



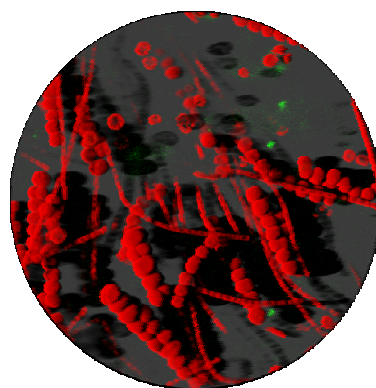
Facultat de Farmàcia
Dept. de Productes Naturals, Biologia Vegetal i Edafologia

Caracterització de biofilms fototròfics d'ambients hipogeus

MÒNICA ROLDÁN MOLINA

2008

Introducció



Capítol 1

Introducció

1.1. Biofilms	5
1.1.1. Què és un biofilm?	5
1.1.2. Formació de biofilms	8
1.1.2.1. Regulació de la formació del biofilm	9
1.1.2.2. Precondicionament del substrat	11
1.1.2.3. Adhesió reversible i irreversible	12
1.1.2.4. Formació de microcolònies i maduració del biofilm	14
1.1.2.5. Dispersió	15
1.1.3. Estructura dels biofilms	15
1.1.4. Biofilms fototròfics d'ambients hipogeus	17
1.1.4.1. Antecedents generals	17
1.1.4.2. Cavitats i altres ambients hipogeus	18
1.2. Patrimoni Cultural	21
1.2.1. Deterioració de substrats per biofilms fototròfics	21
1.2.2. Prevenció, eliminació i control de biofilms fototròfics	24
1.2.2.1. Mètodes de prevenció	25
1.2.2.2. Mètodes d'erradicació	25
1.3. Referències	29

1.1. Biofilms

1.1.1. Què és un biofilm?

La majoria de microorganismes presents en la natura, tant els que produeixen malalties com els que impacten des del punt de vista biomèdic, industrial o medioambiental, proliferen adherits a diferents tipus de superfícies, formant les anomenades biopel·lícules o biofilms [1]. Els biofilms constitueixen una modalitat de creixement protegit que permet als microorganismes sobreviure en ambients hostils, ja que aquestes comunitats mostren certes propietats característiques, com la resistència augmentada als antibiòtics, a la llum ultraviolada, als biocides químics i a l'increment de la producció de metabolits secundaris [2]. Els microorganismes que creixen dins del biofilms són microorganismes sèssils que es troben en diferents fases de creixement, per aquesta raó poden tenir una resposta ràpida a les condicions variables. Aquests microorganismes constitueixen una comunitat funcional coordinada i altament eficient gràcies a la cooperació fisiològica que modifica el seu entorn mitjançant l'associació i la diversitat [1].

Així, quan els microorganismes s'adhereixen a una superfície, les cèl·lules immobilitzades creixen, es repliquen i secreten substàncies polimèriques extracel·lulars (EPS, acrònim de l'anglès), que envolten les cèl·lules amb una matriu gelatinosa [3]. Encara que el terme "biofilm" s'acostuma a utilitzar només per a cèl·lules bacterianes [3], en principi es podria fer extensiu a qualsevol comunitat microscòpica formada per cèl·lules que siguin metabòlicament actives, que tinguin capacitat per adherir-se i que formin estructures heterogènies i dinàmiques en l'espai i en el temps [4]. Un biofilm pot estar format per una o varies espècies diferents. En molts casos, sobretot en ambients naturals, els biofilms no només estan formats per bacteris, sinó també per altres tipus d'organismes com fongs [5], llevats [6] i algues, i cianobacteris [7]. Els productes metabòlics d'un organisme poden servir per al creixement d'un altre, de la mateixa manera que l'adhesió d'unes espècies poden servir de

lligam per a la unió d'altres [1, 8]. Per contra, la competència per als nutrients i l'acumulació de productes tòxics generada pels colonitzadors primaris pot limitar la diversitat d'espècies al biofilm [9].

El desenvolupament de comunitats complexes adherides o en forma d'agregats té un paper molt important per a la supervivència i l'èxit reproductiu dels microorganismes implicats. Els biofilms poden donar refugi a les espècies que els formen vers la competència, la predació o les condicions ambientals desfavorables [10].

Substàncies polimèriques extracel·lulars (EPS)

En el biofilm, els microorganismes s'envolten d'una matriu. Aquesta matriu és un complex exopolisacàridic format pels propis microorganismes, així com per substàncies exògenes del medi ambient. La composició dels EPS és poc coneguda, però consta de polisacàrids o glicoproteïnes de diversos sucres, com glucosa, fructosa, manosa, N-acetilglucosamina i altres. També poden contenir proteïnes lliures, fosfolípids i àcids nucleics [1, 11, 12].

Els EPS poden representar del 50 al 90 % del carboni total del biofilm i es poden considerar com el material primari de la matriu. Els EPS poden estar molt hidratats perquè poden incorporar quantitats molt grans d'aigua en la seva estructura mitjançant els ponts d'hidrogen. Diferents organismes produeixen diferent quantitat d'EPS, que augmenta amb l'edat del biofilm. La producció d'EPS és coneguda en resultar afectada per l'estat nutritiu del medi de creixement, per exemple, l'excés de carboni disponible i la limitació de nitrogen, potassi o fosfat inhibeixen la divisió cel·lular i promouen la síntesi d'EPS.

Taula 1. Taula resum dels diferents rols/funcions dels EPS exsudats per organismes unicel·lulars. *** = la majoria de taxa, ** = molts taxa, * = alguns taxa. M = rols trobats comunament en organismes multicel·lulars. Basat en [13].

Rol	Importància
Unió a superfícies (M)	***
Defensa contra un atac (M)	**
Protecció contra canvis en les condicions fisicoquímiques (M)	**
Formació de biofilms	**
Absorció de nutrients i conservació de exoenzims	**
Ajuda en la locomoció (M)	*
Prevenició de la dessecació (M)	*
Desviació per excés de carboni generat dins les cèl·lules	*

La principal funció atribuïda a les càpsules o a altres embolcalls polisacàrids és fer de barrera entre la cèl·lula i el seu ambient immediat. Molts microorganismes unicel·lulars produeixen EPS que poden presentar diferents rols, depenent de les fases del cicle de vida (Taula 1). Més específicament, els EPS tenen un rol protector contra la dessecació, els agents antimicrobians o la predació per part dels protozoos [14, 15]. Molts estudis tracten de la capacitat d'alguns polisacàrids produïts pels cianobacteris de superar l'estrès causat per la dessecació o la baixa quantitat d'aigua en el desert o en d'altres ambients extrems. La síntesi de polisacàrids extracel·lulars en els microorganismes, incloent-hi els cianobacteris, juga un paper important de protecció cel·lular contra l'estrès en condicions hostils [14] i també els protegeix de l'abradió [13]. Els cianobacteris que repton per superfícies, excreten fibril·les d'EPS dels porus de la paret cel·lular que utilitzen en la locomoció [16]. A més, els EPS són importants en l'adhesió i els poden donar la capacitat de formar biofilms en superfícies sòlides o protegir-los de la depredació si els comparem amb altres microalgues desproveïdes d'aquestes càpsules [14]. Els polisacàrids

procedents dels cianobacteris juguen un paper molt important en la immobilització o en el segrest d'ions metàl·lics, que són essencials o perjudicials per a la vida dels microorganismes [14, 15]. Finalment, per a alguns cianobacteris que viuen en associacions o simbiosi amb les plantes superiors, s'ha suggerit que els EPS poden actuar com adhesiu per a les cèl·lules dels cianobacteris [14].

1.1.2. Formació de biofilms

El procés de formació d'un biofilm ve determinat per una sèrie de variables, entre les quals es troben: les característiques dels microorganismes, la composició de la superfície i els factors mediambientals.

La formació del biofilm segueix una seqüència que en permet la predicció. En diferents ambients, cada fase de la formació d'un biofilm té característiques específiques, però en general poden identificar-se una seqüència que consta de diferents fases: condicionament de la superfície i arribada dels microorganismes, unió del microorganisme a la superfície, maduració i estructura del biofilm, i, per últim, dispersió de cèl·lules colonitzadores (Fig. 1.1.2.).



Fig. 1.1.2. Representació esquemàtica de les diferents etapes que condueixen a la formació d'un biofilm. Modificat de [17].

1.1.2.1. Regulació de la formació del biofilm

Alguns dels factors que afecten el desenvolupament del biofilm inclouen la superfície i les propietats d'interfície, la disponibilitat de nutrients, la composició de la comunitat, la interacció entre espècies i el transport cel·lular [2, 11]. Altres investigacions indiquen que la coexistència de les espècies en un biofilm depèn de la seva capacitat d'unir-se al substrat, i dels competidors [18]. Els biofilms mixtes són més gruixuts i més estables sota estrès ambiental que els biofilms monoespècífics. L'estabilitat dels biofilms mixtes pot ser causada per la producció d'una varietat d'EPS, resultant de l'activitat de diferents microorganismes [19].

Els principals factors que afecten a la formació del biofilm són:

a) Disponibilitat de superfície

Les superfícies a les quals s'uneixen els microorganismes sèssils poden ser abiòtiques (materials inerts) o biòtiques (teixits vius o cèl·lules). La unió de microorganismes a la superfície és un procés complex, amb moltes variables que n'afecten el resultat. Les característiques de les superfícies són importants en el procés d'adhesió. La colonització sembla augmentar amb l'increment de rugositat de la superfície. Això es produïx perquè les forces d'arrossegament són menors i l'àrea és superior en les superfícies més rugoses [2].

Així mateix, els diferents tipus de substrat poden influir en el patró d'unió. Els microorganismes tendeixen a unir-se al vidre (superfície hidrofílica) uniformement en una monocapa, mentre que a les superfícies hidrofòbiques, com el nailon o l'estany, tendeixen a adherir-se en massa [20].

b) Nutrients

L'estrès ambiental, com per exemple la baixa disponibilitat de nutrients, produeix canvis fenotípics de les formes cel·lulars planctòniques (lliures) transformant-les en formes sèssils (unides) [21]. Donat que la matriu del biofilm té sovint una càrrega negativa, molts nutrients (com els cations) són atrets a la superfície del biofilm. A més, els nutrients amb càrrega negativa poden intercanviar ions a la superfície [2].

c) Senyals mediambientals

Altres característiques, com per exemple el pH, els nivells de nutrients, el ferro, l'oxigen, la força iònica i la temperatura, també poden jugar un paper en la proporció d'adhesió microbiana a un substrat. Diferents estudis han mostrat un efecte estacional en l'adhesió microbiana i en la formació del biofilm en diferents sistemes [2].

d) *Quorum sensing*

Un gran nombre de microorganismes produeixen una gran varietat de molècules que regulen la densitat de població; aquest fenomen rep el nom de *quorum sensing* o autoinducció. Per tant, podem definir el *quorum sensing* com un mecanisme de regulació depenent de l'acumulació en el medi ambient d'una molècula senyal, autoinductora, que permet al microorganisme sentir la densitat de la població existent (Fig. 1.1.2.1.). Aquestes petites molècules s'acumulen en altes densitats cel·lulars en el biofilm i a partir d'una concentració crítica s'activa un receptor específic que n'altera l'expressió de gens afectant diferents fenotips [22].

La utilització de molècules senyal per bloquejar els processos d'adhesió o interferint amb els sistemes de comunicació cèl·lula a cèl·lula

implicats en el desenvolupament del biofilm és una possible recerca òbvia que pot ser utilitzada per combatre l'existència dels biofilms. S'ha aconseguit manipular tan la formació del biofilm com la dispersió utilitzant aquestes senyals i altres anàlogues [23].

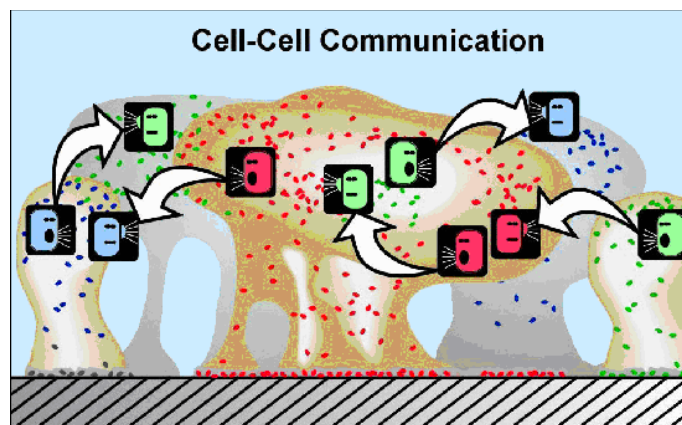


Fig. 1.1.2.1. Esquema de la comunicació mitjançant quorum sensing. Es representen diferents espècies de bacteris en diferents colors. Els bacteris poden produir senyals químics ("parlen") i altres bacteris poden respondre-hi ("escolten") en un procés conegut com "comunicació cèl·lula a cèl·lula". Aquesta comunicació pot resultar en un comportament coordinat de les poblacions microbianes. Center for Biofilm Engineering at Montana State University-Bozeman. (<http://www.erc.montana.edu/biofilmbook/>). Última data d'accès: 01/04/08.

1.1.2.2. Precondicionament del substrat

El biofilm es pot desenvolupar sobre qualsevol tipus de superfície, ja que en la interfase aigua/superfície o aire/superfície es diposita una capa formada per molècules orgàniques i ions del medi, que canvia les propietats químiques i físiques de la superfície i millora la possibilitat de fixació dels microorganismes [24]. Aquesta capa orgànica és capaç de neutralitzar parcialment la càrrega neta i l'energia lliure de la superfície i de crear

micronínxols favorables a l'adhesió estable de microorganismes que troben així els nutrients disponibles i/o les molècules orgàniques. Aquest procés s'anomena "condicionament". Nombrosos estudis demostren que la unió dels microorganismes ocorre millor en superfícies condicionades [25, 26]. L'inici de la unió microbiana depèn de les propietats de la superfície del substrat condicionat. La seqüència d'unió de múltiples espècies influeix en la composició d'espècies del biofilm resultant. La població inicial que s'uneix pot canviar la superfície de manera que les espècies següents poden unir-se per associació via cèl·lula a cèl·lula.

1.1.2.3. Adhesió reversible i irreversible

Existeix molta bibliografia sobre els avantatges selectius dels microorganismes per colonitzar [27] i adherir-se a les superfícies [14, 28, 29].

La mobilitat dels microorganismes és un mecanisme que facilita la colonització dels substrats, ja que proporciona el potencial d'energia suficient per superar les forces electrostàtiques de repulsió que es produeixen entre el microorganisme i el substrat.

Un determinat microorganisme s'apropa a la superfície tan estretament que la mobilitat es redueix i es forma una associació temporal amb aquesta mateixa superfície i/o altres microorganismes que s'han unit prèviament a la superfície [2]. En general, l'adhesió es donarà més aviat en superfícies rugoses, més hidròfobes i recobertes per una pel·lícula acondicionadora de la superfície.

El biofilm comença a formar-se quan alguna cèl·lula individual s'uneix inicialment a una superfície. L'adhesió és afectada per propietats químiques i físiques de la cèl·lula, les superfícies del substrat i la composició del medi que l'envolta. La capacitat de la cèl·lula per realitzar aquest atac inicial a la superfície depèn de factors ambientals, com la temperatura i el pH, i de factors genètics que codifiquen les funcions motrius, la sensibilitat ambiental i les macromolècules procedents de l'activitat dels microorganismes [30, 31]. Les

propietats adherents de la cèl·lula estan influïdes per l'embolcall, a causa dels seus canvis químics en resposta als estímuls ambientals i a les *quorum sensing* -senyals químics d'intercomunicació-. La unió i la producció d'EPS són activats en resposta a estímuls externs com la densitat de població, l'estrès o la limitació de nutrients [2, 11].

L'adhesió al substrat pot ser activa o passiva depenent de la motilitat de la cèl·lula. L'adhesió passiva és conduïda per la gravetat, la difusió i la dinàmica de fluids. En l'adhesió activa, la superfície cel·lular dels microorganisme facilita la unió inicial.

L'adhesió microbiana a les superfícies es produeix generalment en dues etapes. En una primera fase, quan la superfície està condicionada, es produeix una adhesió que és reversible. La unió reversible és una interacció inicial dèbil dels microorganismes amb el substrat. Estan implicades les forces electrostàtiques i de van der Waals [11]. Els microorganismes s'uneixen a les superfícies contactant per una part de la cèl·lula o gràcies a alguna de les seves estructures de superfície. El comportament de les cèl·lules unides de forma reversible podria explicar-se com un mecanisme quimiosensor, que ajudaria a determinar els llocs potencialment colonitzables, avaluant les condicions ambientals a través de quimiorceptors [32]. Si aquesta unió es manté el temps suficient, apareixen noves estructures químiques i físiques que la faran permanent i irreversible. Aquesta segona fase és el resultat de fixar apèndixs i/o la producció de polímers extracel·lulars [33], que juguen un paper molt important en els processos d'unió [2]. La producció de substàncies polimèriques extracel·lulars (EPS), pot actuar simultàniament al procés de colonització o en diferents passos del procés de colonització [34-36]. A més, es pensa que hi ha una relació directa entre el poder d'adhesió del biofilm, el contingut de polisacàrid [37] i la colonització del substrat [38-40]. La composició dels EPS està també relacionada amb el potencial d'adhesió. Els EPS hidrofòbics, excretats per filaments madurs de cianobacteris bènctics, han estat implicats en mecanismes de cohesió entre els mateixos microorganismes [41].

1.1.2.4. Formació de microcolònies i maduració del biofilm

La formació de microcolònies precedeix la unió irreversible quan les condicions de desenvolupament són les adequades. Els microorganismes comencen a multiplicar-se mentre emeten senyals químiques per intercomunicar-se. D'aquesta manera, els microorganismes es multipliquen dins de la matriu d'exopolisacàrids en què estan immersos, donant lloc així a la formació d'una microcolònia [2]. Els EPS són també produïts en resposta a la unió i als estímuls ambientals, com la pressió osmòtica, el pH, la temperatura i la limitació de nutrients [11]. No es pot assumir que el material EPS que es produeix en cultiu sigui similar al que es produeix quan hi ha la unió a la superfície. Allison i Sutherland [42] posen en evidència que la producció d'EPS no sempre ocorre immediatament després de la unió. Els EPS d'unió poden també ser produïts per cèl·lules planctòniques durant la fixació, que dona lloc a una unió més efectiva [43].

La densitat i la complexitat del biofilm augmenta quan els microorganismes que el formen comencen a dividir-se activament i els compostos extracel·lulars originats pels microorganismes units interaccionen amb les molècules orgàniques i inorgàniques del medi i formen els EPS [28]. Si les condicions són les adequades per a un creixement i una aglomeració suficients, el biofilm pot desenvolupar-se en una estructura organitzada. Aquest procés s'anomena "maduració". També s'inicia la fabricació d'una barreja de polímers polianiónics que s'excreten a l'exterior per mantenir unides les cèl·lules, tant entre elles com amb la superfície. El biofilm madur pot estar format per una única capa de cèl·lules immerses en polímers extracel·lulars porosos o multicapes que contenen microcolònies empaquetades junt amb EPS. A la perifèria de l'estructura és on es localitzen la majoria de cèl·lules viables, el nombre de les quals es redueix amb l'edat del biofilm.

El creixement de qualsevol biofilm està limitat per la disponibilitat de nutrients, la difusió de nutrients fins a les cèl·lules situades a l'interior del biofilm i per l'eliminació dels productes de desfet. Altres factors que controlen la

maduració del biofilm són el pH, la difusió d'oxigen, la font de carboni i l'osmolaritat [21, 44]. Quan hi ha manca de nutrients o canvis en les condicions microambientals (pH, O₂, acumulació de productes tòxics, etc.), les cèl·lules que estan més a prop de la superfície esdevenen quiescents [45].

1.1.2.5. Dispersió

Ocasionalment, per raons completament mecàniques, alguns microorganismes se'n van del biofilm, o, més freqüentment, paren de produir EPS i s'alliberen en l'ambient circumdant [2]. Aquests nous colonitzadors ho tindran més fàcil que els inicials perquè des del biofilm original s'alliberen els residus i els nutrients que podran utilitzar per preparar la nova superfície amb la coberta orgànica d'acondicionament i per alimentar altres cèl·lules [46]. Aquest fenomen és una adaptació per colonitzar i ocupar nou substrat, assegurant l'èxit reproductiu i afrontant la competència intra i interespecífica.

La dispersió per part del biofilm pot donar-se quan hi ha un desequilibri o fluctuació dels nutrients o de les substàncies *quorum sensing*. La baixa disponibilitat del carboni pot causar un augment de la producció d'EPS que porta a la dispersió. Alts nivells de carboni disponible també poden activar la dispersió [46].

1.1.3. Estructura dels biofilms

A la natura els biofilms poden tenir un alt nivell d'organització i aquestes comunitats poden estar formades per una o múltiples espècies, formant una única capa o una estructura tridimensional, o bé en forma d'agregats, com per exemple flocs o grànuls [43, 47].

L'estructura del biofilm (tridimensional) i l'arquitectura (organització microbiana) estan connectades a les funcions i a la supervivència dels microorganismes que el formen. Se sap que l'arquitectura del biofilm depèn dels factors ambientals [48]. Aquests es poden dividir en factors físics, químics i

biològics [3]. La combinació de les espècies i els factors físics, químics i biològics influeixen en l'estructura del biofilm de tal forma que és gairebé impossible establir-ne un model estàndard. A la pràctica, els diferents models depenen de les diverses condicions de creixement, basades en un consens de variables.

S'han proposat diferents models per explicar el desenvolupament i les propietats dels biofilms (Fig. 1.1.3.): biofilm en monocapa, pla i homogeni (a); biofilm 3D o multicapa, d'estructura heterogènia (b); o l'estructura de bolet o tulipa del biofilm (c, fletxa) amb torres, pedestals i canals d'aigua [49]. Aquests models estan basats en observacions de l'estructura del biofilm i, a més, estan limitats per la tecnologia de visualització disponible.

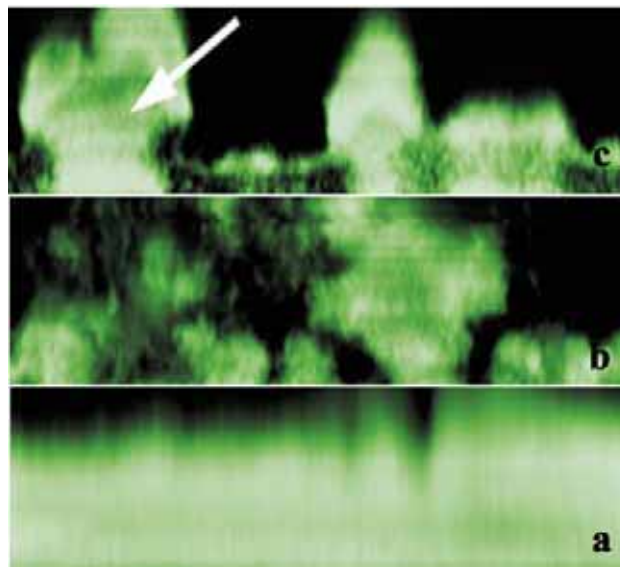


Fig. 1.1.3. Representació esquemàtica de l'estructura dels biofilms (Modificat de <http://www.delftoutlook.tudelft.nl/info/>). Última data d'accés: 01/04/08.

1.1.4. Biofilms fototròfics d'ambients hipogeus

1.1.4.1. Antecedents generals

Quan la llum preval, els biofilms són dominats per organismes fotosintètics (autòtrofs), les algues Chlorophyta (algues verdes), Bacillariophyta (diatomees) i Cyanobacteria [50].

La llum és el principal factor que determina si els biofilms tendeixen cap a l'autotròfia (algues i cianobacteris) o l'heterotròfia (fongs i bacteris). La supervivència de les algues sota aquestes condicions de llum variables és facilitada per factors estructurals, fisiològics i químics [51], però no es coneixen gaire els mecanismes concrets que hi intervenen. Això afecta directament la composició de les espècies i la productivitat. El manteniment de la viabilitat de les microalgues i dels cianobacteris sota condicions de privació de llum ha estat relativament estudiat i la capacitat de persistir sense llum sembla ser específic d'espècies que són capaces de tolerar condicions de poca llum i que també resisteixen l'estrès de privació de llum [50]. Els cianobacteris i les microalgues poden reiniciar la fotosíntesi amb la reexposició a la llum, però la descomposició de clorofil·la *a* durant períodes prolongats de foscor en limiten la viabilitat [52]. Malgrat això, el balanç entre autotròfia i heterotròfia entre el biofilm no és controlat només per la disponibilitat de llum. La predominança de les algues sobre els bacteris pot estar influïda per la disponibilitat de nutrients o de matèria orgànica [53] i els tipus i abundància d'algues són determinades sovint per pertorbacions físiques [50].

Des del famós estudi de la malaltia verda [54] que afectava les pintures murals prehistòriques de les coves de Lascaux a França, la presència de microorganismes fotosintètics en ambients de baixa il·luminació ha estat citada per nombrosos autors. Aquests han fet referència a ambients com les parets i les pintures de coves i esglésies, caracteritzats per una gran humitat [55] i on, per raons diverses, però normalment per tractar-se de llocs oberts en exposició a visitants, s'han instal·lat fonts artificials d'il·luminació.

La presència de microorganismes fotosintètics és molt freqüent i es fa patent en aquests ambients en forma de pàtines de color blau verdós, marró i gris en àrees on hi ha suficient il·luminació. Depenent de la intensitat, la qualitat i la duració de la il·luminació, en aquestes ambients es creen les condicions que porten al creixement fotoautotròfic, permetent que els organismes fotosintètics es puguin estendre a àrees on prèviament no eren presents [55].

Això comporta que molt sovint es produeixi un desenvolupament exuberant dels microorganismes fototròfics al voltant de les fonts de llum. La flora que s'estableix en aquestes condicions, s'anomena *Lampenflora* [56]. Encara que els microorganismes fototròfics són el component principal de la flora, quan es forma terra també s'observen freqüentment molses i falgueres (i en alguns casos plantes de llavor).

1.1.4.2. Cavitats i altres ambients hipogeus

A les cavitats –considerant únicament els ambients de baixa il·luminació– s'han trobat microorganismes fototròfics, pertanyents a diferents grups taxonòmics, com cianobacteris, cloròfits, bacilariòfits, i líquens, molts d'ells presents sobretot a l'entrada de les cavitats.

Existeixen escassos treballs de revisió de la flora de cianobacteris i microalgues a les cavitats. Les revisions posen de manifest la gran diversitat existent en aquests ambients i la seva àmplia distribució [55, 57].

S'han realitzat estudis de la flora de cianobacteris i microalgues de cavitats localitzades en diferents parts del món, a gairebé tots els continents: Brasil [58], Israel [59-63], Florida i les illes Cook [64], les illes Bahamas [65] i Estats Units [64, 66, 67].

També s'han trobat aquests organismes a diferents parts d'Europa: Hongria [68-73], França [74, 75], Alemanya [76-78], Bèlgica [79], Itàlia [80-82], Rumania [83], Iugoslàvia [84] i Escòcia [85].

A Espanya també s'han estudiat cavitats, terres i ambients relacionats, particularment a cavitats de Barcelona, Sevilla, Oviedo [86-88] i a Múrcia [89-91].

Hi ha una gran quantitat d'espècies de cianobacteris habituals en aquests ambients. Entre elles, podríem destacar espècies del gènere *Myxosarcina* en una cova d'Itàlia [56]; l'espècie *Geitleria calcarea*, descrita a coves [59] i àmpliament distribuïda a França [74, 75, 92], Itàlia [80], Espanya [93-95]; i la *Scytonema julianum*, descrita a nombroses cavitats d'Europa [57, 79, 96, 97] i Espanya [94, 98, 99].

En l'incrementar-se l'estudi d'aquests ambients, s'han descrit espècies molt poc freqüents a les cavitats o, fins i tot, noves o molt rares, com és el cas de *Herpyzonema pulverulentum* [100] i *Loriella osteophila* [101] a cavitats espanyoles. Als Estats Units es va trobar un cianobacteri filamentós *Hapalosiphon intricatus* amb la beina dèbilment calcificada [102].

Un altre grup molt freqüent a les cavitats són els bacilariòfits. Se n'han descrit nombroses espècies en diferents continents, però les espècies citades són generalment cosmopolites i poc específiques d'aquests ambients. Als Estats Units [103, 104], a Escòcia [85] i a Roma [105] s'han trobat una gran varietat d'espècies de bacilariòfits, com per exemple: *Navicula mutica*, *Navicula contenta*, *Diploneis oblongella*, *Achnantes minutissima*, *Diadesmis gallica*, i espècies dels gèneres *Nitzschia*, *Cymbella* i *Melosira*.

En el cas dels cloròfits, a les cavitats solen predominar formes unicel·lulars, la taxonomia de les quals és realment problemàtica. Un exemple en seria la identificació com a *Chlorobotrys* (Xantophyta) de l'alga causant de la *maladie verte* a les coves de Lascaux, França [54]. Uns anys més tard, els mateixos autors, després d'haver observat les zoòspores, la van identificar correctament com a *Bracteococcus minor* (Chlorophyta) [106]. S'han descrit espècies molt abundants en altres ambients pertanyents al grup dels cloròfits, com per exemple, *Chlorella vulgaris*, *Muriella terrestris* i *Stichococcus bacillaris*, i espècies rares, com ara el líquen *Physolinum monile*, trobat als Estats Units [107].

A més de les cavitats, també existeixen ambients il·luminats artificialment que formen part del patrimoni cultural, com per exemple les catacumbes romanes, les tombes, etc. Moltes de les espècies trobades en aquests ambients presenten una distribució tropical o atlàntica o es poden trobar en altres ambients relacionats, com ara sòls sense coberta vegetal o monuments.

Han estat citats cianobacteris i bacilariòfits al Partenó d'Atenes [108]. Altres treballs estudien els cianobacteris que afecten els monuments de pedra, en combinació amb líquens [109].

També s'han trobat microalgues que creixen sobre pintures murals a Itàlia [110-112] i en els frescos de les esglésies italianes [112].

A Espanya, s'han realitzat importants treballs sobre la biodeterioració en monuments. S'han trobat cianobacteris i algues en estàtues, a la catedral de Sevilla [113] i en materials de construcció a les catedrals de Salamanca i Toledo [114, 115], i també a Granada [116, 117].

1.2. Patrimoni cultural

1.2.1. Deterioració de substrats per biofilms fotogrífics

Els monuments, les escultures i les obres d'art exposats a la intempèrie s'han alterat, al llarg dels segles, per causes naturals. El sol, les gelades, el vent, la humitat i el desenvolupament d'organismes contribueixen al procés gradual d'envelliment i deteriorament del patrimoni cultural.

Dins dels principals factors que intervenen en el deteriorament dels materials pertanyents al patrimoni cultural d'un país podem esmentar: a) procés de biodeteriorament, b) contaminació ambiental i c) contaminació antropogènica [118].

Els estudis sobre el biodeteriorament que s'han portat a terme en els últims anys indiquen que diversos organismes participen activament en els processos de deteriorament de materials de construcció [119]. El biodeteriorament es pot definir com qualsevol canvi indesitjable de les propietats d'un material originat per l'activitat vital dels microorganismes [120] (Fig. 1.2.1.).



Fig. 1.2.1. Frescos en el "Cubiculum Oceano" en les Catacumbes de St. Callistus (Roma, Itàlia) amb biofilms formats per diferents microorganismes (projecte CATS).

Aquests procés té àmplies dimensions econòmiques i socials quan els substrats colonitzats pertanyent al patrimoni cultural. Diferents tipus de microorganismes, com els cianobacteris, els bacteris, les algues i els fongs creixen formant biopel·lícules (biofilms), que estan constituïts no només per cèl·lules de diversa natura, sinó també per EPS, material particulat divers i aigua, formant d'aquesta manera una matriu mucilaginosa que s'adhereix fortament al substrat, que l'afecta estèticament i que provoca deteriorament físic i químic del material estructural (Taula 2).

Taula 2. Mecanismes de biodeteriorament a la pedra [121].

Influències biogeofísiques

Alteració de la distribució de la porositat i mida del porus causat per la formació de biofilms adherits

Canvis en la difusió de vapor dins del material causat per substàncies polimèriques extracel·lulars

(EPS) i compostos amb tensió superficial reduïda

Descoloriment causat per pigments biogènics (ex. Melanina, clorofil·la) i alteracions d'humitat i temperatura causada per microorganismes

Biofilms com a absorbidors de la pol·lució i precursors de la formació de crostes

Increment de la migració de salts

Alteració de l'ambient aerobi/anaerobi

Influències biogeoquímiques

Acidòlisi: processos quimiolitotròfics

Formació de complexos quimioorganotròfics

Processos redox i enriquiment cel·lular selectiu

Processos fototròfics: acumulació de nutrients orgànics

Els microorganismes que formen el biofilm aprofiten les irregularitats estructurals de la pedra per al seu creixement. S'estimula el creixement del biofilm a causa de la major disponibilitat local d'humitat a les fissures i als porus. La penetració dels microorganismes a l'interior de la pedra, i la difusió

dels seus productes excretats a l'interior de les fissures intergranulars porten a reaccions de desgast i a la disminució de la cohesió entre els grans [122, 123]. Les activitats metabòliques i el material polisacàrid dels biofilms contribueixen al deteriorament químic per solubilització, lixiviació i processos de quelació. Un marcat estovament del substrat i un aprofundiment progressiu del creixement biològic en les capes que estan per sota de la superfície poden incrementar la pèrdua de les partícules de la pedra de l'estructura cristal·lina. Els mucíl·lags extracel·lulars també augmenten el deteriorament i el trencament a causa de la reducció física i l'expansió dels polisacàrids [55, 124].

Els cianobacteris tenen una considerable importància en els biofilms de superfície de monuments exposats a l'aire, a causa de la seva capacitat de resistir cicles de dessecació i rehidratació [125]. Els fongs poden degradar la roca tant químicament com mecànica i produir durant els seus metabolismes pigments i àcids orgànics que es dipositen sobre el substrat colonitzat canviant-ne les característiques i deteriorant-lo [120]. Els bacteris poden estar presents en una superfície aparentment neta, ja que amb poca quantitat d'aigua poden desenvolupar-se i exercir efectes adversos, permetent el creixement posterior d'altres microorganismes [126]. Tant fongs com bacteris poden utilitzar la matèria orgànica produïda pels microorganismes fotosintètics per al seu desenvolupament. No només aquests organismes causen problemes de biodeteriorament; els líquens, les molses, les plantes vasculars i els artròpodes també hi juguen un paper molt important. Les molses amb els seus rizoides poden penetrar el substrat i hi produeixen fissures. L'acció de les plantes vasculars pot ser mecànica per penetració de les arrels en el substrat i/o química ocasionada pels àcids i diversos exsudats excretats per elles mateixes [127]. A més, el moviment dels visitants al llarg de l'any causa una ràpida expansió dels microorganismes [55].

1.2.2. Prevenció, eliminació i control de biofilms fototròfics

En diverses ocasions al llarg de la història s'ha intentat detenir el procés natural de deteriorament mitjançant obres de manteniment i reparació, utilitzant tècniques i materials tradicionals. És en el segle XX quan, davant de l'evident degradació, es fa necessari incrementar el tractament de consolidació i protecció del patrimoni monumental. En les últimes dècades, l'aplicació de tècniques avançades de diagnosi i la investigació al voltant del comportament de materials han permès que la conservació del patrimoni artístic i monumental s'elevi a la categoria de disciplina en la qual les humanitats, la ciència i la tecnologia juguen un paper molt important. Per preservar aquests ambients únics, és necessari determinar un balanç entre les expectatives recreacionals i comercials i la conservació i preservació d'aquests ambients [55].

El control del creixement de les microalgues i els cianobacteris i l'alliberació de les àrees colonitzades implica un estudi multidisciplinar que contempli les mesures preventives i un tractaments en les àrees colonitzades existents [128]. El control dels processos de biodeteriorament ha de començar amb l'adopció de mesures que previndran les condicions favorables del creixement de la microflora contaminant, principalment la disponibilitat de llum, aigua i nutrients, així com el control de la temperatura. Paràmetres específics, com la porositat, la permeabilitat, les condicions arquitectòniques i els factors ambientals locals, determinaran la intensitat i el radi d'atac biocorrosiu. Malgrat la millora dels equips dissenyats, sovint no és possible reduir la disponibilitat d'aigua o controlar la temperatura, això fa que els esforços per controlar el desenvolupament dels biofilms s'enfoquin cap a l'eliminació d'aquests mitjançant medis físics i/o químics [129].

1.2.2.1. Mètodes de prevenció

Les mesures preventives podrien incloure principalment la il·luminació utilitzada en els ambients hipogeus que es volen preservar i la manera com aquesta s'utilitza [128]. Els experiments al voltant del creixement dels cianobacteris exposats a il·luminació artificial mostren que aquests absorbeixen simultàniament la component blava i vermella de la llum, gràcies a la clorofil·la, i la verda i la taronja, gràcies a pigments fotosintètics particulars, les ficobiliproteïnes. En canvi, quan s'il·lumina amb làmpades monocromàtiques de color verd, que no emeten tota la llum necessària per a la fotosíntesi, frenen o suprimeixen el creixement. A les zones que interessa preservar especialment, o que s'han d'il·luminar durant llargs períodes de temps o de forma permanent, s'haurien de substituir les làmpades de llum blanca per altres de longitud fotosintèticament inactiva [130] com, per exemple, la llum verda [55]. És important la limitació de la potència de les làmpades a tot l'ambient, així com la durada de la il·luminació el màxim possible. Això es podria aconseguir instal·lant làmpades amb temporitzadors o amb detectors de moviment, les quals s'activarien només amb la presència dels visitants.

El nombre de visitants permès en aquests ambients hauria de quedar determinat de manera que, una vegada que abandonessin la cova, els paràmetres, com per exemple la temperatura i el CO₂ atmosfèric, poguessin retornar als nivells inicials abans que la nova tanda de visitants entrés a la cova [128, 131].

1.2.2.3 Mètodes d'erradicació

Una vegada que s'han format els biofilms, netejar la superfície esdevé molt més difícil a causa de la presència d'EPS adherents [11]. El procés de neteja pot eliminar un 90 % o més de microorganismes associats a la superfície, però no els eliminarà totalment. Els microorganismes es poden tornar a dipositar en altres llocs i, amb el temps i les condicions adequades,

poden formar un biofilm. La neteja amb aigua ajuda a eliminar eflorescències i sals solubles i, temporalment, evita les infeccions biològiques, però a llarg termini, hi ha un desenvolupament microbià més gran a causa de la humitat [132]. La neteja mecànica i química mostra ocasionalment una escassa eficiència i pot provocar descoloriments i danys greus a la pedra tractada [133]. A més, la freqüent aplicació d'agents blanquejadors per eliminar pigments en roques naturals pot agreujar l'aparició de sals del material, deixant residus, i en alguns casos, poden oxidar inclusions de ferro en el material mineral [134].

Els biocides només han de ser aplicats on els factors de deterioració ambiental no puguin ser controlats i les intervencions químiques siguin inevitables [121]. És important que els tractaments que protegeixen les superfícies del desenvolupament del biofilm siguin biodegradables, no tòxiques i tinguin compatibilitat química amb aquests substrats [23].

L'elecció d'un producte comercial particular s'ha de fer després de considerar un gran nombre de paràmetres [134], [135]. L'estabilitat i l'efectivitat dels biocides han de ser analitzades amb referència a la microflora infectant. Durant l'avaluació dels biocides, s'han observat alguns efectes negatius a la roca tractada, com canvis de color o l'impacte de les sals. Per aquesta raó és convenient testar-los abans de l'aplicació [135-137]. A més, es pot considerar que l'efectivitat de biocides en l'interacció amb la matriu de la roca es pot veure greument reduïda, especialment en substrats rics en argila i minerals [121, 138].

Es poden classificar comunament els biocides comercials i les substàncies antimicrobianes actives com alcohols, aldehids, àcids orgànics, fenols i altres derivats, compostos halogenats, metalls i substàncies organometàl·liques, compostos oxidants, enzims o diferents productes orgànics sintètics [139], molts d'ells àmpliament aplicats per al control del creixement microbià en pedra [134, 135].

Els biocides orgànics tenen el risc d'afavorir, després de l'augment de la mineralització microbiològica o natural, la font de nutrients de la microflora que colonitza la pedra. A més, la inhibició de grups específics de

microorganismes afavorirà el *bloom* i la propagació d'altres espècies microbianes que estaven en estat latent [140]. Els biocides inorgànics tendiran a la formació de dipòsits addicionals de salts solubles a la superfície de la pedra i afectaran un procés de deteriorament secundari [133].

L'efecte antimicrobià dels compostos d'amoni quaternari ("quats") està basat probablement en la inactivació de proteïnes i enzims i l'impacte d'aquest efecte en les membranes de les cèl·lules microbianes. Els compostos de l'amoni quaternari afecten un ampli ventall de microorganismes, des de bacteris i fongs fins a algues i líquens. La seva efectivitat incrementa sota condicions alcalines i temperatures altes durant l'aplicació. La susceptibilitat de la pedra tractada amb aquests compostos ha estat estudiada per molts autors tant al laboratori com en estudis de camp [136, 141]. Aquests biocides aplicats a frescos va provocar un decreixement proporcional de la contaminació per cianobacteris i algues [142]. Malgrat això, s'ha de fer èmfasi en el fet que els "quats" que contenen nitrogen, després de la successiva mineralització poden servir com a font de nutrients per a la supervivència dels microorganismes o perquè aquests s'uneixin novament a una superfície, amb la qual cosa s'agreuja l'estat de biodeteriorament de l'objecte tractat. També, s'han de conèixer les característiques i la delicadesa del material tractat, ja que en alguns casos es poden produir efectes indesitjats [143].

Les substàncies organometàl·liques més utilitzades per a la protecció contra la bioinfestació són els compostos orgànics d'estany (TOC, acrònim de l'anglès). El seu efecte està basat en la inhibició de l'energia del metabolisme de cèl·lules microbianes i afecten bacteris, fongs i algues. En contrast amb els "quats", la superfície dels materials no absorbeix el TOC, i que conserva la seva efectivitat en llargs períodes de temps. Malgrat això, a causa de la seva inestabilitat davant la llum ultraviolada i la seva toxicitat per al medi ambient, l'aplicació de TOC en superfícies de pedra oberta i exposada sembla ser qüestionable, especialment des que estan disponibles tractaments biocides menys tòxics [121].

Els biocides comercials que contenen coure tenen una influència significativa en l'eliminació a llarg termini del creixement de líquens en monuments històrics [144]. Altres tractaments alternatius són les radiacions ionitzants [145] i la radiació UV [146], dels quals es coneix la seva efectivitat contra la contaminació microbiana en pedra, malgrat que la seva aplicació pràctica és limitada [121].

Les noves investigacions de biocontrol inclouen l'ús de pigments i inhibidors de polisacàrids i permeabilitzants per augmentar l'efectivitat de tractaments de biocides existents i nous tractaments utilitzant els agents fotodinàmics. Aquests, sota l'actuació d'una certa longitud d'ona, produeixen radicals lliures [147] que afecten les membranes cel·lulars i, eventualment, causen la mort cel·lular. La comprensió dels mecanismes d'acció dels biocides, junt amb els factors que influencien la seva activitat, han esdevingut la clau més important per a una millor utilització d'aquests i un control de l'aparició de microorganismes resistents [148]. Els nous tractaments amb agents fotodinàmics, *quorum sensing* i permeabilitzants ajuden a reduir les concentracions dels tractaments amb substàncies perilloses [23].

1.3. Referències

- [1] Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, K. G., Ladd, P. I., Nickel, J. C. , Dasgupta, M. & Marrie, T. J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Ann. Review Microbiol.* 41:435-64.
- [2] Prakash, B., Veeregowda, B. M., Krishnappa, G. 2003. Biofilms: a survival strategy of bacteria. *Curr. Sci.* 85:1299-1307.
- [3] Brading, M.G., Boyle, J. & Lappin-Scott, H. M. 1995. Biofilm formation in laminar flow using *Pseudomonas fluorescens* EX 101. *J. Indust. Microbiol.* 15:297-304.
- [4] Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W. & Caldwell, D. E. 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.* 173(20): 6558-6567.
- [5] Jones, M. V. 1995. Fungal biofilms; eradication of a common problem. *In* Wimpenny, J., Handley, P., Gilbert, P. & Lappin-Scott, H. M. (Eds). *The Life and Death of Biofilm*. Cardiff: Bioline, pp.157-160.
- [6] Millsap, K. W., van der Mei, H. C., Bos, R., Busscher, H. I. 1998. Adhesive interactions between medically important yeasts and bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 21:321-336.
- [7] Cooksey, K. E. 1992. Bacterial and algal interactions in biofilms. *In* Melo, L. F., Bott, T. R., Fletcher, M. & Capdeville, B. (Eds). *Biofilms-Science and Technology*. Kluwer Academic Press, Netherlands. pp.163-173.
- [8] Wolfaardt, G. M., Lawrence, J. R., Robarts, R. D., Caldwell, S. E. & Caldwell, D. E. 1994. Multicellular organization in a degradative biofilm community. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:434-446.
- [9] Marsh, P. D. 1995. Dental plaque. *In* Lappin-Scott, H.M. & Costerton, J.W. (Eds). *Microbial biofilms*. Cambridge University Press. New York. pp. 282-300.
- [10] Korber, D. R., James, G. A., & Costerton, J. W. 1994. Evaluation of fleroxacin activity against established *Pseudomonas fluorecens* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1663-1669.

- [11] Chmielewski, R. A. N. & Frank, J. F. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2:22-32.
- [12] Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. & Mattick, J. S. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. 295, 1487.
- [13] Wotton, R. S. 2004. The ubiquity and many roles of exopolymers (EPS) in aquatic systems. *Sci. Mar.* 68:13–21.
- [14] De Philippis, R. & Vincenzini, M. 1998. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiol. Rev.* 22:151-175.
- [15] De Philippis, R., Sili, C., Paperi, R., Vincenzini, M. 2001. Exopolysaccharide-producing cyanobacteria and their possible exploitation: a review. *J. Appl. Phycol.* 13:293–299.
- [16] Hoiczyk, E. 2000. Gliding motility in cyanobacteria: observations and possible explanations. *Arch. Microbiol.* 174:11–17.
- [17] Fuqua, I. & Greenberg, P. 2002. Listening in on bacteria: acyl-homoserine lactone signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:685-695.
- [18] Stewart, P. S. 1997. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2517–2522.
- [19] Kumar, C. G & Anand, S. K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 42:9-27.
- [20] McEldowney, S. & Fletcher, M. 1987. Adhesion of bacteria from mixed cell suspension to solid surfaces. *Archiv. Microbiol.* 148:57-62.
- [21] Carpentier, B. & Cerf, O. 1993. Review. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.* 75:499-511.
- [22] Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., & Greenberg, E. P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 280 (5361):295–298.
- [23] Alakomi, H., Arrien, N., Gorbushina, A. A., Krumbein, W. E., Maxwell, I., McCullagh, C., Robertson, P., Ross, N., Saarela, M., Valero, J., Vendrell, M.,

-
- Young, M. E. 2004. Inhibitors of biofilm damage on mineral materials (BIODAM). *In* Kwiatkowski, D. & Löfvendahl, R. (Eds.) Proceedings of 10th Int. Congress on Deterioration and Conservation of Stone. Stockholm. ICOMOS, Stockholm, Vol.1. pp. 399 – 406.
- [24] Fletcher, M., & Loeb, G. I. 1979. Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine pseudomonad to solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 37(1):67–72.
- [25] Barnes, L. M., Lo, M. F., Adams, M. R., & Chamberlain, A. H. L. 1999. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4543–4548.
- [26] Briandet, R., Meylheuc, T., Maher, C., Bellon-Fontaine, M. N. 1999. *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:5328–5333.
- [27] Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 284:1318–1322.
- [28] Dunne, W. M. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately. *Clin. Microbiol. Rev.* 15:155–166.
- [29] Bakker, D. P., Postmus, B. R., Busscher, H. J., & van der Mei, H. C. 2004. Bacterial strains isolated from different niches can exhibit different patterns of adhesion to substrata. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3758–3760.
- [30] Costerton, J. W. 1995. Overview of microbial biofilms. *J. Indus. Microbiol.* 15:137-140.
- [31] O'Toole, G. A., Kaplan, H. & Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:49-79.
- [32] Lawrence, J. R. & Caldwell, D. E. 1987. Behavior of bacterial stream populations within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironments. *Microb. Ecol.* 14:15–27.
- [33] Sutherland, I. W. 1983. Microbial exopolysaccharides—their role in microbial adhesion in aqueous systems. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 10:173–201.

- [34] Finlay, B. B. & Falkow, S. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61:136–69.
- [35] Hermansson, M. 1999. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 14:105–119.
- [36] Sutherland, I. W. 2001. The biofilm matrix — an immobilized but dynamic microbial environment. *TRENDS Microbiol.* 9: 222–227.
- [37] Hokputsa, S., Hu, C., Paulsen, B. S. & Harding, S. E. 2003. A physico-chemical comparative study on extracellular carbohydrate polymers from five desert algae. *Carbohydrate Polymers.* 54:27-32.
- [38] Albertano, P., Kovacik, L. & Grilli Caiola, M. 1994. Preliminary investigations on epilithic cyanophytes from a Roman Necropolis. *Arch. Hydrobiol., Algal. Stud.* 75:71-74.
- [39] Lamenti, G., Tiano, P., Tomaselli, L. 2000. Biodeterioration of ornamental marble statues in the Boboli Garden (Florence, Italy). *J. Appl. Phycol.* 12:427-433.
- [40] Ortega-Calvo, J. J., Ariño, J., Hernández-Mariné, M. & Saiz-Jiménez, C. 1995. Factors affecting the weathering and colonization of monuments by phototrophic microorganisms. *Sci Total Environ.* 167:329-341.
- [41] de los Ríos, A., Ascaso, C., Wierzchos, J., Fernández-Valiente, E., Quesada, A. 2004. *Appl. Environ. Microbiol.* 70 (1):569-580.
- [42] Allison, D. G. & Sutherland, I. W. 1987. The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. *Gen. Microbiol.* 133:1319-1327.
- [43] Bryers, J. D. 1987. Biologically active surfaces: Processes governing the formation and persistence of biofilms. *Biotechnol. Prog.* 3. n^o.2, pp. 57-68.
- [44] O'Toole, G. A. & Kolter, R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28:449-461.
- [45] La Tourette Prosser, B., Taylor, D., Dix, B. A. & Cleeland, R. 1987. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:1502-1506.
- [46] Moore, G. F., Dunsmore, B. C., Jones, S. M., Smejkal, C. W., Jass, J., Stoodley, P & Lappin-Scott, H. M. 2000. Microbial detachment from biofilms. *In* Allison,

- D., Gilbert, P., Lappin-Scott, H. & Wilson, M. (Eds.). Community structure and co-operation in biofilms. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 107-127.
- [47] Bagge, D., Hjelm, M., Johansen, C., Huber, I. & Gram, I. 2001. *Shewanella putrefaciens* adhesion and biofilm formation on food processing surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2319-2325.
- [48] Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Rev.* 2:95-106.
- [49] Wimpenny, J., Manz, W., Szewzyk, U. 2000. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:661-671.
- [50] Peterson C. G. 1996. Responses of benthic algal communities to natural physical disturbance. In Stevenson, R. J., Bothwell, M. L. & Lowe, R. L. (Eds). *Algal Ecology*. Academic Press, California.
- [51] Richardson, K., Beardall, J. & Raven, J. A. 1983. Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytol.* 93:157-191.
- [52] Wasmund, N. 1989. Micro-autoradiographic determination of the viability of algae inhabiting deep sediment layers. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 28:651-656.
- [53] Ohki, K. & Gantt, E. 1983. Functional phycobilisomes from *Tolypothrix tenuis* (Cyanophyta) grown heterotrophically in the dark. *J. Phycol.* 19: 359-364.
- [54] Lefèvre, M., Laporte, G. & Bauer, J. 1964. Sur les microorganismes envahissant les peintures rupestres de la grotte préhistorique de Lascaux. *C. R. Acad. Sci.* 258:5116–5118.
- [55] Hoffmann, L. 2002. Caves and other low-light environments: Aerophytic photoautotrophic microorganisms. In Bitton, G. (Ed.), *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. John Wiley & Sons, New York. pp. 835-843.
- [56] Abdelahad, N. 1989. On four *Myxosarcina*-like species (Cyanophyta) living in the Inferniglio cave (Italy). *Arch. Hydrobiol., Suppl. bd. Algol. Stud.* 54: 3-13.
- [57] Hoffmann, L. 1989. Algae of terrestrial habitats. In Cronquist, A. (Ed.) *The Botanical Review*. Vol. 55. The New York Botanical Garden, Bronx, NY. pp. 77-105.

- [58] Sant'Anna, C. L., Branco, L. H. Z. & Silva, S. M. F. 1991. A new species of *Gloeothece* (Cyanophyceae, Microcystaceae) from Sao Paulo State, Brazil. *Arch. Hydrobiol., Suppl. bd. Algal. Stud.* 62:1-5.
- [59] Friedmann, I. 1955. *Geitleria calcarea* n. gen. and n. sp. *Bot. Not.* 108: 439-445.
- [60] Friedmann, I. 1961. *Chroococcidiopsis kashaii* sp, n. and the genus *Chroococcidiopsis*. (Studies on cave algae from Israel III). *Österr. Bot. Z.* 108:354-367.
- [61] Friedmann, I. 1962. The ecology of the atmophytic nitrate-alga *Chroococcidiopsis kashaii* Friedmann. (Studies on cave algae from Israel IV). *Arch. Microbiol.* 42: 42-45.
- [62] Friedmann, I. 1964. Progress in the biological exploration of caves and subterranean waters in Israel. *Int. J. Speleol.* 1:29-33.
- [63] Vinogradova, O. N., Kovalenko, O. V., Wasser, S. P., Nevo, E. & Weinstein-Evron, M. 1998. Species diversity gradient to darkness stress in blue-green algae/cyanobacteria: a microscale test in a prehistoric cave, Mount Carmel, Israel. *Isr. J. Plant. Sci.* 46:229-238.
- [64] Friedmann, I. 1979. The genus *Geitleria* (Cyanophyceae or Cyanobacteria): Distribution of *G. calcarea* and *G. floridana* n. sp. *Pl. Syst. Evol.* 131:169-178.
- [65] Davis, J. S. & Rands, D. G. 1981. The genus *Geitleria* (Cyanophyceae) in a Bahamian cave. *Schweiz. Z. Hydrol. Hydrobiol. Limnol. Fisch. Wiss. Abwassereinig.* 43:63-68.
- [66] Jones, H. J. 1964. Algological investigations in Mammoth Cave, Kentucky. *Int. J. Speleol.* 1:491-516.
- [67] Nagy, J. P. 1965. Preliminary notes on the algae of Crystal Cave, Kentucky. *Int. J. Speleol.* 1: 479-490.
- [68] Claus, G. 1962. Data on the ecology of the algae of Peace Cave in Hungary. *Nova Hedwigia, Beih.* 4:55-79.
- [69] Claus, G. 1964. Algae and their mode of life in the Baradla Cave at Aggtelek II. *Int. J. Speleol.* 1:13-17.
- [70] Hajdu, I. 1966. Algological studies in the cave of Matyas Mount, Budapest, Hungary. *Int. J. Speleol.* 2:137-149.

- [71] Kol, E. 1966. Algal growth experiments in the Baradla Cave at Aggletek. *Int. J. Speleol.* 2:457-474.
- [72] Komáromy, Z. P. 1977. The algal flora of the Ördöglyuk Cave at Szoplak (Hungary). *Ann. hist.-nat. Mus. Natl. Hung.* 69:29-35.
- [73] Komáromy, Z. P., Padisák, J. & Rajczy, M. 1985. Flora in the lamp-lit areas of the cave "Annabarlang" near Lillafüred (Hungary). *Ann. hist.-nat. Mus. Natl. Hung.* 77:103-122.
- [74] Bourrelly, P. & Dupuy, P. 1973. Quelques stations françaises de *Geitleria calcarea*, Cyanophycée cavernicole. *Schwiz. Z. Hydrol. Limnol. Fisch. Wiss. Abwassereinig.* 35:136-140.
- [75] Leclerc, J. C., Couté, A. & Dupuy, P. 1983. Le climat annuel de deux grottes et d'une église du Poitou, ou vivent des colonies pures d'algues sciaphiles. *Cryptogamie Algol.* 4:1-19.
- [76] Dobat, K. 1968. Die Pflanzen- und Tierwelt der Charlottenhöhle. *Abh. Karst-Höhlenkd. A.* 3:37-50.
- [77] Dobat, K. 1970. Considérations sur la végétation cryptogamique des grottes du Jura Souabe (Sud-ouest de l'Allemagne). *Ann. Spéléol.* 25:871-907.
- [78] Dobat, K. 1977. Zur Ökogenese und Ökologie der Lampenflora deutscher Schauhöhlen. A. Frey, W. (ed.) Beiträge zur Biologie der niederen Pflanzen. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, pp. 177-215.
- [79] Garbacki, N., Ector, L., Kostikov, I. & Hoffmann, L. 1999. Contribution à l'étude de la flore des grottes de Belgique. *Belg. J. Bot.* 132:43-76.
- [80] Abdelahad, N. & Bazzichelli, G. 1988. *Geitleria calcarea* Friedmann, Cyanophycée cavernicole nouvelle pour l'Italie. *Nova Hedwigia, Beih.* 46:265-270.
- [81] Borzi, A. 1917. Studi sulle Mixoficée. *Nuovo G. Bot. Ital.* 24:100-112
- [82] Skuja, H. 1970. Alghe cavernicole nelle zone illuminate delle grotte di Castellana (Murge di Bari). *Grotte Ital.* 4:193-202.
- [83] Serbanescu, M. & Decu, V. 1962. To the knowledge of cavernicolous algae of Oltenia. *I. Rev. Biol.* 7:201-214.

- [84] Golubic, S. 1967. Algenvegetation der Felsen, eine oekologische Algenstudie im dinarischen Karstgebiet. In Elster, H. J. & Ohle, W. (Eds.) Die Binnengewässer. Vol. 23. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart. pp. 183.
- [85] Carter, J. R. 1971. Diatoms from the Devil's hole cave Fife, Scotland. *Nova Hedwigia* 21:657-681.
- [86] Ariño, X., Canals, A. & Hernández-Mariné, M. 1998. Cianofícies i algues aerofítiques de substrats carbonatats. *Acta Bot. Barc.* 45:133-140.
- [87] Hernández-Mariné, M., Roldán, M., Clavero, E., Canals, A. & Ariño, X. 2001. Phototrophic biofilm morphology in dim light. The case of the Puigmoltó sinkhole. *Nova Hedwigia, Beih.* 123:237-253.
- [88] Roldán, M., Clavero, E., Canals, T., Gómez-Bolea, A., Ariño, X. & Hernández-Mariné, M. 2004. Distribution of phototrophic biofilms in cavities (Garraf, Spain). *Nova Hedwigia.* 78 (3-4):329-351.
- [89] Aboal, M., Asencio, A. D. & Prefasi, M. 1994. Studies on cave cyanophytes from southeastern Spain: *Scytonema julianum*. *Arch. Hydrobiol., Suppl. bd. Algal. Stud.* 75:31-36.
- [90] Asencio, A. D. & Aboal, M. 1996. A new cave-inhabiting blue-green alga: *Symphyonema cavernicolum* sp. nova (Mastigocladaceae, Stigonematales). *Arch. Hydrobiol., Suppl. bd. Algal. Stud.* 83:73-82.
- [91] Asencio, A. D. & Aboal, M. 2000. Algae from La Serreta cave (Murcia, SE Spain) and their environmental conditions. *Arch. Hydrobiol., Suppl. bd. Algal. Stud.* 96:59-78.
- [92] Coute, A. 1982. Ultrastructure d'une cyanophycée aérienne calcifiée cavernicole: *Geitleria calcarea* Friedmann. *Hydrobiologia* 97:255-274.
- [93] Gracia Alonso, C. A. 1974. *Geitleria calcarea* Friedmann nueva alga cavernícola para España. *Speleon (Barcelona).* 21:133-136.
- [94] Hernández-Mariné, M. & Canals, A. 1994. Cianofíceas filamentosas cavernícolas. *Stud. Bot.* 13:227-229.
- [95] Ariño, X. 1996. Estudio de la colonización, distribución e interacción de líquenes, algas y cianobacterias con materiales pétreos de los conjuntos arqueológicos

- de Baelo Claudia y Carmona. Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona, Barcelona – Sevilla. pp. 255.
- [96] Dobat, K. 1977. Zur Ökogenese und Ökologie der Lampenflora deutscher Schauhöhlen. In Frey, W. (Ed.) *Beiträge zur Biologie der niederen Pflanzen*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. pp. 177-215.
- [97] Couté, A. & Bury, E. 1988. Ultrastructure d'une cyanophycée aérienne calcifiée cavernicole: *Scytonema julianum* (Frank) Richter (Hormogonophycidae, Nostocales, Scytonemataceae). *Hydrobiologia*. 160:219-239.
- [98] Asencio, A. D. 1997. Flora algal y condiciones ambientales de cuevas y abrigos con pinturas rupestres de la región de Murcia (SE España). Tesis Doctoral, Universidad de Murcia, Murcia. pp. 382.
- [99] Ariño, X., Hernández-Mariné, M. & Saiz-Jiménez, C. 1997. Colonization of Roman tombs by calcifying cyanobacteria. *Phycologia*. 36:366-373.
- [100] Hernández-Mariné, M. & Canals, T. 1994. *Herpyzonema pulverulentum* (Mastigocladaceae), a new cavernicolous atmophytic and lime-incrusted cyanophyte. *Arch. Hydrobiol., Suppl. bd. Algal. Stud.* 75: 123-136.
- [101] Hernández-Mariné, M., Asencio-Martínez, A., Canals, A., Ariño, X., Aboal, M. & Hoffmann, L. 1999. Discovery of populations of the lime incrusting genus *Loriella* (Stigonematales) in Spanish caves. *Arch. Hydrobiol., Suppl. bd. Algal. Stud.* 94:121-138.
- [102] Davis, J. S. & Rands, D. G. 1982. Lime incrusting *Hapalosiphon intricatus* (Cyanophyceae) and phosphate availability in a Florida cave. *Schweiz. Z. Hydrol. Hydrobiol. Limnol. Fisch. wiss. Abwassereinig.* 44.
- [103] Saint-Clair, L. & Rushforth, R. 1976. The diatoms of Timpanogos cave national monument. *Utah. Amer. J. Bot.* 63:49-59.
- [104] Saint-Clair, L., Rushforth, S. & Allen, J. 1981. Diatoms of Oregon caves national monument, Oregon. *Great Basin Naturalist*. 41:317-332.
- [105] Albertano, P., Kovacic, L., Grilli Caiola, M. 1994. Preliminary investigations on epilithic cyanophytes from a Roman Necropolis. *Arch. Hydrobiol., Algal. Stud.* 75:71–74.
- [106] Lefevre, M. 1974. La maladie verte de Lascaux. *Stud. conserv.* 19:126-156.

- [107] Davis, L. S., Hoffmann, J. P. & Cook, P. W. 1990. Seasonal succession of algal periphyton from a wastewater treatment facility. *J. Phycol.* 26:611-616.
- [108] Anagnostidis, K., Economou-Amilli, A. & Roussomoustakaki, M. 1983. Epilithic and chasmoendolithic microflora (Cyanophyta, Bacillariophyta) from marbles of the Parthenon (Acropolis-Athens, Greece). *Nova Hedwigia, Beih.* 38:227-287.
- [109] Danin, A. & Caneva, G. 1990. Deterioration of limestone walls in Jerusalem and marble monuments in Rome caused by cyanobacteria and cyanophilous lichens. *Int. Biodeterior.* 26:397-417.
- [110] Grilli Caiola, M., Forni, C. & Albertano, P. 1987. Characterization of the algal flora growing on ancient Roman frescoes. *Phycologia.* 26:387-396.
- [111] Albertano, P., Luongo, L. & Grilli Caiola, M. 1991. Observations on cells structure of microorganisms of an epilithic phototrophic community competing for light. *Nova Hedwigia, Beih.* 53:369-381.
- [112] Pietrini, A. M. & Ricci, S. 1993. Occurrence of a calcareous blue-green alga, *Scytonema julianum* (Kütz) Meneghini, on the frescoes of a church carved from the rock in Matera, Italy. *Cryptogam. Bot.* 3:290-295.
- [113] Hernández-Mariné, M., Ortega-Calvo, J. J. & Saiz-Jiménez, C. 1992. El microscopio electrónico de barrido como instrumento de estudio del biodeterioro de obras de arte. A Vilches, J. & López, A. (Eds.) Microscopia electrónica. Universidad de Cádiz, Cádiz. pp. 244-245.
- [114] Ortega, J. J., Hernández-Mariné, M. & Saiz-Jiménez, C. 1991a. Biodeterioration of building materials by cyanobacteria and algae. *Int. Biodeterior.* 28:165-185.
- [115] Ortega, J. J., Sánchez-Castillo, P. M., Hernández-Mariné, M. & Saiz-Jiménez, C. 1993b. Isolation and characterization of epilithic chlorophytes and cyanobacteria from two Spanish cathedrals (Salamanca and Toledo). *Nova Hedwigia.* 57:239-253.
- [116] Sánchez Castillo, P. 1981. Cianofitas en la ciudad de Granada. *Trab. Dept. Bot.-Univ. Granada.* 6:29-48.
- [117] Sánchez Castillo, P. 1983. Clorofitas en la ciudad de Granada. *Trab. Dept. Bot.-Univ. Granada.* 8:63-79.

- [118] Ariño, X. & Saiz-Jiménez, C. 1996. Factors affecting the colonization and distribution of cyanobacteria, algae and lichens in ancient mortars. In: Riederer, J. (Ed.), Proceedings of the Eighth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone, 2. Rathgen-Forschungslabor, Berlin, Germany. pp. 725-731.
- [119] Saiz-Jiménez, C. & Ariño, X. 1995. Colonización biológica y deterioro de morteros por organismos fotótrofos. *Materiales de construcción*. 240: 5-16.
- [120] Videla, H. A. 1996. Manual of Biocorrosion. Lewis Publishers/CRC Press. Boca Raton, FL, USA. pp. 288.
- [121] Warscheid, Th. & Braams, J. 2000. Biodeterioration of stone: a review. *Int. Biodet. Biodeg.* 46:343-368.
- [122] Dornieden, Th., Gorbushina, A., Krumbein, W.E., 1997. Änderungen der physikalischen Eigenschaften von Marmor durch Pilzbewuchs. *Int. J. Restoration Buildings Monuments*. 3:441-456.
- [123] Sterflinger, K. & Krumbein, W. E. 1997. Dematiaceous fungi as a major agent of biopitting for Mediterranean marbles and limestones. *Geomicrobiol. J.* 14:219-230.
- [124] Wolfaardt, G. M., Lawrence, J. R., Korber, D. R. 1999. Function of EPS. In Wingender, J., Neu, T. R., Flemming, H. C. (Eds). Microbial extracellular polymeric substances. Springer, Berlin. pp 170-200.
- [125] Adams, D. G. 1997. Cyanobacteria. In Shapiro, J. A. & Dworkin, M. (Eds.), Bacteria as multicellular organisms. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom. pp. 109-148.
- [126] May, E., Lewis, F. J., Pereira, S., Tayler, S., Seaward, M. R. D. & Allsopp, D. 1993. Microbial deterioration of building stone: A review. *Biodeterioration Abstracts*. 7(2):109-23.
- [127] Saiz-Jimenez, C. 1994. Biodeterioration of stone in historic buildings and monuments. In Leewellyn, C., Dashek, W. V., O'Rear, C. E. (Eds.): Biodeterioration Research 4, Plenum Press, New York. pp. 587-604.
- [128] Grobbelaar, J. 2000. Lithophytic algae: a major threat to karst formation of show caves. *J. Applied Phycology*. 12: 309-315.

- [129] Frank, J. F. & Koffi, R. A. 1990. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Prot.* 53 (7):550-554.
- [130] Albertano, P., Bruno, L. & Bellezza, S. 2005. New strategies for the monitoring and control of cyanobacterial films on valuable lithic faces. *Plant Biosystems.* 139:311 – 322.
- [131] Cigna, A. A. 1993. Environmental management of tourist caves. *Environmental Geology.* 21:173-180.
- [132] Warscheid, Th., Petersen, K., Krumbein, W.E., 1998. Effects of cleaning on the distribution of microorganisms on rocks surfaces. *In*: Houghton, D. R., Smith, R. N., Eggins, H. O. W. (Eds.), *Biodeterioration*, Vol. 7. Elsevier Applied Science, London, New York. pp. 455-460.
- [133] Ashurst, J., Ashurst, N. 1990. Stone masonry. *In* *Practical Building Conservation*, Vol. 1. Gower Technical Press Ltd., London.
- [134] Kumar, R., Kumar, A. V., 1999. Biodeterioration of stone in tropical environments. *Research in Conservation*, Getty Conservation Institute, Los Angeles. pp. 85.
- [135] Richardson, B. A. 1988. Control of microbial growth on stone and concrete. *In* Houghton, D. R., Smith, R. N., Eggins, H. O. W. (Eds.), *Biodeterioration*, Vol. 7. Elsevier Applied Science, London, New York. pp. 101-106.
- [136] Krumbein, W. E. & Gross, M. 1992. Interactions of biocides with cultures of biodeteriorating microbiota in agar diffusion and rock tube tests. *In* Rodrigues, J.D., Henriques, F., Jeremias, F. T. (Eds.), *Proceedings of the Fifth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*. Laboratorio Nacional de Engenharia Civil, Lisbon, Portugal, 15. pp. 501-509.
- [137] Nugari, M. P., Pallecchini, P., Pinna, D. 1993b. Methodological Evaluation of Biocidal Interference with Stone Materials – Preliminary Laboratory Tests. *In* Thiel, M. J. (Ed.), *Conservation of Stone and Others Materials*, Vol. 1. E & F. N. Spon, London. pp. 295-302.

- [138] Young, M. E. 1997. Biological growth and their relationship to the physical and chemical characteristics of sandstones before and after cleaning. Ph.D. Thesis, The Robert Gordon University, Aberdeen.
- [139] Allsopp, C., Allsopp, D. 1983. An updated survey of commercial products used to protect materials against biodeterioration. *Int. Biodet. Bulletin.* 19:99-146.
- [140] Agarossi, G., Ferrari, R., Nonte, M., Gugliandolo, C. & Maugeri, M. 1988. Changes of microbial system in an etruscan tomb after biocidal treatments. *Proceedings of the Sixth International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, Nicolaus Copernicus University, Torun, Poland. pp. 82-91.
- [141] Lisi, S., Riccio, A. M., Zagari, M., Urzi, C. E. 1992. On the efficiency of biocides against biodegradative fungal stains isolated from rock using the contact time technique. *In* Rodrigues, J. D., Henriques, F., Jeremias, F. T. (Eds.), *Proceedings of the Seventh International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*. Laboratorio Nacional de Engenharia Civil, Lisbon, Portugal. pp. 453-457.
- [142] Pietrini, A. M., Ricci, S. 1989. Laboratory evaluation and field trials of algicidal biocides for the treatment of mural paintings. *In* Agrawal, O. P., Dhawan, S. (Eds.), *Proceedings of the International Conference of Biodeterioration of Cultural Property*. National Research Laboratory Conser. Cult. Prop., Lucknow, India, 20. pp. 353-358.
- [143] Tiano, P. & Caneva, G. 1987. Procedures for the elimination of vegetal biodeteriogens from stone monuments. *In* Grimstad, K. (Ed.), *Preprints of the ICOM Committee for Conservation*. The Getty Conservation Institute, Marina del Rey. pp. 1201-1205.
- [144] Warscheid, Th. & Krumbein, W. E. 1996. Biodeterioration of inorganic nonmetallic materials – general aspects and selected cases. *In* Heitz, H., Sand, W., Flemming, H. C. (Eds.). *Microbially Induced Corrosion of Materials*. Springer, Berlin. pp. 273-295.

- [145] Ley, F. J. 1988. The control of microorganisms using ionisation radiation. *In* Houghton, D. R., Smith, R. N., Eggins, H. O. W. (Eds.), *Biodeterioration*, Vol. 7. Elsevier Applied Science, London, New York. pp. 523-528.
- [146] van der Molen, J. M., Garty, J., Aardema, B. W., Krumbein, W. E. 1980. Growth control of algae and cyanobacteria on historical monuments by a mobile UV unit (MUVU). *Studies in Conservation* 25:71-77.
- [147] Calzavara-Pinton, P. G., Szeimeis, R. M., Ortel, B. Zane, C. 1996. Photodynamic therapy with systemic administration of photosensitizers in dermatology. *J. Photochem. Photobiol., B: Biology*. 36(2): 225-231.
- [148] Maillard, J. Y. 2002. Bacterial target sites for biocide action. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.* 92:16S-27S.