las pátinas negras de monumentos, ya que se ha encontrado como constituyente principal de las pátinas de San Martín Pinario, catedral de Lugo, convento del Carmen de Padrón y San Jorge.

12ª.- Los análisis mineralógicos solo permitieron detectar como minerales de neoformación yeso, presente en las pátinas de cuatro edificios urbanos de Santiago y A Coruña pero nunca en afloramientos o monumentos rurales, y un compuesto de plomo de composición compleja en la pátina del Palacio de Fonseca.

13ª.- Se pone en evidencia que para el estudio de las pátinas es necesario el uso de diferentes técnicas analíticas que resultan complementarias entre sí. Esto es debido a que en general las pátinas sobre superficies graníticas tienen un espesor muy pequeño y están fuertemente adheridas al sustrato, de modo que es muy difícil obtener una cantidad suficiente de muestra para la mayoría de los análisis por lo que hay que recurrir a técnicas microanalíticas que son muy sensibles pero que tienen el inconveniente, para este tipo de estudios, de ser puntuales.

14ª.- En las génesis de estas pátinas no parece existir ninguna influencia directa de las rocas graníticas sobre las que se encuentran, al contrario de lo que ocurre con las pátinas formadas sobre rocas calcáreas en las que el calcio procedente de la roca tiene un papel esencial. En los casos estudiados ninguno de los elementos que puede se suministrado por el granito parece tener un papel preponderante en la formación de la pátina, excepto la pátina rojiza de Axeitos en la hay un enriquecimiento de hierro procedente sin duda de la biotita.

15ª.- El ambiente es el factor que determina las diferentes tipologías de pátinas estudiadas. Así, se pueden agrupar en tres tipos: las pátinas de afloramientos formadas en un ambiente natural no contaminado, las pátinas de los dólmenes formadas en un ambiente rural pero antropizado y las demás pátinas de edificios y monumentos situados en un medio urbano.

16ª.- En los monumentos urbanos se distinguen, en función de su composición, tres tipos de pátinas: aquellas en las que el yeso es el componente fundamental, cuya formación está relacionada con materiales de construcción distintos del granito (argamasas de juntas o revestimientos), aquellas en las que el componente fundamental es un compuesto de fósforo y calcio, cuyo origen puede estar relacionado con las deyecciones animales y los productos de limpieza, y aquellas en las que no se identificó ni yeso ni compuestos de fósforo, y que se han formado por la acumulación sobre la piedra de partículas y compuestos contaminantes presentes en la atmósfera.

17ª.- Aunque en esta memoria se ha utilizado la palabra pátina como término más general, teniendo en cuenta las clasificaciones de las alteraciones cromáticas de mayor aceptación, las presentes en las superficies graníticas responden a la tipología de depósitos, puesto que, son acumulaciones de materiales ajenos a la roca sobre la que aparecen y con una interacción mínima con ella.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Abrusci, C.; Martín-González, A.; Del Amo, A.; Catalina, F.; Collado, J.; Platas, G. (2005) Isolation and identification of bacteria and fungi from cinematographic films. *International Biodeterioration and Biodegradation* 56: 58-68

Aires, L.; Graça, R.C.; Velez, A. (1975) Dry and wet laboratory test and termal fatigue of rock. *Engineering Geology* 9: 249-265.

Albertano, P. y Urzí, C. (1999) Structural interaction among epilithic cianobacteria and heterotrophic microorganisms in Roman hypogea. *Microbial Ecology* 38: 244-252.

Albertano, P.; Bruno, L.; Belleza, S.; Paradossi, G. (2000) Polisacharydes as a key step in stone bio-erosión. En: Libro de actas del 9th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone. Ed: Vasco Fassina. Venecia. Vol 1: 425-432.

Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.

Alvarez de Buergo, M. y Fort González, R. (2003) Protective pátinas applied on stony façades of historical building in the past. *Construction and Building Materials* 17: 83-89.

Ariño, X.; Ortega-Calvo, J.J.; Gomez-Bolea, A.; Saiz-Jimenez, C. (1995) Lichen colonization of the Roman pavement at Baleo Claudia (Cadiz, Spain): Biodeterioration vs Bioprotection. *The Science of Total Environment* 167: 353-363.

Ariño, X. (1996) Estudio de la colonización, distribución e interacción de líquenes, algas y cianobacterias con materiales pétreos de los conjuntos arqueológicos de Baleo, Claudia y Carmona. Tesis Doctoral universidad de Barcelona y C.S.I.C. de Sevilla, 256 p.

Ariño, X. y Gómez, A. (2002) Colonización de monumentos y estructuras pétreas por los líquenes. Estudios realizados en la península ibérica. En: Biodeterioro de Monumentos de Iberoamárica. Ed. Saíz-Jimenez, C. y Videla H.A. 95-108.

Arnold, A. (1976) Behaviour of some soluble salt in stone deterioration. En: II International Symposium of Deterioration of Buildings Stones. Atenas. 27-36.

Arnold, A. y Kueng, A. (1985) Crystallization and habits of salt efflorescences on walls I. Methods of investigation and habits. En: V International Congress on Deterioration and Conservation of Stone. Lausanne vol 1: 255-267.

Arnol, A. y Zehnder, K. (1985) Crystallization and habits of salt efflorescence en walls II. Conditions of crystallization. En: V International Symposium on Deterioration and Conservation of Stone, Lausanne vol 1: 268-277.

Arnol, A. y Zehnder, K. (1988) Decay of stony materials by salts on humid atmophere. En: VI International Congress on Deterioration and Conservation of Stone. Polonia. 138-148.

Arnol, A. y Zehnder, K. (1989) Salt weathering in monuments. En: I International Symposium on the Conservation of Monuments in the Mediterraneam Bassin. Ed: Zezza, F. Bari. 31-58.

Arocena, J.M.; Zhu, L.P.; Hall, K. (2003) Mineral acumulations induced by biological activity on granitic rocks in Qingai Plateau, China. *Earth surface Processes and Landforms* 28: 1429-1437.

Ascaso, C.; Wierzchos, J.; De Los Rios, A. (1998) In situ cellular and enzymatic investigations of saxicolous lichens using correlative microscopical and microanalytical techniques. *Symbiosis* 24:221-234.

Ausset, P.; Del Monte, M.; Lefèvre, R.A. (1999) Embryonic sulphated black crust on carbonate rocks in atmospheric simulation chamber ad in the field role of carbonaceous fly-ash. *Atmospheric Environment* 33: 1525-1534.

Ausset, P. y Lefèvre, R.A. (2000) Early mechanisms of the developement of sulphated black crusts on carbonate stone. En: Libro de actas del 9th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone. Ed: Vasco Fassina. Venecia. Vol 1: 329-335.

Begonha, A. y Sequeira, M. A. (1996) Characterization of black crusts and thin black layers in granitic monuments: the role of air pollution. En: Degradation and Conservation of granitic rochs in monuments. Ed: M. A. Vicente, J. Delgado-Rodriguez, J. Acevedo. Santiago de Compostela. 121-126

Bell, R. A. y Sonmerfeld, M. R. (1986) Algal biomass and primary production within a temperature zone sandstone. *Am J. Bot*. 74: 294-297.

Bityukova, L. (2006) Air pollution effect on the decay of carbonate building stones in Old Town of tallin. *Water, Air and Soil Pollution* 172: 239-271.

Bonazza, A; Sabbioni, C.; Ghedini, N.; Favoni, O.; Zappia, G. (2004) Carbon data in black crust on European monuments. En: Air Pollution and Cultural Heritage. Ed: Saíz-Jimenez. Talor y Francis Group, Lonson. 39-46.

Bonazza, A.; Sabbioni, C.; Ghedini, N. (2005) Quantitative data on carbon fractions in interpretation of black crust and soiling on European built heritage. *Atmospheric Envitonment* 39 : 2607-2618.

Bonheyo, G.T.; Fouke, B.W.; Frias-López, J.; Sanzenbacher, B. (2001) Microbial 16S rRNA diversity within travertine depositional facies from 73 degrees to 25 degreec C at Angel Terrace, Mammoth Hot Springs, Yellowstone National Park, USA.No Publicado.

Brunet, J. y Vidal, P. (1984) Preservation of ornamented caves of France. En: libro de actas del VII ISCRCP Conservation and Restoration of Mural Paintings (I): 125-149.

Brunet, J. y Vidal, P. (1988) Les oeuvres rupestres prehistoriques: etude des problems de conservation. *Studies in conservation* 25: 97-107

Burnison, B. K. (1980) Modified dimethil sulfoxide (DMSO) extraction for chlorophyll analysis or phytoplankton. *Can. J. Fhish. Aquat*. Sci. 37 :729-733.

Cachier, R.; Sarda-Estève, K.; Oikonomou, K.; Sciare, J.; Bonazza, A.; Sabbioni, C.; Greco, M.; Reyes, J.; Hermosin, B.; Saiz-Jiménez, C. (2004) Aerosol characterization and sources in different European urban atmospheres: Paris, Seville, Florence and Milan. En: Air Pollution and Cultural Heritage. Ed: Saiz-Jiménez. Taylor and Francis, Londres. 3-14.

Calvo, R.; Guitian, F.; Macías, F. (1981) Aspectos geoquímicas de la alteración de un garnito de dos micas en Galicia. *Acta científica compostelana* 2: 587-596.

Calvo, R. y Macías, F. (1981) Trasformaciones de la organización durante la alteración y edafogénesis de rocas graníticas de Galicia. *An. Edafol. Agrobiol*. 40 (9-10): 1560-1572.

Camuffo, D. (1982) Condensation-Evaporation cycles in pore and capillary systems according to the Kelvin model. *Wather, Air and Soil Pollution* 21: 151-159.

Camuffo, D. (1989) Environment and microclimate. En: libro de actas del European Symposium of Science , Tchnology and European Cultural Heritage. Ed: N.S. Baer, C. Sabbioni y D.I. Sors. Bolonia. 37-49.

Camuffo, D. (1993) Pores, capillaries and moisture movement in the stone. En: 2nd Course Stone Material and Monuments: Diagnosis and Conservation. Ed: M. Adda. Bari, Italia. 1-14.

Camuffo, D. (1995) Physical weathering of stones. *The Science of Total Environment* 167: 1-14.

Camuffo, D. y Bernardi, A. (1985) Fattori microclimatici e conservazione dai beni artistici. En: Dispense di Scienze dell Conservazione, 2. Quaderni didacttici della Scuola Regionale ENAIP per la valorizzazione dei Beni Culturali. Ed: Cooperativa dei Laboratorio 37-49.

Cardell, C.; Yebra, A.; Van Grieken, R.E. (2002) Applyng digital image processing to SEM-EDX and BSE images to determine and quantify porosity and salts with depth in porous media. *Microchimica Acta* 140: 9-14.

Cariello, N.F.; Scout, J.K.; Kat, A.G.; Thilly, W.G.; Keohavong, P. (1988) Resolution of a missense mutant in human genomic DNA by Denaturig Gradient Gel Electrophoresis and direct sequencing using in vitro DNA amplification: HPRT Munich. *American Journal of Human Genetic* 42; 726-734.

Carmona, N.; Laiz, L.; Gonzalez, J.M.; Garcia-Heras, M.; Villegas, M.A.; Saiz-Jimenez, C. (2006) Biodeterioration of historic stained glasses from the Cartuja de Miraflores (Spain). *International Biodeterioration and Biodegradation* 58: 155-161.

Carta, L.; Calcaterra, D.; Cappelletti, P.; Langella, A.; De Gennaro, M. (2005) The stone materials in the historical architecture of the ancien center of Sassari: distribution and state of conservation. *Journal of Cultural Heritage* 6: 277-286.

Casal, M. (1989) Estudio de la alteración del granito en los edificios de interés histórico de la provincia de La Coruña. Tesis Doctoral Universidad de Santiago de Compostela. 273p.

Casal, M.; Silva, B.; Delgado, J. (1989) Agents and forms of weathering in granitic rocks used in monuments. En: European Symposium of Science, Technology and European Cultural Heritage. Ed: N.S. Baer, C. Sabbioni y D.I. Sors. Bolognia. 439-442.

Casar, J. (1993) The hall saflieni prehistoric hipogeum in Malta: an international effort for the conservation of an underground limestone monuments. En: libro de actas del International RILEM/UNESCO Congress Conservation of Stone and other Materials. Vol I.

Chesworth, W. (1973) The parent rock effect in the genesis of soil. *Geoderma* 10:215-225.

Chesworth, W. (1979) The major element geochemistry and the mineralogical evolution of granitic rocks during weathering. En: Origin and distribution of the elements. Ed: L.H. Ahrens. Pergamon Press. London. 305-313.

Collier, D. (1961) Mise au point sur les processus de l´alteration des granites en pays tempéré. *Ann. Agron*. 12 (3): 273-331.

Cooper, T.; Dowding, P.; Lewis, J.O.; Mulvin, L.; O´Brien, P.; Olley, J.; O´Daly, G. (1991) Contribution of calcium from limestones and mortar to the decay of granite walling. En: "Science, Technology and European Cultural Heritage". Ed: N.Baer, C.Sabioni and A Sors. Butterwirth-Heinemann, Oxford. 456-461

Crawford, T. W. J.; Whitting, L.D.; Gegg, E.L.; Hungtington, G.L. (1983) Eolian influence on developement and weathering of some soils of Point Reyes Peninsula, Califormia. *Soil and Science Society of America* 47: 1179-1185.

Crispim, C. A.; Gaylarde, P. M.; Gaylarde, C. C. (2003) Algal and cyanobacterial biofilms on calcareous historic building. *Current Microbiology*. Vol 46: 79-82.

Crispim, C. A.; Gaylarde, C. C.; Gaylarde, P. M. (2004) Biofilms on church walls in Porto Alegre, RS, Brazil, with special attention to cyanobacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation* 54: 121-124.

Cultrone, G.; Rodriguez-Navarro, C.; Sebastián, E. (2004) Limestone and brick decay in simulated polluted atmosphere: the role of particulate matter. En: Air Pollution and Cultural Heritage. Ed: Saiz-Jimenez. Taylor and Francis, Londres: 141-145.

Curmi, P. (1979) Alteration et diferentiation pedologique sur granite and Bretagne. Etude d´une toposecuence. Tesis Doctoral. Universidad de Rennes.

Cuttano, M.; Mastronardi, P; Rossi-Manaressi, R. (1981) Alveolar weathering of the tuff of Matera. Mechnism of deterioration and effectiveness of preservation treatments. En : International Symposium of the Conservation of Stone, Bologna. Ed: R. Rossi-Manaressi vol II: 355-377.

Dag, H; Che, M.; Li, T.; Huang, G. (2007) Molecular determination of bacterial primary colonization and early succesion on submerged surfaces in marine water ofthe quingdao coast. No Publicado.

Dan, T.K.; Sreedharam, V.P.; Patel, F.K. (1982) The mechanism of blackening of tile surfaces. *International Biodeterioration Bulletin*, 18 (4): 99-104.

De Castro, J.J. y Braga, A. (2004) Linear thermal expansion of granitic rock: influence of apparent porosity, grain size and quartz content. *Bulletin of Engineering Geology and the Environment* 63: 215-220.

De los Rios, A.; 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 Santis, F. y Allegrini, I. (1992) The role of NO_2 in the heterogeneous oxidation of SO_2 en $CaCO_3$ prototipe surface. En: Actas del Congreso Internacional Rehabilitación del Patrimonio Arquitectónico y Edificación. Canarias 337-339.

De Vechi, G.P.; Lazzarini, L-; Menegazzo, L. (1981) Deterioration due to salt efflorescence on interior marble facings of the Church of the Sta. Maria dei Miracoli, Venice. En: International Symposium of the Conservation of Stone. Ed: R. Rossi-Manaresi. Bolognia. Vol II: 417-453.

Del Monte, M.; Ausset, P., Forti, P.; Lèfevre, R.A.; Tolomelli, M. (2001) Air pollution record son selenite in the urban environment. *Atmospheric Environment* 35: 3885-3896.

Dejou, J.; Guyot, J.; Chaumont, G. (1977) Evolution superficielle des roches cristallines et criptalophylliennes dans les régions témperées. Ed: I.N.R.A. 464p

Dekas, A.; Moissl, C.; Osman, S.; La Duc, M.T.; Newcombe, D.; Venkateswaran, K. (2006) Geographical Variation of Microbial Burden and Diversity Associated with Spacecraft Assembly Environments. No Publicado.

Delgado, J. (1982) Laboratory study of thermally-fissured rocks. En: IV International Congress on Deterioration and Preservation of Stone Objects. Louisville (Ky).

Delgado, J. (1989) Causes, mechanisms and mesurements of damage in stone monuments. En: European Symposium Science, Techonology and European Cultural Heritage, Bologna. Ed: N.S. Baer, C. Sabbioni y D.J. Sors 124-137.

Descheemaeker, P. y Swings, J. (1995) The application of fatty acid methyl ester analysis (FAME) for the identification of heterotrophic bacteria present in decaying Lede-stone of the Bravo Cathedral in Ghent. *The Science of Total Environment* 167: 241-247.

Diakumaku, E.; Gorbushina, A.A.; Krumbein, W.E.; Panina, L.; Soukharjevski, S. (1995) Black fungi en marble and limestones – an aesthetical, chemical and physical problem for the conservation of monuments. *The Science of the Total Environment* 167: 295-304.

Díez, B.; Pedrós-Alió, C.; Marsh, T.L.; Massana, R. (2001) Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine oicoeukariotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and Environmental Mycrobiology* 67: 4942-2951.

Dong, H.; Rech, J.A.; Jiang, H.; Sun, H.; Buck, B.J. (2006) Endolithic Cyanobacteria in soil sulfates from hyperarid environments on Earth. No Publicado

Drever, J.I. (1994) Durability of stone: mineralogical and textural prespectives. En: Durability and Change. The Science, Responsability and Cost of Sustaining Cultural Heritage. Ed: W.E. Krumbein, P. Brimblecome, D.E. Cosgrove, S. Staniforth. Jon Wiley and sons Ltd, England. Capitulo 4: 27-37.

Drewello, U.; Weifmann, R.; Rölleke, S.; Müller, E.; Wuertz, S.; Fekrsanati, F.; Troll, C.; Drewello, R. (2000) Biogenic surface layers on historical window glass and the effect of excimer laser cleaning. *Journal of Cultural Heritage* 1 :161-171.

Eberhard, W. y Mehner, H. (1998) The iron in black weathering crusts on saxonian sandstone investigated by Mössbauer spectroscopy. *Studies in Conservation* 43 (vol 1): 49-58.

Fassina, V. (1991) Atmospheric pollutants responsible for stine decay. Wet and dry surface deposition of air pollutants on stone and the formation of black scabs. En: 1rd Course Weathering and Air Pollution. Ed: M. Adda. Bari (Italia) 67-88.

Fassina, V.; Schilling, M.R.; Keeney, J.; Khanijan, H. (2004) Weaterin of marble in relation to atmospheric an man-made intervention on the church façade of S. Maria del Giglio in Venice. En: Air Pollution and Cultural Heritage. Ed: Saiz-Jimenez. Taylor and Francis, Londres: 117-125.

Fischer S. G. y Lerman L. S. (1979) Length-independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis. *Cell* 16: 191-200.

Fitzner, B. (1993) Porosity properties and Weathering behaviour of natural stones. Methodology and examples. En: 2nd Course Stone Material an Monuments: Diagnosis and Conservation. Ed: M. Adda, Bari. 43-54.

Flores, M.; Lorenzo, J.; Gomez-Alarcon, G. (1996) Algae and bacteria on historic monuments at Alcala de Henares, Spain. En: Actas del III international Symposium on Biodeterioration and Biodegradation: 47-48.

Fobe, B.; Sweevers, H.; Vleugels, G.; Van Grieken, R. (1993) Weathering of miocene ferruginous sandstones in northeastern Belgium. *The Sience of the Total Environment* 132:53-70.

Fuzzi, S. y Vittori, O. (1975) Climatic chamber for laboratory experiments on the system SO_2 –wet marble-airbone particles. En: Proceedings of 2nd International Symposium on Conservation of Stone. Bologna 651-661

Galán, E. (1991) The influence of temperature changes in stone decay. En:1rd CourseWeathering and Air Pollution. Ed: M. Adda. Bari (Italia), 119-129.

Galletti, G.C.; Bocchini, P.; Cam, D.; Chiavari, G.; Mazzeo, R. (1997) Chemical characterization of the black crust present on the stone central portal of st Denis abbey. *Fresenius Journal Analitical Chemistry* 357: 1211-1214.

Gao, Z.; Tseng, C.H.; Pei, Z.; Blaser, M.J. (2007) Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(8):2927-2932

García de Miguel, J.M.; Sanchez- Castillo, L.; Ortega-Calvo, J.J.; Gil, J.A.; Saiz-Jiménez, C. (1995) Deterioration of building materials from the Great Jaquard Pyramid al Tikal, Guatemala. *Building and Environment* 30: 591-598.

García paz, C. (1982) Estudio de la meteorización de rocas básicas en Galicia. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.

García-Rodeja, E. y Macías, F. (1985) Aplicación de técnicas de disolución selectiva al estudio de los componentes no cristalinos de una secuencia de suelos desrrollados sobre granitos en la sierra de los Ancares (Lugo, Galicia). *An Edafol. Agrobiol* 45 (3-4): 347-366.

García-Vallés, M.; Blázquez, F.; Molera, J.; Vendrell-Saz, M. (1996) Studies of patinas and decay mechanisms leading to the restoration of Santa María de Montblanc (Catalonia, Spain). *Studies in Conservation* 41: 1-8.

García-Vallés, M.; Vendrell-Saz, M.; Molera, J.; Blázquez, F (1998) Interaction of rock and atmosphere: patinas on Mediterraneam monuments. *Environmental Geology* 36 (1-2): 137-149.

Garcia-Vallés, M.; Urzí, C.; De Leo, F.; Salamone, P.; Vendrell-Saz, M. (2000) Biological weatering and mineral deposits of the Belevi marble quarry (Ephesus, Turkey). *International Biodeterioration and Biodegradation* 46: 221-227.

Gaylarde, C.C. (2002) Os fungos como organismos deteriorigênicos en prédios históricos construídos de pedra. En: Biodeterioro de Monumentos de Iberoamérica. Ed: Saíz-Jimenez C. y Videla, H.A. 33-43.

Gaylarde, C.C. Caylarde, P.M.; Copp, J.; Neilan, B. (2004) Polyphasic detection of cyanobacteria in terrestrial biofilms. *Biofouling* 20:71-79.

Gaylarde, C.C.; Ortega-morales, B.O., Bartolo-Pérez, P. (2007) Biogenic black crust on buildings in unpolluted environments. *Current Mycrobiology* 54: 162-166.

Gauri, K.L; Chowdhury, A.N.; Kulshreshtha, N.P; Purunu, A.R. (1989) The sulfation of marble and the treatment of gypsum crusts. *Studies in Conservation,* 34: 201-206.

Gaviño, M; Hermosin, B.; Vergés-belmin, V.; Nowik, W. ; Saiz-Jimenez, C. (2004) Composition of the black crusts from the Saint Denis Basilica, France, as revealed by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 27: 513-523.

Geissler, A. y Selenska-Pobell, S. (2005) Addition of U(VI) to a uranium mining waste sample and resulting changes in the indigenous bacterial community. *Geobiology* 3: 275-285.

Ghedini, N.; Sabbioni, C.; Pantani, M. (2003) Thermal análisis in cultural heritage safeguard: an application. *Thermochimica Acta* 406: 105-113.

Ghedini, N.; Sabbioni, C.; Bonazza, A.; Gobbi, G.; Zappia, G. (2004) A quantitative methodology por carbon speciation in black crust on monuments. En: Air Pollution and Cultural Heritage. Ed: Saiz-Jimenez. Taylor y Francis Group. London. 31-38.

Gomez Alarcon, M.; Cilleros, B.; Flores, M.; Lorenzo, J. (1995) Microbial comunities and alteration processes in monuments at Alcala de Henares, Spain. *The science of the Total Environment* 167: 231-239.

Gomez Alarcón, M.; Muñoz, G; Ariño, X; Ortega-Calvo, J.J. (1995b) Microbial communities in weathered sandstones: The case of Carrascosa del Campo church, Spain. *Science of the Total Environment* 167:249-254.

Gomez-Alvarez,V.; King, G.M; Nusslein, K. (2003). Comparative bacterial diversity in recent Hawaiian volcanic deposits of different ages. *FEMS Microbiology Ecology* 60 (1): 60-73.

Gomez-Alvarez, V. y Nuesslein, K. (2005) Comparative 16S rRNA Gene Sequence Analysis of Microbial Communities on Recent Hawaiian Volcanic Deposits (1982, 1979, 1974, 1973, 1971, 1969, 1959, 1921, 1894, 1790 & 1700): Colonization and Succession of Microbes in Extreme Environments. No Publicado.

González, J.M y Saiz-Jimenez, C. (2004) Microbial diversity in biodeteriorated monuments as studied by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Separation Science* 27: 174-180.

González, J.M y Saiz-Jimenez, C. (2005) Application of molecular nucleic acid-based techniques for the study of microbial communities in monuments and artworks. *International Microbiology* 8: 189-194.

Gotoh O.y Tagashira Y. (1981) Location of frequently opening regions on natural DNAs and their relation to funtional loci. *Biopolymers* 20 (5):1043-1058.

Gorbushina, A.A; Krumbein, W.E; Hamman, C.H.; Panina, L.; Soukharjevski, S.; Wollenzien, U. (1993) Role of black fungi in colour changes and biodeterioration of antique marbles. *Geomicrobiology journal* 11: 205-221.

Gorbushina, A.A.; Heyrman, J.; Dornieden, T.; Gonzalez-Delvalle, M.; Krumbein, W.E.; Laiz, L.; Petersen, K.; Saiz-Jimenez, C.; Swings, J. (2004) Bacterial and fungal diversity and biodeterioration problems in mural painting environments of St. Martins church (Greene-Kreiensen, Germany). *International Biodeterioration and Biodegradation* 53: 13-24.

Gordon, D.; Abajian, C; Green, P. (1998) Consed: A Graphical Tool fo Sequence Finishing.*Genome Research* 8: 195-202**.**

Gordon, S.J y Dorn, R.I. (2005) In situ weathering erosion. *Geomorphology* 67:97-113.

Grant, C. (1982) Fouling of terrestrial substrates by algae and implications for control. A review. *International Biodeterioration Bulletin* 18 (3): 57-65.

Grossi, C.M. y Esbert, R.M. (1994) Las sales solubles en el deterioro de las rocas monumentales. Revisión bibliografica. *Materiales de Construcción* 44 (235): 15-30.

Grossi, C.M; Esbert, R.M; Díaz-Pache, F.; Alonso, F.J. (2003) Soiling of building stones in urban environments. *Building and Environment* 38: 147-159.

Groth, I.; Vettermann, R.; Schuetze B.; Schuman, P.; Saiz-Jimenez, C. (1999) Actinomycetes in karstic caves of the northerm Spain (Altamira and Tito Bustillo). *Journal of Microbiological Methods*. 36 : 115-122.

Guitián, F. y Calvo, R. (1981) Evolución de los minerales primarios de las rocas graníticas de Galicia. Aplicación de las técnicas de microscopía elctrónica (SEM) y análisis con microsonda. *An Edafol. Agrobio*. 40: 1687-1706.

Gurtner, C.; Heyrman, J.; Piñar, G.; Lubitz, W.; Swings, J.; Rölleke, S. (2000) Comparative analyses of the bacterial dyversity on two different biodeteriorated wall paitings by DGGE and 16S rDNA sequence analysis. *International Biodeterioration and Biodegradation* 46: 229-239.

Gutiérrez, A.; Martínez, M.J.; Almendros G.; Gonzalez-Vila, F.J.; Martínez, T.A. (1995) Hyphal-sheath polysaccharides in fungal deterioration. *The Sciende of the Total Environment* 167: 315-328.

Hamilton, R.S.; Revitt, D.M.; Vincent, K.J.; Butlin, R.N. (1995) Sulphur and nitrogen particulate pollutant deposition on to building surfaces. *The Science of the Totatl Environment* 167: 57-66.

Hansen, A.A.; Jensen, L.L.; Kristoffersen, T.; Mikkelsen, K.; Merrison,J.; Finster, K.W.; Lomstein,B.A. (2004) Effects of long-term simulated Martian conditions on a bacterial permafrost soil community. No Publicado.

Hatsagortsian, Z. (1985) Principles experimentaux et theoriques pour l´evaluation de durabilite de la pierre. En: V International Congreess on Deterioration and Conservation of Stone, Laussane vol 1: 195-202.

Helmi, F. M. (1985) Deterioration of stone granite in Egypt. En: V International Congress of Deterioration and Conservation of Stone. Lausanne. Vol 1: 421-430.

Henriksen, J. F. (1994) Dry deposition on stone surfaces. Preliminary Norwegian results from an ECC-STEP Project. En: III International Symposium on Conservation of Monuments in Mediterraneam Basin. Ed: V. Fassina, H. Ott y F. Zezza. Venecia. 189-193.

Hermosin, B.; Gaviño, M.; Saiz-Jimenez, C. (2004) Organic compounds in black crust from different European monuments a conparative study. En: Air Pollution and Cultural Heritage. Ed: Saiz-Jimenez. Taylor and Francis, Londres: 47-55.

Heyrman, J.; Mergaert, J.; Denys, R.; Swings, J. (1999) The use of fatty acid methyl ester analysis (FAME) for the identification of heterotrophic bacteria present on three mural paintings showing severe damage by microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*. 181 : 55-62.

Hirsch, P.; Eckhardt, F.E.W.; Palmer, R.J (1995) Fungi active in weathering of rock and stone monuments. *Can. J. Bot*. 73 (suppl. 1).

Hiscox, J. D. y Israelstam, G.F. (1978) A method for the extraction of clorophyll from leaf tissue without maceration. *Can. J. Bot*. 57:1332-1334.

Hoffman, L. (1989) Algae of terrestrial habitats. *Botanical Review* 55: 77-105.

Holt, G. K.; Krieg, N. R.; Sneath, P. H. A.; Staley, J. T.; Williams, S. (1994) Bergey´s manual of determinative bacteriology. Baltimore: Williams and Wilkins.

Hugenholtz,P.; Goebel, B.M.; Pace, N.R. (1998) Impact of culture-independing studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *Journal of Bacterio*logy 180: 4765-4774.

Instituto geológico y minero de España (I.G.M.E.) (1975). Mapa geológico escala 1:50.000, hoja 21 5.4. Servicio de publicaciones Ministerio de Industria y Energía.

Instituto geológico y minero de España (I.G.M.E.) (1981). Mapa geológico escala 1:50.000, hojas 69 4.6, 93 3.7, 151 8.9, 94 4.7, 120 4.8 y 72. Servicio de publicaciones Ministerio de Industria y Energía.

Instituto geológico y minero de España (I.G.M.E.) (1982). Mapa geológico escala 1:50.000, hojas 152 4.9 y 153 5.9. Servicio de publicaciones Ministerio de Industria y Energía.

Instituto Tecnológico y Geominero de España (ITGE) (1982) Rocas ornamentales de España. 2ª edición

Iñigo, A.C.; Vicente, M.A.; Rives, V. (2000) Reproducción en cámara climática de las formas de alteración más frecuentes detectadas en materiales graníticos, en clima de tendencia continental. *Materiales de Construcción* 257: 57-60.

Iñigo, A.C. y Vicente-Tavera, S. (2001) Different degrees of stone decay on the inner and outer walls of a Cloister. *Building and Environment* 36: 911-197.

Iñigo, A.C y Vicente-Tavera, S. (2002) Surface-inside (10cm) thermal gradients in granitic rocks: effects of environmental conditions. *Building and Environment* 37: 101-108

Jangid, K.; Williams, M.A.; Franzluebbers, A.; Jenkins, M.; Coleman, D.C.; Whitman, W.B. (2006) Soil bacterial community composition and diversity as affected by animal manure application in pasture and cropping systems of the Southern Piedmont USA. No Publicado

Jimenez del Haro, M.C.; Justo, A.; Durán, A.; Sigüenza,M.B.; Pérez-Rodriguez, J.L. (2004) Crust formed on diferent building materials from the cathedral of Seville, Spain. En: Air Pollution and Cultural Heritage. Ed: Saiz-Jimenez. Taylor and Francis, Londres: 79-84.

Kellog, W. W.; Cadle, R. D.; Allen, E. R.; Lazrus, A. L.; Martell, E. A. (1972) The sulfur cicle. *Science* 175: 587-596.

Kiel, G. y Gaylarde, C. C. (2006) Bacterial diversity in biofilms on historic buildings in Porto Alegre. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22: 293-297.

Kowalchuk G.; Stephen J. R.; De Boer W.; Prosser J.; Embley T. M.; Woldendorp J. W. (1997) Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the β subdivision of the class *proteobacteria* in costal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and secuencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 1489-1497.

Kowalchuk, G.; Gerards, S.; Woldendorp, J. (1997) Detection and Characterization of fungal (Marran Grass) roots by denaturing gradient gel electrophoresis of specificaly amplified 18S r DNA. *Applied and Environmental Mycrobiology* 63 (4) 3858-3865.

Kowalski, W.C. (1966) The interdependence between the strength and void ratio on limestone and mares in connection with their wather saturing and anisotropy. En: 1er International Congress society Rock Merch. Lisboa vol1: 142-144.

Krumbein, W.E. (1992) Colour changes of building stone and their direct and indirect biological causes. En: 7th Int. Cong. Deterioration and Conservation of stone. Ed: J. Delgado Rodrigues, F. Henriques, y F. Telmo Jeremias. Lisboa. 443-452.

Laiz, L.; Groth, I.; Gonzalez, I.; Saiz-Jimenez, C. (1999) Microbiological study of the dripping waters in Altamira cave (Santillana del Mar, Spain). *Journal of Microbiological Methods*. 36: 129-138.

Laiz, L; Hermosin, B.; Caballero, B.; Saiz-Jimenez, C. (2000) Bacterial isolated from the rocks supporting prehistoric paintings in two shelters from Sierra de Cazorla, Jaen, Spain. *Aerobiologia* 16: 119-124.

Laiz, L.; Gonzalez-Delvalle, M.; Hermosin, B.; Ortiz-Martinez, A.; Saiz-Jimenez, C. (2003) Isolation of cave bacteria and substrate utilization at different temperaturas. *Geomicrobiology Journal*. 20: 479-489.

Lamb, D.; Miller, D. F.; Robinson, N. F.; Gertler, A. W. (1987) The importance of liquid water concentration in the atmospheric oxidation of SO_2. *Atmospheric Environment* 21:2333-2344.

Larson, B. y Tjalve, H. (1979) Studies on the mechanism of drug binding to melanin. *Biochemistry Pharmacologye* 28:1181-1187.

Latridou, J.P y Ozouf, J.C. (1978) Relations entre la gelivité et les propietes physiques (porosité, ascensión capillaire) des roches calcaires. En: International Symposium of Deterioration and Protection of Stone in Monuments Paris vol 5.

Lazarini, L. y Tabaso, M. (1986) Il restauro della pietra. Ed: CEDAM, Padova. 319p.

Lisci , M.; Monte, M.; Pacini, E. (2003) Lichens and higher plants on stone: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 51 (1): 1-17.

Lucas, J. y Prévòut L. (1984) Synthèse de l´apatite par voice bactérianne à partir de matiére organique phosphatée et the divers carbonates de calcium dans des eaux douce et marines naturelles. *Chemical Geology* 42: 287-301.

Lundberg, K.S.; Shoemaker, D.D., Adam, M.W.; Short, J.M.; Sorge, J.A.; Mathur, E.J. (1991) High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated fom pyrococcus furiosus. *Gene* 108: 1-6.

Macías, F. (1981) Formation o gibbsite in soils and saprolites of temperate-humid zones. *Clay minerals* 16: 43-52.

Macías, F.; García, C.; García-Rodeja, (1982) Mineralogía de las arcillas en suelos y alteraciones sobre materiales graníticos de Galicia. *Cuaderno do Laboratorio Xeoloxico de Laxe* 3: 387-414.

Malucelli, F.; Terribile, F.; Colombo, C. (1999) Myneralogy, micromorfology and chemical análisis of andosol on the island of Sao Migüel (Azores). *Geoderma* 88: 73-98.

Mansch, R. y Bock, E. (1998) Biodeterioration of natural stone with special reference to nitrifying bacteria. *Biodegradation* 9: 47-64.

Maravelaki-Kalaitzaki, P (2004) Characterization of weathering crusts from monuments ina Athens, Greece. En: Air Pollution and Cultural Heritage. Ed: Saiz-Jimenez. Grupo Taylor and Francis, Londres: 71-78.

Maravelaki-Kalaitzaki, P. (2005) Black crusts and patinas on pentelic marble from de Parthenon and Erechtheum (Acropolis, Athens): Characterization and origin. *Analytica Chimica Acta* 532: 187-198.

Marszalek, M. (2004) Deterioration of stone in some monuments exposed to air pollution: a Cracow case study. En: Air Pollution and Cultural Heritage. Ed: Saiz-Jimenez. Grupo Taylor and Francis, Londres: 151-154.

Martín, A. (1990) Ensayos y experiencias de alteración en la conservación de obras de piedra de interés histórico artístico. Ed: Fundación Ramón Areces. 609p.

McAlister, J.J.; Smith, B.J.; Török, A. (2006) Element partitioning and potential mobility within surface dusts on buildings in a polluted urban environment, Budapest. *Atmospheric Environment* 40:6780-6790.

McKeage, J.A.; Grant, D.R.; Kodama, H.; Beke, G.J; Wang, C. (1983) Properties and genesis of a soil and the underlying gibbsite-bearing saprolite, Cape, Breton Island, Canada. *Canadian Journal for Earth Science* 20: 37-48.

McNamara, C.J.; Perry IV, T.D.; Bearce, K.A.; Hernandez-Duque, G.; Mitchell, R. (2006) Epilithic and endolithic bacterial communities in limestone from Maya archaeological site. *Mycrobial Ecology* 51:51-64.

Melfi, A.K.; Cerri, C.C.; Kronberg, B.L.; Fyfe, W.S.; McKinnon, B. (1983) Granitic weathering: a Brazilian study. *Journal of Science soil* 34: 841-851.

Meunier, A. (1980) Les mecanismos de l´alteration des granites et le róle des mrycrosystémes. Etude des arénes du massif granitique de Parthenay (Deux-Sevrés). *Men. Soc. Geol. De France* 140: 37-48.

Michaelsen, A.; Pinzari, F.; Ripka, K.; Lubitz, W.; Piñar, G. (2006) Aplication of molecular techniques for identification of fangal communities colonising paper material. *International Biodegradation and Biodeterioration* 58: 133-141.

Mishra, A.K.; Jain, K.K; Garg, K.L. (1995) Role of higher plants in the deterioration of historic building. *The Science of the Total Environment* 167: 375-392.

Moroni, B. y Poli, G. (2000) Corrosion of limestones in sumid air containing sulphur and nitrogen dioxides: a model study. En: libro de actas del 9th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone. Ed: Vasco Fassina. Venecia. Vol 1: 367-374.

Moropoulou, A.; Polikreti, K.; Ruf, V.; Deodatis, G. (2003) San Francisco Monastery, Quito, Equador: characterisation of building materials, damage assessment and conservation considerations. *Journal of Cultural Heritage* 4: 101-108.

Müller, K-D.; Schmid, E.N.; Kroppenstedt, R.M. (1998) Improved identification of mycobacteria by using the microbial identification system in combination with additional trimethylsulfonium hydroxide pyrolysis. *Journal of Clinical Microbiology* 36 (9): 2477-2480.

Müller, E.; Drewello, U.; Drewello, R.; Weifmann, R.; Wuertz, S. (2001) In situ analysis of biofilms on historical window glass using confocal laser scaning microscopy. *Journal of Cultural Heritage* 2 :31-42.

Muyzer G.; De Waal E.C.; Uitterlinden A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 59: 695-700.

Muyzer G. y Smalla K. (1998) Application of denaturing gradient gel electrophoretis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127-141.

Myers, R.M; Fisher, S.G; Lerman, L.S.; Maniatis, T. (1985) Nearly all single base substitution in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 13: 3131-3145.

Newby, P. T.; Mansfield, T.A.; Hamilton, R.S. (1991) The source and economic implications of building in urban areas. *Science of Total. Enviroment* 100: 347-366

Newton RJ, Kent AD, Triplett EW, McMahon KD (2006) Microbial community dynamics in a humic lake: differential persistence of common freshwater phylotypes. *Environmental microbiology* 8: 956-970.

Nicolaus, R.A.; Piatelli, M. (1995) Progress in the chemistry of natural black pigments. Rends. *Accad. Sci. Fis. Mat. Naples Ser*. 4 (32): 83-97.

Nübel U.; García-Pichel F.; Muyzer G. (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes fom cianobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 63: 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 Environment*. 364 : 272-283.

O`Brien, P.F.; Bell, E.; Santamaría, S.P.; Boyland, P.; Cooper, T.P. (1995) Role of mortars in the decay of granite. *The Science of the Total Environment* 167: 103-110.

Oeste, C. (1988) Polimerase Chain reaction. *Biotechniques* 6: 162-167.

Ordaz, J. y Esbert, R. M. (1988) Glosario de términos relacionados con el deterioro de las piedras de construcción. *Materiales de construcción.* 209: 39-45.

Ortega-Calvo, J.J. y Saiz-Jimenez, C. (1997) Microbial degradation of phenanthrene in two European cathedrals. *FEMS Microbiology Ecology* 22: 95-101

Ortega-Morales, O.; Guezennec, J.; Hernández-Duque, G.; Gaylarde, C. C.; Gaylarde P.M. (2000) Phototrophic biofilms on ancien Mayan buildings in yucatán, Mexico. *Current Microbiology*. 40: 81-85.

Ovreas L.; Formey L.; Daae F. L.; Torsvir V. (1997) Distribution of bacterioplankton in meromictic lake Saelevannet, as determined by denaturin gradient gel electrophoresis of PCR-Amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 3367-3373.

Palla, F.; Federico, C.; Russo, R.; Anello, L. (2002) Identification of *Nocardia restricta* in biodegraded sandstone monuments by PCR and nested-PCR DNA amplification. *FEMS Mycrobiology Ecology* 39: 85-89.

Papida, S.; Murphy, W.; May, E. (2000) Enhancement of physical weathering of building stones by microbial populations. International *Biodeterioration and Biodegradation* 46(4): 305-317.

Parga Pondal, I. (1958) El relieve geográfico y la erosión diferencial de los granitos de Galicia. En: Libro homenaxe a Ramón Otero Pedrayo.

Perez Bernal J.L. (2000) Estudio del sistema dioxido de azufre-carbonato cálcico. Catálisis e inhibición. Tesis Doctoral Universidad de Sevilla.

Pérez Bernal J. L. y Bello López M. A. (2004) Dióxido de Azufre Química atmosférica y destrucción del patrimonio. Ed: Fundación El Monte. 129p.

Pérez-Rodríguez, J.L.; Jiménez del Aro, M.C.; Maqueda, C. (2004) Isolation and characterisation of barium sulphate and titanium oxides in monument crusts. *Analytica Chemica Acta* 524: 373-377.

Peterson, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* wich is more generally applicable. *Anal. Biochem* 83: 346:356.

Piñar, G.; Laiz, L.; Lubitz, W.; Saiz-Jiménez, C. (2002) Estudio comparativo de comunidades bacterianas en monumentos mediante técnicas moleculares y microbiológicas. En: Biodeterioro de Monumentos de Iberoamérica. Ed: C. Saíz-Jiménez y H. Videla. 57-79.

Pochon J.y Jaton C. (1968) Facteurs biologiques dálteration des pierres. En: Biodeterioration of Materials. Ed: A.H. Walters and J.J. Ephick. Elsevier Publishing Co Ltd. London. Vol 1: 258-268.

Polikreti, K. y Maniatis, Y. (2003) Micromorfology, composition and origin of the orange patina on the marble surface of Propylaea (Acropolis, Athens). *The Science of the Total Environment* 308: 111-119.

Potgieter-Vermaak, S.S.; Godoi, R.H.M.; Van Grieken, R.; Potgieter, J.H.; Oujja, M.; Castillejo, M. (2005) Micro-structural characterization of black crust and laser clearing of building stones by micro-Raman and SEM techniques. *Spectrochimica Acta Part A* 61: 2460-2467.

Price, C. y Brimblecombe, P. (1994) Preventing salt damage in porous materials. En*:* Preventive Conservation: Practique, Theory and Research. Otawa. Ed: International Institute of Conservation (London).

Prieto, B.; Silva, B.; Rivas, T; Ascaso, C. (1997) Mineralogical transformation and neoformation in granite caused by the lichens *Tephromela atra* and *Ochrolechia parella*. *International Biodeterioration and Biodegradation* 40 (2-4): 191-199.

Prieto, B.; Seaward, M.R.D.; Edwards, H.G.M.; Rivas, T.; Silva, B. (1998) Biodeterioration of granite monuments by Ochrolechia parella (L.). Mass an F.T. Raman spectroscopy study. *Bioespectroscopy* 5: 53-59.

Prieto B.; Seaward, M.R.D.; Edwards, H.G.M.; Rivas, T.; Silva, B. (1999) An Fourier transform-Raman spectroscopic study of gypsum neoformation by lichens growing on granitic rocks. *Spectrochimica Acta. Part A.* 55: 211-217.

Prieto, B; Edwards, H.G.M.; Seaward, M.R.D. (2000) A Fourier transform-Raman spectroscopic study of lichen strategies on granitica monuments. *Geomicrobiology Journal* 17: 55-60.

Prieto, B.; Rivas, T.; Silva, B. (2002) Alteración del granito por acción de los líquenes. Aspectos biogeofísicos y biogeoquímicos. En: Biodeteriro de Monumentos Históricos de Iberoamérica. Ed: H. Videla y C. Saiz-Jiménez 125-147.

Prudêncio, M.I.; Nasraoui, M.; Trindade, M.J. (2000) Secondary phosphate in altered Trachytes from S. Miguel island (Azores, Portugal)- A possible contribution to the stone degradation. En: libro de actas del 9th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone. Ed: Vasco Fassina. Venecia. Vol 1: 165-170.

Rampazzi, L.; Andreotti, A.; Bonaduce, I.; Colombini, M.P.; Colombo,C.; Toniolo, L. (2004) Analytical investigation of calcium oxalate films on marble monuments. *Talanta* 63: 967-977.

Regert, M. ; Langlois, J.; Laval, E.; Le Hô A.S.; Pagès-Camagna, S. (2006) Elucidation of molecular and elementary composition of organic and inorganic substances involved in 19th century wax sculptures using an integrated analytical approach. *Analytica Chimica Acta* 577: 140-152.

Rappé, M.S. y Giovannoni, S.J. (2003) The uncultured microbial majority. *Annual Reviews in Mycrobiology* 57: 369-394.

Rehnstrom, A.L y Free, S.J. (1997) The isolation and characterization of melanin-deficient mutants of *Minilinia fruticola*. *Physiol. Mol. Plant. Pathol* 49: 321-330.

Reyes, J.; Hermosín, B.; Saiz-Jiménez, C. (2004) Organic análisis of aerosols in Seville atmosphere. En: Air Pollution and Cultural Heritage. Ed: Saiz-Jiménez. Taylor and Francis, Londres. 15-20.

Rifón-Lastra, A. y Noguerol-Seoane, A. (2001) Green algae associated with the granitic walls of monuments in Galician (NW Spain) *Cryptogamie Algologie* 22: 305-326.

Riganti, V; Rossetti, R.; Soggetti, F.; Veniale, F.; Zezza, V. (1978) Alteraziones e protezione della pietra dei monumenti storici dell´Universitá di Pavia. *Tai. Soc. Ital. Sci. Nat. Mus. Stor*. Milano, Pavia 119: 75-82.

Rivas, T.; Prieto, B.; Silva, B. (1994) Plaque-shedding by granite in the Monastery of San Martín Pinario (Santiago de Compostela, NW, Spain). En: Procedings of III International Congress on deterioration and Conservation of Monuments in the Mediterraneam Bassin. Venecia. 737-742.

Rivas, T. (1996) Mecanismos de alteración de las rocas graníticas utilizadas en la construcción de edificios antiguos de Galicia. *Tesis Doctoral Universidad de Santiago de Compostela*. 366p.

Rivas, T.; Prieto, B.; Silva, B. (1997) Gypsum formation in granitic rocks by dry deposition of sulphur dioxide. En: Proc. IV Int. Symp. on the conservation of monuments in the Mediterranean Basin. Rhodes: 263-270.

Rivas, T.; Prieto B.; Silva B. (2000) Influence of rift and bedding plane on the physico-mechanical properties of granitic rocks. Implications for the deterioration of granitic monuments. *Building and Environment* 35: 387-396.

Rivas, T.; Prieto, B.; Lantes, O.; Silva, B. (2002) Grado de meteorización y formas de alteración de las rocas de construcción de megalitos gallegos. Nova Acta CientificaCompostelana 12: 203-217.

Rivas, T.; Prieto, B.; Silva, B.; Birgine, J.M. (2003) Weathering of granitic rocks by chlorides: Effect of the nature of the solution on weathering morphology. *Earth Surface Processes and Landforms* 28:245-436.

Robert, R. (1973) The experimental transformation of mica towards smectite; relative importance of total charge and tetrahedral charge. *Clay Minerals* 21: 167-174.

Robert, M. y Berthelin, J. (1986) Role of biological and biochemical factor in soil mineral weathering. En: Interactions of Soils Minerals whit Natural Organics and Microbes. Ed: P.M. Huang and H. Schnitzer. Soil Science Societe of America. Cap 12 : 453-495.

Rodriguez Navarro, C. y Sebastian, E. (1996) Role of paticulate matter from vehicle exhaust on porous building stones (limestone) sulfation . *Science of the Total Environmen*t 187: 79-91.

Romero, R.; Robert, M.; Elsass, F.; García, C. (1992a) Evidence by trasmision electron microscopy of weathering microsystems in soil developed from crystalline rocks. *Clay Minera*ls 27: 21-33

Romero, R.; Robert, M.; Elsass, F.; García, C. (1992b) Abundance of halloysite neoformation in soil developed from crystalline rocks. Contribution of transmission electron microscopy. *Clay Minerals* 27: 35-46.

Rosa, A.L. y Casadevall, A. (1997) Melanization effects susceptibility of *Cryptococcus neoformans* To heat and cold. *FEMS Microbiology Letters* 153: 265-272.

Roselló-Mora, R. y Amann, R. (2001) The species concept in prokariotes. *FEMS Mycrobiology Revie*ws 25: 39-79.

Rossi-Manaressi, R. y Tucci, A. (1989) Pore estructure and salt crystallization; salt decay of Agriento biocalcarenite and case hardening in sandstone. En: I International Symposium of the Monuments in Mediterraneam Bassin, Bari. Ed: F. Zezza. 97-100.

Roszak, D.B. y collwell, R.R. (1987) Survival strategies of bacterial in the natural environment. *Mycrobial Reviews* 51: 365-379.

Sabbioni, C. (1995) Contribution of atmospheric deposition to the formation of damage layers. *The Science of the Total Environment* 167: 49-55.

Sabbioni, C.; Ghedini, N.; Bonazza, A. (1995) Organic anions in damage layer on monuments and buildings. *Atmospheric Environment* 37: 1261-1269.

Sabbioni, C.; Ghedini, N.; Gobbi, G.; Riontino, C.; Zappia, G. (2000) Analytic methodologies forcarbon compound identification: leaning tower and baptistery of Pisa. En: libro de actas del 9th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone. Ed: Vasco Fassina. Venecia. Vol 1: 383-390.

Sabbioni, C.; Bonazza, A.; Zamagni, J.; Ghedini, N.; Grossa, C.M.; Brimblecombe, P. (2004) The tower of London: a case study on stone damage in an urban area. Air Pollution and Cultural Heritage. Ed: Saiz-Jimenez. Taylor and Francis, Londres: 57-62.

Sait, M.; Hugenholtz, P.; Janssen, P.H. (2002) Cultivation of globally distributed from phylogenetic linajes previusly only detected in cultivation-independent surveys. *Environmental Microbiology* 4: 654-666.

Saiz-Jimenez, C. (1991) Characterization of organic compounds in weathered stones. En: Science, Technology and European Cultural Heritage. Ed: N.S. Baer. C. Sabbioni and A.I. Sors. Oxford. 523p.

Saiz-Jimenez C.; Hermosin, B.; Ortega-Calvo, J.J; Gomez-Alarcon, G. (1991) Applications of analytical pyrolysis to the study of stony cultural properties. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 20: 239-251.

Saiz-Jimenez C.; Hermosin, B.; Ortega-Calvo, J.J; Leeuw, J.W. (1995) The chemical structure of fangal melanins and their posible contribution to black satín in stone monuments. *The Science of the Total Environment* 167: 305-314.

Saiz-Jimenez C. y Hermosin B. (1999) Termally assisted hydrlysis and methylation of disolved organic matter in dripping waters from the Altamira Cave. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 49: 337-334.

Saiz-Jimenez, C; Brimblecome, P.; Camuffo, D.; Lefèvre, R.A.; Van Grieten, R. (2004) Damages caused to European monuments by air pollution: assessment and preventive measures. En: Air Pollution and Cultural Heritage. Ed: Saiz-Jiménez. Taylor and Francis, Londres. 91-109.

Sanchez-Moral, S.; Luque, L.; Cuezva, S.; Soler,V.; Benavente, D.; Laiz, L.; Gonzalez, J.M.; Saiz-Jimenez, C. (2005) Deterioration of building materials in Roman catacombs: the influence of visitors. *Science of the Total Environment* 349: 260-276.

Sand, W. (1997) Microbial mechanisms of deterioration of inorganic substrates-a general mechanistic overview. *International Biodeterioration and Biodegradation* 40: 183-190.

Sanjurjo Sanchez, J. ; Vidal Romaní, J. R.; Alves, C. A. S. (2004) Characterisation, tipology and origino f patinas in the church of Las Capuchinas, A Coruña NW (Spain). En: libro de actas del " 6th International Symposium on the Conservation of Monuments in the Mediterraneam Basin" Lisboa 202-206.

Santamaría, P.S. (1994) Material de construcción antiguo de Logroño y La Rioja alta: petrografía, propiedades físicas, geología y alteración. Ed: Instituto de Estudios Riojanos, Gobierno de la Rioja. 241p.

Santegoeds C. M.; Nold S. C.; Ward D. M. (1996) Denaturing gradient gel electrophoresis used to monitor the enrichment culture of aerobic chemoorganotrophic bacteria from a hot spring cyanobacteria mat. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3922-3928.

Sarró, M.I.; García, A.M.; Rivalta, V.M.; Moreno, D.A.; Arroyo, I. (2006) Biodeterioration of the lions fountain at the Alhambra Palace, Granada (Spain). *Building and Environment* 41: 1811-1820.

Scarciglia, F.; Le Pera, E.; Critelli, S. (2005) Weatering and pedogenesis in the Sila Grande Massif (Calabria, South Italy): from field scale to micromorphology. *Catena* 61: 1-29.

Schabereiter-Gurtner, C.; Piñar, G.; Lubitz, W.; Rölleke, S. (2001) And advanced molecular strategy to identify bacterial communities on art objects. *Journal of Microbiologycal Methods* 45: 77-87.

Schabereiter-Gurtner, C.; Saiz-Jimenez, C.; Piñar, G.; Lubitz, W.; Rölleke, S.; (2002a) Altamira cave Paleolithic paintings harbor partly unknown bacterial communities. *FEMS Mycrobiology Letters* 211: 7-11.

Schabereiter-Gurtner, C.; Saiz-Jimenez, C.; Piñar, G.; Lubitz, W.; Rölleke, S. (2002b) Phylogenetic 16S rRNA análisis reveals the presence of complex and partly unknown bacterial communities in Tito Bustillo cave, Spain, and on its Palaeolithic paintings. *Environmental Microbiology* 4(7): 392-400.

Scherer, G.W. (2000) Stress from crystallization of salts in pores.En: libro de actas del 9th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone. Ed: Vasco Fassina. Venecia. Vol 1: 187-194.

Schiavon, N.; Chiavari, G.; Fabbri, D.; Schiavon, G. (1994) Microscopical and chemical analysis of black patinas on granite. En: libro de actas del "III International Symposium the Conservation of Monuments in the Mediterraneam Basin".ed: V. Fassina, H.Ott, F. Zezza. Venecia : 22-25

Schiavon, N.; Chiavari, G.; Schiavon, G.; Fabbri, D. (1995) Nature and decay effects of urban soiling on granitic building stones. *The Science of the Total Environment* 167: 87-101.

Schiavon, N. (2000) Granitic building stone decay in an urban environment: a case of authigenic kaolinite formation by heterogeneus sulphur dioxide attack. En: libro de actas del "9th International Congress on deterioration and conservation of stone". Ed: Vasco Fassina. Venecia. vol 1:411-421.

Schiavon, N (2007) Kaolinisation of granite in an urban environment. *Environmental Geology* 52: 399-407.

Schneeberger, C.; Speiser, P.;Kury, F.; Zeillinger, R. (1995) Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods Applications* 4: 234-238.

Schutter, M.E. y Dick, R.P. (2000) Comparison of fatty acid methyl ester (FAME) methods for characterizing microbial communities. *Soil Science Society of America Journal* 54: 1659-1668.

Sequeira Braga, M.A. (1988) Arenas e depósitos associados da bacia de drenagem do rio Cádavo (Portugal). Contribuçao para o estudo da arenizaçao. Tesis Doctoral. Universidade do Minho.

Sequeira, M.A.; Lopes, J.E.; Paquet, H.; Millot, G (1989) Essais sur les arénes de L´Europe atlantique. Zonalité climatique. Place de l´arenisation parmi les grands systémes mondiaux de alteration métèorique. *C.R. Academy de science of Paris* 209: 1955-1962.

Sequeira, M.A.; Lopes, J.E.; Paquet, H.; Millot, G. (1990) Climatic zonalit of coarse granite saprolite ("arenes"). En: Atlantic Europe from Scandinavian to Portugal. Sci. Geol. Mem 85: 99-100.

Sequeira, M.A.; Paquet, H:; Begonha, A. (2002) Weathering of granites in a temperate climate (NW Portugal): granitic saprolites and arenization. *Catena* 49 :41-56.

Shoaf, W. T.y Lium, B.W. (1976) Improved extraction of clorophyll a and b from algaeusing dimethyl sulfoxide. *Limnology and Oceanography*. 21(6): 926-928.

Silva, B.; Rivas, T.; Prieto, B.; Martinez, A.(1993) Metodología aplicable al estudio de la alteración de rocas graníticas usadas en construcción. *Cuad.Lab.Xeol.Laxe*.18: 345-354.

Silva, B.; Rivas, T.; Prieto, B. (1996a) The iron-rich or gypsum-rich patina present on Santiago Cathedral. Do they have a biologically control origin. En: libro de resumenes del III Int. Symp. on Biodeterioration and Biodegradation.Santiago de Compostela: 79-80.

Silva, B.M.; Rivas, M.T.; Prieto, B.; Delgado, J. (1996b) A comparison of the mechanisms of plaque formation and sand disintegration in granite in historic buildings. En: Degradation and Conservation of granitic rocks in monuments. Eds. M.A. Vicente, J. Delgado, J. Acevedo. European Comnission DG XIII. Bruselas. 269-274

Silva, B.; Prieto, B.; Rivas, T. (1998) Análisis de las causas de deterioro del edificio del Centro Galego de Arte Contemporáneo. En: Libro de actas del IV Congreso Internacional de Rehabilitación del Patrimonio Arquitectónico y Edificación. Cuba. 315-317.

Silva, B.; Rivas, T.; Prieto, B. (1999) Effects of lichens on the geochemical weathering of granitic rocks. *Chemosphere* 39: 379-388.

Silva, B.; Rivas,T.; Prieto,B. (2003) Soluble Salts in Granitic Monuments: Origin and Decay Effects. En: Applied Study of Cultural Heritage and Clays. (Pérez-Rodríguez, J.L. Editor) CSIC. Madrid: 113-131.

Silva, B. y Prieto, B. (2004) Lichens on granite monuments: decay implication. En: Biodeterioration of Stone Surfaces. Ed: L.L. St. Clair y M. Seaward. Kluwer Academic Publishers . Netherlands.

Silva, B.; Prieto, B.; Rivas, T. (2005) Origin of gypsum in decayed granite building. En: "Sais solúveis em argamassas de edifícios antigos. Danos, processos e soluçoes". Lisboa. 20.1-20.10.

Skiotis, D.; Paradellis, T.; Katselis, V. (1979) Catalitic oxidation of SO_2 en marble surface. En: "3rd international congress on the Deterioration and Preservation of Stone". Venecia 35-42

Soundry, D. y Lewy, Z. (1988) Microbially influenced formation of phosphate nodules and megafossil moulds (Negev, Southern Israel). *Palaeogeography Palaeoclimatic Palaeoecology* 64: 15-34.

Snaidr, J.; Amann, R.; Huber, I.; Ludwing, W.; Schleifer, K.H. (1997) Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated skudge. *Appied and Environmental Mycrobiology* 63: 2884-2896.

Spanevello, M.D. y Patel, B.K.C. (2001) Phylogenetic characterization of microbial communities from Australia's Great Artesian Basin. No Publicado.

Spades, S. y Russ, J. (2005) GC-MS análisis of lipids in prehistoric rock paints and associated oxalate coatings from the lower Pecos region, Texas. *Archaeometry* 47: 115-126.

Speksnijder, A.G.C.L.; Kowalchuk, G.A.; De Jong, S.; Kline, E.; Stephen, J.R.; Laanbroek, H.J. (2001) Microvariation artifacts introduced by PCR and cloning of closely related 16S rRNA gene secuence. *Applied an Environmental Mycrobiology* 67: 469-472.

Steger, W.E. y Mehner, H. (1998) The iron in black weatering crust on Saxonian sandstones investigated by Mössbauer spectroscopy. *Studies in Conservation* 43: 49-58.

Sze, N. D. y Ko, M. K. W. (1980) Photochemistry of COS, CS_2, CH_3SCH_3 and SH_2: Implications for the atmospheric sulfur cycle. *Atmopheric Environment*. 14: 1223-1239

Taboada, T.M. (1992) Procesos de meteorización de rocas graníticas de Galicia bajo diferentes ambientes edafoclimáticos. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. 367p

Taboada, T. y García, C. (1999) Pseudomorphic transformation of plagioclases during the weathering of granitic rock in Galicia (NW Spain). *Catena* 35 (2-4): 291-302.

Taboada, T.; Cortizas, A.M.; García, C.; García-Rodeja, E. (2006) Particle-size fractionation of titanium and zirconium durin weathering and pedogenesis and granitic rocks in NW Spain. *Geoderma* 131: 218-236.

Tardy, Y.; Bocquier, G.; Paquet, H.; Millot G. (1973) Formation of clay from granite and its distribution in relation to climate and topography. *Geoderma* 10: 271-284.

Teske A.;Wawer C.;Muyzer G.; Ramsing N. B. (1996) Distribution of sulphate-reducing bacteria in a stratified fjord (Mariager Fjord, Denmark) as evaluated by most-probable-number counts and denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 1405-1415.

Tomaselli, L.; Lamenti, G.; Bosco, M.; Tiano, P. (2000) Biodiversity of photosynthetic mocro-organisms dwelling on stone monuments. *International Biodeterioration and Biodegradation* 46:251-258.

Torraca, G. (1981) Porous building materials. En: "3ª Edition of Materials Science for architectural Conservation". Ed: I.C.C.R.O.M. 149p

Torrent, J. y Benayas, J. (1977) Origin of gibbsite in a weathering profile from granite in west-central Spain. *Geoderma* 19: 37-49.

Tsai, S.H.; Selvan, A.; Chang, Y.P.; Yang, S.S. (2006) Bacterial Community Composition in Fushan Forest Soils of Taiwan. No Publicado

Tuck, V.A.; Edyvean, R.G.J.; West, J.M.; Bateman, K.; Coombs, p.; Milodowski, A.E.; McKervey, J.A. (2006) Biologically induced clay formation in subsurface granitic environments. *Journal of Geochemical Exploration* 90: 123-133.

Urzi, C.; Lisi, S.; Griseo, G.; Pernice, A. (1991) Adhesion to and degradation of marble by a *Micrococcus* strains isolated from it. *Geomicrobiology Journal* 9:81-90

Urzi, C. E.; Krumbein, W. E.; Warscheid, T. (1992) On the question of biogenic colour changes of Mediterranean monuments (coating-crust-microstomatolite-patina-scialbatura-skin-rock varnish). En: La Conservación des Monuments dans le Basin Mediterraneé: Museé d´art et d´histoire. Ed:D. Decrouez, J. Chamay and F. Zezza. Genève 397p.

Urzi C.; Wollenzien U.; Griseo G.; Krumbein W. E. (1997) Biodiversity of the rock inhabitating winth special reference to black fungi and black yeasts. En: Microbial diversity and ecosystem function .Ed: D. Allsopp, R.R. Colwell and Hawksworth. CAB International Publishers Wallingford, Oxon, U. K. 289-302.

Urzi C. y Realini M. (1998) Colour changes of Noto´s calcareous sandstone as related to its colonisation by microorganisms. *International Biodeterioration and Biodegradation* 42: 45-54.

Valero J. M. (2000) La alteración cromática en piedra arenisca. Tesis Doctoral, Universidad del País Vasco. 198p

Vallaeys, T.; Topp, E.; Muyzer, G.; Macheret, V.; Laguerre, G.; Rigaud, A.; Soulas, G. (1997) Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in thizobia and methanotrophs. *FEMS Mycrobiology Ecology* 24: 279-285.

Valls del Barrio, S.; García-Valles, M.; Pradell, T.; Vendrell-Sanz, M. (2002) The red-orange patina developed on a monumental dolostone. *Engineering Geology*. 63 : 31-38.

Van Grieken, R. y Torfs, K. (1996) Atmospheric aerosols and deposition near historic buildings: chemistry, sources, interrelations and relevance. En: Origin, mechanisms and effects of salts on degradation of monuments in marine and continental environment. Ed:F. Zezza. Bari (Italia) 25-27.

Venkat, P.; La Duc, M.T.; Kulhman, G.M., McKay, C.P.; Kuhlman, K.R. (2006) Microbial Diversity of Rock Varnish from Yungay in the Atacama Desert, Chile. No Publicado.

Vicente, M.A.; Razzaghe, M.; Robert, M. (1977) Formation of aluminium hydroxy vermiculite (intergrade) and smectite from mica under acidic conditions. *Clay minerals* 12: 101-112.

Videla, H. A.; Guiamet, P. S.; Gomez de Saravia S. (2000) Biodeterioration of Mayan archaeological sites in the Yucatán Peninsula, México. *Internacional Biodeterioration and Biodegradation*. 46: 335-341.

Videla, H. A. y Herrera, L.K. (2004) Deterioration of three churches of the Latin America cultural heritage. A comparative study of weatering effects in different urban environments. En: Air Pollution and Cultural Heritage. Ed: Saiz-Jimenez. Grupo Taylor and Francis, Londres: 127-132.

Vos, B.H. (1976) Waterabsorption and drying f materials. En: International Symposium on Conservation of Stone. Ed: R. Rossi-Manaresi. Vol I: 676-694.

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

Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A.; Lane, D.J. (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173: 697-703.

Wheeler, M.H. y Bell, A.A. (1998) Melanins and their importance in pathogenic fungi. Current tropics in medical mycology 2. Ed: M. R. McGinnis. 338-387.

Winkler, E.M. y Wilhelm, E.J. (1970) Salt burst by hidration pressures in architectural stone in urban atmosphere. *Geological Society of American Bulletin* 81: 567-572.

Winkler E.M. (1975) Stone decay by plants and animals. En: Stone: Properties, Durabilities in Man´s Environment. Ed Springer Verlag (Wien-New York) 154-163.

Wintzingerode, F.V.; Göbel, U.B.; Stackebrandt, E. (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiology Reviews* 21: 213-239.

Woese, C. (1987) Bacterial evolution. *Microbial Reviews* 52: 221-271.

Wollenzien, U.; De Hog G.S.; Krumbein W.E.; Urzí, C. (1995) On the isolation of microcolonial fungi occurring on ad in marble and other calcareous rocks. *The science of the Total Environment* 167: 287-297.

Xunta de Galicia (2005) Calidade do aire en Galicia 2000-2002. Colección técnica Medio Ambiente. Ed: Xunta de Galicia. 115p.

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

Zarnowski, R. (2002) Fatty acid profiling: Its usefulness in the evaluation of microbial associations with the green microalga Apatococcus constipatus. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7: 61-67.

En este trabajo se estudian las pátinas negras que se desarrollan sobre las rocas graníticas, tanto en edificios antiguos y otros monumentos como en afloramientos rocosos naturales.

El estudio pretende contribuir al conocimiento de la naturaleza y los procesos de formación de estas pátinas. Este conocimiento será de gran utilidad para su eliminación en los monumentos o para su inducción en frentes de cantera con el objeto de corregir el impacto paisajístico.

