

Cambiando el paradigma del biodeterioro.
Las microalgas de la Alhambra y el Generalife
como oportunidad para la creación de nuevas
técnicas artísticas

*Changing the paradigm of biodeterioration.
The microalgae of the Alhambra and
Generalife as an opportunity for the creation of
new artistic techniques*

Isabel Calvo Bayo

Universidad de Granada

isabelcb@ugr.es

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6354-4038>

Lorena Cuberos Cáceres

Universidad de Granada

lorenamaria@ugr.es

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8443-330X>

María Belén Ruiz Ruiz

Instituto de Patrimonio Histórico Andaluz, Sevilla

ruizruizmbelen@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0009-0005-4911-4281>

Ana María Yebra Rodríguez

Universidad de Granada

ayebra@ugr.es

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0524-6336>

Fernando Bolívar Galiano

Universidad de Granada

fbolivar@ugr.es

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-8456-9613>

Julio Romero-Noguera

Universidad de Sevilla

juliorn@us.es

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7590-232X>

Resumen: Los agentes bióticos como algas, hongos y bacterias conviven con los bienes culturales y artísticos, acelerando su deterioro y produciendo modificaciones indeseables si su crecimiento se produce de manera descontrolada. La arquitectura hidráulica del complejo monumental de la Alhambra y el Generalife, en Granada (España), supone un lugar idóneo para su proliferación, a causa de los materiales que componen las fuentes ornamentales y del protagonismo cultural que cobra el agua en este lugar. Mediante el proyecto «Aplicación avanzada de las algas procedentes de la Alhambra y el Generalife en técnicas artísticas y de conservación-restauración», con el acrónimo de Ficoarte II y financiado por el plan andaluz de investigación, desarrollo e innovación PAIDI 2020, Programa FEDER (cód. P18-FR-4477), se están investigando las propiedades de las sustancias producidas por microalgas pertenecientes a este emblemático monumento y que frecuentemente son tratadas como agentes de biodeterioro, con el objetivo de crear nuevos materiales con fines artísticos, principalmente colorantes y pigmentos, de origen natural y baja toxicidad e impacto ambiental. De este modo, se han seleccionado pigmentos de diversas coloraciones de especies pertenecientes a los géneros *Coelastrella*, *Haematococcus* (algas verdes) y *Cyanosarcina* (cianobacterias), que crecen habitualmente en la Alhambra y su entorno. Se han optimizado las condiciones de cultivo, con el objetivo de desarrollar una mayor producción de pigmentos fotosintéticos y, posteriormente, se han estudiado las propiedades de los colorantes obtenidos para su uso en técnicas artísticas.

Palabras claves: Alhambra. Pigmentos. Técnicas. Arte. Materiales.

Abstract: Biotic agents such as algae, fungi and bacteria coexist with cultural and artistic assets, accelerating their deterioration and producing undesirable modifications if their growth occurs in an uncontrolled manner. The hydraulic architecture of the monumental complex of the Alhambra and the Generalife, in Granada (Spain) is an ideal place for their proliferation, due to the materials that make up the ornamental fountains and the cultural prominence of water in this place. Through the project «Advanced application of algae from the Alhambra and the Generalife in artistic techniques and conservation-restoration», with the acronym of Ficoarte II and funded by the Andalusian Plan for Research, Development and Innovation PAIDI 2020, ERDF Program, (cod. P18-FR-4477), the properties of substances produced by microalgae belonging to this emblematic monument and which are frequently treated as biodeterioration agents are being investigated, with the aim of creating new materials for artistic purposes, mainly dyes and pigments, of natural origin and low toxicity and environmental impact. Thus, pigments of different colorations have been selected from species belonging to the genera *Coelastrella*, *Haematococcus* (green algae) and *Cyanosarcina* (cyanobacteria), which commonly grow in the Alhambra and its surroundings. The cultivation conditions have been optimized, with the aim of developing a higher production of photosynthetic pigments and subsequently, the properties of these microalgae have been studied to be used in artistic techniques.

Keywords: Alhambra. Pigments. Techniques. Art. Materials.

1. Introducción

En el conjunto de la Alhambra, al igual que sucede en otros bienes culturales, existe una gran biodiversidad de microorganismos que colonizan la piedra. Cabe destacar de manera especial el crecimiento de microalgas, ya que estas proliferan en lugares con presencia de agua, elemento fundamental en el arte nazarí y musulmán en general. En todo el complejo arquitectónico de la Alhambra encontramos numerosas fuentes, albercas, canales, surtidores, acequias y estanques, que se ven afectados por su desarrollo. Estos organismos son pioneros en la colonización de la piedra, formando películas y tapetes y causando modificaciones sobre el sustrato. Asimismo, estas biopátinas se caracterizan por desarrollar distintos colores; desde verdes, colores más característicos de las microalgas, hasta naranjas, amarillos, marrones-pardos y azulados. El estudio de la tipología de microalgas presente en las fuentes de la Alhambra y sus efectos se ha abordado anteriormente

(Bolívar-Galiano, 1994: 9; Sánchez-Castillo, 1995: 8). Los microorganismos están considerados en general como importantes agentes de biodeterioro, y los procesos que los provocan han sido ampliamente estudiados a lo largo de las últimas décadas, aunque también se ha indicado que los organismos que colonizan materiales pétreos pueden actuar en ocasiones como agentes de bioprotección (Gaylarde y Morton, 1999: 61; Scheerer *et al.*, 2009: 102; Chand y Singh, 2012: 7).

Por otro lado, las algas son una fuente de materias primas para multitud de aplicaciones, debido a la gran diversidad de componentes químicos que se pueden obtener de ellas (De Souza *et al.*, 2018: 2). Entre los compuestos de mayor interés comercial se encuentran polisacáridos, pigmentos, lípidos, ácidos grasos, proteínas o compuestos fenólicos (Stengel, Connan y Popper, 2011: 490). Son utilizadas en la producción de biofuel (Sudhakar *et al.*, 2018: 172), como biofertilizantes (Nabtiet *et al.*, 2017: 1124), protectores contra la radiación solar (Campanini *et al.*, 2018: 320), en biomedicina (Wang *et al.*, 2017: 12), farmacia (Bhattacharjee, 2016), nutrición (Biancarosa *et al.*, 2018: 41), cosmética (Bueno *et al.*, 2017: 483) o incluso en el tratamiento de aguas residuales (Cole *et al.*, 2016: 101).

En lo que respecta a las técnicas artísticas y a la conservación-restauración de bienes culturales, sus aplicaciones son más limitadas. Los colorantes y pigmentos que contienen se encuentran entre las moléculas con mayor interés potencial para las técnicas artísticas. En general, las cianobacterias presentan una mayor diversidad de colores, seguidas por las algas verdes, mientras que las diatomeas ofrecen una variedad más reducida (Bolívar-Galiano, 2003: 9). En situaciones de estrés fisiológico como limitación de nutrientes, iluminancia, temperatura elevadas y presencia de sales, las coloraciones de las algas pueden cambiar o potenciarse (Abalde *et al.*, 1999: 96). Normalmente, el cambio de tonalidad que sufre una microalga de color verde (por sus contenidos de clorofila) a naranja se debe a la producción de pigmentos fotosintéticos conocidos como β -carotenos. Estos aportan propiedades antioxidantes y actúan como protectores de la clorofila y del daño celular provocado por radicales libres (García-Morales, 2020: 1). De este modo, cada microalga, en función del medio en el que se encuentra, desarrolla una serie de pigmentos característicos, habiéndose propuesto incluso métodos de identificación a través de las coloraciones que desarrollan a nivel macroscópico, en función de la época estacional (Bolívar-Galiano, 1994: 6).

Asimismo, otros compuestos de origen algal como los carotenoides y ficobiliproteínas, tienen diversas aplicaciones como colorantes naturales en la industria alimentaria, cosmética o marcadores fluorescentes (Eriksen, 2008: 3).

Los casos de aplicación de productos de origen algal en técnicas artísticas son hasta el momento bastante limitados. Se han utilizado fitoextractos aplicados con aglutinantes acrílicos para la creación de obras pictóricas con «pintura algal», que han sido expuestas en varias exposiciones desde el año 2002 (Bolívar Galiano, 2003: 6). Es un campo prácticamente inexplorado que presenta múltiples posibilidades de desarrollo. Así pues, el objetivo principal de esta investigación es el estudio de las propiedades de las algas que proliferan en la arquitectura hidráulica del patrimonio cultural de la Alhambra y el Generalife para su aplicación en técnicas artísticas.

Las microalgas estudiadas fueron recogidas mediante muestreos realizados en el marco del Proyecto Nacional «Métodos sinérgicos arte-ciencia-tecnología para la conservación-restauración de la Alhambra y otros bienes culturales», conocido con el acrónimo VIRARTE II (código: PID2019-109713RB-I00) y financiado por la Convocatoria Plan Nacional Generación del Conocimiento 2018.

Se seleccionaron aquellas de fácil desarrollo, que siguen proliferando a pesar de los tratamientos mecánicos y los biocidas aplicados periódicamente. Entre ellas, se eligieron las cepas *Coelastrella thermophila*, *Haematococcus pluvialis* y *Cyanosarcina* sp, debido a la resistencia que ofrecen a los factores externos medioambientales como iluminancia y temperatura, estudiada en varios ensayos realizados en laboratorio.

El género *Coelastrella* comprende algas habitualmente unicelulares, o que forman agregados de pocas células que destacan por su pared celular, esculpida con varias costillas longitudinales. Se ha descrito principalmente en hábitats subaéreos y terrestres, y solo raramente en agua dulce. Esta microalga, de carácter bentónico, coloniza la piedra ornamental causando daños estructurales en el sustrato, debido al pedúnculo que porta en su estructura, que le permite adherirse a las superficies rocosas. Varias especies de este género muestran una alta propensión a acumular carotenoides, concretamente β -caroteno, luteína y astaxantina, muy estables ante factores externos de temperatura e iluminación (Hali *et al.*, 2022: 3). Además, habitan en lugares húmedos a 65 °C, llegando a crecer también a temperaturas inferiores a 35 °C (Boutarfa *et al.*, 2022: 7).

La microalga *Haematococcus pluvialis* es frecuentemente descrita en el biodeterioro de bienes culturales. Se trata de un organismo unicelular biflagelado de agua dulce, que pertenece a la clase Clorofíceas, orden Volvocales, familia *Haematococcaceae*. El interés de esta cepa radica en la producción de astaxantina, un pigmento liposoluble de color rojo intenso con altos niveles de antioxidantes (Hoys, 2016: 25-27).

Por último, *Cyanosarcina sp* es una cianobacteria que se caracteriza por desarrollar colonias formadas por densos paquetes de células verdes-azuladas, envueltas en una matriz mucilaginosa estrecha. Cuando se divide lo hace en las tres direcciones del espacio, formando pequeñas arquitecturas de bloques redondeados (Guiry, 2022; Gil y Martínez-Ron, 2002).

2. Materiales y métodos

La metodología para el estudio de las microalgas mencionadas para su uso en nuevas técnicas artísticas se ha dividido en dos bloques:

- Bloque I: Identificación de microalgas, optimización de las condiciones de cultivo y obtención de biomasa.
- Bloque II: Estudio de las propiedades de resistencia con ciclos de envejecimiento acelerado.

Bloque I

2.1. Identificación de microalgas

La selección de las tres algas anteriormente mencionadas es resultado de un largo proceso de investigación previo, que se inició con la creación de un banco de microalgas de la Alhambra, que cubren un amplio abanico de géneros y especies presentes en la piedra ornamental, el estudio de la optimización de sus condiciones de cultivo y, finalmente, el desarrollo y obtención de pigmentos fotosintéticos.

Para ello se tomaron muestras de 21 fuentes de la Alhambra, localizadas especialmente en los Palacios Nazaríes, y de ellas se obtuvieron un total de ciento veinte muestras de microalgas, aisladas e identificadas por métodos fenotípicos y moleculares (Bolívar-Galiano, 2020: 7).

2.2. Desarrollo de monocultivos y biomasa

De los muestreos realizados se seleccionaron, por su potencialidad en la producción de pigmentos y facilidad para el cultivo, las algas *Coelastrella thermophila*, *Haematococcus pluvialis* y *Cyanosarcina sp*. Se obtuvieron monocultivos de las mismas mediante varias resiembras en placas Petri con Agar BAC (Labkem) al 2 % enriquecido con los medios BBM (Bold's Basal Medium) para algas verdes y

BG11 (Bigco) para cianobacterias. Se mantuvieron en una cámara termostática Pol-Eko ST/2 COMF con cuatro fluorescentes luxtar 4W AC220-240V, 4000 K, 50/60 Hz, a una temperatura de 22 °C y con ciclos de 12:12 horas de luz/oscuridad, equipada con lámparas CXhome LED T5 40w de 660 nm.

Una vez obtenidas las cepas aisladas se procedió a la optimización del método de cultivo con medios líquidos, con la finalidad de conseguir biomasa y obtener los pigmentos y colorantes mediante técnicas de extracción de metabolitos, basadas en disolventes polares, apolares y una combinación de estos.

El método de optimización de cultivos se realizó a través de una adaptación de la metodología propuesta por Rodríguez *et al.* (2016: 7). Para ello, se utilizaron medios de crecimiento: M8a¹, BBM y BG11. Todos los medios se esterilizaron, exceptuando los metales trazas, en autoclave a 121 °C y 1 atmósfera durante 20 minutos.

En matraces de 50 ml se añadieron los diferentes medios de crecimiento y, en cada caso, los inóculos procedentes de *C. thermophila*, *H. pluvialis* y *Cyanosarcina* sp sin aireación. Se comenzó con una cantidad de 10 ml de medio durante la primera semana, y posteriormente se adicionaron 40 ml en la segunda. Se mantuvieron diariamente en un agitador LB SHKP-500-001, durante 50 minutos a 120 rpm. Transcurridas dos semanas se testó el nivel de crecimiento en cada caso con cámara Neubauer, utilizando un microscopio óptico binocular Leica Gaen III (40x).

C. thermophila y *H. pluvialis* crecen más rápidamente en M8a que en el resto de medios, mientras que en el caso de *Cyanosarcina* sp se eligió el medio BG11. Se procedió a trasvasar a Erlenmeyer de 250 ml con aireación continua mediante compresor HG-946 en cámara de cultivo y, posteriormente, a frascos de 500 y 2000 mg/l durante el mismo periodo de tiempo.

En las primeras etapas de crecimiento se añadieron semanalmente 50 ml de medio de crecimiento para conseguir un aumento gradual de biomasa. Tras obtener 2 litros de medio de cultivo, se escalaron a un fotobiorreactor de capacidad de 10 litros, añadiendo un 10 % de inóculo del volumen total del recipiente. El pH se mantuvo entre 6 y 8. Transcurridas tres semanas, se escalaron a cinco fotobiorreactores de capacidad de 10 litros, añadiendo a cada uno 1 litro de inóculo, 8 litros de agua destilada y 50 ml de medio de cultivo 9,50 litros en total, respetando un espacio para facilitar la aireación. Mediante repetición de este procedimiento, se obtuvo un total de 100 litros de cada una de las algas estudiadas.

Semanalmente se tomaron medidas de la densidad óptica (DO) de todos los cultivos mediante espectrofotometría UV-visible (Yoke Instrument N6000 PLUS). Se tomaron alícuotas de 3 ml y se introdujeron en cubetas de vidrio de 16 mm de diámetro y como blanco se empleó agua destilada. Las muestras se estudiaron a 600 nm de longitud de onda, recomendada para organismos fotosintéticos, buscando informar la curva de crecimiento máxima y determinar con precisión la fase exponencial, durante la cual el alga aumenta la producción de pigmentos. El valor obtenido fue el resultado de la media de tres medidas.

2.3. Estrés inducido para la producción de pigmentos fotosintéticos

Para inducir estrés celular se realizó un ensayo con placas multipocillos 6x4 (128 x 86 x 22 cm) de ensayo de cultivo celular TPP, según una adaptación del método descrito por May *et al.* (2011: 68) y García *et al.* (2022: 9). Para ello, se seleccionaron diferentes medios de cultivo y se añadió un

¹ Composición del medio de crecimiento M8a. Las concentraciones están expresadas en (mg/l): KH₂PO₄: 740; Na₂HPO₄·2H₂O: 260; MgSO₄·7H₂O 400; CaCl₂·2H₂O: 13; KNO₃ 3000; EDTA sal sódica férrica: 116; NA₂EDTA·2H₂O 37.2; H₃BO₃: 0.0618; MnCl₂·4H₂O 13; ZnSO₄·7H₂O 3.2; CuSO₄·5H₂O: 1.83 (Pavez *et al.*, 2015: 2).

total de 1 ml en cada pocillo con distintas concentraciones de nitratos, fosfatos y sales. Los detalles del estudio aparecen en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Multipocillos 1. Metodología: estrés inducido para la producción de pigmentos fotosintéticos

Multipocillos 1	1	2	3	4	5	6
A <i>Coelastrrella thermophila</i>	Medio M8a	Medio M8a Sin KNO ₃	Medio M8a Sin KNO ₃ , Sin Fosfatos	Medio M8a más NaCl al 0,4 %	Medio M8a con menos KNO ₃ más NaCl al 0,4 %	Medio M8a con menos KNO ₃
B <i>Klebsormidium</i>	Medio M8a	Medio M8a Sin KNO ₃	Medio M8a Sin KNO ₃ , Sin Fosfatos	Medio M8a más NaCl al 0,4 %	Medio M8a con menos KNO ₃ más NaCl al 0,4 %	Medio M8a con menos KNO ₃
C <i>Haematococcus pluvialis</i>	Medio M8a	Medio M8a Sin KNO ₃	Medio M8a Sin KNO ₃ , Sin Fosfatos	Medio M8a más NaCl al 0,4 %	Medio M8a con menos KNO ₃ más NaCl al 0,4 %	Medio M8a con menos KNO ₃
D <i>Pseudodendroclonium commune</i>	Medio M8a	Medio M8a Sin KNO ₃	Medio M8a Sin KNO ₃ , Sin Fosfatos	Medio M8a más NaCl al 0,4 %	Medio M8a con menos KNO ₃ más NaCl al 0,4 %	Medio M8a con menos KNO ₃

Tabla 2. Multipocillos 2. Metodología: estrés inducido para la producción de pigmentos fotosintéticos

Multipocillos 2	1	2	3	4	5	6
A <i>Scenedesmus obliqua</i>	Medio M8a	Medio M8a con menos KNO ₃	Medio M8a Sin KNO ₃	Medio M8a sin KNO ₃ , sin Fosfatos	Medio M8a más NaCl al 0,4 %	Medio M8a con menos KNO ₃ más NaCl al 0,4 %
B <i>Cyanosarcina</i>	Medio BG11	Medio BG11 más NaCl al 0,4 %	Medio BG11 más NaCl al 0,4 % *	Medio M8a con menos KNO ₃ más NaCl al 0,4 %	Medio M8a con menos KNO ₃ , Sin Fosfatos, más NaCl al 0,4 %	Medio M8a Sin KNO ₃ , Sin Fosfatos, más NaCl al 0,4 %
C <i>Leptolyngbya</i>	Medio BG11	Medio BG11 más NaCl al 0,4 %	Medio BG11 más NaCl al 0,4 % *	Medio M8a con menos KNO ₃ más NaCl al 0,4 %	Medio M8a con menos KNO ₃ , Sin Fosfatos, más NaCl al 0,4 %	Medio M8a Sin KNO ₃ , Sin Fosfatos más NaCl al 0,4 %
D 1,2,3 <i>Coelastrrella thermophila</i> 4,5,6 <i>Haematococcus pluvialis</i>	Medio M8a Sin KNO ₃ más NaCl al 0,4 %	Medio M8a con menos KNO ₃ , Sin Fosfatos más NaCl al 0,4 % *	Medio M8a Sin KNO ₃ , Sin Fosfatos más NaCl al 0,4 % *	Medio M8a Sin KNO ₃ , más NaCl al 0,4 % *	Medio M8a con menos KNO ₃ , Sin Fosfatos más NaCl al 0,4 % *	Medio M8a Sin KNO ₃ , Sin Fosfatos más NaCl al 0,4 % *

* Volumen de 0,5 mL de NaCl al 0,4%.

Mediante el método Arredondo-Vega (2007: 23-24) se hizo recuento celular con cámara Neubauer con el objetivo de cuantificar el crecimiento, junto con el cambio cromático de las microalgas en cada uno de los medios de cultivo bajo estrés fisiológico. Se realizaron tres repeticiones por medida y se calculó la concentración media.

BLOQUE II

2.4. Preparación de muestras

La biomasa obtenida de las tres cepas estudiadas se centrifugó durante 4 minutos a 4000 rpm, eliminando el sobrenadante y reservando el pellet. Con el objetivo de deshidratar las muestras se

desecharon en una estufa Liebherr Profiline FKS 3600 index. El procedimiento se realizó gradualmente, con la finalidad de no dañar las paredes celulares de las microalgas. Se comenzó por una temperatura de 30 °C (8h), después se aumentó a 40 °C (8h) y finalmente a 45 °C (8h). No se emplearon temperaturas más elevadas para no desnaturalizar las proteínas presentes en las muestras.

Las microalgas deshidratadas se trituraron con la ayuda de un mortero hasta obtener un grano fino, semejante al utilizado habitualmente en la preparación de pigmentos de uso pictórico.

Las materias colorantes obtenidas se mezclaron con diversos aglutinantes de cara a su estudio y aplicación en técnicas artísticas. Se seleccionaron tres, de amplio uso, diferente polaridad y composición: aceite de linaza clarificado (código N135025), goma arábiga (aglutinante habitual en la acuarela) y medio acrílico de la casa Sennelier. Se empleó también agua, con el objetivo de conocer el comportamiento del extracto de microalga sin la presencia de aglutinante.

Como soporte, se utilizó papel de acuarela Sennelier 100 % algodón, de 300 gramos, grano fino y libre de ácidos. Para la preparación del aglutinante de goma arábiga se empleó la receta de Mayer (1985:265) para su uso en acuarelas:

- Goma arábiga: 56 gramos.
- Agua destilada hervida: 115 cc.
- Hidromiel (agua y miel a partes iguales) o jarabe de azúcar o glucosa: 35 cc.
- Glicerina 42 cc.

Las dimensiones de cada muestra fueron 2x5 cm, siguiendo las indicaciones de la norma ISO 9124:2003. Para el desarrollo del protocolo de preparación de las muestras y la medición del desvanecimiento del color que sufren las mismas se tomó como referencia la norma *Standard Test Methods for Lightfastness of Colorants Used in Artists Materials* (ASTM D4303-03). Se realizaron tres réplicas: una de control, mantenida en oscuridad a 22 °C y 50 ± 10 % HR, otra destinada a someterse a ciclos de envejecimiento acelerado y la última se expuso en exterior a una orientación SO 216°, durante 12 horas de exposición diaria durante 30 días y una iluminancia media de 30000 lux/hora, con un total de exposición de 10,8 Mluxh, medido con luxómetro Chauvin Arnoux CA 1110. Para el control de los parámetros de humedad y temperatura se utilizó un data-logger KlimaLogg Pro No. 30.3039.

Como controles, se seleccionaron tres pigmentos orgánicos de la casa Sennelier (París, Francia):

- Laca de alizarina roja. Colour Index (PR83). Composición química: 2-dihydroxiantraquinona. Categoría de solidez a la luz II.
- Azul índigo. Colour Index (PB60). Composición química: indantrona [aminoantraquinona + hidróxido de potasio]. Categoría de solidez a la luz III.
- Verde ftalocianina. Colour Index (PG7). Composición química: ftalocianina de cobre clorada (McEvoy, 2015). Categoría de solidez a la luz III.

Se prepararon un total de tres muestras para cada control. Los resultados analíticos han sido la media de esas tres muestras.

2.5. Ensayos con envejecimiento acelerado

Se realizaron ensayos de envejecimiento acelerado para conocer la estabilidad química y los cambios físicos que se generan en condiciones climatológicas extremas, así como los mecanismos y procesos de degradación que sufren los materiales colorantes de las microalgas al ser empleadas en

técnicas artísticas. Es importante destacar que en este ensayo no se han empleado barnices, protectores solares o estabilizantes, con el fin de estudiar aisladamente el comportamiento de los materiales seleccionados sin la interferencia de aditivos.

Se utilizó en el ensayo una cámara equipada con cinco lámparas fluorescentes TL-D 36W BLB 1SL/25 de luz negra, con vapor de mercurio a baja presión que emite onda larga (UVA) con una distribución espectral de energía dentro del intervalo 300-400 nm.

Con la finalidad de conocer la estabilidad del color se siguieron las indicaciones del «método A» de la norma ISO 16474-3 para pinturas y barnices: «Métodos de exposición a fuentes luminosas de laboratorio. Parte 3: Lámparas fluorescentes UV». Los parámetros de irradiación, temperatura y humedad relativa (HR) se modificaron adaptándolas a la naturaleza orgánica de las muestras a estudiar. Así, se redujo la temperatura de 60 °C a 50 °C, para evitar la desnaturalización de las proteínas presentes en las muestras y la HR se mantuvo en el intervalo 50-60 %. Así pues, los ciclos propuestos fueron los siguientes:

Tabla 3. Ciclo de envejecimiento acelerado.
Metodología: estudio de las propiedades de resistencia con ciclos de envejecimiento acelerado

Número de ciclo	Periodo de exposición	Radiación	Temperatura (°C)	Humedad Relativa (%)	Horas totales
1	4 h seco	340 nm	50 ± 3	60 ± 10	168 h
	4 h condensación	340 nm	50 ± 3	60 ± 10	168 h
2	5 h seco	340 nm	50 ± 3	60 ± 10	84 h
	1 h de pulverización	340 nm	50 ± 3	60 ± 10	84 h

Las muestras fueron medidas semanalmente mediante estudios de colorimetría durante 21 días hasta alcanzar el grado de envejecimiento deseado (3 semanas, 504 horas).

2.6. Estudios de colorimetría

Para realizar las medidas colorimétricas las muestras se colocaron sobre una base a 45° en el centro de una cabina Gretag Macbeth Spectralight III lightingbooth (X-Rite) equipada con un simulador de luz día D65. Los valores triestímulo X, Y y Z de cada muestra se obtuvieron con un espectrorradiómetro Konica Minolta CS2000 situado a 40 cm de la muestra y empleando el observador estándar CIE 1964. A partir de los valores triestímulo se calcularon las coordenadas CIELAB L*, a* y b*, y los valores de croma (C_{ab}) y ángulo de tono (h_{ab}).

Para la obtención de estos valores, se ha calculado la media entre las medidas correspondientes a las muestras no envejecidas (control) y las del mismo panel antes de la exposición a los ciclos de envejecimiento artificial.

Inicialmente se calcularon las diferencias de color CIELAB producidas por el envejecimiento con la ecuación:

$$\Delta E_{ab} = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

Esta ecuación de diferencia de color es ampliamente utilizada en la industria, pero, debido a las recomendaciones de la Comisión Internacional de la Iluminación (CIE, 2004), también calculamos

las diferencias de color con la fórmula CIEDE2000 (Luo *et al.*, 2001), mejor correlacionada con la percepción visual.

$$\Delta E_{00} = \sqrt{\left(\frac{\Delta L'}{\kappa_L S_L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C'}{\kappa_C S_C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta H'}{\kappa_H S_H}\right)^2 + R_T \left(\frac{\Delta C'}{\kappa_C S_C}\right)^2 \left(\frac{\Delta H'}{\kappa_H S_H}\right)^2}$$

2.7. Análisis estadístico

Los resultados se representan como media grupal (n=3) y error estándar de la media. Mediante el programa Microsoft Excel se realizó el estudio estadístico mediante la prueba t de Student. El asterisco (*) indica diferencias significativas entre grupos experimentales. Se ha establecido como diferencia significativa un p-valor < 0,05.

3. Resultados

3.1. Obtención de biomasa a partir de monocultivos

Las cepas *C. thermophila* y *H. pluvialis* se cultivaron en un medio rico en nutrientes M8a a 25 °C de temperatura durante un mes, para observar el patrón de crecimiento en el cultivo y su pH, con objetivo de estudiar su fase de mayor desarrollo de pigmentos fotosintéticos. La fase estacionaria se observó a partir de la cuarta semana, probablemente debido a la limitación de nutrientes en el medio. Esta se determinó mediante densidad óptica (DO) a 600 nm en el espectrofotómetro de UV.

Los resultados obtenidos muestran que el cultivo de *C. thermophila* llega a su fase estacionaria con una absorbancia de 1,87 y pH de 8,78, mientras que *H. pluvialis* presenta una absorbancia de 1,246 y pH de 8,83. Se observó que su coloración pasó de verde a un color anaranjado (Figura 1), debido a la limitación de nutrientes como el nitrógeno, fundamental en el crecimiento de microalgas. *Cyanosarcina sp* se cultivó en medio BG11 en las mismas condiciones que las anteriores, obteniendo una DO de 0,784 y pH de 8,79. El crecimiento en condiciones de estrés se produjo a partir de un mes de cultivo, el tiempo más prolongado de las tres algas estudiadas. En general, estos resultados nos indican que el estrés en medio líquido es mucho más lento y dificultoso que los cultivos en medio sólido.

3.2. Determinación del estrés inducido en placa multipocillo y agar

En la figura 2 se representa la concentración celular (cél/ml) de la cianobacteria *Cyanosarcina sp*, sometida durante tres semanas a diferentes medios de cultivo para su estrés (Figura 2). Como se puede apreciar, la cianobacteria presentó un mayor crecimiento con el medio de cultivo BG11 (CT), debido a que contiene todos los nutrientes necesarios. Se observó que en el resto de condiciones de



Figura 1. Colores que ofrece la microalga *Haematococcus pluvialis*. Control (color verde) y bajo estrés inducido (color naranja). Fotografía: Isabel Calvo.

cultivo el crecimiento fue significativamente inferior con respecto al control. La menor concentración celular se dio en el medio M8a modificado sin nitrógeno, sin fosfatos y adicionando un volumen de 0,25 ml de NaCl al 0,4%, indicada en la fila 2 del cultivo en multipocillos (Figura 3). En todos los casos hay que tomar en consideración que este estudio emplea volúmenes mucho más pequeños a los que habitualmente se utilizan en sistemas industriales (Rosales-Loaiza, 2017: 84-85).

En cuanto a la concentración celular (cél/ml) de *H. pluvialis*, no se observaron diferencias significativas entre el control y el resto de medios (Figura 4). Se aprecia una mayor concentración celular en el control, al igual que sucedió con la cianobacteria, mientras que si disminuimos o

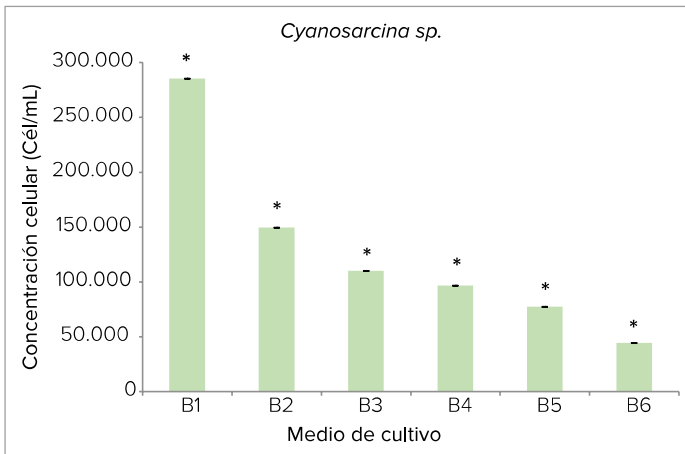


Figura 2. Concentración celular (cél/mL) de *Cyanosarcina sp.* sometida a diferentes condiciones de cultivo, durante tres semanas. **B1:** Medio BG11 (CT); **B2:** BG11 con 0,25 mL de NaCl al 0,4 %; **B3:** BG11 con 0,5 mL NaCl al 0,4 %; **B4:** M8a con menos nitrógeno y 0,25 mL NaCl al 0,4 %; **B5:** M8a con menos Nitrógeno, sin fosfatos y con 0,25 mL NaCl al 0,4 %; **B6:** M8a sin Nitrógeno, Fosfatos y con 0,25 mL NaCl al 0,4 %. Los resultados expresan la media de al menos 4 réplicas de un mismo cultivo y el error estándar de la media. * Representan diferencias significativas mediante un test de T de Student ($p < 0,05$).

Figura 3. Cultivo de microalgas en multipocillos con diferentes condiciones de estrés, después de tres semanas. Fotografía: Lorena Cuberos.

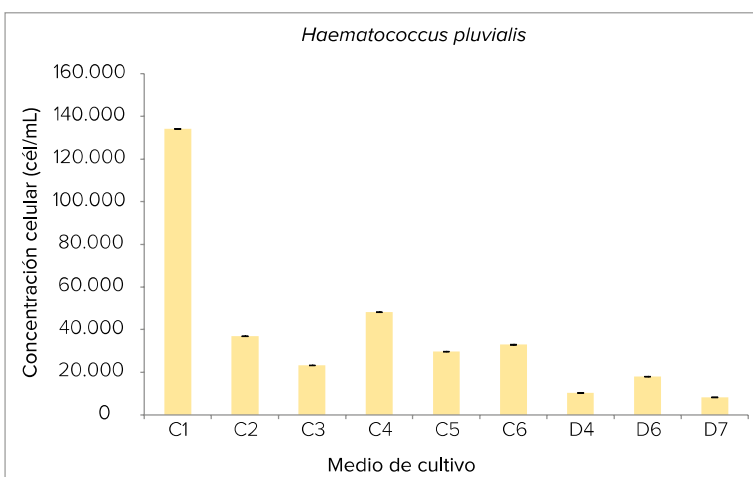
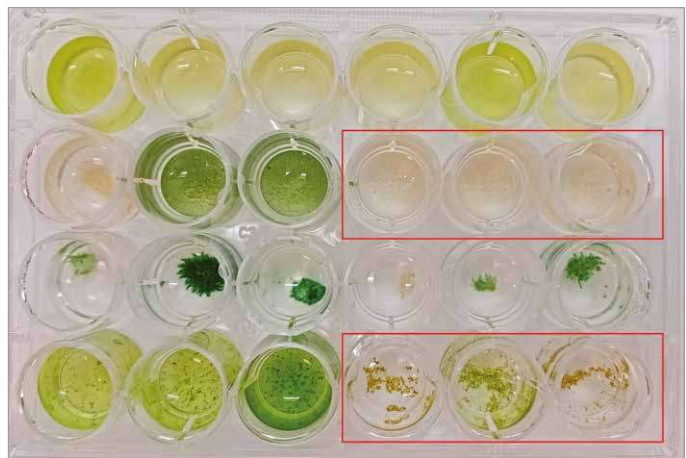


Figura 4. Concentración celular (cél/mL) de *Haematococcus pluvialis* sometida a diferentes condiciones de cultivo, durante tres semanas. **C1:** Medio M8a (CT); **C2:** M8a sin nitrógeno; **C3:** M8a sin nitrógeno y fosfatos; **C4:** M8a con 0,25 mL NaCl al 0,4 %; **C5:** M8a con menos nitrógeno y con 0,25 mL NaCl al 0,4 %; **C6:** M8a con menos nitrógeno; **D4:** M8a sin nitrógeno y con 0,25 mL de NaCl al 0,4 %; **D5:** M8a con menos nitrógeno, sin fosfatos y 0,5 mL NaCl al 0,4 %; **D6:** M8a sin nitrógeno, sin fosfatos y con 0,5 mL NaCl al 0,4 %. Los resultados expresan la media de al menos 4 réplicas de un mismo cultivo y el error estándar de la media. * Representan diferencias significativas mediante un test de T de Student ($p < 0,05$).

eliminamos sus macronutrientes esenciales (N y P), su crecimiento va disminuyendo. La adición de un volumen de 0,5 mL de concentración de NaCl al 0,4% provoca el cese de su crecimiento, como se pudo observar en la última fila del cultivo multipocillo (Figura 3).

Los resultados obtenidos nos muestran que la producción de astaxantina por *H. pluvialis* se debe a la aplicación de diferentes factores que ocasionan el estrés fisiológico: alta intensidad luminosa, temperatura superior a 33 °C, deficiencia o ausencia de nitrógeno y fósforo, así como la adición de NaCl.

Por último, se representan las diferentes concentraciones celulares (cél/ml) de *C. thermophila*, sometida durante 3 semanas a diferentes condiciones de cultivo para su estrés (Figura 5). Como se puede apreciar, la microalga tuvo un mayor crecimiento con el medio de cultivo M8a sin modificación (CT), al igual que ocurrió en los casos anteriores. Se observaron diferencias significativas en los medios M8a sin nitrógeno y 0,5 ml de NaCl al 0,4%; M8a con menos nitrógeno, sin fosfatos y 0,5 ml de NaCl al 0,4%; y M8a sin nitrógeno, sin fosfatos y 0,5 ml de NaCl al 0,4%, con respecto al control. Esto se debe a que la microalga necesita N y P para crecer. Si alguno de estos macronutrientes son eliminados o reducidos, tiende a disminuir su crecimiento con respecto al control.

De todas las microalgas, cianobacterias y diatomeas estudiadas hasta el momento, *C. thermophila* es la más difícil de estresar en medio líquido, mientras que en medio sólido se aprecia una diferencia de color. Esto se debe a que después de algunas semanas en la fase estacionaria y sin reemplazo de nuevos nutrientes, el cultivo tornó de color verde amarillento a naranja rojizo (Figura 6), consecuencia de la producción de pigmentos como astaxantina, cantaxantina y luteína (Richmond, 1986: 84-85).

Según Wang Q (2019: 1295), los hábitats donde crecen las especies de *C. thermophila* (con estrés salino, término y exposición a la luz intensa) favorecen la producción de pigmentos y ácidos grasos. Esta cepa generalmente muestra una gran capacidad de supervivencia bajo tensiones foto-oxidativas extremas y por tanto se considera una buena candidata para la producción a gran escala de pigmentos naturales y biocombustibles.

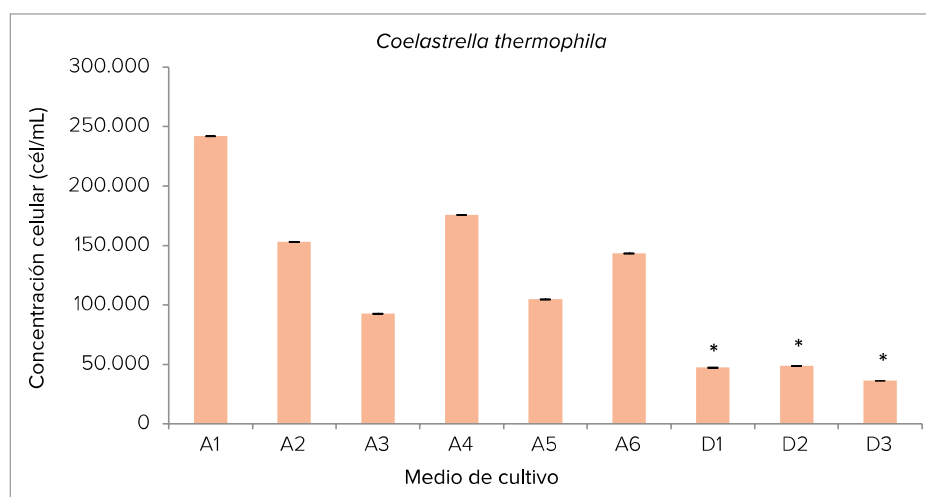


Figura 5. Concentración celular (cél/mL) de *Coelastrella thermophila* sometida a diferentes condiciones de cultivo, durante tres semanas. **A1:** Medio M8a (CT); **A2:** M8a sin nitrógeno; **A3:** M8a sin Nitrógeno y Fosfatos; **A4:** M8a con 0,25 mL NaCl al 0,4 %; **A5:** M8a con menos nitrógeno y con 0,25 mL NaCl al 0,4 %; **A6:** M8a con menos nitrógeno; **D1:** M8a sin nitrógeno y con 0,25 mL de NaCl al 0,4 %; **D2:** M8a con menos nitrógeno, sin fosfatos y 0,5 mL NaCl al 0,4 %; **D3:** M8a sin nitrógeno, sin fosfatos y con 0,5 mL NaCl al 0,4 %. Los resultados expresan la media de al menos 4 réplicas de un mismo cultivo y el error estándar de la media. * Representan diferencias significativas mediante un test de T de Student ($p < 0,05$).



Figura 6. Cambio de color verde amarillento a naranja rojizo del cultivo *Coelastrella thermophila*. Fotografía: Isabel Calvo.

3.3. Desarrollo de probetas

Se han analizado cualitativamente las propiedades de las microalgas utilizadas para su aprovechamiento en técnicas pictóricas. Así pues, estas presentan una gran similitud en cuanto a textura, ya que contienen una serie de sustancias con propiedades adhesivas, como los mucopolisacáridos, que favorecen la adhesión del material sobre una superficie. Además, estas microalgas contienen buenas características filmógenas, favoreciendo el desarrollo de una película tras su aplicación. En el caso de *C. thermophila*, a causa de su biotipología y altos porcentajes de ácidos grasos, genera una película ligeramente vítrea, mostrando buenas cualidades de mezcla y aplicación en técnica al óleo y con goma arábiga (acuarela). En cambio, su mezcla con acrílico fue más problemática, generando una masa poco fluida y con propiedades muy reducidas de tixotropía. Las cepas *Cyanosarcina sp* y *H. pluvialis*, tras su uso con diferentes aglutinantes, presentan características muy similares de trabajabilidad, fluidez, aplicabilidad y disolución. Con técnicas acuosas presentan una buena afinidad química, siendo fácilmente solubles. En el caso de la goma arábiga, desarrollan una excelente afinidad, debido a la matriz gelatinosa con grandes contenidos de exopolisacáridos que excretan ambas cuando se encuentran en situación de estrés (Hoys, 2019:140; Gil y Martínez-Ron, 2002). Sin embargo, en técnicas oleosas, concretamente con el empleo de aceite de linaza, no se han mezclado de forma sencilla con el aglutinante, dificultando su aplicabilidad en el soporte. De esta forma, tras su aplicación y secado, la microalga *Cyanosarcina sp* con aceite de linaza desarrolló un tipo de craquelado prematuro, siguiendo las líneas de la pincelada. Este hecho se debe muy probablemente a la falta de compatibilidad de materiales magros con grasos, que genera una diferenciación de tensión y tiempo de secado en la muestra.

3.3. Estudios de colorimetría

Tras someterse a los tratamientos de envejecimiento, las muestras estudiadas muestran un desvanecimiento del color bastante evidente a simple vista. Los resultados que se muestran a continuación corresponden a la diferencia de color antes del primer ciclo (semana 0) y después del último (semana 3), registrada en las muestras expuestas al exterior, siendo las más afectadas por el envejecimiento (Tabla 4). Según los datos recogidos, las condiciones atmosféricas de estas muestras son las siguientes: la HR alcanzó un valor máximo del 100% de HR en los días de lluvia, mientras que en los días más secos y soleados se registró una mínima del 12%. Las muestras estuvieron sometidas a valores altos de HR (80-100%) durante 84 horas repartidas en 8 días, mientras que en valores mínimos (10-20%) estuvieron 92 horas, repartidas en 9 días. En cuanto a la temperatura, alcanzó una máxima de 22 ± 2 °C durante 11 horas en total, divididas en 8 días. Los valores más bajos ($4-7$ °C) se dieron durante 69 horas repartidas en 17 días.

Tabla 4. Resultados de diferencia de color, croma y tono. Panel expuesto en exterior. Metodología: Ensayos de colorimetría

Dif. Semanas 0-3								
Color	Aglutinante	ΔE_{ab}	ΔE_{00}	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	Δcab	Δhab
Verde phtalo (PG7)	Sin aglutinante	6,5288	2,7037	-0,295935	6,514187	-0,321361	-6,489539	-1,142932
Verde phtalo (PG7)	Goma arábica	9,9189046	5,0433427	-2,972898	9,1470672	-2,424398	-9,326303	3,2500128
Verde phtalo (PG7)	Óleo	4,7607513	4,2835753	-4,337994	1,4166433	1,3563482	-1,393933	-5,028251
Verde phtalo (PG7)	Acrílico	1,0676226	1,2306484	-0,545761	0,9137294	0,0840323	-0,863145	5,2710352
Rojo alizarina (PR83)	Sin aglutinante	11,7656	8,3854	8,5125868	-7,726099	-2,50461	-8,108326	1,0407321
Rojo alizarina (PR83)	Goma arábica	1,7616	1,5423	-1,74669	0,1553412	0,1675758	0,206835	0,1392294
Rojo alizarina (PR83)	Óleo	3,5698	2,6430	-2,58998	2,0274527	1,3874697	2,3803342	1,0670849
Rojo alizarina (PR83)	Acrílico	3,2038	1,2426	0,0267269	-2,540188	-1,952151	-3,074875	-1,292495
Azul Índigo (PB6)	Sin aglutinante	2,1520432	0,839506	-0,228962	0,1514249	2,1344641	-1,962636	-1,353297
Azul Índigo (PB6)	Goma arábica	8,092916	4,7851378	0,5451959	4,9851747	6,3518568	-7,53855	6,6310522
Azul Índigo (PB6)	Óleo	2,2334503	2,1365216	2,0622721	-0,846637	0,1361636	0,2186032	-1,787814
Azul Índigo (PB6)	Acrílico	5,9651178	4,7228989	-4,544641	3,3516444	1,9223285	-2,998434	4,5176552
Coelastrella thermophila	Sin aglutinante	43,553428	29,353969	40,562153	4,5661192	-15,1909	-15,75566	-6,397195
Coelastrella thermophila	Goma arábica	42,248092	28,736529	40,192634	3,6353893	-12,4995	-12,91494	-5,393449
Coelastrella thermophila	Óleo	8,2109084	6,7821374	6,2395072	2,2959755	4,8183049	4,7114466	-7,767044
Coelastrella thermophila	Acrílico	26,123963	17,670566	25,709591	0,6960024	4,5819162	4,3653239	-4,459195
Cyanosarcina sp	Sin aglutinante	11,862242	9,8298241	11,601717	0,8213853	2,3320115	2,1501886	-2,427044
Cyanosarcina sp	Goma arábica	20,622015	15,249677	14,556646	14,21093	3,3795021	-13,77954	-31,73882
Cyanosarcina sp	Óleo	10,768604	7,7446655	9,4766287	5,1123483	0,1422351	-5,047957	-6,938254
Cyanosarcina sp	Acrílico	9,2963462	7,2939998	5,8643421	7,1248302	-1,126206	-7,207792	1,7072566
Haematococcus pluvialis	Sin aglutinante	14,221356	12,539319	14,204667	0,5686414	0,3886604	0,2923158	-1,215245
Haematococcus pluvialis	Goma arábica	40,639378	19,922545	7,335155	-2,735638	-39,8782	-39,9633	-3,891825
Haematococcus pluvialis	Óleo	13,986279	9,5978692	13,899937	1,0797326	1,1144225	0,8163687	-5,614376
Haematococcus pluvialis	Acrílico	9,5631601	13,302292	9,2834644	1,513796	-1,726193	-1,37876	9,8490802

Los cambios generados en los controles son mínimos respecto a los desarrollados en los colorantes algales tras su exposición a ciclos de envejecimiento. Las muestras que han presentado un mayor desvanecimiento del color corresponden a las aglutinadas con goma arábica. Por ejemplo, el verde de ftalocianina (PG7) muestra una diferencia del color $\Delta E_{00} = 5,0433427$, mientras que en muestras al óleo $\Delta E_{00} = 4,2835753$ y con acrílico $\Delta E_{00} = 1,2306484$, lo que indica que en el caso del verde de ftalocianina el color es más estable en muestras en acrílico. El rojo de alizarina (PR83) muestra unas diferencias de color algo mayores, por ejemplo, $\Delta E_{00}=1,5423$ con el aglutinante de goma arábica. En el caso de los controles PR83 y PG7, las diferencias de color son menos elevadas que la obtenida en el control azul (PG60): $\Delta E_{00} = 4,7851378$ para la técnica con goma arábica, $\Delta E_{00}= 2,1365216$ con óleo y $\Delta E_{00}= 4,7228989$ con acrílico.

En cuanto a los colorantes procedentes de las microalgas, los cambios cromáticos en *C. thermophila* son más perceptibles en las muestras sin aglutinante. La diferencia de color tras su exposición a envejecimiento natural es $\Delta E_{00}= 29,353969$. La diferencia de color se debe principalmente a la variación producida en la luminancia $\Delta L^*= 40,562153$ y en el croma $\Delta C_{ab}= -15,75566$ y variando su tono $\Delta b_{ab}= -6,397195$, adquiriendo así una tonalidad amarillenta. De este modo, las coloraciones se observan más blanquecinas, perdiendo gran parte de su saturación. Sin embargo, aquellas aglutinadas con aceite de linaza presentan una menor diferencia de color ($\Delta E_{00}= 6,7821374$), siendo el valor más bajo en comparación con el resto de aglutinantes y esta cepa. Así pues, *C. thermophila* ha mantenido su color más estable tras su aplicación con técnicas oleosas. Este hecho se evidencia por las grandes cantidades de aceites poliinsaturados que contiene esta microalga (Boutarfaet *al.*, 2022:8), que muestran afinidad con el aceite de linaza. Así pues, estos aceites actúan como una membrana protectora de los pigmentos, favoreciendo la conservación de los mismos y aumentando la solidez del color, ya que el aceite de linaza es conocido por sus buenas propiedades de resistencia a los agentes atmosféricos (Gottsegen, 2006: 205). En técnicas acuosas con aglutinante de goma arábica (Figura 7a), el desvanecimiento es más latente, siendo su diferencia de color $\Delta E_{00}= 28,736529$ y observándose una diferencia en croma de $\Delta C_{ab}= -12,91494$. Además, se aprecia una ligera variación en el ángulo, adquiriendo una coloración más amarillenta ($\Delta b_{ab}=-5,393449$). Con el acrílico ocurre algo parecido, aunque la variación del color es menor.

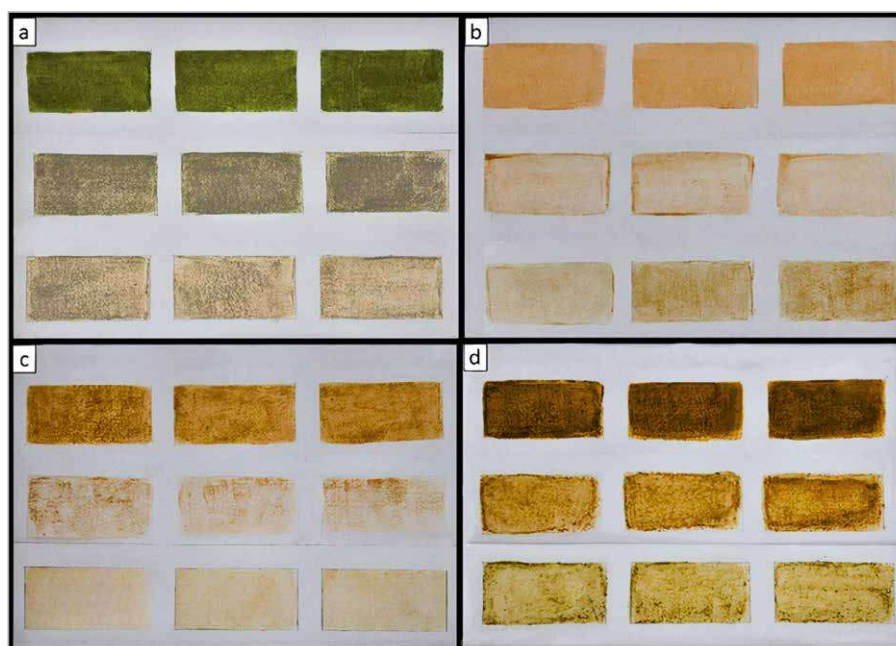


Figura 7. a. Resultados de diferencia de color con *Coelastrella thermophila*, aglutinante goma arábica. b. *Cyanosarcina sp.*, goma arábica. c. *H. pluvialis*, goma arábica. d. *H. pluvialis*, técnica al óleo. Fotografía: Isabel Calvo.

Respecto a *Cyanosarcinasp*, las diferencias de color son mucho mayores con el empleo de goma arábica (Figura 7b), mostrando una diferencia de color $\Delta E_{00}= 15,249677$, y una variación en el croma de $\Delta C_{ab}= -13,77954$, mostrándose la muestra mucho menos saturada. En técnica al óleo, existe una variación del color $\Delta E_{00}= 7,7446655$ y de croma de $\Delta C_{ab}= -5,047957$, variando a su vez el tono y adquiriendo una tonalidad amarillenta.

Las variaciones del color en *H. pluvialis*, al igual que ocurre con *C. thermophila*, son mayores en aquellas mezcladas con goma arábica (Figura 7c): $\Delta E_{00}= 19,922545$, perdiéndose gran parte del pigmento y dejando visible el color blanco del soporte subyacente. En el caso de las técnicas aplicadas al óleo (Figura 7d) se aprecia una diferencia en el ángulo de tono, ya que la muestra adquiere una tonalidad amarillenta ($\Delta b_{ab}= -5,614376$).

Esta cepa, *Cyanosarcina sp*, presenta los valores más reducidos de diferencia de color tras su envejecimiento en comparación con el resto de los resultados obtenidos a partir de las coloraciones procedentes de las microalgas. Los motivos apuntan a la naturaleza de la misma, una cianobacteria primitiva que ofrece grandes propiedades de resistencia ante los factores atmosféricos (Gil y Martínez-Ron, 2002). Además, contiene escitonemina, sustancia que actúa como protector frente a altas dosis de irradiación (García-Pichel y Castenholz, 1991: 1). Entre las tres algas estudiadas, *H. pluvialis* es la que muestra un mayor porcentaje del desvanecimiento del color en todas las muestras realizadas con diferentes aglutinantes. Este hecho se evidencia con mayor claridad en técnicas acuosas. En el caso de *C. thermophila*, sufre una degradación muy similar, ofreciendo los mejores resultados de resistencia y variación del color en técnicas grasas.

Finalmente, basándonos en las indicaciones del protocolo ASTM 4303-3 para definir la solidez de las coloraciones obtenidas a partir de las microalgas, su clasificación tendría una categoría de «Lightfastness V».

4. Conclusiones

Las microalgas *Coelastrrella thermophila*, *Haematococcus pluvialis* y *Cyanosarcina sp*, que frecuentemente proliferan en sitios artístico-culturales, son buenas candidatas para ser aprovechadas con el fin de desarrollar pigmentos utilizables en técnicas artísticas, debido a la variedad de coloraciones que ofrecen y los diferentes metabolitos que excretan. En este sentido destaca sobre todo la cianobacteria, que por su genética muestra gran resistencia ante condiciones climatológicas extremas, siendo el organismo que mejores resultados ha mostrado en cuanto a la persistencia del color y estabilidad ante los factores de degradación. Actualmente, los ensayos para el progreso de esta investigación se encuentran en fase de desarrollo, implementando diversas formas de estabilización mediante síntesis química y la adición de diversos aditivos. Por lo tanto, los resultados obtenidos no deberían ser considerados concluyentes, pero sí marcan una guía para el desarrollo óptimo de diferentes pigmentos y colorantes a través de microalgas y el conocimiento de sus propiedades para su utilización en técnicas artísticas.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Junta de Andalucía (Plan andaluz de investigación, desarrollo e innovación PAIDI 2020, Programa FEDER) la financiación del Proyecto P18-FR-4477: «Aplicación avanzada de las algas procedentes de la Alhambra y el Generalife en técnicas artísticas y de conservación – restauración», conocido con el acrónimo FICOARTE II.

Bibliografía

- ABALDE, J., OROSA, M., TORRES, E. *et al.* (1999): «La microalga *Haematococcus* como fuente de Astaxantina». *Biotecnología y aplicaciones de organismos pigmentados*, 5 (4), pp. 95-117.
- ARREDONDO-VEGA B. O. y VOLTOLINA. D. (2007): *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. La Paz B.C.S., México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
- BHATTACHARJEE, M. (2016): «Pharmaceutically valuable bioactive compounds of algae». *Asian J Pharm Clin Res*, 7, pp. 43-47.
- BOLÍVAR-GALIANO, F. (1994): *Diagnosis y tratamiento del deterioro por microalgas en los palacios nazaríes de la Alhambra*. Tesis doctoral inédita. Universidad de Granada, Granada.
- (2003): «Pintura Algal: Paralelismos entre comunidades microalgales y técnicas pictóricas. ¿Pudo ser la primera pintura?». *ALGAS. Boletín de la Sociedad Española de Ficología*, 30, pp. 9-12.
- BOLÍVAR-GALIANO, F. y SÁNCHEZ-CASTILLO, P. (1995): «Preliminary results on the study of the algal biodeterioration within the Alhambra (Granada, Spain)». En: Bousher, A., Chandra, M., Edyvean, R. (eds.) *Biodeterioration and Biodegradation*. Reino Unido: Institution of Chemical Engineers, pp. 210-216.
- BOLÍVAR-GALIANO, F., ABAD-RUIZ, C., SÁNCHEZ-CASTILLO, P. *et al.* (2020): «Frequent Microalgae in the Fountains of the Alhambra and Generalife: Identification and Creation of a Culture Collection». *Applied Science*, 10 (18), p. 6603.
- BOLÍVAR-GALIANO, F., CONTRERAS, R. y YEBRA, A. (2002): «Aplicación de técnicas colorimétricas para el desarrollo de pigmentos pictóricos no convencionales». En: *VI Congreso Nacional del Color*. Sevilla: Universidad de Sevilla, pp. 151-152.
- BOUTARFA, S., MOURAD, M., GONZÁLEZ-SILVERA, D. *et al.* (2022): «The Green Microalga *Coelastrella thermophila* var. *Globulina* (Scenedesmaceae, Chlorophyta) Isolated from an Algerian Hot Spring as a Potential Source of Fatty Acids». *Life (Basel)*, 12 (4), p. 560.
- BRUCE, M. (2015): *Handprint*. Disponible en: <https://www.handprint.com/HP/WCL/waterb.html> [Consulta: 18 de noviembre de 2022].
- BUENO, M., MARCÍLIO, T., MOROCHO, A. *et al.* (2017): «Cosmetic attributes of algae- A review». *Algal research*, 25, pp. 483-487.
- CAMPANINI, O., NAPOLEAO, R. V., ENGRACIA, D. *et al.* (2017): «Photoprotective potential of metabolites isolated from algae-associated fungi *Annulohyphoxylonstygium*». *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 178, pp. 316–322.
- CHAND, T. y SINGH, S. (2012): «Microbially induced deterioration of architectural heritages: routes and mechanisms involved». *Environmental Sciences Europe*, 24 (1), p. 36.
- COLE, A., NEVEUX N., WHELAN, A. *et al.* (2016): «Adding value to the treatment of municipal wastewater through the intensive production of freshwater macroalgae». *Algal research*, 20, pp. 100-109.
- COMMISSION INTERNATIONALE DE L'ÉCLAIRAGE (CIE) (2004): *CIE 15:2004. Colorimetry (Technical report)*. Tercera edición. Viena: CIE Central Bureau.
- DE SOUZA, M., HOELTZ, M., GRESSLER, P. *et al.* (2018): «Potential of Microalgal Bioproducts: General Perspectives and Main Challenges». *Waste and Biomass Valorization*, 10, pp. 2139-2156.
- ERIKSEN, N. (2008): «Production of phycocyanin - a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine». *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, pp. 1-14.

- FERNÁNDEZ, D., CAMILA, A. y PIMIENTA, W. (2013): «Incidencia del nitrógeno en la producción de biomasa y ácidos grasos de la microalga *Chlorellavulgaris* en un fotobiorreactor de panel plano a escala laboratorio». *Revista de investigación en Biotecnología. Fundación Universidad de América*, 6 (1), pp. 1-17.
- GARCÍA-MORALES, J., LÓPEZ, J. A., MEDINA, D. *et al.* (2022): «Efecto del estrés por nitrógeno y salinidad en el contenido de β -caroteno de la microalga *Dunaliella tertiolecta*». *Biotecnia*, 22 (2), pp. 13-19.
- GARCÍA-PICHEL, F. y CASTENHOLZ, R. (1991): «Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment». *An internacional journal of algal research*, 27 (3), pp. 395-409.
- GAYLARDE, C. y MORTON, L. (1999): «Deteriogenic biofilms on buildings and their control: a review». *Biofouling*, 14 (1), pp. 59-74
- GIL, P y MARTÍNEZ-ROD, A. (2002): *Proyecto agua*. Disponible en: <https://www.flickr.com/photos/microagua/3840711896/in/photostream/> [Consulta: 25 de septiembre de 2022].
- GOTTSEGEN, M. (2006): *Painter's Handbook: Revised and Expanded*. United States of America: Watson-Guption.
- GUIRY, M. D. (2022): *Algae Base*. Disponible en: <https://www.algaebase.org> [Consulta: 29 de septiembre de 2022].
- HALI, E., VORISEK, F., DOWD, S. *et al.* (2022): «Formation of Lutein, β -Carotene and Astaxanthin in a *Coelastrella* sp. Isolate». *Molecules*, 27 (20), p. 6950.
- HOYS, C. (2019): *Análisis de metabolitos de Haematococcus pluvialis en cultivo continuo durante la acumulación de astaxantina*. Tesis doctoral inédita. Universidad de Sevilla, Sevilla.
- KOLESKE, J. (2012): *Paint and Coating Testing Manual: 15th Edition of the Gardner-Sward Handbook*. 15ª edición. Virginia: ASTM International.
- LANCHEROS, A., DÍAZ, E. y CAMACHO, K. (2021): «Producción de astaxantina en *Haematococcus pluvialis* bajo factores de estrés salino utilizando un biorreactor de 5 L». *Mutis*, 11 (2), pp. 64-83.
- LUO, M., CUI, G. y RIGG, B. (2001): «The Development of the CIE 2000 Colour-Difference Formula: CIEDE2000». *Color Research&Application*, 26 (5), pp. 340-350.
- MAY, E. (2011): «Bioremediation of Algal Contamination on Stone». En: Charola, A. E., McNamara, C. y Koestler, R. J. (eds.) *Biocolonization of Stone: Control and Preventive Methods*. Washington: Smithsonian, pp. 59-70.
- MAYER, R. (1985): *Materiales y técnicas del Arte*. Madrid: Hermann Blume.
- NABTI, E., JHA, B. y HARTMANN, A. (2017): «Impact of seaweeds on agricultural crop production as bio-fertilizer». *International Journal of Environmental Science and Technology*, 14 (5), pp. 1119-1134.
- PAVEZ, J., CABRERA, F. y AZÓCAR, L. (2015): «Ultrafiltration of nonaxenic microalgae cultures: Energetic requirements and filtration performance». *Algal Research*, 10 (1), pp. 121-127.
- PÉREZ-VILLARES, N. (2017): *Modelo de Superficies de Respuesta para la Limpieza de Pintura al Óleo. Influencia del barniz, del envejecimiento, de la naturaleza de los pigmentos y de la composición del limpiador*. Tesis doctoral inédita. Universidad de Granada, Granada.
- RICHMOND, A. (1986): «Cell response to environmental factors». En: *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Florida: CRC Press Inc. Boca Raton, pp. 69-99.
- RODRÍGUEZ, R., SÁNCHEZ, Y., ZUMALACÁRREGUI, L. M. *et al.* (2016): «Obtención de biomasa de microalga *Chlorellavulgaris* en un banco de prueba de fotobiorreactores de columna de burbujeo». *Afinidad IQS*, 73 (574), pp. 125-129.

- ROSALES-LOAIZA, N. (2017): «Cultivos a cielo abierto de las cianobacterias Nostoc LAUNOO15 y Anabaena MOF025 para la producción de biomasa enriquecida. Pruebas piloto para cultivos masivos». *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 48 (3), pp. 81-86.
- ROWAN, S. (1984): *Photosynthetic Pigments of Algae*. Cambridge: Cambridge University Press.
- SAMEÑO, M. (2018): *El biodeterioro en edificios del patrimonio cultural. Metodología de evaluación de tratamientos biocidas*. Tesis doctoral inédita. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla, Sevilla.
- SARADA, R., TRIPATHI, U. y RAVISHANKAR, G. A. (2002): «Influence of stress on astaxanthin production in Haematococcus pluvialis grown under different culture conditions». *Process Biochemistry*, 37 (2), pp. 623–627.
- SCHEERER, S., ORTEGA-MORALES, O. y GAYLARDE, C. (2009): «Microbial deterioration of stone monuments, an updated overview». *Advances in applied microbiology*, 66 (2), pp. 97-139.
- STENGEL, D., CONNAN, S. y POPPER, Z. (2011): «Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application». *Biotechnology advances*, 29, pp. 483-501.
- SUDHAKAR, K., MAMAT R., SAMYKANO, M. *et al.* (2018): «An overview of marine macroalgae as biore-source». *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 91, pp. 165-179.
- VERA-LÓPEZ, F. y MARTÍNEZ, A. (2021): «Pigmentos en microalgas: funciones, aplicaciones y técnicas de sobreproducción». *Biotecnología y Bioingeniería A.C.*, 5 (5), pp. 36-51.
- WANG, Q., SONG, H., LIU, X. *et al.* (2019): «Morphology and molecular phylogeny of coccoid green algae Coelastrellasensulato (Scenedesmaceae, Sphaeropeales), including the description of three new species and two new varieties». *Journal of Phycology*, 55 (6), pp. 1197-1415.