

Estudio tridimensional de la microfractografía en materiales geológicos mediante microscopía láser confocal

ÁNGEL MARTÍNEZ NISTAL (*); MODESTO MONTOTO SAN MIGUEL (**)

RESUMEN La microscopía láser confocal es una nueva técnica de observación microscópica que está logrando excelentes resultados en diversas ramas de la ciencia, principalmente en el campo de la biomedicina. Su éxito se debe a las indudables ventajas que ofrece frente a la microscopía óptica tradicional (imágenes de mayor nitidez y contraste, mayor resolución vertical y horizontal) y, sobre todo, a la posibilidad de obtener "secciones ópticas", lo que permite realizar estudios tridimensionales sin necesidad de seccionar la muestra. Por consiguiente, mediante una sencilla preparación de la muestra (impregnación con fluoresceína) es posible obtener una imagen de la distribución tridimensional de la red microfractográfica, siendo posible, además, observar fisuras que no aparecen en la superficie de la muestra y estudiar detalles de su geometría como: orientaciones, rugosidad, conectividad etc.

Pese a las indudables ventajas que ofrece la microscopía láser confocal, su utilización dentro del campo de los materiales geológicos todavía es escasa. En este trabajo se realiza una descripción de las principales características de este tipo de microscopía presentándose su aplicación en el estudio de la red microfisural en una roca granítica.

THREE-DIMENSIONAL STUDY OF MICROFRACTOGRAPHY IN GEOLOGICAL MATERIALS USING CONFOCAL LASER MICROSCOPY

ABSTRACT Confocal laser microscopy is a new microscopic observation technique which is producing excellent results in diverse branches of science, principally in the biomedical field. Its success is due to the undoubted advantages it offers compared to traditional optical microscopy (greater definition and contrast in the images obtained and higher resolution, both vertical and horizontal) and, above all, to the possibility of obtaining "optical sections", which enables three-dimensional studies to be effected without having to section the sample. As a result, following a simple preparation of the sample (impregnation with fluorescein), it is possible to obtain a three-dimensional image of the distribution of the microfractographic patterns, and also to observe fissures that do not appear on the surface of the sample and study details of its geometry such as orientations, rugosity, connectivity, etc.

Despite the undeniable advantages to be gained from the use of confocal laser microscopy, its utilisation within the field of geological materials is still scant. In this work, a description is given of the principal characteristics of this type of microscopy, along with its application in the study of the microfissure patterns within a granite rock.

Palabras clave: Microscopía láser confocal; Microfisuración; Rocas; Reconstrucción tridimensional.

1. INTRODUCCIÓN

Las microfisuras constituyen uno de los componentes petrográficos que más influye en las propiedades físicas de las rocas. En el caso concreto de los estudios sobre almacenamiento de residuos radiactivos en macizos rocosos la microfisuración juega un papel muy importante. Está ampliamente admitido que las microfisuras abiertas, los feldspatos alterados y los fenómenos de absorción en las superfi-

cies minerales provocan un mecanismo de retención en la migración de radionúclidos hacia el exterior del macizo rocoso (Neretkiens, 1980; Heath et al. 1992; Montoto et al. 1996). Igualmente los espacios vacíos de la textura de las rocas (poros y fisuras) representan la zona de actuación preferente de los fenómenos físico-químicos y biológicos de alteración en las rocas ornamentales (Fitzner, 1990). Por consiguiente, el estudio y cuantificación de la red microfisural es de fundamental importancia en la determinación de las propiedades físicas de los materiales rocosos.

La microscopía láser confocal (MLC) es una nueva técnica microscópica que presenta evidentes ventajas frente a la microscopía óptica tradicional. Su mayor resolución y contraste y sobre todo la posibilidad de analizar tridimensionalmente la muestra sin necesidad de destruirla, mediante la realización de secciones ópticas, es lo que ha hecho de este

(*) Doctor en Geología. Analista del Servicio de Proceso de Imágenes de la Universidad de Oviedo.

(**) Catedrático de Petrología y Geoquímica de la facultad de Geología de la Universidad de Oviedo.

tipo de microscopía una técnica ampliamente utilizada en los campos de la biología y la medicina. Sin embargo su utilización en el campo de la geología y de los materiales en general, ha sido y es todavía bastante escasa.

Scott (1989) describe las ventajas de la MLC en el estudio de microfósiles, minerales metálicos y rocas; Knoester y Brakenhoff (1990) muestran las posibilidades de la MLC en el estudio de determinados materiales industriales como fibra óptica y polímeros; Petford & Miller (1990, 1992, 1993) presentan la utilización de la MLC para el estudio tridimensional de "fission tracks" producidas por U^{238} en granos de apatita; Petford (1993) describe las posibilidades de la MLC para la realización de estudios del relieve de las superficies de granos minerales. Más recientemente Friedrich et al. (1995) realizan un estudio tridimensional del espacio poroso en materiales geológicos mediante MLC y Montoto et al. (1995) presentan una detallada aplicación de la MLC al estudio de la microfractografía de rocas graníticas.

En el presente artículo se describen las posibilidades de la microscopía láser confocal en el estudio de la microfractografía de materiales rocosos. Esta técnica microscópica, en combinación con técnicas de proceso digital de imágenes va a permitir la realización de un estudio tridimensional de la red microfractográfica.

2. MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL (MLC)

La mayor parte de las muestras de materiales geológicos observadas con microscopía óptica son traslúcidas o, en el caso de ser opacas, su superficie de reflexión no se encuentra perfectamente pulida. En ambos casos la luz interacciona con la muestra a varias profundidades por lo que la imagen que llega al observador presenta áreas borrosas debidas a la luz procedente de zonas fuera del plano de enfoque, lo que produce una degradación en el contraste y resolución de la imagen.

El principio de la microscopía confocal, postulado por Minsk en 1958, se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco. Para ello se ilumina una pequeña zona de la muestra y se toma el haz luminoso que proviene del plano focal, eliminándose los procedentes de los planos inferiores y superiores (Boyde, 1988). Esto se logra utilizando una fuente de luz intensa (láser) que es enfocada en un punto de la muestra mediante la lente de un objetivo. Trabajando en epi-iluminación, la señal emitida por el punto iluminado (fluorescencia o luz reflejada) vuelve por el mismo camino óptico, pasa a través de un espejo dicróico y es enfocada en un fotomultiplicador; un diafragma o "pinhole" es colocado delante del fotomultiplicador para eliminar las señales procedentes de la zona fuera de foco (Figura 1).

Un conjunto de filtros de emisión y excitación permiten seleccionar la longitud de onda deseada cuando se trabaja con diferentes tipos de impregnaciones fluorescentes.

La utilización de un láser como fuente de luz permite enfocar la iluminación en una región muy pequeña de la muestra y con una gran intensidad.

Dado que sólo se ilumina una pequeña zona de la muestra (punto o línea), para poder visualizarla se necesita un sistema de barrido que permita el muestreo "puntual" de esa zona y un sistema de formación de la imagen donde se recoja la información de cada uno de éstos. La emisión de fluorescencia producida por la muestra es recogida en un fotomultiplicador donde se transforma en una señal de vídeo que se digitaliza y almacena en un ordenador, visualizándose a través de un monitor. Algunos sistemas cuentan con

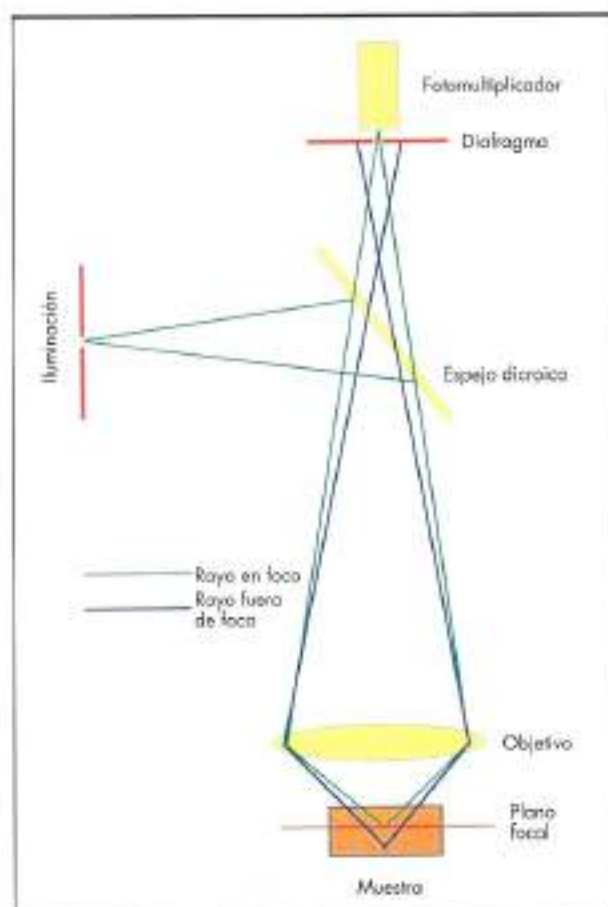


FIGURA 1. Esquema del principio de la microscopía confocal. La luz procedente de los puntos fuera del plano focal es eliminada por el diafragma mientras que la luz procedente del punto en el plano focal llega al fotomultiplicador a través de su abertura.

dos o tres fotomultiplicadores y un sistema óptico que permite recoger en cada uno de ellos diferentes longitudes de onda.

En la Figura 2 se muestra el esquema de un microscopio láser confocal. Consta básicamente de: una fuente de iluminación (rayo láser), dos fotomultiplicadores para recoger la fluorescencia y un mecanismo para desplazar la muestra en vertical. El sistema utiliza un ordenador con una tarjeta digitalizadora que recoge las señales de vídeo generadas por los dos fotomultiplicadores y mediante sendos convertidores analógico/digital las transforma en imágenes digitalizadas que son visualizadas en un monitor RGB. Un ordenador PC 486, con su correspondiente software de adquisición y proceso de imágenes, es utilizado para capturar, procesar y analizar las imágenes. El sistema puede ser complementado con una unidad de disco óptico para el almacenamiento de imágenes y una vídeo impresora en color para la realización de copias en papel.

Las principales ventajas de la microscopía confocal frente a la microscopía óptica de fluorescencia son las siguientes:

- **Mayor resolución.** Para un objetivo de inmersión en aceite con una apertura numérica de 1.4 y una longitud de onda de 442 nm es posible alcanzar resoluciones de 0.14 μ m en horizontal y 0.23 μ m en vertical (Wilson, 1990).

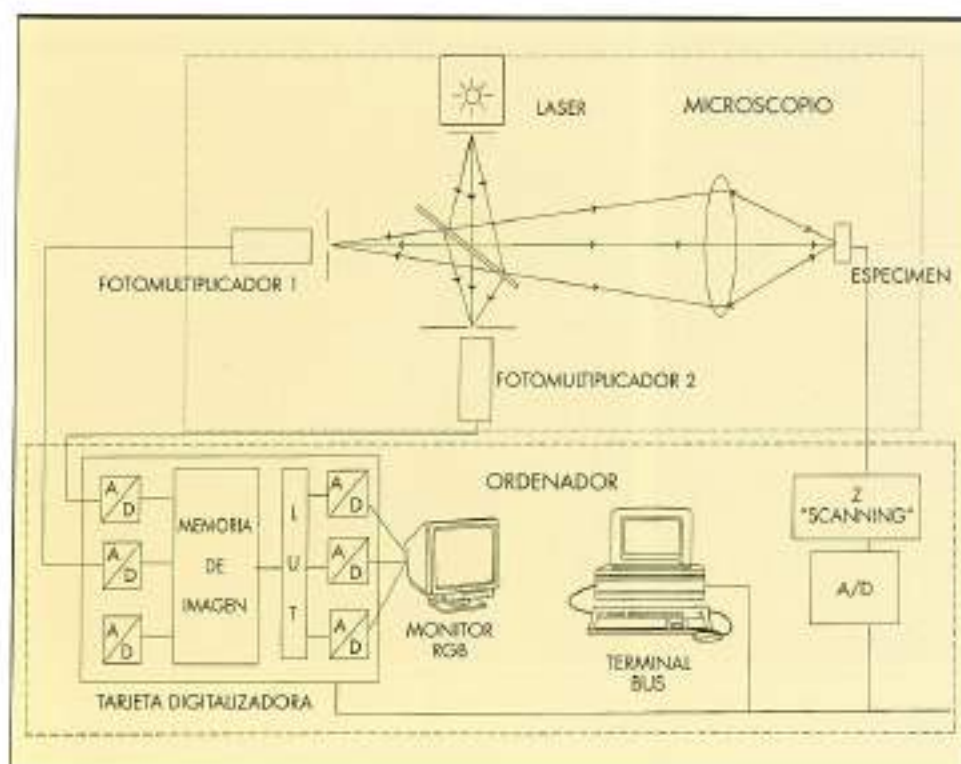


FIGURA 2. Esquema básico del microscopio confocal CLSM Bio-Rad MRC con sus dos principales componentes: el sistema de microscopía y el ordenador de control.

- **Mayor contraste.** Debido a que se elimina la luz procedente de las zonas fuera de foco.
- **Posibilidad de realizar secciones ópticas.** Variando el plano de enfoque, el sistema es capaz de tomar imágenes bidimensionales a diferente profundidad en el seno de la muestra; esto permite obtener información tridimensional sin necesidad de realizar cortes seriados.
- **Análisis de imágenes.** Al obtenerse la imagen de modo electrónico es posible digitalizarla y aplicar sobre ella toda una serie de técnicas de análisis de imágenes como: realce de imágenes para mejorar su calidad, combinación de imágenes para comparar cambios en el tiempo, medida de intensidades, medidas de tamaño, forma, etc.
- **Reconstrucción 3D.** A partir de las secciones ópticas es posible aplicar técnicas de reconstrucción 3D que permiten una visualización de las estructuras inédita hasta ahora.

El sistema de barrido punto a punto ("scan") utilizado en el MLC comporta una serie de ventajas adicionales como son:

- Posibilidad de obtener imágenes perpendiculares al plano XY barriendo la misma línea a diferentes profundidades.
- Aumentar la resolución mediante zoom del área a barrer tomando mayor número de puntos en áreas más pequeñas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha estudiado la microfractografía de una roca cristalina (Granito de El Berrocal, Toledo). Se trata de un granito de grano medio-grueso, heterogranular y alotriomórfico compuesto mayoritariamente por cuarzo (43%), feldespato potásico (17%), plagioclasas (29%), moscovita (9%) y biotita (2%)

además de una serie de minerales accesorios (Pérez del Villar & de la Cruz, 1989).

El estudio de la microfractografía implica una cuidadosa preparación de la muestra con el fin de evitar la producción de "artefactos" morfológicos (Montoto et al., 1981). Para ello se ha tomado un pequeño volumen de muestra (1-2 cm de espesor), procediéndose a continuación a impregnar la red microfisural con una resina teñida con Rodamina B. Esta impregnación se ha realizado primeramente en vacío y a continuación sometiendo la muestra a una presión de 10 MPa. Las superficies de la muestra impregnada se han cortado con una sierra de baja deformación a fin de evitar los citados "artefactos". Finalmente la muestra ha sido pulida hasta obtenerse un lámina de 150 µm de espesor con una rugosidad superficial < 1 µm. La orientación de la muestra de roca con respecto a su posición original en el macizo rocoso, es conocida, pudiendo por tanto realizarse estudios de orientación y buzamiento de la red fisural.

El sistema de microscopía láser confocal utilizado ha sido un Bio-Rad MRC-600 CLSM (Bio-Rad Laboratories, S.A., Madrid) compuesto por:

- Microscopio invertido Olympus IMT-2.
- Unidad confocal con: láser multilinea kriptón/argón como fuente de iluminación, sistema automático de desplazamiento de la muestra en z y dos fotomultiplicadores (Figura 2).
- Ordenador PC compatible, con procesador Intel 486 (60 Mhz), 8 Mb de RAM, tarjeta procesadora de imágenes, disco duro de 170 Mb y lector de discos magneto-ópticos Sony RMO S-350.

Para la adquisición y proceso de imágenes se utilizaron los paquetes de software COMOS y MPL (Bio-Rad Laboratories S.A.) incluidos en el sistema confocal.

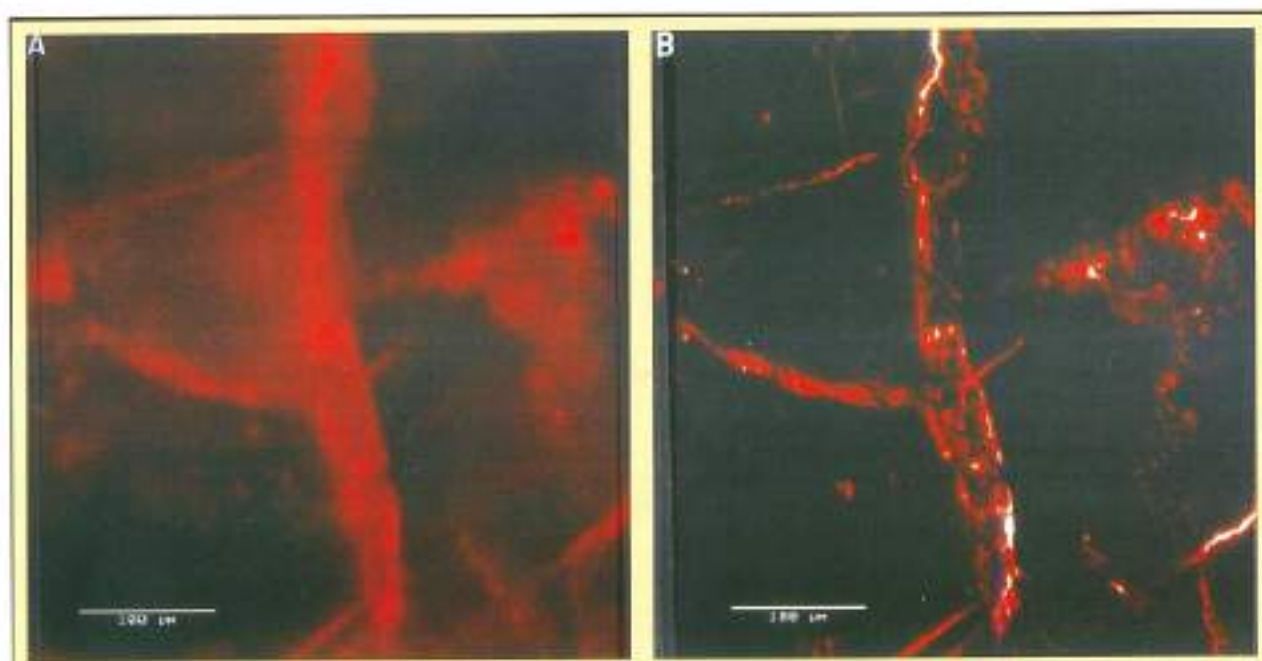


FIGURA 3. Imagen de una zona de fisuras en una roca granítica tomada con microscopía óptica de fluorescencia (a) y la misma zona observada con microscopía láser confocal (b). Obsérvese la mayor resolución de esta última imagen.

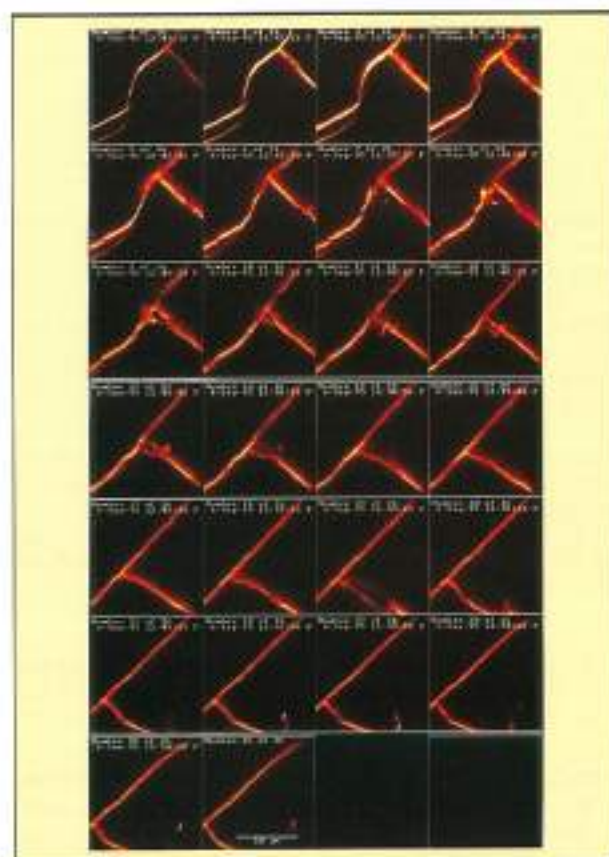


FIGURA 4. Serie de 26 secciones ópticas tomadas con MLC, correspondientes a la red microfractográfica de una roca granítica. La distancia entre secciones es de 4 µm. El tamaño de cada sección es de 512 x 512 pixels con una resolución de 0.178 µm.

La cuantificación de las imágenes y las reconstrucciones 3D se realizaron en un ordenador SUN 4/330 (SUN Microsystems) equipado con un procesador de imágenes IMCO 1000 (Kontron Electronic GmbH), utilizándose los paquetes de proceso de imágenes: Geojars (Microm España S.A), complementado con nuevas funciones para el cálculo de parámetros petrográficos (Martínez-Nistal, 1993) y Khoros 2.02 (Khoros Research Inc.).

Las imágenes se han obtenido utilizando la línea azul de emisión del láser (488 nm). Todas las observaciones han sido realizadas con un objetivo 100X NA 1.3 de inmersión en aceite.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tal como ya se ha mencionado en comparación con la microscopía de fluorescencia la MLC presenta un mayor poder de resolución. La figura 3 presenta una misma zona de muestra observada con microscopía de fluorescencia y con MLC. La imagen confocal presenta una resolución superior porque en ella aparece información de un único plano focal mientras que en la imagen de fluorescencia se tiene información procedente de distintos planos focales.

Las secciones ópticas longitudinales (x-y) se obtuvieron localizando la posición inicial y final de la zona a analizar y programando el sistema para tomar un número determinado de imágenes entre ambas posiciones. En todos los casos la distancia entre secciones es constante, pudiendo aumentarse o disminuirse dicha distancia en función del grado de detalle que se pretenda conseguir. Si se representa la imagen en tres dimensiones como $I(x, y, z)$, entonces enfocando a la posición z_1 se obtiene la imagen $I(x, y, z_1)$. Teóricamente se podrían obtener secciones para cualquier valor de z , pero en la realidad no sucede así porque la sección óptica no es infinitamente delgada, en cambio sí que es posible tomar secciones ópticas con variaciones de z lo suficientemente pequeñas como para tener la información tridimen-

sional de la muestra. La máxima profundidad a la que se puede llegar depende de la transmitancia del láser en los diferentes minerales de la roca. En cuarzo es posible alcanzar profundidades de hasta 300 μm , en feldespatos el poder de penetración del láser depende de su grado de alteración, aunque profundidades de 100-130 μm son fácilmente alcanzables (Montato et al, 1995).

La figura 4 muestra un conjunto de 26 secciones tomadas con una distancia de 4 μm entre secciones. El tamaño de cada una de las imágenes es de 512 x 512 pixels con una resolución de 0.178 μm por pixel. El volumen de roca analizado ha sido de 91 x 91 x 104 μm^3 . En cada una de las sec-

ciones la imagen aparece perfectamente enfocada. Según esto es posible extender la profundidad de foco del microscopio integrando la información suministrada por cada una de las secciones. Esta imagen es denominada "extended focus" (Wilson, 1990).

La figura 5 corresponde a la imagen "extended focus" de las secciones de la figura 4. Cada pixel de esta imagen representa la máxima intensidad de los valores correspondientes a los pixels localizados en la misma posición x-y en el conjunto de las secciones de la serie.

Si en lugar de construir una imagen donde cada pixel representa la máxima intensidad a lo largo del eje z, se cons-

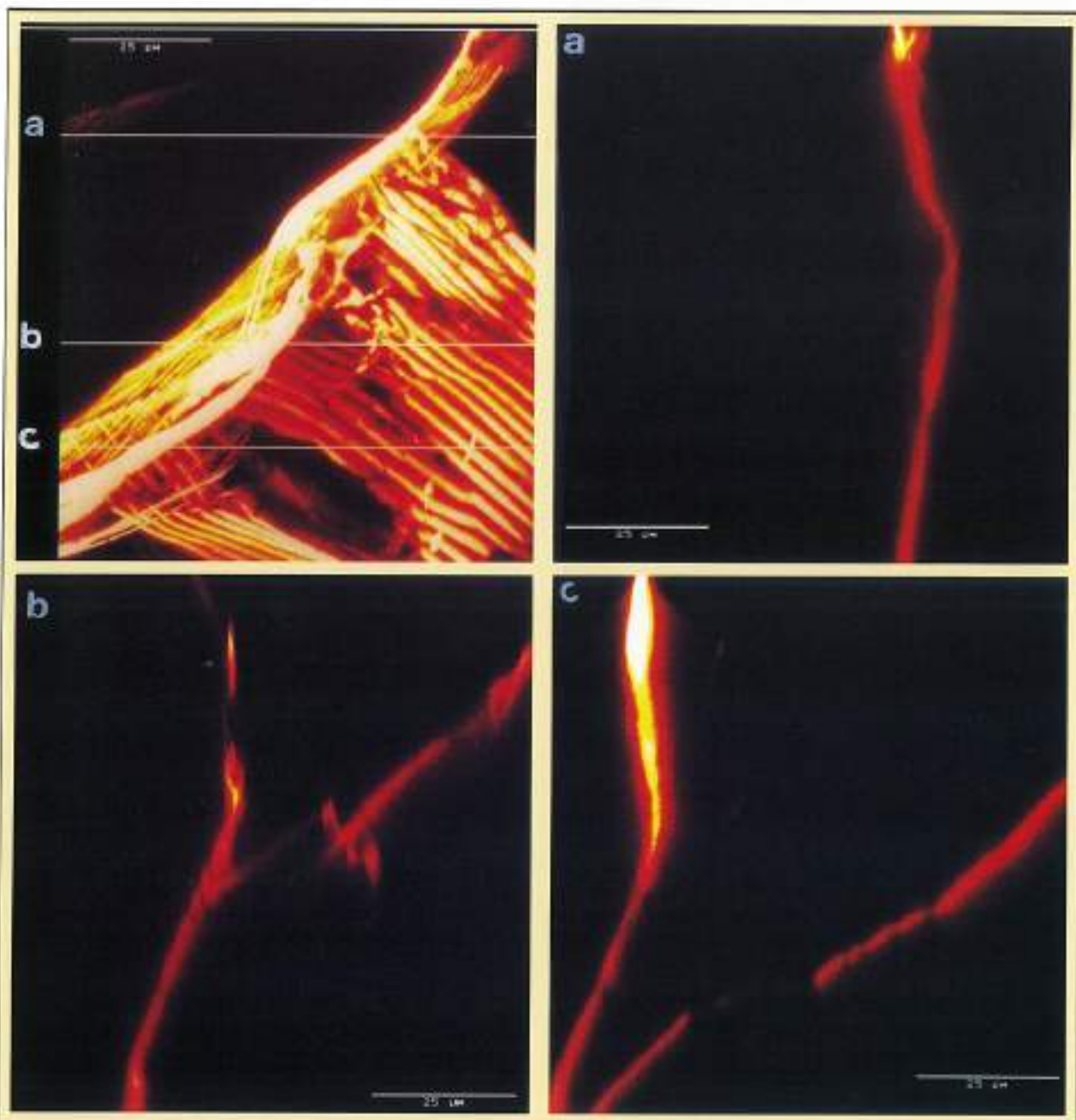


FIGURA 5. Imagen "extended focus" y secciones transversales (x-z). La imagen "extended focus" está formada por la proyección de las 26 secciones de la figura 4. Las líneas horizontales a, b y c señalan las posiciones en las que se realizaron las correspondientes secciones transversales.

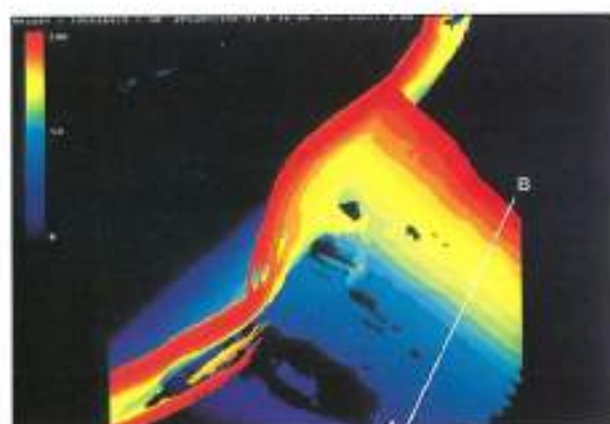


FIGURA 6. Imagen topográfica correspondiente al volumen de muestra analizado. En la zona superior izquierda se representa la escala de colores con el valor de altitud correspondiente a cada color. La línea blanca de la zona inferior derecha ha sido trazada para calcular la rugosidad del plano de fisura, los valores de rugosidad obtenidos a lo largo de esta línea pueden verse en la figura 7.

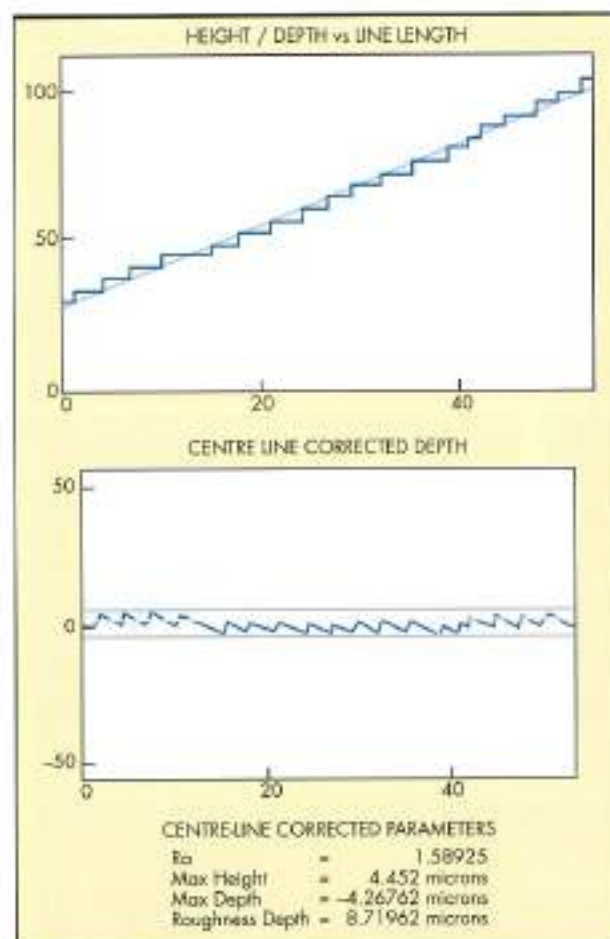


FIGURA 7. Gráficas para el cálculo de la rugosidad obtenidas a partir del segmento AB trazado sobre la imagen topográfica (figura 6). La gráfica superior representa los valores de altitud para cada uno de los puntos del segmento, la línea recta corresponde a la recta de ajuste de dichos valores. La gráfica inferior corresponde al perfil de altitudes corregido por la línea de ajuste, mostrándose los límites superior e inferior de la rugosidad.

truye de forma que a cada pixel perteneciente a la zona de fisuras se le asigna el valor correspondiente a su altitud, se obtiene una imagen de la orografía de las fisuras. Esta imagen es denominada imagen topográfica por ser equivalente a un mapa topográfico (figura 6). Cada color correspondería a una curva de nivel tomada a diferente altitud, desde rojo (100 μm) a azul oscuro (0 μm). Esta imagen permite un mejor conocimiento de la distribución de las fisuras en profundidad.

El sistema de formación de la imagen mediante barrido del láser permite la realización de secciones transversales en el plano x-z fijando la línea de barrido en una posición y desplazando la muestra verticalmente a lo largo del eje z. Para obtener la misma resolución que en las secciones x-y la distancia entre líneas debería de ser de 0.178 μm pero dado que el mínimo desplazamiento permitido por el sistema es de 0.2 μm éste ha sido el utilizado. En la figura 5 se muestran tres secciones transversales (x-z) de la zona de estudio, tomadas en las posiciones a, b y c marcadas en la imagen "extended focus". En la sección a se observa una única fisura vertical mientras que en las secciones b y c aparece una segunda fisura con una pendiente más tumbada que se cruza con la anterior.

5. CUANTIFICACIÓN DE IMÁGENES Y RECONSTRUCCIÓN TRIDIMENSIONAL

A partir de la imagen topográfica es posible la cuantificación de una serie de parámetros del plano de fisura como son: la rugosidad, la pendiente y la orientación.

Para el cálculo de la rugosidad se ha utilizado una función del programa COMOS del propio microscopio confocal. Mediante esta función, que trabaja como un perfilómetro, es posible trazar una línea a lo largo del plano de fractura (figura 6) obteniéndose dos gráficas y una serie de valores relacionados con la rugosidad del plano a lo largo de la línea trazada (figura 7). La primera gráfica representa las variaciones en altitud o profundidad a lo largo de todos los puntos de la línea marcada junto con la recta de ajuste de dichos puntos. En la segunda gráfica se representa el perfil de altitudes corregido por la línea de ajuste y dos líneas horizontales que marcan sus valores máximo y mínimo con respecto a la línea de ajuste. A partir de esta gráfica se obtienen los siguientes parámetros: altura máxima (Max Height = 4.452 μm), profundidad máxima (Max Depth = -4.267 μm), la suma de ambos (Roughness Depth = 8.7196 μm) y el valor de la rugosidad normalizada (R_a = 1.589), definido como la integral de la desviación absoluta de la línea de ajuste dividida por la longitud de dicha línea.

El cálculo de los buzamientos y orientaciones de los planos de fisuras se ha realizado utilizando funciones del programa Geojars. Estas funciones diseñadas para trabajar sobre imágenes de modelos digitales del terreno pueden ser aplicadas a la imagen topográfica de las fisuras. Ambas aplican un filtro sobre una ventana de 30 x 30 píxeles para la obtención de una imagen cuyos valores de gris son proporcionales al buzamiento o a la orientación de la línea de máxima pendiente. Los valores de gris en la imagen de buzamientos varían entre 0 y 90 mientras que en la de orientaciones varían entre 0 y 252, siendo el valor 63 equivalente a una orientación de 90° y el valor 126 equivalente a 180°. La figura 8 presenta las imágenes de buzamientos y orientaciones obtenidas.

Calculando el área en cada una de las secciones y conociendo la distancia entre ellas es posible obtener el volumen de la zona de fisura mediante la fórmula de Cavalieri (Gun-

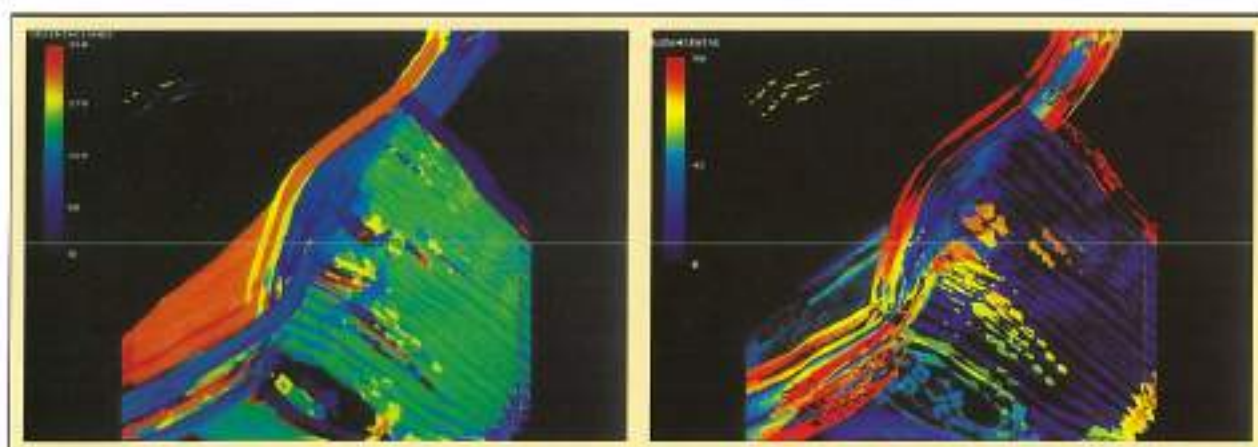


FIGURA 8. Mapas de los valores de orientaciones (a) y buzamientos (b) correspondientes a la red de microfisuras analizada.

dersen et al., 1988). Este matemático italiano del siglo XVII demostró que el volumen de un objeto V_{obj} puede ser estimado a partir de secciones paralelas separadas por una distancia t , sumando las áreas de las secciones del objeto $\Sigma a(\text{prof})$ y multiplicando por la distancia t :

$$V_{obj} = t \cdot \Sigma a(\text{prof})$$

El valor de V_{obj} obtenido ha sido $0,06398 \text{ mm}^3$ siendo el volumen de la zona analizada $0,8 \text{ mm}^3$ por lo que el porcentaje en volumen V , de la zona de fisuras es un 8%.

A partir de las secciones de la figura 4, mediante el programa Khoros, se ha realizado una reconstrucción tridimensional de la zona de fisuras desde diferentes puntos de vista (figura 9). En ella se observa claramente como existe una fisura subvertical asociada a otra que presenta una inclinación bastante acusada en su zona superior pero que se va

progresivamente tumbando a medida que se profundiza. Una apropiada elección de los parámetros de textura, luz y rotación en este tipo de reconstrucciones permite obtener una visión realista y en tres dimensiones de la compleja red fisural.

6. CONCLUSIONES

La microscopía láser confocal es una nueva técnica microscópica con grandes posibilidades de aplicación en el estudio de la microfractografía en rocas. Además de su mayor resolución y contraste, en relación con la microscopía óptica de fluorescencia, su principal ventaja radica en la posibilidad de realizar secciones ópticas, tanto en el plano x-y como en planos transversales x-z, lo que permite un detallado estudio de la red fisural de la roca. A partir de estas secciones

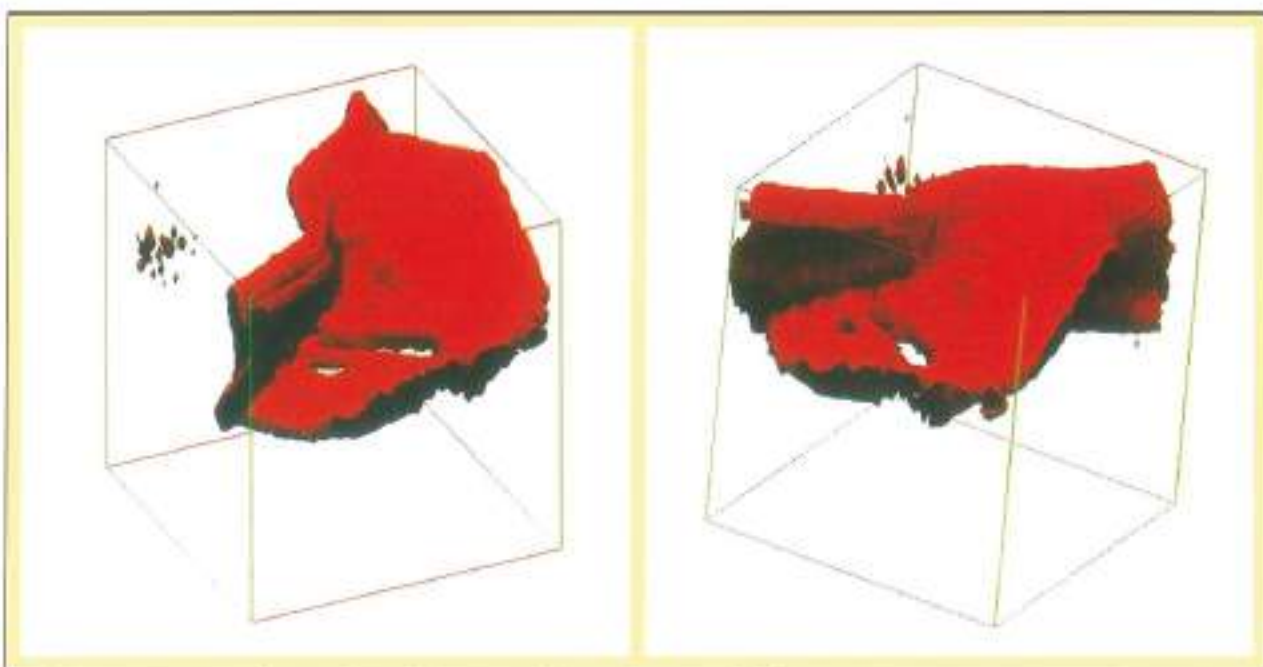


FIGURA 9. Reconstrucciones tridimensionales realizadas a partir de la serie de secciones de la figura 4.

ópticas, mediante técnicas de análisis de imágenes y reconstrucción tridimensional se puede obtener una exacta cartografía de la distribución de la red fisural así como cuantificar una serie de parámetros (porcentaje en volumen, rugosidad del plano de fisura, buzamiento, orientación, etc).

BIBLIOGRAFÍA

- BOYDE, A. (1988). Confocal optical microscopy. *Microscopy and analysis*, Enero, pp 7-13.
- FITZNER, B. (1990). Porosity analysis A method for the characterization of building stones in different weathering states. *Engineering Geology of Ancient Works, Monuments and Historical Sites*, Vol 4, pp 2031-2037, Marinus & Koukis (eds), Balkema, Rotterdam.
- FREDRICH, J. T.; MENÉNDEZ B.; WONG T. F. (1995) Imaging the Pore Structure of Geomaterials. *Science*, 268, pp 276-279.
- GUNDERSEN, H. J. G.; BENDTSEN, T. F.; KORBO, L.; MARCUSSEN, N.; MØLLER, A.; NIELSEN, K.; NYENGARD, J. R.; PAKKENBERG, B.; SØRENSEN, F. B.; VESTERBY, A.; WEST, M. J. (1988). Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 96, pp. 379-394.
- HEATH, M. J.; MONTOTO, M.; RODRÍGUEZ-REY, A.; RUIZ DE ARGANDOÑA, V. G.; MENÉNDEZ, B. (1992). Rock Matrix diffusion as a mechanism of radionuclide retardation: a natural study of El berrocal granite, Spain. *Radiochim. Acta* 58/59, 379-384.
- KNOESTER, A.; BRAKENHOFF, G. J. (1990). Applications of confocal microscopy in industrial solid materials: some examples and a first evaluation. *Journal of Microscopy*, Vol. 157, Pt. 1, pp. 105-113.
- MARTÍNEZ-NISTAL, A. (1993). Discriminación cuantificación y cartografiado de componentes petrográficos mediante proceso digital de multi-imágenes microscópicas. Tesis Doctoral, Facultad de Geología, Universidad de Oviedo. (Oviedo, España). 235 pp.
- MARTÍNEZ-NISTAL, A.; SAMPEDRO A.; MATSUGUCHI M. (1995). Introducción a la Microscopía Láser Confocal. En *Técnicas de fluorescencia en microscopía y citometría*. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo. ISBN: 84-7468-850-7. pp 15-30.
- MINSK, M. (1957). *Microscopy Apparatus*, U.S. Pat. 3,013,467.
- MONTOTO, M.; MENÉGER, M. T.; RODRÍGUEZ-REY, A.; MENÉNDEZ, B.; MARTÍNEZ-NISTAL, A.; FERNÁNDEZ-MERAYO, N. (1996). Uranium transfer phenomena in rock matrix: petrophysical and geochemical study of El Berrocal experimental site, Spain. *Journal of Contaminant Hydrology*, Vol. 21, pp 35-46.
- MONTOTO, M.; MARTÍNEZ-NISTAL, A.; RODRÍGUEZ-REY, A.; FERNÁNDEZ-MERAYO, N.; SORIANO, P. (1995). Microfractography of granitic rocks under confocal scanning laser microscopy. *J. Microscopy*, 177, pp 138-149.
- MONTOTO, M.; MONTOTO, L.; ROSHOFF, K.; LEIJON, B. (1981). Microfractographic study of heated and non-heated Stripa granite. *Subsurface Space (Rockstore '80)*, 3, pp 1357-1368.
- NERETKIENS, I. (1980). Diffusion in the rock matrix: an important factor in radionuclide migration? *J. Geophys.* 85, 4379-4397.
- PÉREZ DEL VILLAR, L.; DE LA CRUZ CANTERO, B. (1989). Caracterización Mineralógica y Geoquímica del Granito Sano y Alterado del Macizo de el "Berrocal" (Sierra de Gredos, Provincia de Toledo). *Studia Geológica Salmanticensis*, Vol. XXVI, pp. 47-80.
- PETFORD, N. & MILLER, J. A. (1990). SLM confocal microscopy: an improved way of viewing fission tracks. *J. Geol. Soc.* 147, pp. 217-218.
- PETFORD, N. & MILLER, J. A. (1992). Three dimensional imaging of fission tracks using confocal scanning laser microscopy. *Am. Miner.* 77, pp. 529-533.
- PETFORD, N. & MILLER, J. A. (1993). The study of fission tracks and other crystalline defects using confocal scanning laser microscopy. *J. Microscopy*, 170, pp 201-212.
- PETFORD, N. (1993). Mineral studies using confocal scanning laser microscopy. *Microsc. Anal.* Sept., pp. 19-21.
- SCOTT, A. C. (1989). Geological applications of laser scanning microscopy. *Microscopy and Analysis*, Marzo, 1989.
- WILSON, T. (1990). *Confocal microscopy*. Confocal microscopy. Edited by T. Wilson. Academic Press. 426 pp.