



Evaluación del producto Aquashield Active frente a microorganismos fotosintéticos



Código:RXPMw847Z6JMFX20wMrPbrRt j Gh5YI. Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma					
FIRMADO POR	VÍCTOR MANUEL MENGUIANO CHAPARRO	FECHA	22/06/2023		
ID. FIRMA	RXPMw847Z6JMFX20wMrPbrRtjGh5YI	PÁGINA	1/10		



JUSTIFICACIÓN.

A solicitud del Centro Tecnológico Lurederra, se ha ensayado la propiedad antimicrobiana frente a microorganismos fotosintéticos de uno de los productos fabricados y comercializados por su empresa Tecnología Navarra de Nanoproductos S.L. (TECNAN).

INTRODUCCIÓN.

Los materiales pétreos son susceptibles al ataque de organismos y microorganismos (bacterias, cianobacterias, algas, hongos y líquenes) que causan su deterioro.

En el caso del material pétreo exterior, las algas verdes y sobre todo las cianobacterias son los primeros organismos que lo colonizan, formando las primeras pátinas verdosas que se observan, puesto que sólo necesitan luz, agua y unos cuantos compuestos inorgánicos y prefieren además un sustrato alcalino. Los factores más importantes que condicionan su aparición son la intensidad luminosa, la humedad, la temperatura y el pH. Su crecimiento se ve favorecido por el alto grado de humedad, así como la adherencia de polvo, residuos orgánicos y otras sustancias, por lo que se forma una capa o pátina fangosa que puede ser aprovechada por otros organismos (líquenes, musgos y plantas vasculares).

Los biofilms de cianobacterias y algas verdes no sólo ocasionan un daño estético, sino también físico y químico. Los organismos fotosintéticos contribuyen al deterioro de los materiales pétreos a través de sus procesos respiratorios, reteniendo el agua y liberando ácidos (carbónico, láctico, oxálico, succínico, acético o pirúvico) o compuestos quelantes.

La colonización del material pétreo por parte de microorganismos depende de varios factores como la bioreceptividad del sustrato, parámetros ambientales (luz, temperatura, humedad relativa, viento, contaminación atmosférica, etc.), y parámetros microclimáticos específicos (orientación, exposición a la sombra, humedecimiento constante por capilaridad, etc.).

Parece claro que la disponibilidad de agua es uno de los factores más importantes puesto que todos los organismos la necesitan para su metabolismo. Por tanto, cualquier medida que disminuya la humedad de los materiales pétreos, contribuirá a impedir o dificultar el desarrollo de los mencionados microorganismos. Y una medida muy extendida es la aplicación de productos hifrofugantes como el que se ha testado en este estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Producto testado.

Se han testado el producto Aquashiel Active, hidrofugante/hidro-repelente, que es, además, inhibidor de microorganismos según se indica en su ficha técnica.

	Código:RXPMw847Z6JMFX20wMrPbrRt j Gh5YI. Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://ws050.juntadea	andalucia.es/verificarFirn	na
FIRMADO POR	VÍCTOR MANUEL MENGUIANO CHAPARRO	FECHA	22/06/2023
ID. FIRMA	RXPMw847Z6JMFX20wMrPbrRtjGh5YI	PÁGINA	2/10



Material pétreo testado.

El producto se ha testado en la denominada piedra del Puerto de Santa María (Cádiz), una calcarenita bioclástica. Para ello se han usado dos probetas de 20x20x2 cm., que fueron previamente esterilizadas en autoclave.

Aplicación del producto.

Cada una de las probetas se dividió en dos partes, una para el producto y otra sin producto que ha servido como control. El producto se aplicó sobre la superficie de las probetas siguiendo las instrucciones del fabricante, y se dejó secar durante 24 horas.



Probetas tras la aplicación de los productos. En ambos casos, a la izquierda el área tratada con Aquashield Active y a la derecha el área no tratada.

Inoculación de microorganismos fotosintéticos.

Para la inoculación se utilizó un cultivo en medio líquido BG11 procedente de una biopelícula fototrófica natural presente en la superficie de piedra biodeteriorada, concretamente del edificio del antiguo Hospital de las Cinco Llagas de Sevilla, actual sede del Parlamento Andaluz, cuya piedra original es precisamente del Puerto. Dicho cultivo contiene las cianobacterias *Chroococcus sp.*, *Gloeocapsa sp.*, *Leptolyngbya sp.* y *Phormidium sp.*, y las algas verdes *Chlorella sp.*, *Chlorococcum sp.* y *Desmodesmus sp.*

La inoculación de llevó a cabo mediante pulverización de la superficie con el cultivo.

Incubación.

Dada la indisponibilidad de cámara climática, la incubación se llevó a cabo durante 6 meses en una zona húmeda de una terraza de nuestras instalaciones en las que de forma natural se desarrolla verdina, con los ciclos de luz naturales y la meteorología real. Las probetas se humedecieron casi a diario pulverizando su superficie con la solución de cultivo microbiológico, por lo que cada vez que se humedecía, a la vez se estaba re-inoculando, para acelerar el desarrollo de microorganismos fotosintéticos. Posteriormente las probetas se introdujeron en cubetas que permitían una humedad constante por capilaridad, permaneciendo otros 6 meses en las mismas dentro del laboratorio, también con los ciclos de luz naturales y a una temperatura constante de aproximadamente 24 °C.

Código:RXPMw847Z6JMFX20wMrPbrRtjGh5YI. Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma			
FIRMADO POR	VÍCTOR MANUEL MENGUIANO CHAPARRO	FECHA	22/06/2023
ID. FIRMA	RXPMw847Z6JMFX20wMrPbrRtjGh5YI	PÁGINA	3/10





Ubicación de las probetas en una zona húmeda de una azotea de la sede del IAPH durante los primeros 6 meses (izquierda) y en cubetas en el laboratorio durante el resto del ensayo (derecha).

Cuantificación del crecimiento fotosintético.

El área de las superficies pétreas cubierta por colonización fotosintética se consideró una medida del crecimiento fotosintético. Para cuantificar el desarrollo de los microorganismos fotosintéticos sobre la superficie de las probetas tras el tiempo de incubación, se midieron las áreas cubiertas por los biofilms. Ello se llevó a cabo de dos maneras, por un lado de forma manual mediante papel milimetrado transparente, y por otro lado mediante análisis digital de imágenes, midiendo el área colonizada con un conocido programa de tratamiento de imágenes sobre fotografías de las probetas.

Colorimetría.

La colorimetría permite determinar las variaciones de color que se producen en los distintos materiales. Habitualmente se utiliza para evaluar los posibles cambios de color en los materiales tras algún tratamiento (biocida, hidrofugante, consolidante, etc.), pero en este caso hemos utilizado la colorimetría no para calcular la variación global en el color, sino simplemente para calcular la variación hacia el verde, asumiendo que un cambio hacia el verde es consecuencia de la clorofila de los microorganismos fotosintéticos que se han desarrollado.

Se utilizó un colorímetro Minolta Chroma meter CR-210, que caracteriza el color en forma de coordenadas tridimensionales en el espacio de color CIE-Lab. Este sistema de medición proporciona los parámetros cromáticos L* a* b*. L* indica la luminosidad y a* y b* son las coordenadas cromáticas, a* corresponde a las coordenadas rojo/verde (+a indica rojo, -a indica verde) y b* corresponde a las coordenadas amarillo/azul (+b indica amarillo, -b indica azul).

Se tomaron medidas colorimétricas en 10 puntos distintos de cada área ensayada de las probetas, antes de comenzar el ensayo, y en los mismos puntos después de terminar el mismo. Cuanto más negativa sea la diferencia del parámetro a* después del ensayo ($\Delta a^*=a^*_2-a^*_1$), más cambio cromático hacia el verde.

Código:RXPMw847Z6JMFX20wMrPbrRt j Gh5YI. Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma				
FIRMADO POR	VÍCTOR MANUEL MENGUIANO CHAPARRO	FECHA	22/06/2023	
ID. FIRMA	RXPMw847Z6JMFX20wMrPbrRtjGh5YI	PÁGINA	4/10	



RESULTADOS.

Desarrollo de microorganismos fotosintéticos.

En primer lugar, hay que destacar la capacidad hidro-repelente del producto ensayado. Al pulverizar para humedecer, es evidente el efecto perlante en las superficies donde se han aplicado los productos, mientras en las no tratadas las gotas de agua se absorben rápidamente.

Quizás por ello la formación de biofilms de microorganismos fotosintéticos fue muy lenta en un principio; no fue hasta los 3 meses cuando se empezó a notar de visu su crecimiento, por supuesto en las zonas de control o no tratadas. A partir de los 6 meses es cuando se hizo evidente de visu el crecimiento, que cubre prácticamente la totalidad de la superficie en el caso de las zonas no tratadas. La piedra del Puerto es un material bastante poroso y presenta una superficie con irregularidades, que proporcionan puntos de anclaje y micronichos para el asentamiento de células microbianas, favoreciendo por tanto su crecimiento.



Capacidad hidrofugante en la piedra del Puerto. Dada su elevada porosidad, no se produce perlado, pero se aprecia cómo la zona no tratada se ve más oscura por la absorción de agua respecto al área tratada.

En las superficies control o no tratadas, es evidente el desarrollo de microorganismos fotosintéticos. Este desarrollo comenzó a los 3 meses con cianobacterias, adquiriendo un color verdeazulado, a las que les siguieron las algas verdes. A los 6 meses el desarrollo de microorganismos fotosintéticos ya era más que evidente a simple vista, siendo completo al finalizar el ensayo. En algunos puntos se observan manchas pardo-negruzcas sobre las biopelículas verdes; se trata de crecimiento fúngico. Cianobacterias y algas verdes contribuyen mediante la fotosíntesis a un aumento significativo del contenido de carbono orgánico de la piedra, favoreciendo el crecimiento de microorganismos heterótrofos (bacterias y hongos) que viven a expensas de la materia orgánica extracelular sintetizada por las algas vivas, o bien se alimentan de las algas que van muriendo. Vemos por tanto la sucesión ecológica que se produce de forma natural, y que en teoría seguiría con el desarrollo de líquenes y briófitos.

En cambio, en las zonas tratadas con el producto Aquashield Active, la superficie colonizada por microorganismos fotosintéticos es menor, y se aprecian más cianobacterias que algas verdes. Tras 12 meses de ensayo, vemos aún una colonización incipiente en estas zonas tratadas. Sin embargo la vitalidad de los microorganismos es la misma que en las zonas no tratadas, por lo que en realidad el productos no es biocida, aunque sí tiene una función retardante del desarrollo microbiano.

Código:RXPMw847Z6JMFX20wMrPbrRt j Gh5YI. Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma				
FIRMADO POR	VÍCTOR MANUEL MENGUIANO CHAPARRO	FECHA	22/06/2023	
ID. FIRMA	RXPMw847Z6JMFX20wMrPbrRtjGh5YI	PÁGINA	5/10	





Evolución de las probetas de piedra del Puerto durante el ensayo. De arriba abajo, a los 3, 6, 9 y 12 meses. En todos los casos, a la izquierda el área la tratada con Aquashield Active y a la derecha la zona sin tratamiento.

C	г	7
		٦

Código:RXPMw847Z6JMFX20wMrPbrRt j Gh5YI. Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma				
FIRMADO POR	VÍCTOR MANUEL MENGUIANO CHAPARRO	FECHA	22/06/2023	
ID. FIRMA	RXPMw847Z6JMFX20wMrPbrRtjGh5YI	PÁGINA	6/10	

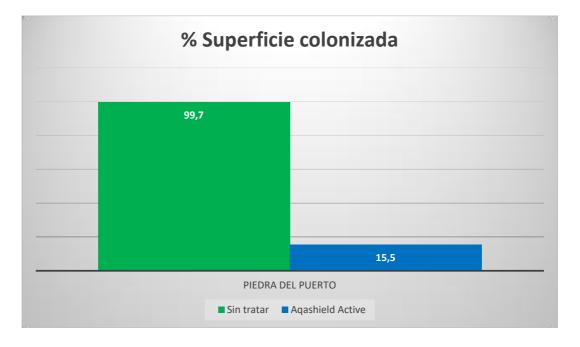




Imágenes al estereomicroscopio (7x) de piedra del Puerto sin colonizar (izquierda), colonización incipiente en área tratada con Aquashield Active (centro) y colonización total en área no tratada (derecha). Independientemente de si están tratadas o no, los microorganismos fotosintéticos presentes tienen la misma vitalidad.

Cuantificación del crecimiento fotosintético.

El siguiente gráfico refleja el porcentaje calculado de superficie cubierta por colonización fotosintética para el sustrato sin tratar respecto al tratado con Aquashield Active.

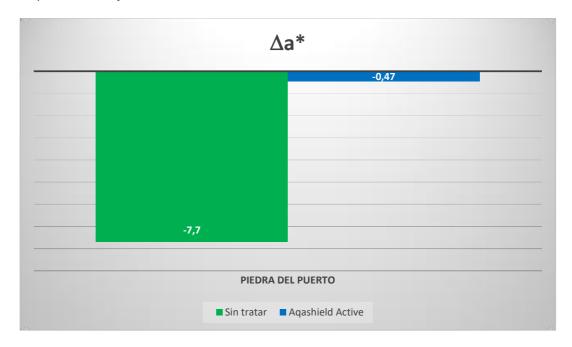


Código:RXPMw847Z6JMFX20wMrPbrRtjGh5YI. Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma					
FIRMADO POR	VÍCTOR MANUEL MENGUIANO CHAPARRO	FECHA	22/06/2023		
ID. FIRMA	RXPMw847Z6JMFX20wMrPbrRtjGh5YI	PÁGINA	7/10		



Colorimetría.

El siguiente gráfico muestra los valores medios de diferencia del parámetro a^* (Δa^*) respecto a las mediciones previas al ensayo.



CONCLUSIONES.

Se ha llevado a cabo un ensayo de colonización artificial sobre piedra del Puerto, en el que se ha testado la capacidad antimicrobiana del producto hidrófugo Aquashield Active.

La superficie final colonizada al final del ensayo ha sido casi del 100% cuando el sustrato no ha sido tratado con ningún producto. En cambio cuando el sustrato ha sido tratado con Aquashield Active, la superficie colonizada por microorganismos fotosintéticos ha disminuido en un 84,45% de media.

Los datos colorimétricos están en consonancia con los de superficie colonizada. El cambio cromático hacia el verde por el desarrollo de clorofila es de media unas 16 veces menor en la superficie tratada respecto a la no tratada.

Aunque el producto Aquashield Active consigue disminuir el crecimiento de microorganismos fotosintéticos, la vitalidad de los organismos que se desarrollan es la misma que en las zonas no tratadas, por lo que en realidad el producto no es biocida, aunque sí tiene una función retardante del desarrollo microbiano dada su capacidad de repeler el agua, factor limitante para el desarrollo de dichos microorganismos.

	Código:RXPMw847Z6JMFX20wMrPbrRt j Gh5YI. Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://ws050.juntadea	andalucia.es/verificarFirn	na
FIRMADO POR	VÍCTOR MANUEL MENGUIANO CHAPARRO	FECHA	22/06/2023
ID. FIRMA	RXPMw847Z6JMFX20wMrPbrRtjGh5YI	PÁGINA	8/10



El fabricante del producto garantiza su durabilidad durante 10 años. Este ensayo ha durado un año, y aunque la colonización ha sido artificialmente acelerada por exposición intensificada tanto a humedad como a los microorganismos fotosintéticos, no puede extrapolarse a tiempo real y condiciones totalmente naturales, aunque sí pueden extraerse patrones o tendencias que también tengan lugar en condiciones naturales. Por ello, si durante un año humedeciendo e inoculando constantemente el material tratado con Aquashield Active, los resultados son los esperables, podemos considerar que sí puede garantizarse su funcionalidad durante 10 años.

BIBLIOGRAFÍA.

Alum A, Mobasher B, Rashid A, Abbaszadegan M. *Image analyses-based nondisruptive method to quantify algal growth on concrete surfaces*. J Environ Eng 2009; 135: 185–90.

Ascaso C, Wierzchos J, Souza-Egipsy V, De los Ríos A, Delgado Rodrigues J. *In situ evaluation of the biodeteriorating action of microorganisms and the effects of biocides on carbonate rock of the Jeronimos Monastery* (*Lisbon*). Int Biodeter Biodegr 2002; 49:1-12.

Caneva G, Nugari MP, Salvadori O. Biology in the conservation of works of art. Rome: ICCROM; 1991.

Escadeillas G, Bertron A, Blanc G, Dubosc A. Accelerated testing of biological stain growth on external concrete walls. Part 1: Development of the growth tests. Mater Struct 2007; 40:1061–71.

Escadeillas G, Bertron A, Ringot E, Blanc G, Dubosc A. Accelerated testing of biological stain growth on external concrete walls. Part 2: Quantification of growths. Mater Struct 2009; 42:937–45.

Gómez-Alarcón G, Muñoz M, Ariño X, Ortega-Calvo JJ. *Microbial communities in weathered sandstones: the case of Carrascosa del Campo church, Spain.* Sci Total Environ 1995; 167:249–54.

Menguiano Chaparro V, Sameño Puerto, M. Estudios de biodeterioro y evaluación de tratamientos biocidas en materiales pétreos de la capilla del antiguo Hospital de las Cinco Llagas de Sevilla (actual sede del Parlamento de Andalucía). En: La piedra en el patrimonio monumental, Ediciones Universidad de Salamanca, 2022, págs. 67-79.

Miller AZ, Laiz L, Gonzalez JM, Dionísio A, Macedo MF, Saiz-Jimenez C. *Reproducing stone monument photosynthetic-based colonization under laboratory conditions*. Sci Total Environ 2008; 405:278–85.

Miller AZ, Dionísio A, Laiz L, Macedo MF, Saiz-Jimenez C. *The influence of inherent properties of building limestones on their bioreceptivity to phototrophic microorganisms*. Ann Microbiol 2009a; 59:1–9.

Miller AZ, Laiz L, Dionísio A, Macedo MF, Saiz-Jimenez C. *Growth of phototrophic biofilms from limestone monuments under laboratory conditions*. Int Biodeter Biodegr 2009b; 63:860–7.

	Código:RXPMw847Z6JMFX20wMrPbrRtjGh5YI. Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://ws050.juntadea	andalucia.es/verificarFirn	na
FIRMADO POR	VÍCTOR MANUEL MENGUIANO CHAPARRO	FECHA	22/06/2023
ID. FIRMA	RXPMw847Z6JMFX20wMrPbrRtjGh5YI	PÁGINA	9/10



Miller AZ, Sanmartín P, Pereira-Pardo L, Dionísio A, Saiz-Jimenez C, Macedo MF, Prieto B. *Bioreceptivity of building stones: A review*. Science of The Total Environment, Volume 426, 2012, Pages 1-12.

Prieto B, Silva B, Lantes O. *Biofilm quantification on stone surfaces: comparison of various methods*. Sci Total Environ 2004; 333:1–7.

Saiz-Jimenez C, Ariño X. *Colonización biológica y deterioro de morteros por organismos fotótrofos*. Materiales de construcción, Vol. 45, N°. 240, 1995, págs. 5-16.

Tomaselli L, Lamenti G, Bosco M, Tiano P. *Biodiversity of photosynthetic microorganisms dwelling on stone monuments*. Int Biodeter Biodegr 2000; 46:251–8.

Urzì C, De Leo F. Evaluation of the efficiency of water-repellent and biocide compounds against microbial colonization of mortars. Int Biodeter Biodegr 2007; 60:25–34.

Urzì C, Realini M. Colour changes of Noto's calcareous sandstone as related to its colonisation by microorganisms. Int Biodeter Biodegr 1998; 42:45–54.

EQUIPO TÉCNICO

Víctor Menguiano Chaparro Laboratorio de Biología Dirección de Investigación y Transferencia IAPH

Código:RXPMw847Z6JMFX20wMrPbrRtjGh5YI. Permite la verificación de la integridad de este documento electrónico en la dirección: https://ws050.juntadeandalucia.es/verificarFirma					
FIRMADO POR	VÍCTOR MANUEL MENGUIANO CHAPARRO	FECHA	22/06/2023		
ID. FIRMA	RXPMw847Z6JMFX20wMrPbrRtjGh5YI	PÁGINA	10/10		