

Capítulo I – Considerações Iniciais

1.1. Considerações Gerais e Objectivos

A pedra é um material privilegiado para a construção, tendo vindo a ser utilizada desde há séculos em variados edifícios e estruturas. Ainda que a meteorização das rochas seja uma etapa fundamental dos ciclos dos minerais no nosso planeta, torna-se um processo inconveniente e com consequências nefastas e dispendiosas quando atinge as pedras usadas em construção. Esta é uma verdade mais premente e relevante em edifícios considerados património histórico e cultural.

Apesar disto, o estudo da alterabilidade das rochas aplicadas em monumentos é relativamente recente. O conceito de conservação de edifícios surgiu apenas no século XIX, como resultado da revolução industrial. Na realidade, dados os inúmeros factores intrínsecos e extrínsecos associados à alteração da pedra de uma determinada construção, este é um problema complexo, para o qual dificilmente se encontrará uma solução universal. Por um lado, os factores ambientais raramente podem ser controlados na sua totalidade, por outro, a interacção destes factores com a actividade de consórcios microbianos adensa ainda mais o problema. De facto, actualmente, é amplamente reconhecido que os dois tipos de factores tipicamente considerados intervenientes na meteorização das rochas – químicos e físicos – são co-adjuvados por um terceiro factor, o biológico.

Portugal, possuidor de um inegável e variado património histórico e cultural edificado tem inúmeros exemplos da acção combinada destes três agentes promotores do decaimento da pedra, pelo que urge a criação de estratégias integradas de restauro e combate à degradação. Uma abordagem multidisciplinar, pressupondo o respeito pela obra, impõe-se, tendo em consideração que qualquer intervenção de conservação ou restauro se materializa em alterações das condições originais, podendo ser vista como uma perda de autenticidade. Desta forma, talvez mais do que intervenções de restauro, é importante

conhecer os factores de alteração das rochas para que seja possível fazer uma conservação preventiva e de manutenção viável e útil.

Tendo em conta o anteriormente exposto, procurou-se, de um ponto de vista mais próximo da química e da microbiologia, perceber os factores envolvidos na alteração do substrato pétreo. Assim, o objectivo geral deste projecto é identificar alguns factores intervenientes na degradação biológica e física da pedra na Sacristia Incompleta do Convento de Cristo em Tomar, bem como testar a eficácia relativa de alguns biocidas usados em conservação e restauro.

Desta forma, o trabalho foi repartido em três grandes fases:

1. Isolamento e identificação preliminar de microrganismos pertencentes à flora recuperada de amostras retiradas da zona em estudo. Para tal, utilizaram-se técnicas de microbiologia clássica para recolha de amostras e isolamento dos microrganismos. De seguida, recorrendo a colorações (Gram, de flagelos e de endósporos), testes metabólicos (catalase e oxidase) e outros métodos, e com recurso à bibliografia, procurou-se identificar os microrganismos presentes nas amostras.
2. Compreensão da relação entre o crescimento microbiano e as condições de exposição da rocha às condições atmosféricas, através da relação entre os locais de recolha de amostras e a análise quantitativa das mesmas.
3. Teste à eficácia relativa de alguns agentes biocidas usados em conservação e restauro de edifícios em pedra utilizando os isolados obtidos. Para tal, utilizaram-se discos embebidos em soluções de biocidas, medindo-se os halos de inibição de crescimento resultantes.

1.2. O Convento de Cristo:

O Convento de Cristo (Fig. 1) é um complexo monumental histórico localizado na cidade de Tomar, freguesia de S. João Baptista, cuja construção foi iniciada em 1160, com a edificação do Castelo Templário e da Charola. Considerado Património da Humanidade pela UNESCO desde 1983, abrange uma área de 45 hectares, divididos entre o Castelo Templário e o Convento de Cristo, que ocupam 5 hectares, e pela Mata dos Sete Montes que ocupa os restantes 40. Estende-se do Castelo de Tomar até ao aqueduto dos Pegões, numa distância de mais de 7 quilómetros (Convento de Cristo, 2011).

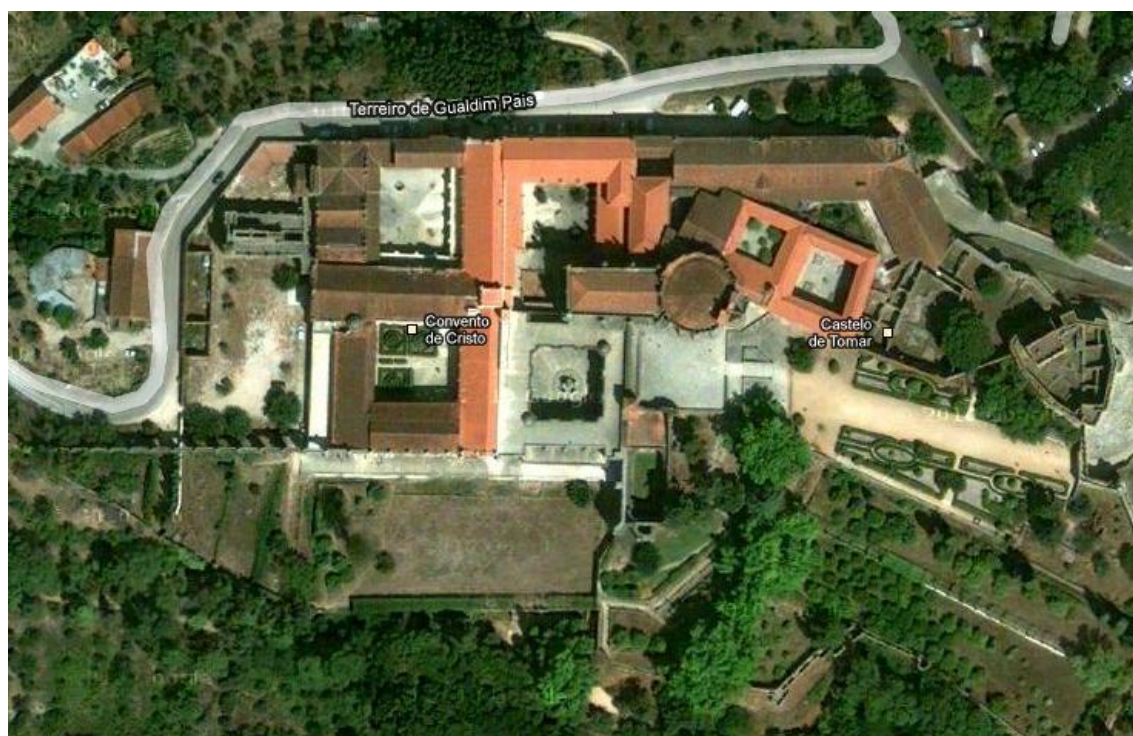


Fig. 1: Convento de Cristo, Tomar (Google maps, 2011).

Em 1159, D. Afonso Henriques concede aos Templários o território de Ceras, que abarca o actual concelho de Tomar. A 1 de Março do ano seguinte, sob as ordens de D. Gualdim Pais, Grão-Mestre da Ordem, dá-se início à construção do Castelo de Tomar,

encetando o actual complexo, apesar de existirem, no local, vestígios mais antigos de uma estrutura militar que remontará, possivelmente, à época romana e/ou islâmica. Trata-se de um recinto fortificado, no qual se destacam a torre de menagem na alcáçova e a muralha exterior que albergou, no seu interior, os primeiros habitantes de Tomar. Da mesma data é a Charola, local de oração para os Templários, de forma poligonal, com 8 faces no tambor central, desdobradas em 16 faces no exterior e cuja inspiração provém do Igreja do Santo Sepulcro, em Jerusalém. Esta parte do complexo foi finalizada já em 1190 e deu origem ao Convento (Convento de Cristo, 2011).

Após a extinção da Ordem dos Pobres Cavaleiros de Cristo e do Templo de Salomão, vulgarmente conhecida por Ordem dos Templários, em 13 de Outubro de 1307, por ordem do Papa Clemente V sob a acusação de heresia, os Cavaleiros do Templo foram dizimados por toda a Europa, tendo os seus bens revertido a favor de Roma. A extinção oficial foi confirmada, em 1312 pela bula *Vox in Excelso*. Em Portugal, porém, D. Dinis procurou evitar a dissipação da riqueza económica e intelectual da Ordem, transferindo-a para a Ordem dos Hospitalários. Posteriormente, e por bula do Papa João XXII datada de 1319, foi criada a Ordem Militar de Nosso Senhor Jesus Cristo, vulgarmente conhecida como Ordem de Cristo, que viria a receber a herança dos Templários, tendo-se estabelecido, tal como estes, em Tomar.

Esta Ordem prosseguiu o desenvolvimento do complexo monumental, destacando-se o papel do Infante D. Henrique, Grão-mestre da Ordem entre 1420 e 1460, que mandou construir o seu paço sobre parte da antiga casa militar e promoveu a ampliação das instalações do convento, com a construção dos Claustros da Lavagem e do Cemitério. A partir do Infante de Sagres, a Ordem passou a estar intimamente ligada à coroa portuguesa, tendo, por exemplo, D. Manuel I sido, simultaneamente, Rei de Portugal e Governador da Ordem de Cristo. Foi, aliás, com D. Manuel I que o complexo conventual conheceu uma das fases de mais acentuada expansão, graças às riquezas provenientes dos Descobrimentos, sendo de destacar a decoração da Charola e a sua ampliação e transformação na actual igreja conventual. D. Manuel I ordenou, ainda, a deslocação da população intra-muros para a vila, junto ao rio Nabão.

Em 1528, sob as ordens de D. João III, foram construídos mais seis claustros e as dependências conventuais (cozinha, refeitório, corredores das celas, entre outros) que

resistem até aos nossos dias, tendo sido anexados os domínios rurais denominados por cerca conventual ou, nos nossos dias, Mata dos Sete Montes, assim designada por estar limitada por sete colinas de acentuado relevo. Durante o reinado de D. João III, a Ordem de Cristo sofreu profundas remodelações e os trabalhos de ampliação ocultaram ou destruíram algumas das obras manuelinas. Alguns anos mais tarde, durante o período filipino, foi construído o aqueduto conventual, destacando-se nesta obra a área do vale dos Pegões.

Em 1834 as ordens religiosas foram extintas e o seu património foi transferido para a fazenda pública. O Convento de Cristo foi parcialmente alienado, tendo sido adquirido pela família Costa Cabral que o transformou em residência e exploração agrícola. Mais tarde, o convento voltou à posse do Estado português e foi ocupado pelo Seminário das Missões Ultramarinas e pelo Hospital Militar Regional nº3.

Só em 1993, o Convento encerrou as suas funções como hospital, tendo todo o complexo sido retomado pelo Estado, e transformado exclusivamente em atracção turística monumental (Convento de Cristo, 2011).

É neste complexo que se insere a Sacristia Incompleta (Figs. 2 e 3), também designada por Casa do Capítulo Incompleta, cuja construção foi iniciada em 1513 por ordem de D. Manuel. Possuía dois pisos, o inferior para os frades e o superior para os cavaleiros e sofreu renovações entre 1533 e 1545, tendo estas obras sido suspensas por D. João III, e nunca retomadas (Stara e Urro, 2010). O arquitecto responsável pela obra foi João Castilho.

Trata-se de um edifício rectangular, situado a sudoeste do primeiro claustro, que originalmente tinha um teto abobadado plano, sustentado por pilares.



Fig. 2: Imagem 3D do convento de Cristo, evidenciando a Sacristia Incompleta (Google maps, 2011).



Fig. 3: Fotografia aérea da Sacristia Incompleta (Stara e Urro, 2010).

O complexo reúne em si uma série de estilos, desde o Românico presente no Castelo, na cintura de muralhas e na grande rotunda templária, ao Gótico dos Claustros do Infante. A Sacristia e a casa do Capítulo Incompleta são do estilo Manuelino e as construções filipinas pertencem ao Maneirismo. O conjunto divide-se em 3 espaços distintos:

- O castelo templário e o recinto da vila;
- A casa templária, parcialmente adaptada a convento pelo Infante D. Henrique;
- O convento do Renascimento, de clausura, com claustros, dormitórios, refeitório, cozinha, bem como outros espaços funcionais;

1.3. A Rocha do Convento de Cristo

A região de Tomar é caracterizada pela proximidade da Serra D'Aire (Fig. 4), predominantemente calcária. O calcário, influenciou não só a paisagem natural, dando origem a inúmeras grutas, como também o modo de vida local, verificando-se, na região, a adaptação da agricultura às terras mais calcárias e a utilização desta rocha na construção, tanto na habitação como nos monumentos.

Na realidade, os calcários são extremamente comuns no nosso país, sendo utilizado como pedra de construção, pedra ornamental, fabrico de cimento e de cal em diversas zonas, com particular incidência nos distritos de Lisboa, Coimbra, Aveiro, Leiria, Santarém, Setúbal e Faro (Aires-Barros, 2001). O calcário é uma rocha sedimentar, isto é, é formada por sedimentos resultantes de processos de meteorização de rochas pré-existentes e caracteriza-se pelos altos teores de que carbonato de cálcio (CaCO_3) sob a forma de aragonite (estrutura cristalina ortorrômbica) ou calcite (estrutura cristalina romboédrica) (Aires-Barros, 2001). Frequentemente, são ricos em fósseis (Ashurst e Dimes, 2001).

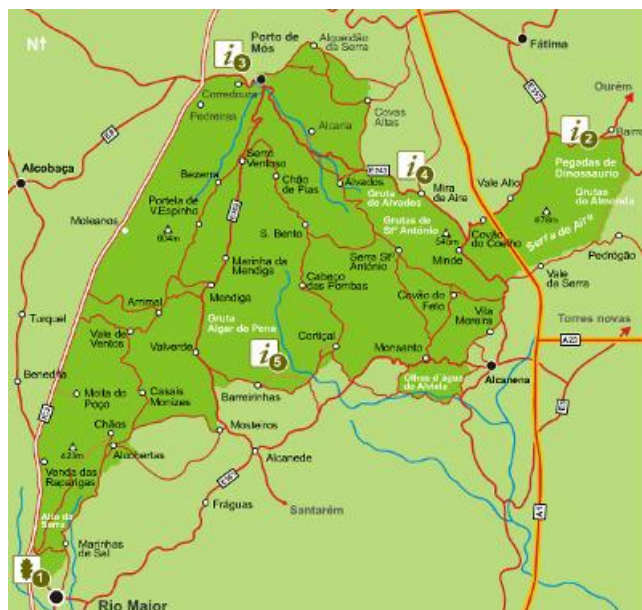


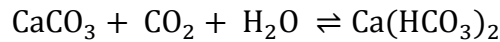
Fig. 4: Parque Natural da Serra de Aires e Candeeiros (Parque Nacional da Serra de Aires e Candeeiros, 2011).

A coloração do calcário passa pelo branco até ao preto, podendo ser cinza claro ou cinza escuro. Muitos calcários apresentam tons de vermelho, amarelo, azul ou verde, dependendo do tipo e quantidade de impurezas que apresentam. Estas impurezas podem ser provenientes do próprio processo de sedimentação que dá origem à rocha ou podem ser posteriores, sendo, em ambos os casos, relevantes para a utilização do calcário.

Ao contrário das rochas ígneas, as rochas sedimentares são o produto de longos processos de transformação meteórica das rochas. Os calcários podem apresentar estruturas extremamente variadas: a maioria é composta por grãos tão finos que não é possível observá-los macroscopicamente, outros, porém, são nitidamente cristalinos. Para além disto, originam-se em circunstâncias ecológicas diversas, mas a maioria forma-se em ambientes marinhos, dado que os produtos de meteorização que os constituem são transportados, regra geral, dos continentes para as baías de deposição (mares) (Aires-Barros, 2001). Por outro lado, podem ser originados em águas doces de pouca profundidade por precipitação química do carbonato de cálcio ou a partir de organismos com esqueleto calcário.

De acordo com a origem, podemos, então, classificar os calcários como:

- Químicos, quando são formados directamente por precipitação de carbonato de cálcio da água (este é pouco solúvel). A maioria das águas subterrâneas, bem como a água da chuva, contêm dióxido de carbono, o que promove a transformação de carbonato de cálcio em bicarbonato de cálcio, muito mais solúvel, de acordo com a equação:



Quando a água, rica em bicarbonato de cálcio, chega à superfície, o dióxido de carbono é libertado e o carbonato de cálcio re-precipita, formando a rocha. Trata-se do mesmo princípio subjacente à formação de estalactites e estalagmites nas grutas.

Este tipo de calcário pode também ser originado no mar, em condições específicas, com a precipitação do carbonato de cálcio em camadas concêntricas, geralmente em torno de um fragmento de concha. Os calcários originados desta forma são designados de oolíticos (Ashurst e Dimes, 2001).

- Orgânicos, quando são originários, em grande parte ou na totalidade, de conchas de organismos fossilizadas (durante a vida, os organismos retiram o carbonato de cálcio da água e concentram-no nas suas conchas ou esqueletos) (Ashurst e Dimes, 2001).
- Cláticos ou detríticos, quando são o resultado da erosão de calcários pré-existent (Ashurst e Dimes, 2001).

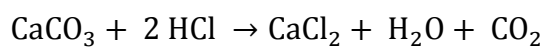
De acordo com as características e composição química, os calcários podem ser classificados de várias outras formas, variando a sua nomenclatura com o critério de classificação escolhido.

Em particular, o calcário existente na zona de Tomar e da Serra de Aire, é originário do Jurássico médio, e é classificado como calcário oolítico rijo (Aires-Barros, 2001) (Fig. 5), tal como muitos dos calcários deste período (Ashurst e Dimes, 2001).



Fig.: 5: Calcário oolítico.

Uma forma rápida de identificação do calcário, é a observação de efervescência gerada pela libertação de dióxido de carbono, quando em contacto com ácido clorídrico, por intermédio da reacção:



Capítulo II – Processos de degradação das rochas

A extracção de rochas para utilização em obras de arte, monumentos e outros edifícios é o início do processo de exposição a variados agentes degradadores – humidade, luz solar, vento ou poluentes de origem antropogénica, entre outros. Uma vez que a meteorização é função do ambiente, estes agentes induzem a alteração química e física do material por si só, mas são igualmente importantes pela influência que têm no crescimento de microrganismos responsáveis pela degradação biológica.

Na realidade, os agentes físicos, químicos e biológicos actuam em conjunto, de forma antagonista ou sinergista, na deterioração da pedra (Aires-Barros, 2001), estando intimamente ligados entre si.

2.1. Processos Físicos:

A alteração física das rochas deve-se à quebra das ligações físicas intercristalinas e intracristalinas, perda de coesão ou desmoronamento (Aires-Barros, 2001). Desta forma, os materiais pétreos podem sofrer degradação devido a variados processos físicos, dos quais se destacam:

- A expansão devido à amplitude térmica. Este efeito é, obviamente, mais evidente em zonas em que o clima apresenta maiores variações térmicas (por exemplo entre as temperaturas diurna/ nocturna ou de Verão/ Inverno). O efeito da expansão térmica pode ser também visível se houver dilatação diferencial dos metais constituintes do material pétreo quando submetidos à variação térmica.
- A expansão por descompressão provocada pela erosão dos materiais que cobrem o material pétreo.

- A expansão devida à variação do volume da água. Quando há variações de temperatura, a água contida nos poros e fissuras da rocha sofre expansão ou contracção. Se a temperatura baixa, a água congela, aumentando de volume, e quando volta a subir, a água funde, retomando o seu volume original. Tendo em conta que estes ciclos térmicos podem ocorrer facilmente devido à variação da temperatura exterior e que as rochas possuem água embebida nos seus poros, compreende-se o impacto deste factor na degradação pétrea.
- Em minerais argilosos, pode ocorrer a expansão devido à hidratação.
- Acção mecânica causada por choques vibracionais como os provocados por sismos ou por outras vibrações do terreno, incluindo as vibrações mecânicas causadas pela acção do ser humano.
- Acção mecânica da água e do vento, agentes de erosão por excelência, que causam atrito sobre o material pétreo.
- Acção de seres vivos, quer macro, quer microscopicamente. Se a acção de animais e planta é perfeitamente visível e facilmente compreensível como agente degradador da rocha, a acção de seres microscópicos não é menos importante.

2.2. Processos Químicos:

Enquanto a degradação física se deve à destruição das estruturas cristalinas, a degradação química está ligada às reacções que ocorrem envolvendo os minerais constituintes das rochas. Daqui se infere que a degradação química das rochas está intimamente relacionada com a composição química das mesmas, mas também, com as condições climáticas em que estas estão inseridas ou seja, para compreender o fenómeno é imprescindível conhecer o material pétreo mas, igualmente, as condições exógenas que influem nos fenómenos da transformação. (Aires-Barros, 2001)

Em termos de condições exógenas, são particularmente importantes dois factores – a atmosfera envolvente e a presença de água. Para qualquer um destes factores, é

importante considerar as condições de porosidade da própria rocha, na medida em que têm influência directa na superfície exposta. Assim, considera-se que uma mesma porosidade pode advir da existência de poucos poros de grande diâmetro ($> 0.2 \text{ mm}$) ou de muitos poros de menor diâmetro ($< 0.2 \text{ mm}$) (Charola et al, 2009), mas que a dimensão dos poros pode levar a uma entrada e saída de água mais rápida ou mais lenta. O ar em contacto com a rocha, quer à superfície, quer nos seus interstícios, produz reacções químicas com os elementos constituintes da mesma, o que faz com que a composição química da atmosfera seja um dado importante no estudo da degradação pétrea. Os constituintes do ar mais relevantes neste contexto são o oxigénio, o dióxido de carbono e o vapor de água, porém, outros gases considerados contaminantes atmosféricos têm vindo a assumir um papel cada vez mais importante, à medida que o crescimento urbano e industrial os torna mais abundantes (Nuhoglu et al, 2005).

O dióxido de enxofre (SO_2), por exemplo, proveniente da queima de combustíveis contendo enxofre como impureza, reage com o oxigénio ou com o ozono, resultando em ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Saiz-Jimenez, 1997; Aires-Barros, 2001) que, por sua vez, reage com as rochas carbonatadas, tal como se demonstra na Figura 6.

Quando combinadas com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e sob a acção de microrganismos, o gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) forma crostas negras que podem aprisionar partículas de pólen, poluentes orgânicos e outros agentes degradadores (Saiz-Jimenez, 1997; Polo et al, 2010). A oxidação do dióxido de enxofre é catalisada pela presença de metais pesados e de transição (Ferro, Chumbo, Zinco, Cobre, Níquel e Bromo) provenientes de gases de escape de motores de diesel (El-Metwally e Ramadam, 2004).

Também os óxidos de azoto, vulgarmente designados por NO_x e provenientes da combustão de motores de explosão e algumas indústrias, podem converter-se em ácido nítrico (HNO_3) que reage com rochas carbonatadas, de acordo com as reacções ilustradas na Figura 7.

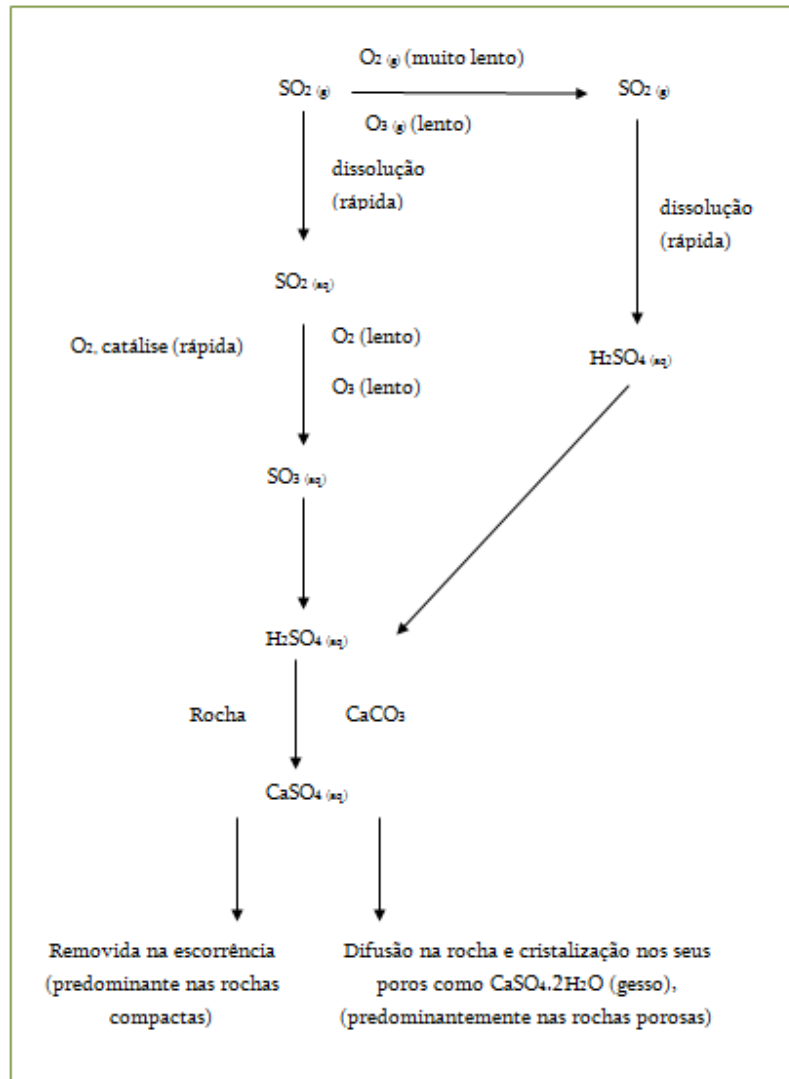


Fig.6: Diagrama esquemático ilustrativo da conversão de SO_2 em ácido sulfúrico e a reacção com rochas carbonatadas sujeitas a escorrência (Aires-Barros, 2001).

Tal como se descreve em Charola et al (2009), a água pode entrar nos materiais porosos sob a forma de vapor ou em estado líquido. No primeiro caso entra por difusão, por intermédio dos seus poros e no segundo, por efeito de capilaridade. Nas superfícies horizontais, pesa, ainda, o fenómeno de absorção capilar, directamente relacionado com a permeabilidade do próprio material pétreo. A existência de fissuras ou rachas na pedra promove, obviamente, um maior contacto com a água.

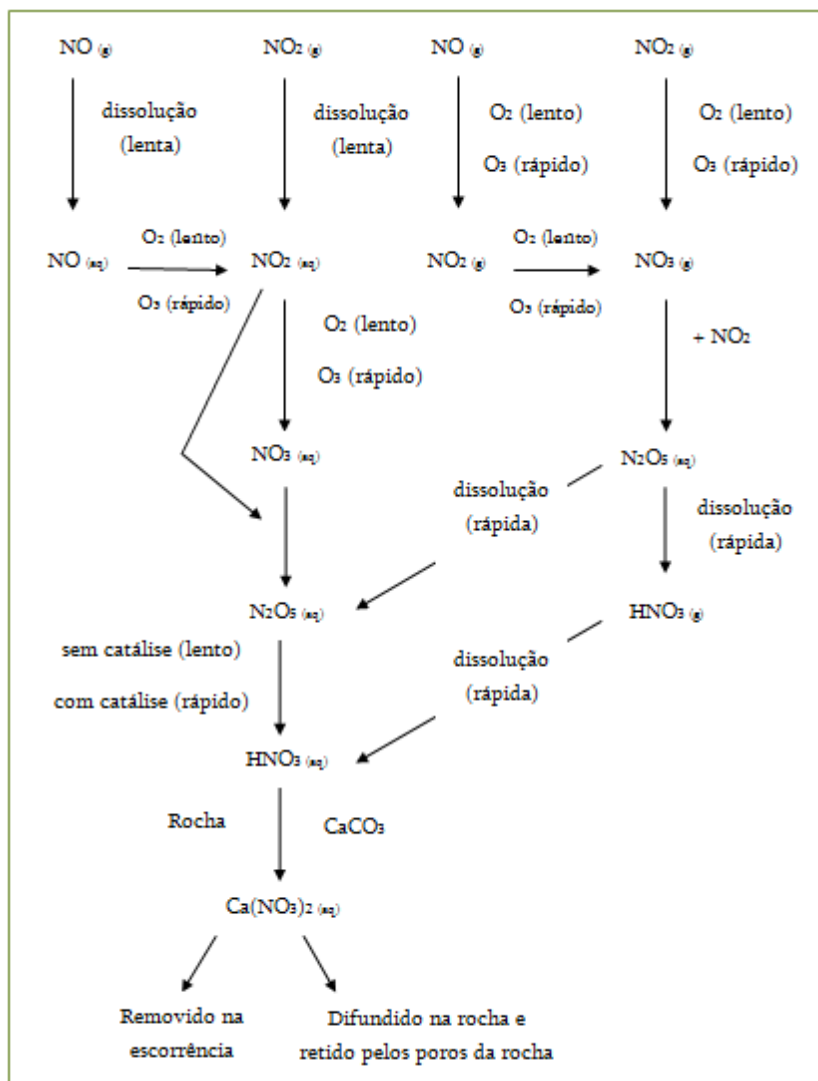


Fig.7: Diagrama esquemático ilustrativo da conversão de NO_x em ácido nítrico e a reacção com rochas carbonatadas sujeitas a escorrência (Aires-Barros, 2001).

A presença de água, principalmente água das chuvas, é importante para a degradação química das rochas, uma vez que a água forma soluções agressivas para o material pétreo e porque a presença de grandes quantidades de água contribui para o já referido efeito de alteração por expansão e contracção. Mais ainda, a água da chuva dá origem ao fenómeno de deposição húmida, que pode incorporar ou retirar poluentes da superfície e poros da rocha. Igualmente, se a superfície da rocha está húmida, a aderência de partículas e a captura de gases do ar é facilitada. Importa, ainda, o facto de a água dissolver sais solúveis e promover o seu transporte.

As principais reacções dos minerais constituintes das rochas que contribuem para a sua degradação química são:

- Dissolução de minerais por acção de soluções aquosas de dióxido de carbono ou de ácidos orgânicos, particularmente evidente em rochas calcárias, uma vez que estes promovem a transformação de carbonato de cálcio em bicarbonato de cálcio, muito mais solúvel. Outros sais comuns são o cloreto de sódio, o sulfato de cálcio diidratado (gesso), o sulfato de sódio, o cloreto de potássio e o sulfato de magnésio. Estes sais têm origens diversas, podendo pertencer à própria rocha ou ser provenientes da colonização biológica. A dissolução dos sais provoca a sua migração e consequente penetração noutros materiais porosos vizinhos. Caso a humidade evapore, os sais cristalizam formando efluorescências (se ocorrer na superfície) ou deterioração do material por stress mecânico (caso ocorra no interior dos poros) (López-Acevedo et al, 1997; Roeselers et al, 2007).
- Precipitação de sais que conduz ao aumento da porosidade da rocha, bem como ao aumento do tamanho dos poros e à produção de microfacturas no substrato (El-Metwally e Ramadam, 2004).
- Oxidação, principalmente de minerais de ferro, que conduz à alteração inestética da coloração da pedra (Aires-Barros, 2001).
- Redução, que ocorre em pequena escala e, sobretudo, por acção de matéria orgânica.
- Hidrólise, por acção dos iões H^+ e OH^- , principalmente sobre os silicatos.
- Hidratação, fenómeno limitado a alguns tipos de rocha, nomeadamente as argilas que, por terem uma estrutura laminar, absorvem água, expandindo. A deterioração causada por este tipo de fenómeno é essencialmente física e ocorre por fadiga mecânica do material devido a contínuos ciclos de absorção/dessorção de água (Aires-Barros, 2001).
- Oxidação – Hidratação, fenómeno muito mais importante do que as duas reacções separadamente. Ocorre quando há a dissolução de oxigénio na água, podendo levar, por exemplo, à formação de ácidos, com consequente desgaste da pedra (Aires-Barros, 2001).

2.3. Processos Biológicos:

A biodeterioração da pedra está intimamente ligada aos processos químicos e físicos de deterioração. Inicialmente, pensava-se que a deterioração biológica se seguia a outros processos deteriorativos que preparariam a superfície da pedra para a colonização por microrganismos, porém, actualmente tem vindo a ser argumentado que esta é observável mesmo nos estágios iniciais da degradação da rocha. (Gaylard e Morton, 1999)

Os processos biológicos de deterioração da rocha podem ser divididos em dois grandes tipos: *biofouling* e *bioweathering*. O primeiro ocorre quando há deposição ou produção de substâncias com efeitos inestéticos sobre a rocha, resultado da acção de microrganismos, e não envolve necessariamente a desagregação da rocha, ainda que os dois processos ocorrem, frequentemente, em simultâneo. Estas substâncias, geralmente pigmentos produzidos pelos microrganismos, têm como função proteger as células contra os efeitos dos raios UV (Urzí e Realini, 1998; Urzí et al, 1999) e podem tomar várias tonalidades. Por outro lado, o *bioweathering* pode ser definido como a desagregação da estrutura física da pedra devido à actividade directa de seres vivos, podendo ser de origem química ou física. (Cutler e Viles, 2010)

Na realidade, é impossível separar a acção biológica dos factores químicos e físicos (Mohammadi e Krumbein, 2008). A deterioração das rochas dos monumentos é um processo combinado, causado por factores físicos, químicos e biológicos variando a importância relativa de cada factor com as condições ambientais, o tipo de pedra, o seu estado de conservação e a sua localização no monumento (Papida et al, 2000). Assim, podemos falar em deterioração biogeoquímica e biogeo física para identificar os processos globalmente.

A deterioração biogeoquímica pode ser devida a processos solúveis como reacções ácidas, alcalinas, enzimáticas ou de complexação, que levam ao enfraquecimento da matriz pétreia (Cutler e Viles, 2010), ou a processos insolúveis como a oxidação, redução (principalmente de compostos de enxofre) ou a degradação de compostos orgânicos metálicos. Isto significa que a alteração biogeoquímica envolve a dissolução e/ ou alteração dos minerais constituintes da pedra por acção da actividade biológica

desenvolvida sobre a mesma. Esta biossolubilização resulta, frequentemente, da produção de ácidos e é uma estratégia que os microrganismos possuem para aceder aos nutrientes que necessitam e que são constituintes da matriz pétreo (Nuhoglu et al, 2005). A produção de ácidos é uma das formas de deterioração biogeoquímica mais estudada e é frequentemente designada por biocorrosão (Warscheid, 2004). A degradação biogeofísica, por seu lado, ocorre quando alterações morfológicas nas estruturas orgânicas induzem stresses internos na rocha, Quando estes excedem a resistência mecânica da pedra, ocorre a sua fragmentação (Cutler e Viles, 2010). O stress mecânico pode, ainda, ser resultante de ciclos de expansão/ contracção de água.

O desenvolvimento de ecossistemas baseados em microrganismos foi descrito nas mais variadas condições ambientais, não fossem estes seres vivos extremamente versáteis. São conhecidos microrganismos capazes de sobreviver em salinas, com conteúdos de sal no meio ambiente elevados, em lamas industriais sujeitas a temperaturas extremas, ou nas fossas oceânicas onde as pressões são muito superiores à pressão atmosférica. O denominador comum em todos estes ambientes é a existência de água. Assim, em primeiro lugar, ao falar em biodeterioração, importa referir a importância da presença ou disponibilidade de água. Esta é determinada tanto por parâmetros característicos do material, como pelas condições ambientais e de exposição (Warscheid e Braams, 2000), isto é, os factores climáticos, geográficos e topográficos têm um grande impacto na colonização das rochas dos monumentos, mas as características do próprio material (porosidade, permeabilidade, etc), são igualmente fulcrais.

Por outro lado, a biorreceptividade (conjunto de propriedades que contribui para o estabelecimento de fauna ou flora (Urzí e Realini, 1998; Miller et al, 2009b)) do próprio substrato pétreo é um factor importante na biodegradação, ou seja, a colonização da rocha depende de parâmetros do próprio material, como a composição mineral, a permeabilidade e, acima de tudo, a porosidade (de los Rios et al, 2008). Assim, a existência de uma rede de poros na rocha resulta numa maior acessibilidade dos microrganismos ao interior da matriz pétreo, bem como numa maior penetração da humidade. Regra geral, rochas com poros de grandes dimensões têm uma baixa retenção de água durante longos períodos, o que implica que são alvo de colonização biológica temporária, enquanto que rochas com poros de

reduzidas dimensões retêm a água durante mais tempo, oferecendo um ambiente propício à colonização permanente. (Warscheid et al, 2000; Miller et al, 2009b)

A rugosidade do substrato é, também, um factor que influi na biorreceptividade – superfícies mais rugosas são mais propícias ao estabelecimento de microrganismos (Macedo et al, 2009; Miller et al, 2009b). Da mesma forma, a presença de carbonatos na rocha é um factor promotor do crescimento microbiano, na medida em que funciona como tampão, mantendo o pH do meio a um nível aceitável. (Warscheid e Braams, 2000)

Adicionalmente, a própria colonização da rocha contribui para um aumento da biorreceptividade (Nuhoglu et al, 2005), na medida em que altera as propriedades do substrato. A formação de biofilmes ou a excreção de surfactantes (Urzí e Realini, 1998; Gaylard e Morton, 1999) que alteram a permeabilidade dos minerais são exemplos típicos. Tal como notam vários autores, a colonização é um processo cumulativo, sendo a alteração do estado da superfície pétrea determinada pela extensão da sua colonização (Papida et al, 2000; de los Rios et al, 2008).

Se cada monumento, sujeito ao clima local, pode ser considerado um habitat diferente de qualquer outro (Mohammadi e Krumbein, 2008), o mesmo se aplica às estruturas de um monumento: existem locais com condições específicas, sendo possível observar diferenças significativas na colonização de acordo com o local, dentro de um mesmo monumento, em termos qualitativos, mas sobretudo, quantitativos (Bellinzoni et al, 2003). Por exemplo, a formação de biofilmes fotossintéticos está profundamente relacionada com o tempo em que a humidade permanece na rocha, mas também com a orientação espacial do substrato. (Papida et al, 2000; Macedo et al, 2009; Miller et al, 2009b) e com as condições de luminosidade (Roeselers et al, 2007).

2.3.1. Colonização biológica:

Conforme já foi referido, a colonização biológica é um importante factor de alteração da rocha. É definida pelo *International Scientific Committee for Stone* (ISCS) como “a colonização da pedra por plantas e microrganismos, como bactérias,

cianobactérias, algas, fungos e líquenes (...). Inclui, também, influências de outros organismos tais como os ninhos de animais sobre ou no interior da pedra.” (International Scientific Committee for Stone, 2008). O mesmo comité alerta para a possibilidade de confusão com outros tipos de material que se podem acumular sobre a rocha e que, ainda que sejam de origem biológica, não são considerados colonização, como os dejectos animais. Os consórcios microbianos que crescem nas rochas são ecossistemas complexos que podem desenvolver-se de várias formas, de acordo com as condições ambientais e com as propriedades físico-químicas de substrato (Crispim e Gaylard, 2004).

A colonização biológica do substrato pétreo pode ocorrer em dois habitats – epilítico (ou seja, à superfície) ou endolítico (ou seja, abaixo da superfície). Os habitats endolíticos estão mais protegidos das variações bruscas das condições ambientais, porém, não podem ser extensamente colonizados por todos os organismos. Por exemplo, os microrganismos fotossintéticos apenas conseguem colonizar ambientes epilíticos ou endolíticos pouco profundos (Cutler e Viles, 2010). Em ambientes extremos, em que as temperaturas são muito altas ou muito baixas, ou em que a disponibilidade de água é baixa, a protecção existente na camada endolítica é, de facto, vantajosa, passando a ser predominante o crescimento neste habitat (Macedo et al, 2009). A exposição solar também influi na predisposição epilítica ou endolítica do crescimento (Urzì e Realini, 1998).

Desta forma, importa fazer uma distinção entre os tipos de organismos envolvidos na colonização biológica, bem como dos danos por eles causados, tendo em conta que a interacção entre diferentes microrganismos pode ter uma influência directa na velocidade de degradação (Gaylard e Gaylard, 2002).

2.3.1.1. Bactérias:

São organismos extremamente versáteis, com uma enorme variedade metabólica. Existem exemplares destes organismos praticamente em todos os ambientes, incluindo ambientes extremos - com grandes conteúdos de sal, altas ou baixas temperaturas, elevadas pressões ou níveis de radioactividade considerados perigosos para o ser humano.

Graças a esta resiliência, as bactérias são capazes de crescer nas condições adversas da superfície da pedra, principalmente as bactérias Gram positivas (Urzí e Realini, 1998; Urzí et al, 1999; Warscheid e Braams, 2000). Na rocha podem estar presentes bactérias autotróficas, que produzem ácidos inorgânicos, ou heterotróficas, que libertam compostos orgânicos quelantes (Crispim e Gaylard, 2004). Para além disto, em termos de impacto na rocha, as bactérias são importantes por causarem variadas alterações físico-químicas e por interferirem nos processos de cristalização de sais (Warscheid e Braams, 2000). Alguns tipos de bactéria, como as sulfato-redutoras, têm vindo a ganhar expressão na degradação de monumentos, à medida que os poluentes antropogénicos se tornam mais comuns (El-Metwally e Ramadam, 2004).

Adicionalmente, têm um papel vital na criação dos consórcios microbianos que colonizam a rocha, não só graças à produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS – extracellular polymeric substances), mas, acima de tudo, porque são capazes de degradar compostos orgânicos complexos em moléculas mais simples que, por sua vez, são usadas como fontes de nutrientes por outros microrganismos (Warscheid e Braams, 2000).

Em ambientes extremos, as bactérias capazes de formar endósporos têm uma vantagem selectiva, passando a ser mais frequentes do que as que não possuem esta capacidade. Existem, igualmente, indicações de que a capacidade de alternar o metabolismo aeróbio e anaeróbio é uma vantagem neste tipo de ambiente, na medida em que permite às bactérias permanecer sobre uma camada de biofilme, onde existe substancialmente menos oxigénio, mas onde as condições são mais amenas (Nuhoglu et al, 2005).

Tal como nas algas, há uma correlação entre o crescimento bacteriano e a formação de crostas que aumentam a retenção de água no substrato pétreo.

2.3.1.2. Cianobactérias:

Previamente conhecidas como algas azuis ou cianófitas, são organismos fotossintéticos que podem surgir em associação simbiótica com fungos ou viver em fendas e fissuras em rochas transparentes e porosas.

Nos géneros mais observados em edifícios, destaca-se a presença de uma bainha gelatinosa que conserva água, permitindo às cianobactérias sobreviver a condições secas (Macedo et al, 2009). Um dos factores que tornam estes organismos importantes na degradação de material de construção é, precisamente, a sua capacidade de resistir a ciclos de ausência/ presença de água, aliada à elevada tolerância à radiação UV (Bellinzoni et al, 2003; Crispim e Gaylard, 2004).

A cor resultante do crescimento das cianobactérias é muito variável. Por exemplo, em ambientes com baixos níveis de azoto, a presença de clorofila é reduzida e aumenta a de carotenóides, o que implica uma coloração amarelo-acastanhada (Macedo et al, 2009) e em organismos envelhecidos foi descrita uma coloração laranja pálida, igualmente resultante da degradação da clorofila (Urzì e Realini, 1998). Outros factores ambientais como a intensidade luminosa ou a temperatura podem induzir alterações cromáticas (Macedo et al, 2009).

As cianobactérias estão, ainda, envolvidas na precipitação de sais de cálcio em granitos. Este elemento migra de zonas próximas da colonização, o que implica uma destruição adicional de substrato, principalmente em rochas calcárias (Ascaso et al, 1998).

2.3.1.3. Algas:

São organismos eucariotas fotossintéticos, sem caules nem folhas, que formam películas de várias tonalidades, de acordo com o tipo de pigmento que possuem.

Na rocha, são encontrados em associações simbióticas com fungos ou em camadas e biofilmes, na forma unicelular ou pluricelular (Gladis et al, 2009), mas nunca sob a forma de macrorganismos e, maioritariamente em locais em que a humidade é retida por longos períodos de tempo (International Scientific Committee for Stone, 2008). Apesar de terem sido descritos vários tipos de alga em património edificado (por exemplo diatomácias e algas vermelhas), considera-se que a maior parte é rara, sendo frequente e relevante apenas o aparecimento de algas verdes (Cutler e Viles, 2010). Estas são particularmente tolerantes à dessecação e recuperam facilmente quando desidratadas, ainda que necessitem de humidade para crescer (Häubner et al, 2006). O baixo rácio superfície/ volume e as paredes

celulares grossas são, igualmente características que permitem a sobrevivência das algas na rocha (Gladis et al, 2009).

Os principais factores que determinam a colonização das rochas por algas são as características físicas das mesmas, como a porosidade, a permeabilidade ou a rugosidade. A natureza química do substrato é um factor apenas secundário (Macedo et al, 2009).

As algas estão, acima de tudo, envolvidas em processos de *biofouling*, com o aparecimento de manchas de tom normalmente esverdeado (Cutler e Viles, 2010) e de crostas que aumentam a retenção de água, o que implica um aumento do potencial de colonização das rochas.

2.3.1.4. Fungos:

São organismos eucariotas, e as espécies filamentosas são particularmente importantes, dado que as suas hifas conseguem penetrar vários centímetros na matriz rochosa, criando graves danos químicos e mecânicos. Alguns fungos, porém, usam como estratégia contra ambientes adversos o não crescimento de hifas (Wiktor et al, 2009).

Os fungos são particularmente activos na biodeterioração da rocha (Wiktor et al, 2009), sendo bastante resistentes e adaptáveis às alterações das condições atmosféricas (de los Rios et al, 2009).

Dado necessitarem de matéria orgânica como fonte de carbono e energia, o seu aparecimento está, muitas vezes, associado de forma simbiótica a organismos fotossintéticos, ou à presença de poluentes orgânicos.

Muitos autores têm descrito a penetração das estruturas fúngicas como causa de stress mecânico, com consequente degradação do substrato (Kondratyeva et al, 2005; de los Rios et al, 2009; Mohammadi e Krumbein, 2008), e este efeito pode ser coadjuvado pela produção de ácidos orgânicos e a oxidação de catiões formadores de metais, principalmente ferro e manganês (Warscheid e Braams, 2000; Warscheid, 2004), ou pelo processo de respiração. Para além disso, as hifas tornam este tipo de organismo particularmente difícil de erradicar porque a limpeza mecânica do fungo pode não ser

suficiente para as remover, sendo esta condição suficiente para que volte a haver crescimento. Adicionalmente, alguns fungos produzem pigmentos inestéticos como as melaninas que provocam a alteração cromática da rocha (Warscheid e Braams, 2000), principalmente pigmentos escuros que causam manchas cinzentas ou pretas (Urzì e Realini, 1998).

Sterflinger (2000) propõe que as comunidades fúngicas ajudam a manter a estabilidade de substratos frágeis, graças às redes de hifas que ligam os grãos constituintes da pedra.

2.3.1.5. Líquenes:

São associações simbióticas entre um fungo e uma alga ou cianobactéria. O primeiro organismo contribui com a fixação ao substrato e a protecção contra a dessecação enquanto que o segundo fornece nutrientes produzidos por fotossíntese. Podem ser responsáveis por situações de *pitting* ou alterações cromáticas e são facilmente distinguíveis de outros tipos de alteração (como as incrustações) porque, raspando a superfície, é possível observar a coloração verde proveniente da clorofila do organismo fotossintético (International Scientific Committee For Stone, 2008).

Tal como acontece com os fungos isoladamente, a colonização por líquenes está altamente dependente da exposição e retenção de água (de los Rios et al, 2009).

2.3.1.6. Musgos:

Plantas briófitas que formam pequenos tufo verdes na superfície da pedra (Fig. 8) e, principalmente, em cavidades, fendas e juntas. Crescem em zonas com elevada humidade e, preferencialmente, sem luz solar directa.



Fig. 8: Crescimento de musgo Sacristia Incompleta do Convento de Cristo.

2.3.1.7. Plantas superiores:

São organismos fotossintéticos complexos, normalmente constituídos por raiz, caule, folhas e, por vezes, flores. Colonizam, frequentemente, as fendas e fracturas exteriores dos edifícios com pouca ou nenhuma manutenção (Fig. 9). O crescimento das estruturas radiculares leva ao agravamento das fendas, para além de promover a manutenção de ambientes húmidos, propícios ao desenvolvimento de outros organismos.

Os seus efeitos, tal como no caso das briófitas, são facilmente reconhecidos, porém o seu crescimento só pode ocorrer depois da formação de um “protossolo”, por intermédio da acção degradativa de microrganismos (Gaylard e Gaylard, 2002).

2.3.1.8. Animais:

Dada a enorme variedade de organismos englobados nesta categoria, é impossível isolar os efeitos que produzem sobre a pedra. Muitos animais escolhem as fendas nas construções como local de nidificação, provocando a erosão ou perfuração da rocha.

2.3.2. Sucessão Biológica:

Tal como a disponibilidade de água, a existência de nutrientes é um factor de enorme relevância para a colonização microbiana da rocha. Para que ocorra sucessão e estabelecimento de ecossistemas é necessário que se instale no ambiente previamente não colonizado, um organismo, designado por pioneiro (Roeselers et al, 2007) ou colonizador primário. Tem vindo a ser considerado que os primeiros microrganismos a colonizar a rocha seriam fotoautotróficos: dado que requerem apenas luz solar, água e minerais para o seu crescimento, são normalmente tidos como os colonizadores primários em edifícios, abrindo caminho para as bactérias heterotróficas, fungos e organismos superiores, promovendo o aparecimento de uma camada de alimento orgânico (Allsopp et al, 2004). Desta forma, a biomassa dos microrganismos fotosintéticos pode ser utilizada por microrganismos heterotóxicos como fontes de carbono e energia (Miller et al, 2009a).

Actualmente, porém, tem vindo a ser referido que a colonização inicial de edifícios pode ser realizada por bactérias e fungos organotróficos, em conjunto com organismos fotoautotróficos (Warscheid e Braams, 2000) e Zanardini et al (2000) tornou claro que os poluentes de origem antropogénica podem, igualmente ser utilizados por microrganismos heterotróficos, o que implica a possibilidade de estes serem os organismos pioneiros.

As evidências relativamente à sucessão de microrganismos na pedra continuam a não ser definitivas relativamente a qualquer uma das hipóteses, ainda que muitos autores continuem a considerar os fototróficos como primeiros colonizadores da pedra (Nuhoglu et al, 2005). Gaylarde e Gaylard (2000), demonstraram que, aplicando um algicida em paredes exteriores se inibe o crescimento de bactérias e fungos, mesmo que o produto não tenha efeito bacteriostático ou fungistático. Este facto parece apontar para que o crescimento de autotrofos ocorra primeiro, seguido do aparecimento de heterotrofos. Porém, em alguns casos, na presença de tintas ou poluentes orgânicos, os heterotrofos podem ser colonizadores primários (Nuhoglu et al, 2005).

A disponibilidade de luz tem vindo a ser apontada como outro factor importante no problema da sucessão biológica neste tipo de ambiente. Existem indicações de que, na presença de altas intensidades luminosas, os organismos pioneiros são autotróficos,

enquanto que com intensidades luminosas mais baixas este papel cabe aos heterotróficos (Roeselers, 2007).

2.3.3. Biofilmes:

Um biofilme (Fig. 10) é um ecossistema estruturado e dinâmico ou, se quisermos, uma comunidade de microrganismos associados aos seus produtos extracelulares (Miller et al, 2009b), agregados, neste caso, a uma superfície abiótica – a rocha. Tal como se descreve em Kondratyeva, 2005, os materiais de construção, quer sejam interiores ou exteriores, são reconhecidamente ambientes favoráveis ao aparecimento biofilmes microbianos. Os biofilmes podem ou não ser visíveis a olho nu, mas mesmo aqueles que não o são desempenham um importante papel na degradação da pedra (Gaylard e Gaylard, 2002).

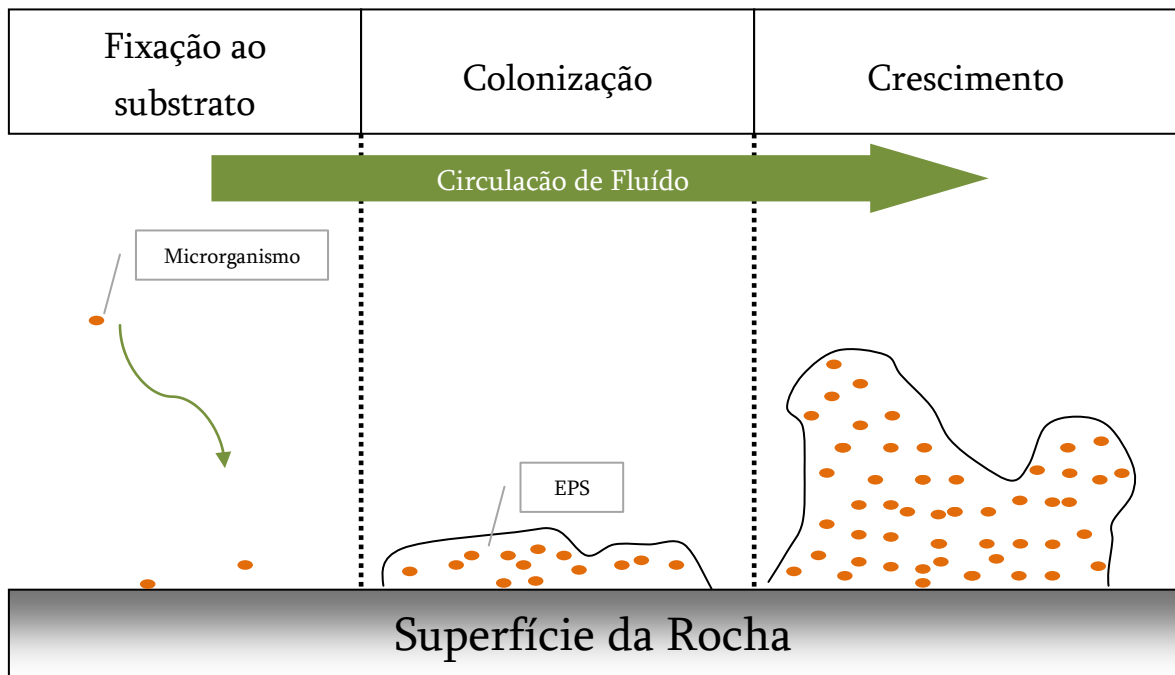


Fig. 9: Esquema da formação de um biofilme.

Para além de promoverem a descoloração inestética da pedra, os biofilmes são um local privilegiado para a precipitação de sais e poluentes que passam a funcionar como fontes de nutrientes para o crescimento de novos organismos (Warscheid e Braams, 2000). Para além disso, a elevada concentração de EPS dos biofilmes implica stress mecânico sobre a rocha, à medida que as variações de volume induzidas por variações de temperatura se fazem notar (Papida et al, 2000; Warscheid e Braams, 2000). Os EPS são responsáveis pela coesão do biofilme, ou seja, por manter unidas as células e outras partículas, mas também pela adesão ao substrato (Warscheid e Braams, 2000). Outra das funções da produção de EPS é proteger os microrganismos contra a dessecação ou agentes biocidas (Urzí e Realini, 1998), pelo que são um factor a ter em conta nos projectos de restauro de edifícios. Aliás, a função dos biofilmes, para além de promover a adesão e coesão, é precisamente proteger os microrganismos das flutuações ambientais e da radiação solar, bem como reter água (Miller et al, 2009b). Outros produtos extracelulares de origem microbiana podem, ainda, estar ligados a processos de biocorrosão e biooxidação do material pétreo (Papida et al, 2000). Estes efeitos levam à decomposição da matriz rochosa, o que implica a desagregação da rocha, abrindo novas zonas para a colonização (Warscheid e Braams, 2000).

Novas técnicas de microscopia têm vindo a revelar que os EPS não se limitam a acumular na superfície da pedra, sendo capazes de penetrar nos poros do substrato, o que facilita a colonização destes espaços por parte de microrganismos (Macedo et al, 2009).

Geralmente, as pedras mais duras e polidas, com menor porosidade, são mais resistentes aos microrganismos, porém todas são susceptíveis ao desenvolvimento de biofilmes (Gaylard e Gaylard, 2002). Os biofilmes têm, portanto, um importante papel tanto na degradação biogeoquímica como biogeofísica e o seu estudo revela existir uma forte interacção entre a rocha e os microrganismos (de los Rios et al, 2008).

Adicionalmente, os biofilmes capturam esporos e outras partículas do meio ambiente, bem como poluentes, promovendo ainda mais a degradação da rocha (Urzí e Realini, 1998; Mohammadi e Krumbein, 2008).

Depois de completamente estabelecidos, os biofilmes albergam uma grande variedade de seres vivos, desde fungos filamentosos, bactérias, protozoários e nemátodes (Allsopp et al, 2004).

A rocha pode ser considerada um ambiente extremo no que toca ao crescimento de microrganismos (Miller et al, 2009a) – para além da escassez de nutrientes, a superfície pétrea está, frequentemente, exposta a temperaturas extremas, elevados níveis de radiação UV e níveis de humidade muito variáveis. Desta forma, considera-se que na superfície da pedra existirão poucas interações competitivas entre microrganismos – em ambientes desfavoráveis ou inóspitos, os organismos tendem a gastar os seus recursos na sobrevivência e não na competição. Assim, os organismos que habitam a superfície das rochas dos monumentos são altamente especializados (Miller et al, 2009a), ainda que possam se encontrados igualmente em ambientes mais favoráveis como os solos (Cutler e Viles, 2010) (a maioria destes microrganismos é ubiquitária (Urzú e Realini, 1998; Miller et al, 2009a; Sainz-Jimenez, 2001)). Isto é explicado pelo facto de o solo ser a principal fonte de colonização da pedra (Macedo et al, 2009). Frequentemente, as interações entre os microrganismos tendem a ser simbióticas, o que pode levar, por exemplo, à associação ou agregação de autotrofos e heterotrofos. O conhecimento da forma como se articulam as comunidades microbianas é essencial para delinear estratégias de conservação e restauro.

Capítulo III - Limpeza e prevenção da degradação pétrea

Como já foi referido, o crescimento de microrganismos tem um impacto nefasto sobre o substrato pétreo, particularmente relevante quando a rocha pertence a monumentos ou estruturas de importância histórica ou cultural.

Até há pouco tempo, os problemas relacionados com a biodeterioração eram controlados, simplesmente, pela aplicação de biocidas, porém, esta atitude começa a mudar e surge a compreensão de que é necessária uma abordagem multidisciplinar que inclua os factores ambientais e as propriedades do substrato para criar uma solução mais eficaz (Warscheid, 2004; Polo et al, 2010). Mais ainda, considera-se, cada vez mais, que a conservação preventiva e de manutenção devem ter um papel primordial, na medida em que permitem reduzir as intervenções de restauro (Charola et al, 2009). A falta de limpeza e manutenção de edifícios e monumentos históricos é um dos factores que contribui de forma mais decisiva para a colonização biológica e deterioração (El-Metwally e Ramadam, 2004).

Desta forma, torna-se importante compreender o problema da biodeterioração da rocha como um todo, por forma a criar uma solução integrada para lidar com ele. Para tal, podemos dividir o problema em quatro fases distintas, tal como se faria para o estudo de um problema de deterioração num processo industrial:

- I. Determinar a causa da biodeterioração: Na realidade, é provável que não haja uma causa única, mas antes um conjunto de factores que contribuem para o processo. Em primeiro lugar é necessário ter em conta o próprio material, fazendo uma avaliação da origem e composição do mesmo e, mais tarde, fazer uma estimativa quantitativa e qualitativa dos agentes biológicos em causa (Allsopp et al, 2004). É igualmente importante avaliar as condições ambientais a que o monumento está exposto, como a presença de água e nutrientes (de los Rios et al, 2008). Finalmente, é necessário ter em conta anteriores intervenções feitas no monumento e que podem interferir com o actual processo (Warscheid, 2004).

- II. Determinar estratégias de controlo da biodeterioração, sejam elas preventivas ou de remediação. Esta fase está profundamente enraizada na anterior, na medida em que um método de prevenção ou limpeza deve ser dirigido à população microbiana em causa, mas, igualmente, ter em conta as características do substrato.
- III. Aplicar o sistema de controlo da biodeterioração criado anteriormente (Allsopp et al, 2004). Todo o processo de limpeza deve poder ser controlável, não originar matérias perigosas para a conservação da pedra ou originar alterações nas superfícies limpas que possam acelerar futuras degradações (Aires-Barros, 2001).
- IV. Monitorizar a eficácia do sistema de controlo desenhado e, se necessário, ajustá-lo (Allsopp et al, 2004).

Pesa, ainda, a necessidade de todo o processo de limpeza e manutenção ser devidamente acompanhado por historiadores e/ou especialistas em conservação, a fim de garantir a preservação do testemunho histórico e do valor cultural do edifício ou obra de arte em questão (Aires-Barros, 2001; Allsopp et al, 2004).

Conhecidos os agentes que afectam a pedra, bem como as características da própria, é importante seleccionar um método de protecção que, em simultâneo seja eficaz, respeite o substrato e se coadune com a importância histórica do monumento ou estrutura em causa. Assim, em primeiro lugar, deve ser dada prioridade ao controlo das condições exteriores que propiciam o crescimento microbiano. A protecção da pedra contra a biodeterioração pode ser eficazmente obtida, em primeiro lugar, pela redução da humidade em contacto com a matriz rochosa (El-Metwally e Ramadam, 2004), incluindo a presença de biofilmes que concentram a água (Warscheid, 2004), ou controlando a exposição solar. Por vezes, podem ser úteis medidas de nível estrutural como a protecção ou reforço de estruturas, o escoamento de águas pluviais, entre outros (Warscheid, 2004). É, ainda, possível, a aplicação de tratamentos hidrorrepelentes para diminuir a absorção de água líquida (Urzì e de Leo, 2007), tendo em conta que esta não resolve a absorção de água por capilaridade, podendo antes agravá-lo (Charola et al, 2009). Da mesma forma, a diminuição do conteúdo salino, combinado com um método de prevenção de aquisição de novos sais, pode diminuir

a actividade microbiana e, portanto, a biodeterioração (El-Metwally e Ramadam, 2004), uma vez que a presença de sais é um dos factores que influencia a produção de EPS.

Porém, quando as condições exógenas não podem ser eficazmente controladas, torna-se necessário recorrer a métodos de limpeza da contaminação (Allsopp et al, 2004).

3.1. Métodos Físicos e Mecânicos:

Tal como já foi referido, o conhecimento das características dos agentes envolvidos na biodeterioração é extremamente importante na escolha dos métodos de controlo da mesma. Em termos industriais, existem muitos métodos físicos para controlo da biodeterioração - aplicação de temperatura, pressão, etc... A maioria destes não pode, contudo, ser aplicada no contexto da degradação de monumentos e obras de arte.

Um exemplo de um método físico que tem vindo a ser aplicado em obras de arte é o *solar bagging*, que consiste na cobertura com plástico preto do objecto a limpar, fazendo aumentar a temperatura muito rapidamente e evaporar a água. Este método é bastante eficaz no controlo de contaminação por insectos e organismos fotossintéticos. Trata-se de uma técnica muito simples, que não envolve material dispendioso ou tecnologia complexa, mas tem a desvantagem de funcionar melhor em países quentes.

Outro método físico consiste na utilização de radiação prejudicial aos microrganismos, em particular radiação ultravioleta (UV) e gama (γ). A radiação γ é mais penetrante, atingindo, por isso, camadas mais profundas do material, mas é, igualmente, muito mais perigosa, razão pela qual deve ser usada com extremo cuidado. A sua utilização está documentada na eliminação de fungos contaminantes dos livros de uma biblioteca que havia sido alvo de inundação (Allsopp et al, 2004).

Uma outra técnica física para a limpeza de monumentos é a utilização de lasers, nomeadamente para a remoção de crostas e patinas de origem biológica. A maioria dos estudos publicados nesta área debruçam-se sobre a utilização em materiais graníticos e

mármore, tendo sido utilizados comprimentos de onda bastante variados. Alguns, porém, alertam para a possibilidade de o laser induzir alterações morfológicas e descolorações na pedra (López et al, 2010). O laser produz radiações luminosas muito energéticas que podem reagir de diferentes maneiras com os materiais, tendo como principal vantagem a grande selectividade que permite (Aires-Barros, 2001).

Dentro dos métodos mecânicos, podemos destacar a simples escovagem com escovas de cerdas macias que não danificam o substrato e a microabrasão que usa pequenos jactos de areia localizados, para remover incrustações. Para grandes superfícies, pode ser usado o método do jacto de areia, em que um material granular (não necessariamente areia) é impulsionado com uma certa pressão para a rocha, limpando-a por erosão. Estes métodos são, porém, agressivos e podem causar danos ao substrato pétreo caso não sejam correctamente aplicados (Charola et al, 2009).

A simples lavagem com água tem a vantagem de não degradar o substrato pétreo, removendo sais solúveis que se encontrem precipitados na rocha e ajudando a remover efluorescências e alguns microrganismos. Em alguns casos opta-se pelo escoamento de água durante o tempo necessário para amolecer a sujidade, seguindo-se uma escovagem, de forma a removê-la (Aires-Barros, 2001). Outras vezes, usam-se de jactos de água ou de vapor com elevada pressão que removem com bastante sucesso os biofilmes da superfície da rocha (Aires-Barros, 2001), sendo, contudo, necessário ter especial atenção quando se usa este método, dado o risco de remoção indesejada de material pétreo (Allsopp et al, 2004). Esta técnica designa-se por hidrolavagem, e pressupõe que a água actue como agente mecânico. Uma outra técnica, designada por hidroareado, utiliza jactos de areia misturados com água, com a vantagem de produzir pouco pó para o ambiente e da água actuar como lubrificante e amortecedor do impacto das partículas de areia (Charola et al, 2009). A médio/longo prazo, porém, esta não é uma solução satisfatória, na medida em que pode fazer aumentar o crescimento microbiano devido à maior disponibilidade de água na rocha (Warscheid e Braams, 2000).

Desta forma, recorre-se frequentemente ao uso de biocidas, em conjunto com a lavagem com água, para otimizar a remoção de microrganismos e obter um efeito mais duradouro. Isto é, para além de retirarem os microrganismos existentes na rocha, os biocidas têm a vantagem adicional de ajudar a prevenir novas colonizações.

3.2. Métodos Químicos:

Os métodos químicos de controlo da biodeterioração envolvem, então, o uso de biocidas. É indispensável ter em conta que, actualmente, nenhum biocida é capaz de resolver todos os problemas de biodeterioração, pelo que é importante conhecer as limitações de cada um para garantir que o sistema correcto é utilizado (Allsopp et al, 2004)

Assim, considera-se que um biocida deve reunir um conjunto de características para que seja ideal, nomeadamente:

- Ser tóxico para os organismos alvo, uma vez que, obviamente, só faz sentido aplicar um biocida se este for capaz de atingir o objectivo de remover a contaminação biológica (Allsopp et al, 2004). Mais ainda, antes da aplicação de um biocida, a abrangência do espectro de acção para os microrganismos presentes no local deve ser provada laboratorialmente, sob pena de se forçar um processo de selecção e adaptação, criando novas populações, muito mais resistentes ao tratamento (Warscheid, 2004).
- Ser compatível com o substrato e não provocar alterações no mesmo, por forma a que não se altere o valor histórico do património edificado (Allsopp et al, 2004; Gladis et al, 2009). Uma vez mais, os efeitos do biocida sobre o substrato devem se testados laboratorialmente, para prevenir alterações cromáticas ou estruturais no mesmo (Warscheid, 2004).
- Existir numa fase que possa ser aplicada no substrato em questão, tipicamente na forma líquida, ainda que alguns biocidas possam ser usados sob a forma de gases (Allsopp et al, 2004).
- Ser inócuo para o ser humano e para a vida animal e vegetal envolvente, característica extremamente difícil de obter uma vez que os biocidas são eficazes, precisamente, por serem tóxicos (Allsopp et al, 2004; Gladis et al, 2009). A ecotoxicidade do biocida deve ser cuidadosamente estudada a fim de limitar os riscos para a saúde daqueles que o aplicam, bem como de outras pessoas que possam entrar em contacto com ele (Warscheid, 2004). Obviamente,

qualquer ser humano que manipule e/ou aplique o biocida deve estar protegido de forma considerada apropriada (Charola et al, 2009).

- Ser estável, tanto na forma concentrada, como na forma diluída (Allsopp et al, 2004), dado que os biocidas são, frequentemente, aplicados sob a forma de soluções aquosas diluídas a partir de uma forma concentrada na qual são comercializados.
- Ter uma boa relação custo-eficácia (Allsopp et al, 2004).
- Ser eficaz durante um longo período de tempo (tipicamente, a garantia oferecida por tratamento é de 5 anos) (Gladis et al, 2009), para minorar a quantidade de intervenções necessárias.

3.2.1. Tipos de Biocida:

3.2.1.1. Sais de Amónia Quaternária:

São agentes surfactantes (maioritariamente surfactantes catiónicos), cuja actividade antimicrobiana está directamente relacionada com o tamanho da cadeia lateral. Apresentam uma estrutura análoga ao cloreto de amónio, em que os grupos químicos orgânicos (R_1 , R_2 , R_3 e R_4) se encontram ligados ao átomo de azoto central (Fig. 11).

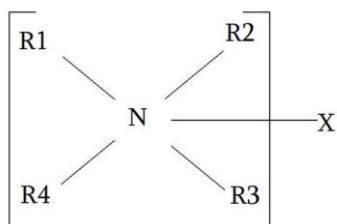


Fig. 10: Estrutura geral dos compostos de amónia quaternária, em que R_1, R_2, R_3 e R_4 são grupos com carbono e X^- é um anião (como cloro ou bromo).

Dada a sua elevada estabilidade em diferentes condições de pH e temperatura, são usados em aplicações em que a permanência no meio é uma vantagem (Allsopp et al, 2004), como é o caso da limpeza de monumentos, mas ainda assim, a sua acção residual estende-se apenas até um máximo de alguns anos (Charola et al, 2009). Para além disso, são biocidas de largo espectro e são considerados ambientalmente mais seguros do que outros biocidas. São considerados os biocidas com melhores resultados no controlo da biodegradação de monumentos, apesar de não serem esporicidas. Na utilização de sais de amónia quaternária, deve ter-se em conta que é frequente os resultados serem visíveis apenas passados alguns meses (Charola et al, 2009).

3.2.1.2. Isotiazolinonas:

Conjunto de biocidas relativamente novo, caracterizado pela presença de um anel de isotiazolinona, cujos grupos substituintes conferem à molécula diferentes propriedades biocidas. Por exemplo os derivados de octilisotiazolinona (OIT) têm uma baixa solubilidade em água e boas propriedades algicidas e fungicidas, sendo, por isso, usados em tintas e outros materiais.

3.2.1.3. Outros compostos Organohalogenados:

Usados principalmente na protecção de superfícies contra fungos e algas, normalmente em conjugação com isotiazolinonas, oferecem um efeito de longa duração.

3.2.1.4. Triazinas:

Família de compostos orgânicos, isómeros, cuja formula empírica é $C_3H_3N_3$ e que se apresentam como um anel heterociclo com 3 heteroátomos de azoto. São frequentemente usados como herbicidas.

3.2.1.5. Compostos fenólicos:

Os compostos fenólicos, principalmente os clorados, são usados como bactericidas e o ortofenilfenol tem actividade fungicida, sendo usado na forma de sal de potássio, em conjugação com compostos de amónia quaternária em biocidas de largo espectro para uso em substratos pétreos.

3.2.1.6. Agentes Oxidantes:

O cloro e os compostos clorados são alguns dos biocidas mais usados em várias aplicações domésticas e industriais, tendo porém, algumas limitações devido à possibilidade de formação de reacções secundárias. É de realçar que os produtos inorgânicos como o hipoclorito de sódio jamais devem ser usados como biocidas em substratos pétreos de valor histórico, na medida em que deixam, como resíduos, sais solúveis que se colocam como um novo factor de degradação. Outros agentes oxidantes incluem o ozono e outros halogénios, bem como o peróxido de hidrogénio, que podem ser usados sobre a rocha, uma vez que não deixam qualquer resíduo. Esta característica, porém, implica que não protegem a rocha de nova colonização (Charola et al, 2009).

3.2.1.7. Aldeídos:

Um dos aldeídos mais usados é o formaldeído, um bom exemplo de um biocida de largo espectro e com elevada solubilidade na água. Outro aldeído frequentemente usado como biocida é o glutaraldeído, principalmente para a esterilização de instrumentos cirúrgicos a frio. Têm como grave desvantagem a produção de vapores carcinogénicos.

3.2.1.8. Álcoois:

Usados não como biocidas propriamente ditos, dada a sua rápida taxa de evaporação, mas antes como desinfectante de superfícies ou da pele.

3.2.1.9. Ácidos Orgânicos e seus Ésteres:

São usados principalmente em preservação de alimentos, não sendo indicados para uso em rocha.

Actualmente têm vindo a ser estudados biocidas alternativos, com toxicidades reduzidas e, por isso, ecologicamente mais responsáveis, como os sais metálicos, as nanopartículas fotocatalíticas, os ácidos acético e salicílico, o bórax (tetraborato de sódio), os ésteres PHB, entre outros (Warscheid, 2004). Obviamente, devido à sua menor toxicidade, os resultados demonstrados com o uso destas alternativas têm apontado para uma menor diminuição da carga microbiana viável. Por outro lado, algumas destas soluções alternativas apresentam vantagens adicionais, como é o caso das nanopartículas fotocatalíticas que podem ser fixadas de forma mais eficaz à matriz pétreia (Gladis et al, 2009).

3.2.2. Mecanismos de acção:

Um aspecto importante quando se fala em biocidas é o mecanismo de acção, uma vez que este pode determinar a eficácia relativamente a um tipo de organismo, mas tornar o biocida ineficaz perante outro. Desta forma, podemos dividir os mecanismos de acção dos biocidas em oxidação, alteração da actividade membranar, desnaturação proteica, inibição da síntese proteica, inibição da divisão nuclear, inibição da síntese membranar e inibição da fotossíntese (Tabela 1).

Independentemente do método usado para a limpeza da pedra e do mecanismo de actuação do biocida utilizado, é necessário reduzir ao máximo a exposição à humidade, por forma a garantir que a microflora que permanece no substrato não volte a crescer rapidamente (Warscheid, 2004).

Tabela 1: Mecanismos de acção dos biocidas.

Mecanismo de acção	Modo de acção	Exemplos
Oxidação	Lise celular, por acção sobre a parede e os constituintes das células	Hipoclorito, Ozono
Alteração da actividade membranar	Disrupção dos mecanismos de transporte membranar ou comprometimento da integridade da membrana celular	Compostos de amónia quaternária, álcoois
Desnaturação proteica	Alteração da estrutura tridimensional das proteínas celulares	Formaldeído, fenóis
Inibição da síntese proteica	Ligação aos grupos tiol das células, afectando a actividade enzimática	Isotiazolinonas
Inibição da divisão nuclear	Inibição da síntese de ADN	<i>IPBC</i> ⁽¹⁾
Inibição da síntese membranar	Inibição da síntese de compostos membranares nos fungos	<i>Imazalil</i> ⁽¹⁾
Inibição da fotossíntese	Alteração do transporte de electrões	<i>Diuron</i> ⁽¹⁾

⁽¹⁾ – Nomes comerciais

3.3. Métodos Biológicos - Biorremediação:

A poluição atmosférica, juntamente com a meteorização da rocha resulta, muitas vezes na formação de crostas de sais (frequentemente de sulfato de cálcio di-hidratado ou gesso), compostas por sais solúveis, e que se desenvolvem na presença de elevadas concentrações salinas e devido a ciclos de humidade/seca (International Scientific Committee for Stone, 2008). Conforme já foi referido, as técnicas mecânicas e físicas para a remoção de sais da rocha podem ter um efeito nefasto, acelerando a alteração do substrato (Webster e May, 2006). A formação de gesso a partir de dióxido de enxofre da atmosfera, já anteriormente descrita, leva à formação de cavidades abaixo da superfície pétreia devido à migração de iões de cálcio. Isto implica que, ao remover mecanicamente o gesso, é possível que se arraste parte da rocha.

Frequentemente, as crostas negras que se observam nos monumentos são o resultado de uma mistura de gesso, produtos do metabolismo microbiano, poluentes atmosféricos e, também, substâncias usadas para a protecção da própria pedra (Webster e May, 2006; Polo et al, 2010). As crostas negras constituem um problema importante na degradação da rocha e retirá-las mecanicamente pode contribuir para a alteração da pedra. Uma vez mais isto reforça a ideia de que anteriores processos de limpeza e protecção da pedra podem contribuir para a sua degradação.

Deste problema, surge a possibilidade de utilizar microrganismos para a limpeza da pedra. Assim, tem vindo a ser sugerida a aplicação de técnicas de biorremediação na limpeza de monumentos.

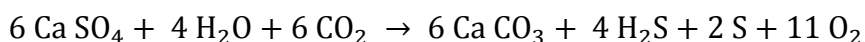
A biorremediação pode ser descrita como um conjunto de técnicas que usam seres vivos (tipicamente microrganismos, mas também plantas) ou as suas enzimas para despoluir, limpar ou de outra forma fazer voltar às condições originais, um determinado meio. Tem vindo a ser explorada, pelo seu elevado potencial, em diversas situações como derrames de crude, contaminação de solos ou tratamento de efluentes com peróxido de hidrogénio.

Os microrganismos e as plantas possuem uma capacidade natural para degradar substâncias consideradas nocivas para o ser humano, mesmo em concentrações consideradas altas. A biorremediação é, afinal de contas, um mecanismo de estimulação de capacidades naturais de biodegradação em proveito do Homem, com enormes vantagens ao nível do impacto ambiental e económico. Apesar de ser um processo lento, a sua eficácia, baixo impacto ecológico, baixo custo e boa aceitação pela opinião pública, têm vindo a ser determinantes no desenvolvimento e estudo de novas técnicas, ainda que os estudos na área da sua aplicação para a limpeza de monumentos sejam, por ora, insuficientes (Webster e May, 2006).

Regra geral, a biorremediação aplicada a obras de arte baseia-se na utilização de três grandes tipos de bactérias: as sulfato-redutoras, as nitrato-redutoras e as degradadoras de hidrocarbonetos (Fernandes, 2006).

Uma das aplicações de processos de biorremediação em monumentos que tem vindo a ser estudada é a remoção de crostas negras de gesso com recurso a bactérias

sulfato-reductoras, principalmente pertencentes ao género *Dessulfovibrio* (Polo et al, 2010), que têm a capacidade de transformar o gesso em iões de cálcio e sulfato. Os iões sulfato são, então, reduzidos pelas bactérias, enquanto os iões cálcio reagem com o dióxido de carbono do ar para formar calcite (Webster e May, 2006):



Estas bactérias podem, ainda, remover poluentes da rocha, nomeadamente, hidrocarbonetos (Saiz-Jimenez, 1997; Webster e May, 2006), contribuindo para a diminuição da degradação. Células viáveis ou enzimas podem, igualmente, ser usadas para restaurar e limpar frescos, com bons resultados (Ranalli et al, 2004).

Algumas limitações são, porém, de realçar quanto à aplicação em larga escala da biorremediação em edifícios. A dimensão dos monumentos, por exemplo, pode ser um factor a ter em conta, bem como os alargados períodos de tempo necessários para que o processo seja eficaz (Saiz-Jimenez, 1997). Por outro lado, a biorremediação tem grandes vantagens, como sejam a maior selectividade e maior homogeneidade relativamente aos métodos químicos (Polo et al, 2010).

Para além da possibilidade de usar microrganismos para remover poluentes ou sais da superfície da rocha, tem vindo a ser estudada uma outra capacidade das bactérias no restauro e conservação de monumentos – a biomineralização.

A consolidação da pedra é uma necessidade em monumentos gravemente deteriorados e várias técnicas têm vindo a ser usadas ao longo dos tempos. Exemplos disto são a utilização de hidróxido de cálcio que reage com o dióxido de carbono atmosférico para formar carbonato de cálcio ou a formação de oxalatos de cálcio a partir de ácido oxálico. Porém, a aplicação deste tipo de tratamento altera a movimentação de sais no interior da rocha, levando, a médio e longo prazo, a um aumento da degradação (Saiz-Jimenez, 1997).

Desta forma, surge a ideia de usar a capacidade de precipitar sais que muitas bactérias possuem para mineralizar as rochas carbonatadas, consolidando-as (Saiz-Jimenez, 1997; Jroundi et al, 2010). Muitos microrganismos existentes na pedra possuem a capacidade de precipitar carbonato de cálcio na forma de calcite (Jroundi et al, 2010), com a vantagem adicional de esta ser menos solúvel e mais resistente ao stress mecânico (devido à inclusão de metabolitos) do que a calcite de origem inorgânica. Para além disso, uma vez que não alteram a estrutura dos poros, os depósitos de calcite de origem bacteriana não aumentam a degradação porque não alteram o movimento de sais (Saiz-Jimenez, 1997; Jroundi et al, 2010).

Capítulo IV – Materiais e Métodos

Conforme já foi referido, este projecto tem como objectivo caracterizar os factores intervenientes na alteração do substrato pétreo da Sacristia Incompleta do Convento de Cristo, em Tomar. Para tal, procedeu-se à recolha de amostras e posterior inoculação das mesmas, em meios que permitam a diferenciação em organismos autotróficos e heterotróficos e, dentro destes, em fungos e bactérias.

Após a inoculação e incubação das amostras em meios selectivos, procedeu-se ao isolamento dos microrganismos, seguido da caracterização dos isolados, a fim de obter uma identificação preliminar.

Finalmente, testou-se a eficácia relativa de alguns biocidas nos microrganismos isolados, recorrendo a discos embebidos e colocados na superfície de placas inoculadas, medindo-se os halos de inibição resultantes.

4.1. Recolha de amostras:

A recolha de amostras foi feita em seis locais (ver tabela 2) da mesma zona da Sacristia Incompleta do Convento de Cristo em Tomar, tal como se assinala na Figura abaixo (Fig 12).

O método de recolha de amostras escolhido foi o *swabbing*, com zaragatoas esterilizadas (Fig. 13) e mergulhadas em solução de Ringer para transporte (Fig. 14). Este método foi escolhido pela simplicidade e facilidade de execução, com baixos custos associados e, ainda, por não destruir o substrato. As desvantagens que apresenta prendem-se com a dificuldade de padronizar as amostras e o facto de não conservar o arranjo espacial das células no meio, mas estes factores não foram considerados críticos para o trabalho em causa. Outra desvantagem reside no facto de não permitir uma análise quantitativa rigorosa.

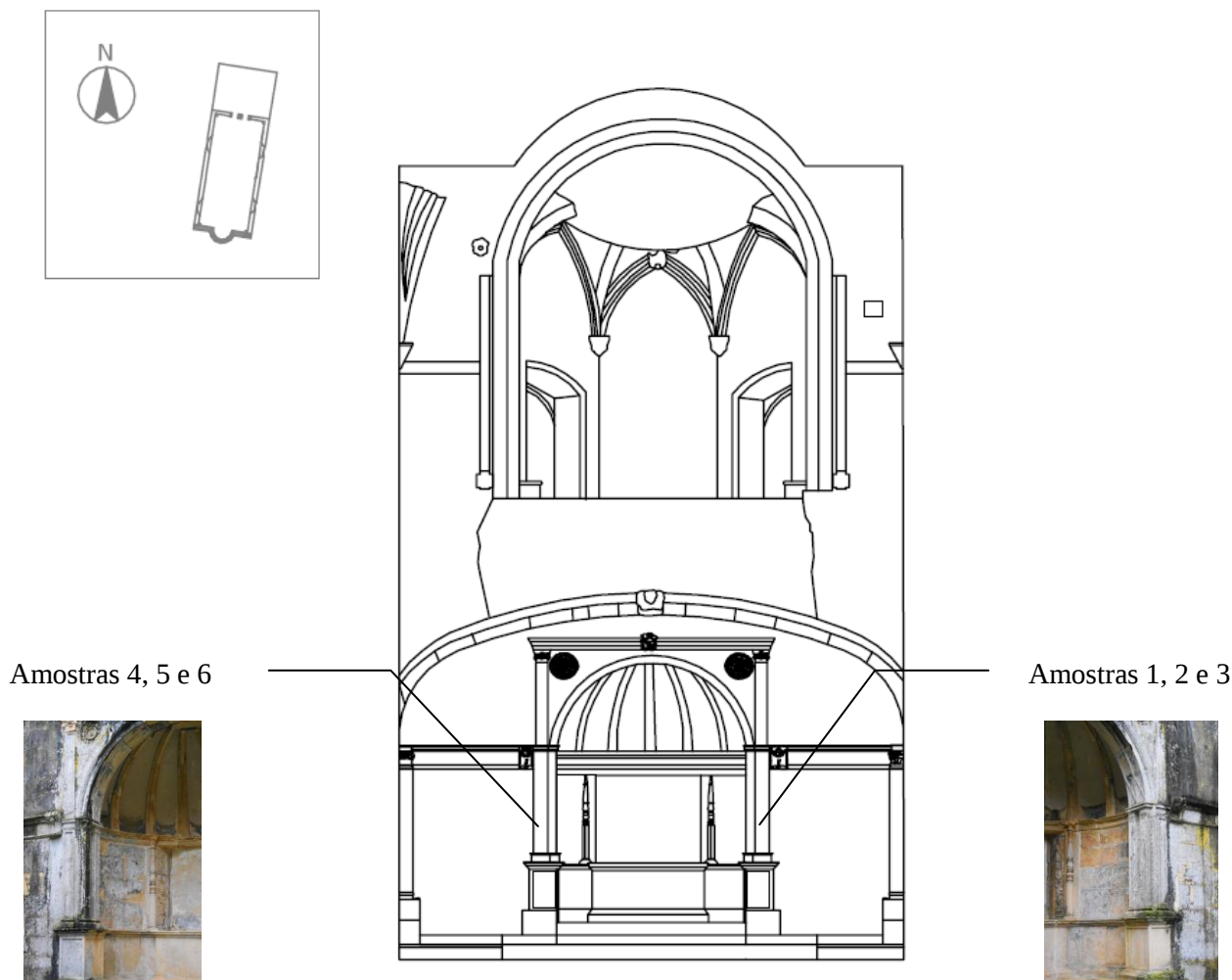


Fig. 11: Local de recolha das amostras (Stara, Urro 2010).

Foram, então, recolhidas seis amostras da abside da Sacristia Incompleta, que se encontra voltada a Sul. As amostras 1,2 e 3 foram recolhidas do lado direito, ou seja, Oeste e as amostras 4,5 e 6 do lado esquerdo, ou seja, Este. A escolha dos locais de recolha de amostra permitiu avaliar a diferença de colonização biológica com a diferente exposição aos elementos atmosféricos (sol, chuva, etc).

Em todos os locais é visível a presença de crescimento biológico, embora não se observe a existência de briófitas, plantas superiores ou colonização animal. Não é visível, a

olho nú, uma diferença acentuada de colonização biológica entre o lado direito e esquerdo da abside. Os locais de recolha de amostra encontram-se descritos na tabela 2.

Tabela 2: Locais de recolha de amostras.

Amostra	Local de recolha	Imagem
1	Base da coluna direita	
2	Coluna direita	
3	Zona interior direita	

Amostra	Local de recolha	Imagem
4	Zona interior esquerda	
5	Base da coluna esquerda	
6	Coluna esquerda	



Fig.12: Recolha de amostra por *swabbing*.



Fig. 13: Amostra recolhida e pronta para transporte.

É necessário ter em conta que qualquer método de recolha de amostras para crescimento em placa ou em meio líquido só permite o isolamento de uma pequena parte dos microrganismos presentes no local, uma vez que muitos não são, simplesmente, cultiváveis (Sainz-Jimenez, 2001).

4.2. Meios de Cultura

Foram utilizados três meios, com a finalidade de fazer crescer diferentes tipos de organismo. Para os organismos heterotróficos foram usados dois meios: *Tryptic Soy Agar* (TSA) como meio geral e *Potato Dextrose Agar* (PDA) suplementado com clortetraciclina para fungos. Para os organismos autotróficos foi seleccionado o meio *Bold Basal Medium* (BBM) que não contém compostos orgânicos, garantindo que não há crescimento de organismos heterotróficos.

Todos os meios foram esterilizados em autoclave, a 121°C e 1 bar durante 15 minutos.

Tabela 3: Composição dos meios de cultura utilizados.

Meio	Composição (por litro de meio):
BBM	• KNO₃: 0,25g • K₂HPO₄: 0,074g • KH₂PO₄: 0,0175g • CaCl: 0,024g • MgSO₄.7H₂O: 0,073g • NaCl: 0,025g • FeSO₄.7H₂O: 0,005g • EDTA: 0,045g • Agár: 15g • Água destilada: 1 l
PDA (HIMEDIA, Ref. 096 – 500g)	• 200,00 g de infusão de batatas • 20,00 g de dextrose • 15,00 g de agar • 10µg clortetraciclina • Água destilada: 1 l
TSA (HIMEDIA, Ref. M290 – 500g)	• 15,00 g de digestivo de caseína pancreática • 5,00 g de digestivo de farelo de soja • 5,00 g de cloreto de sódio • 15,00 g de agar • Água destilada: 1 l

4.3. Isolamento de culturas puras (repicagem):

Para melhor estudar e caracterizar determinado microrganismo é necessário separá-lo de outros que estejam presentes na amostra. Para tal, é necessário proceder à técnica de

isolamento ou repicagem, que consiste na transferência de uma pequena quantidade de uma colónia (ou de uma gota caso haja crescimento em meio líquido) com uma ansa para uma placa, estriando segundo um padrão definido. Inicialmente segue-se um movimento em zig-zag numa pequena área da placa, após o que a ansa (aquecida ao rubro e arrefecida) arrasta desta zona um pouco de inóculo em estrias paralelas. Esta operação repete-se várias vezes para garantir uma boa diluição do microrganismo e o crescimento de colónias isoladas.

Esta foi a técnica utilizada para isolar os microrganismos que cresceram inicialmente nas placas inoculadas com as amostras.

4.4. Testes de identificação dos isolados:

Para se proceder à identificação preliminar dos microrganismos isolados efectuaram-se vários testes e colorações. Os resultados destes, juntamente com o tamanho dos microrganismos obtido por microscopia foram utilizados para consulta no *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* com o objectivo de fazer a referida identificação preliminar.

4.4.1. Coloração de Gram:

→ Procedimento:

1. Colocar uma gota de água sobre uma lâmina de microscópio.
2. Com uma ansa, retirar um pouco de uma colónia isolada e suspender na gota, espalhando o líquido. Deixar secar ao ar durante cerca de um minuto e depois fixar à chama.
3. Cobrir o esfregaço com uma gota de corante cristal de violeta durante 1 minuto.
4. Lavar com água.

5. Cobrir com soluto de lugol durante 1 minuto.
6. Lavar com álcool etílico 96% e deixar durante 30 segundos.
7. Lavar com água.
8. Cobrir com safranina durante 1 minuto.
9. Lavar com água.
10. Observar ao microscópio com a objectiva de imersão.

→ Fundamentos:

Trata-se de um dos métodos de coloração mais aplicados em Bacteriologia por ser um método de coloração diferencial, permitindo uma das divisões mais básicas em termos de classificação bacteriana: bactérias Gram negativas e Gram positivas.

Esta diferenciação baseia-se na diferente estrutura e composição da parede celular bacteriana. Enquanto que a parede das células Gram positivas é constituída por uma grossa camada de peptidoglicano, as Gram negativas possuem apenas uma fina camada deste polissacárido, juntamente com um elevado teor de lípidos.

O cristal de violeta penetra na bactéria a corar e, quando se aplica o mordente (Soluto de Lugol) forma-se, intracelularmente, um complexo corante-iodo, insolúvel em água, que vai corar o citoplasma e a parede celular. A lavagem com álcool dissolve o complexo corante-iodo, e, se a parede celular for permeável a este (ou seja, for pouco rica em peptidoglicano), arrasta-o para fora da célula. Isto implica que, após o passo de diferenciação com álcool, as células Gram negativas deixam sair todo o cristal de violeta que tinham no seu interior, ao passo que as Gram positivas, com uma parede rica em peptidoglicano, não. Ao aplicar a safranina, apenas as bactérias sem complexo corante-iodo no seu interior deixam entrar o corante secundário.

Resumindo, as bactérias Gram positivas coram de roxo e as Gram negativas coram de vermelho ou rosa.

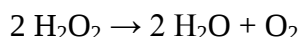
4.4.2. Teste para a presença de catalase:

→ Procedimento:

1. Colocar uma gota de peróxido de hidrogénio 5% sobre uma lâmina.
2. Com o auxílio de uma ansa, suspender material da cultura microbiana e observar a presença/ ausência da formação de bolhas.

→ Fundamentos:

A catalase é uma enzima intracelular (subclasse das peroxidases), encontrada na maioria dos organismos, que decompõe o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) segundo a reacção química:



Encontra-se nos peroxissomas de células animais e vegetais e no citoplasma de células procariotas. O peróxido de hidrogénio é um produto decorrente do metabolismo celular em organismos expostos ao oxigénio atmosférico, capaz de induzir stress oxidativo nas células. Como tal, tem de ser rapidamente convertido numa espécie inócua.

A catalase é também capaz de catalisar a oxidação de outras moléculas como o formaldeído, o ácido fórmico e alguns álcoois. Neste tipo de reacção, a catalase usa uma molécula de peróxido de hidrogénio como agente oxidante, segundo a reacção:



em que R é a forma oxidada da molécula que sofre a reacção.

A diferenciação dos organismos possuidores desta enzima a partir deste teste, é feita pela formação de bolhas devidas à produção de oxigénio nos organismos catalase positivos e a não formação de bolhas nos organismos catalase negativos.

4.4.3. Coloração de Endósporos:

→ Procedimento (Técnica de Schaeffer-Fulton):

1. Colocar uma gota de água sobre uma lâmina de microscópio.
2. Com uma ansa, retirar um pouco de uma colónia isolada e suspender na gota, espalhando o líquido. Deixar secar ao ar durante cerca de um minuto e depois fixar à chama.
3. Aplicar uma gota de corante verde de malaquite.
4. Aquecer à chama durante 5 minutos
5. Lavar com água.
6. Cobrir com safranina durante 1 minuto.
7. Lavar com água e deixar secar durante ao ar.
8. Observar ao microscópio com a objectiva de imersão.

→ Fundamentos:

Os endósporos são estruturas de resistência de bactérias cuja função primária é garantir a sobrevivência do organismo em condições adversas ou de stress ambiental.

Estas estruturas são, por isso mesmo, muito mais resistentes aos raios uv e γ , à ausência de água ou nutrientes e à temperatura do que as formas vegetativas. Neste âmbito, é importante saber quais os organismos produtores de endósporos, na medida em que se espera que estes sejam particularmente resistentes ao biocidas aplicados.

A coloração utilizada seguiu o técnica de Schaeffer-Fulton, na qual os esporos aparecem a verde devido ao verde de malaquite enquanto que as células vegetativas aparecem a rosa.

4.4.4. Coloração de Flagelos:

→ Procedimento (Método de Leifson):

1. Colocar uma gota de água sobre uma lâmina de microscópio.
2. Com uma ansa, retirar um pouco de uma colónia isolada e suspender cuidadosamente na gota, espalhando o líquido. Deixar secar ao ar.
3. Cobrir o esfregaço com corante durante 10 minutos.
4. Lavar cuidadosamente com água.
5. Cobrir o esfregaço com corante de contraste durante 10 minutos.
6. Lavar com água e deixar secar durante ao ar.

Na técnica de coloração de flagelos de Leifson, o corante é uma mistura filtrada de três soluções (I, II e III) e o corante de contraste é a solução IV:

Tabela 4: Soluções utilizadas no método de Leifson.

Solução I	Cloreto de Sódio - 1,5 g Água destilada - 100 ml
Solução II	Ácido Tânico - 6 g Água destilada - 100 ml
Solução III	Fucsina Básica - 1,2 g Álcool Etílico 95% - 100 ml
Solução IV	Azul de Metileno - 1,0 g Água destilada - 100 ml

→ Fundamentos:

Flagelos são apêndices bacterianos de origem endocelular que se projectam para o exterior da célula, ligados à locomoção. Têm 15-20 µm de comprimento e 14-20 nm de espessura, pelo que só podem ser visualizados com colorações especiais.

São compostos por uma proteína designada por flagelina e a sua disposição na célula tem significado taxionómico (ver Fig. 15).

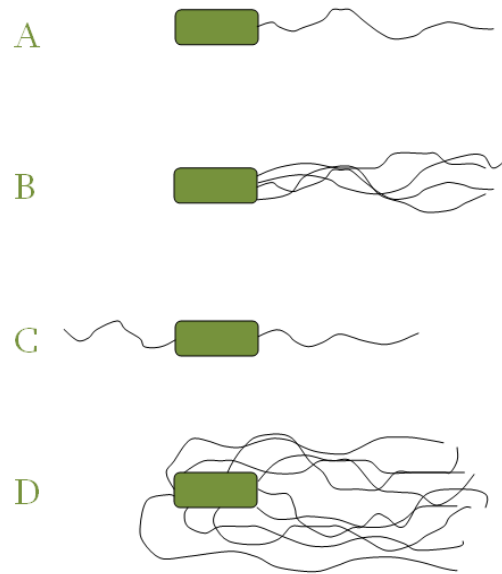


Fig. 14: Localização dos flagelos na célula bacteriana (A- Flagelo monótrico; B- Flagelos lofótricos; C- Flagelos anfítricos; D- Flagelos perítricos).

4.4.5. Teste para a presença de Oxidase:

→ Procedimento:

1. Com a ansa, retirar uma porção de uma colónia.
2. Esfregar a ansa na tira de teste de oxidase.

→ Fundamentos:

A oxidase é uma enzima (subclasse das oxirredutases) que catalisa uma reacção de oxidação/redução envolvendo oxigénio molecular (O_2) como aceitador de electrões. Nestas reacções, o oxigénio é reduzido a água (H_2O) ou peróxido de hidrogénio (H_2O_2).

Em microbiologia, o teste da oxidase refere-se à detecção da presença da enzima citocromo c-oxidase que é a última proteína da cadeia transportadora de electrões. A presença da enzima é reconhecida quando aparece uma coloração azul na tira de teste, após o contacto com a colónia a testar.

4.5. Testes aos biocidas:

A última parte do trabalho consistia em testar a reacção dos microrganismos isolados a alguns agentes biocidas, como forma de estimar a eficácia dos mesmos. É de realçar que os microrganismos no meio natural (neste caso, a pedra) nunca se encontram isolados, estabelecendo, antes, comunidades. As interacções entre os diversos membros destas comunidades podem ser antagonistas ou sinergistas, influenciando directamente a sobrevivência e a resistência a agressões externas como a presença de biocidas no meio.

Desta forma, a avaliação de eficácia de um biocida só pode ser considerada completa quando feita em comunidades semelhantes às encontradas nos locais a que se destinam, ainda que a escolha de microrganismos particularmente resistentes possa servir de indicador para a escolha de biocidas adequados. Pesa, ainda, neste tipo de testes de eficácia, o facto de uma grande parte dos microrganismos não crescerem em placa, pelo que qualquer avaliação deste tipo terá, obrigatoriamente, como alvo, apenas uma parte da população microbiana do local.

A escolha dos biocidas teve como principal critério uma avaliação económica pragmática, tendo sido seleccionados dois agentes que já estavam a ser usados no Convento de Tomar, pelo que estavam imediatamente disponíveis. Foi, ainda, testado um

terceiro biocida, não usado directamente no substrato pétreo, mas antes como aditivo em tintas e vernizes (ver tabela 5).

Tabela 5: Caracterização dos biocidas usados.

Biocida		Acção	Princípio activo
Nome comercial	Designação dada		
Aditivo Anti-Algas e Fungos da Dyrup	Aditivo para tintas	Fungicida e Algicida	• N-2-terbutil-N-4-etil-6-metiltio-1,3, 5-triazina-2-4-diamina (Triazina)
Cloreto de benzalcónio	Biocida 1	Largo espectro	• Cloreto de alquil dimetil benzil amónio (Sal de amónia quaternária)
Biotin T	Biocida 2	Largo espectro	• Cloreto de didecil dimetilamónio (Sal de amónia quaternária), • 2-octil-2H-isotiazol-3-ona (izotiazolinona), • Ácido fórmico

Para a avaliação da eficácia dos diferentes biocidas, utilizaram-se pequenos discos de papel absorvente (recortados de filtros de papel), que foram embebidos no biocida a testar (soluções 3%). Estes discos foram colocados sobre placas nas quais haviam sido recentemente inoculados, por espalhamento, os diferentes microrganismos a testar. Após 96 horas, fez-se a observação do crescimento, confirmando a presença de halos de inibição de crescimento microbiano em torno dos discos embebidos em biocida. Estes halos de inibição foram medidos e comparados, sendo tomados como indicadores da susceptibilidade do microrganismo ao biocida em causa - quanto maior o halo, mais eficaz será o biocida.

Capítulo V – Apresentação e Discussão dos Resultados

5.1. Identificação de Microrganismos:

Tal como esperado, das amostras retiradas da superfície da pedra, foi possível cultivar uma grande variedade de microrganismos. A utilização de meios com diferentes composições permitiu isolar microrganismos heterotróficos (separados entre bactérias e fungos) e também autotróficos.

Dado o longo período de incubação dos microrganismos autotróficos e o período relativamente curto para execução do trabalho experimental, não se realizou a identificação destes. Da observação das placas inoculadas, percebe-se a presença de uma grande variedade de microrganismos (Fig. 16) e, a existência de estruturas aparentemente fúngicas sugere o início do estabelecimento de relações entre os microrganismos: os organismos autotróficos produzem compostos orgânicos que são, então, utilizados pelos heterotróficos como fonte de carbono e energia. O crescimento foi visível em todas as placas, ao fim de, aproximadamente, seis semanas.

Quanto aos microrganismos heterotróficos, desde cedo foi possível verificar uma marcada diferença quantitativa nas diferentes placas inoculadas com amostras. Tal como se percebe pela análise do gráfico 1, há uma diferença nítida no número de microrganismos presentes nas amostras, sendo que as retiradas do lado direito possuem, de modo geral, uma maior contaminação. Dado que o material pétreo é o mesmo para ambos os lados, podemos eliminar a possibilidade de o maior nível de contaminação se dever a características do mesmo, pelo que se pode postular que se deva à menor exposição às condições atmosféricas. Esta hipótese é sustentada pelo facto de no interior do arco, nos locais onde foram recolhidas as amostras 3 e 4 (loais menos expostos), a contaminação ser mais elevada.

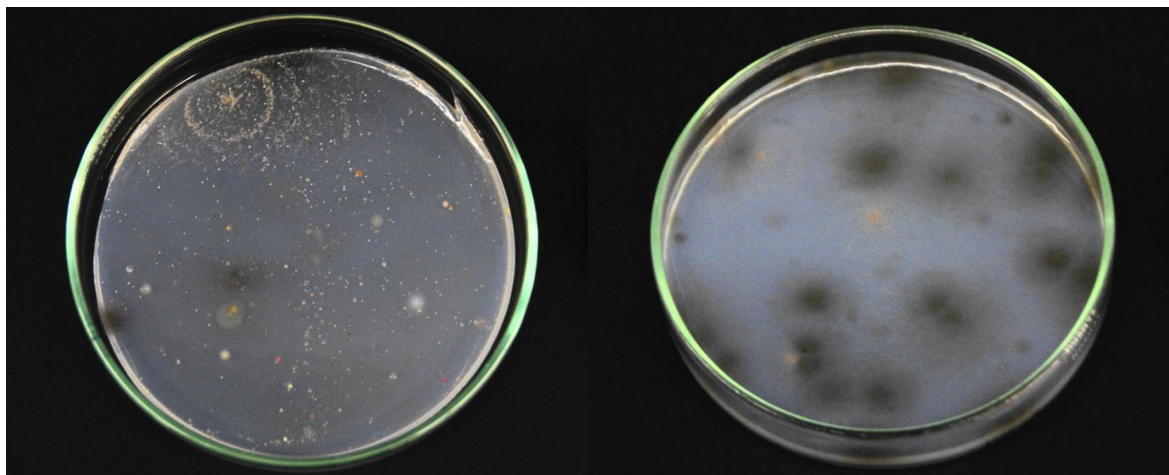


Fig. 15: Exemplos de placas cultivadas de meio BBM (após 6 semanas)

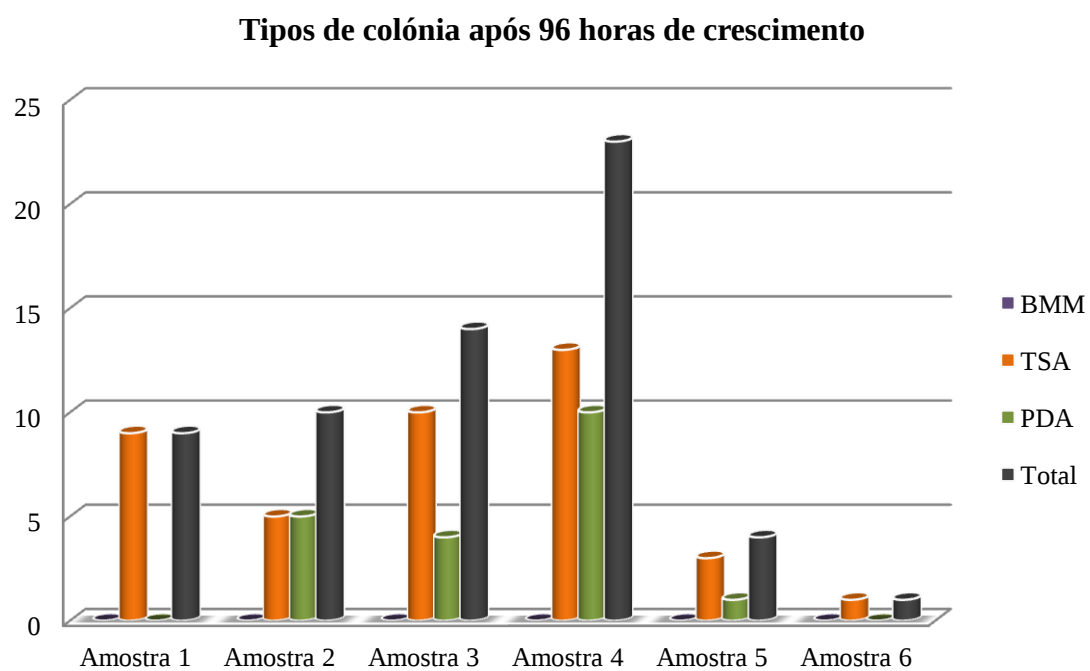
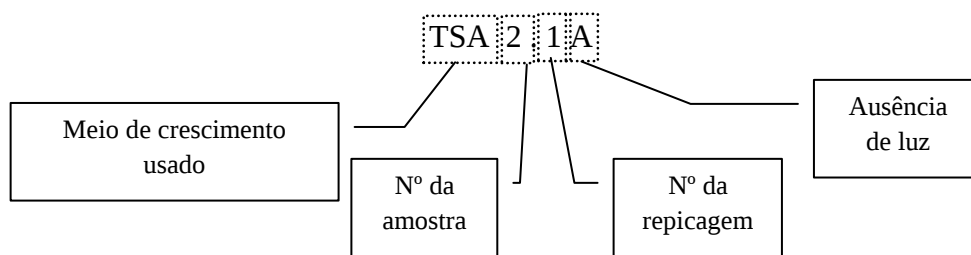


Gráfico 1: Tipos de colónia em cada amostra, divididos por meio de cultura, após 96 horas de crescimento.

Note-se que no meio TSA se observa o crescimento tanto de bactérias, como de fungos, o que explica o facto de haver um maior número de colónias diferentes representadas neste meio do que no meio PDA que é diferencial para crescimento de fungos. Repare-se, ainda, que após 96 horas, o meio mineral não apresentou qualquer crescimento, dada a já referida taxa de crescimento lenta dos organismos autotróficos.

Durante o isolamento inicial dos microrganismos usou-se uma nomenclatura para as placas em que se especificou o tipo de meio usado, o número da amostra da qual provinha o isolado, o número do isolado e o local de crescimento (A- na ausência de luz; B- na presença de luz). Assim, por exemplo, o isolado TSA 2.1A é a primeira repicagem, da placa inoculada com a amostra 2, no meio TSA, na ausência de luz:



Dado que muitos microrganismos aparecem representados em várias placas, abandonaram-se os microrganismos duplicados, adoptando-se uma nova nomenclatura. Assim, passou a designar-se os isolados pelo meio em que se cultivam, seguidos de um B se forem isolados bacterianos ou um F se forem fúngicos e, finalmente, um número que identifica o isolado. Por exemplo:

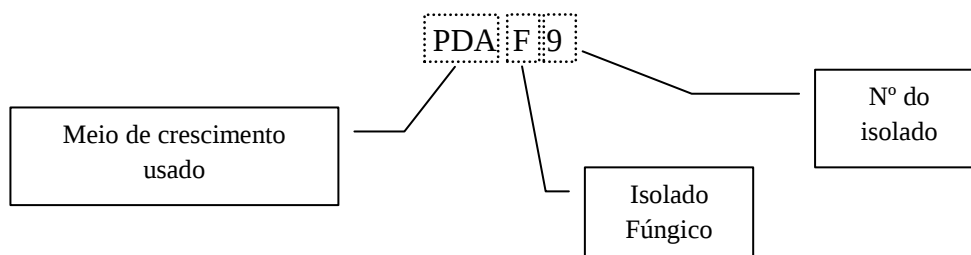


Tabela 6: Nomenclatura dos isolados bacterianos.

Isolado	Isolado Inicial
TSA B1	TSA 4.7B
TSA B2	TSA 4.2B
TSA B3	TSA 4.7A
TSA B4	TSA4.8B; TSA4.6A; TSA3.6A
TSA B5	TSA1.7A; TSA6.1A; TSA1.9A
TSA B6	TSA 6.2A
TSA B7	TSA 1.3A
TSA B8	TSA 5.2A
TSA B9	TSA 4.5A
TSA B10	TSA 4.1A
TSA B11	TSA 2.3A
TSA B12	TSA 4.3A
TSA B13	TSA 4.4A
TSA B14	TSA 5.2A
TSA B15	TSA5.1A; TSA5.1B
TSA B16	TSA3.1B
TSA B17	TSA1.8 A
TSA B18	TSA1.1B; TSA1.2A; TSA6.1B
TSA B19	TSA1.5A

Tabela 7: Nomenclatura dos isolados fúngicos.

Isolado	Isolado Inicial
TSA F1	TSA 1.4A; TSA 2.2A
TSA F2	TSA3.5A
TSA F3	TSA2.1A; TSA4.2B; TSA4.6B
TSA F4	TSA3.3A
TSA F5	TSA3.4A
TSA F6	TSA2.1B
TSA F7	TSA4.3B
TSA F8	TSA 3.1A
TSA F9	TSA1.1A; TSA1.6A
PDA F1	PDA 3.3A; PDA3.4A
PDA F2	PDA 4.1A

Isolado	Isolado Inicial
PDA F3	PDA 5.1A
PDA F4	PDA3.2A; PDA 4.6A; PDA4.8A
PDA F5	PDA4.1B
PDA F6	PDA4.AB
PDA F7	PDA2.1A; PDA3.1A; PDA4.3A; PDA4.7A
PDA F8	PDA2.2A; PDA3.1A; PDA3.2B; PDA3.3B; PDA4.2A; PDA4.4A; PDA4.5A
PDA F9	PDA6.1A; PDA 6.2A

5.1.1. Isolados Bacterianos:

Os resultados obtidos após a realização dos testes anteriormente referidos para os isolados bacterianos estão descritos na tabela 8.

Tabela 8: Resultados dos testes de identificação realizados aos isolados bacterianos.

Isolado	Forma	Gram (Fig 17 e 18)	Coloração das colónias	Tamanho das colónias	Catalase (Fig 19)	Oxidase (Fig 20)	Endósporos	Flagelos
TSA B1	bacilos	-	amarela	médias	+	+	-	-
TSA B2	cocobacilo	-	laranja	pequenas	+	-	-	-
TSA B3	cocobacilo	-	verde/cinza	espalhamento pela placa	+	+	-	-
TSA B4	cocobacilo	-	amarela	muito pequenas	+	-	-	-
TSA B5	cocobacilo	+	amarela	muito pequenas	-	-	-	-
TSA B6	bacilo	-	amarelo	espalhamento pela placa	-	+	-	-
TSA B7	coco	-	rosa forte	pequenas	+	-	-	-
TSA B8	bacilo	-	amarela	espalhamento pela placa	+	+	-	-
TSA B9	cocobacilo	+	amarela	espalhamento pela placa	-	+	-	-
TSA B10	bacilo	+	amarela	pequenas	+	+	-	-
TSA B11	cocobacilo	-	amarela	médias	+	+	-	-

Isolado	Forma	Gram (Fig 17 e 18)	Coloração das colónias	Tamanho das colónias	Catalase (Fig 19)	Oxidase (Fig 20)	Endósporos	Flagelos
TSA B12	cocobacilo	-	amarela	espalhamento pela placa	+	+	-	-
TSA B13	coco	-	amarelo ténue	médias	+	-	-	-
TSA B14	bacilo	-	amarela	espalhamento pela placa	+	+	+	-
TSA B15	cocobacilo	-	amarela	espalhamento pela placa	+	+	-	-
TSA B16	cocobacilo	-	amarela	médias	+		-	-
TSA B17	cocobacilo	-	amarela	pequenas	+	+	-	
TSA B18	bacilo	-	rosa claro	médias/grandes	+	-	-	-
TSA B19	bacilo	+	rosa	médias	+	+	-	-

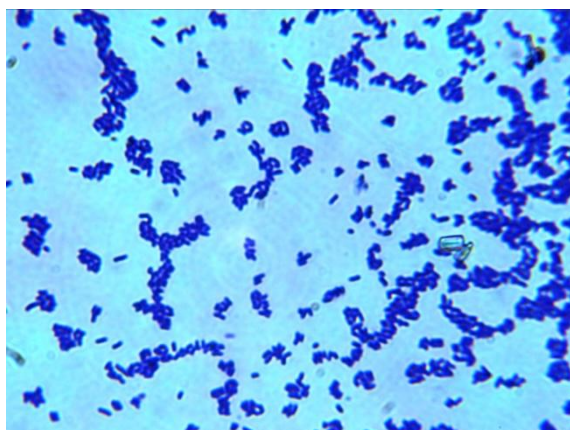


Fig. 16: Exemplo de bactérias Gram positivas

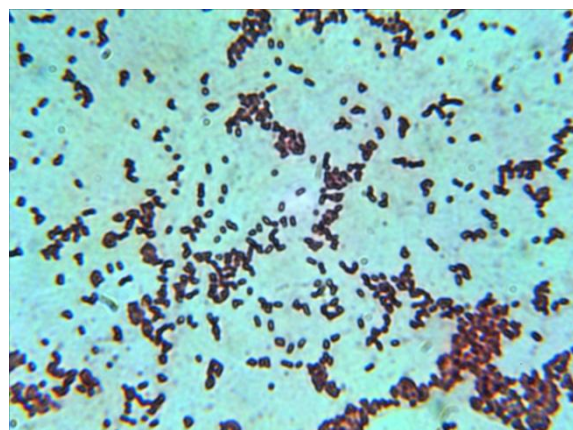


Fig. 17: Exemplo de bactérias Gram negativas

Adicionalmente, realizou-se a medição dos isolados bacterianos, recorrendo a uma câmara fotográfica ligada a um microscópio e a um computador com o software *Scope Photo*. Os resultados são os que se indicam na tabela 9.

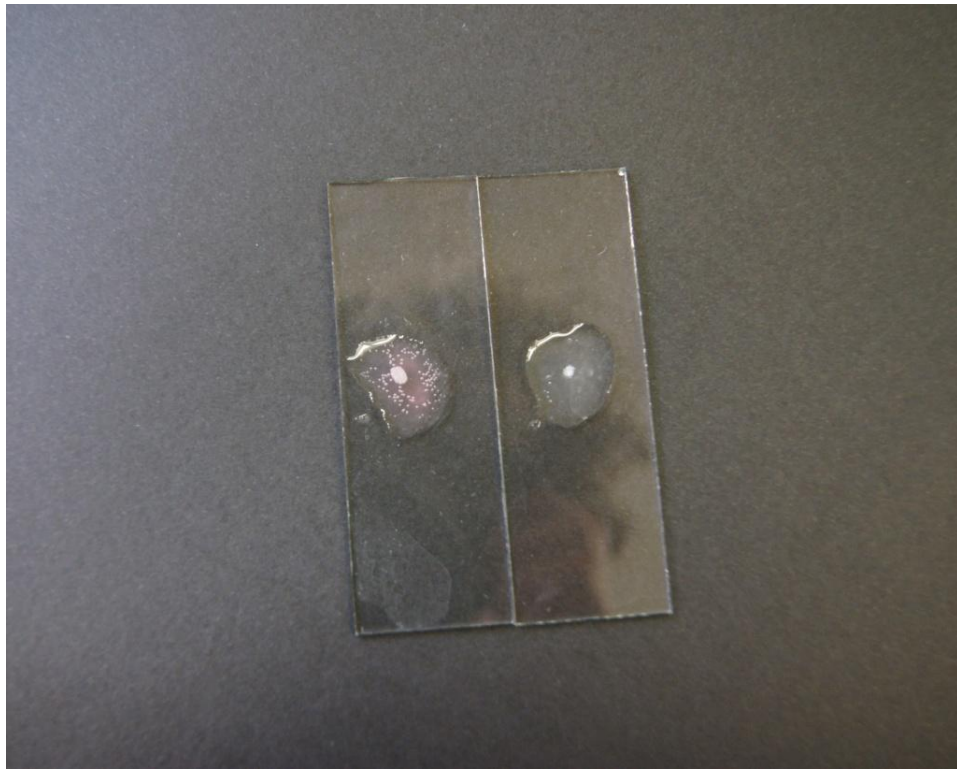


Figura 18: Teste para a presença de Catalase (Esquerda – positivo; direita - negativo)



Figura 19: Tiras de teste para a presença de Oxidase (Tira de cima - positivo; tira do meio – negativo; tira de baixo – controlo)

Tabela 9: Medição dos isolados bacterianos.

Isolado	Comprimento (px)	Largura (px)	Comprimento (μm)	Largura (μm)
TSA B1	68,82	20,00	2,58	0,75
TSA B2	50,91	16,97	1,91	0,64
TSA B3	62,61	32,25	2,34	1,21
TSA B4	74,73	34,41	2,80	1,29
TSA B5	48,17	31,24	1,80	1,17
TSA B6	48,17	20,00	1,80	0,75
TSA B7	24,00	24,00	0,90	0,90
TSA B8	87,73	32,25	3,29	1,21
TSA B9	44,18	33,94	1,65	1,27
TSA B10	70,88	26,83	2,65	1,00
TSA B12	50,60	29,12	1,90	1,09
TSA B13	31,24	31,24	1,17	1,17
TSA B14	73,76	28,84	2,76	1,08
TSA B15	50,12	34,41	1,88	1,29
TSA B17	45,71	28,84	1,71	1,08
TSA B18	144,22	17,59	5,40	0,66
TSA B19	198,60	41,74	7,44	1,56

Ao contrário do que era esperado, as bactérias Gram positivas são muito menos frequentes do que as Gram negativas (ver gráfico 2). Dado o tamanho reduzido da amostra não é possível especular quanto às razões deste facto: poderá ser, simplesmente, uma anomalia estatística ou, por outro lado, poderá haver algum factor que contribua para o sucesso das bactérias Gram negativas em detrimento das Gram positivas como por exemplo presença de um biofilme maduro que proteja os microrganismos presentes da dessecação e de outras condições ambientais adversas.

Coloração de Gram

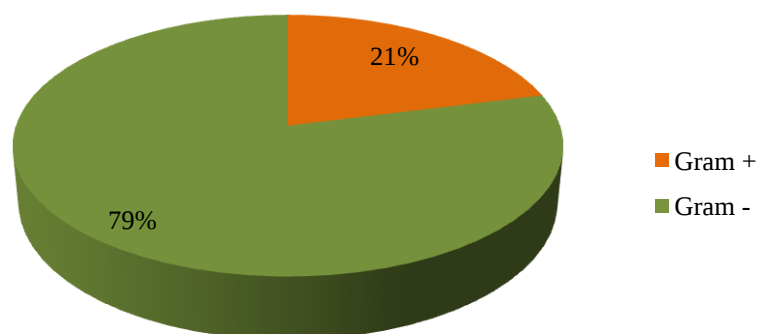


Gráfico 2: Percentagem de bactérias Gram negativas e Gram positivas.

Tal como já foi referido, a pesquisa bibliográfica para identificação das bactérias isoladas baseou-se, principalmente, no *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Dado que para identificar com certeza um microrganismo são necessários vários testes morosos, onerosos e extensos partiu-se de alguns pressupostos, nomeadamente:

- Os microrganismos de cor laranja, rosa, vermelha ou amarelo forte consideram-se produtores de carotenóides.
- Não há deposição de ferro ou manganésio no interior das células.
- Nenhum dos microrganismos é extremófilo.
- Nenhum dos microrganismos é patogénico.

Desta forma, chegou-se à seguinte identificação preliminar:

Tabela 10: Identificação preliminar dos isolados bacterianos.

Isolado	Identificação preliminar
TSA B1	<i>Azotobacter</i> / <i>Zymomonas</i>
TSA B2	<i>Thiobacterium</i> / <i>Cytophaga</i> / <i>Thiobacillus</i> / <i>Arthrobacter</i> / <i>Acetobacter</i> / <i>Pseudomonas</i> / <i>Mycoplana</i> / <i>Aerobacter</i> / <i>Escherichia</i> / <i>Pasteurella</i>
TSA B3	<i>Azotobacter</i> / <i>Zymomonas</i>
TSA B4	<i>Azotobacter</i> / <i>Zymomonas</i>
TSA B5	<i>Propionibacterium</i> / <i>Mycococcus</i> / <i>Cellulomonas</i> / <i>Brevibacterium</i>
TSA B6	<i>Thiobacterium</i> / <i>Acetobacter</i> / <i>Mycoplana</i> / <i>Pseudomonas</i> / <i>Escherichia</i> / <i>Pasteurella</i> / <i>Flavobacterium</i> / <i>Aerobacter</i>
TSA B7	<i>Rhodotheca</i> / <i>Staphylococcus</i>
TSA B8	<i>Azotobacter</i> / <i>Zymomonas</i>
TSA B9	<i>Arthrobacter</i>
TSA B10	- ⁽¹⁾
TSA B11	- ⁽²⁾
TSA B12	<i>Cytophaga</i> / <i>Zymomonas</i> / <i>Mycoplana</i> / <i>Thiobacillus</i> / <i>Flavobacterium</i> / <i>Escherichia</i>
TSA B13	<i>Arthrobacter</i>
TSA B14	<i>Clostridium</i>
TSA B15	<i>Zymomonas</i> / <i>Mycoplana</i> / <i>Thiobacillus</i> / <i>Actinobacillus</i> / <i>Flavobacterium</i> / <i>Escherichia</i>
TSA B16	- ⁽²⁾
TSA B17	<i>Acetobacter</i> / <i>Arthrobacter</i> / <i>Zymomonas</i> / <i>Actinobacillus</i> / <i>Flavobacterium</i> / <i>Escherichia</i>
TSA B18	<i>Rhodotheca</i>
TSA B19	

⁽¹⁾ - Identificação não realizada por falta de dados

⁽²⁾ - Identificação não realizada por falta de crescimento do microrganismo

Obviamente, esta identificação não é definitiva e seriam necessários testes adicionais para determinar com certeza quais os microrganismos presentes. A utilização das actuais técnicas de biologia molecular, francamente aplicadas na área da saúde, seria, certamente útil no processo de confirmação dos microrganismos presentes.

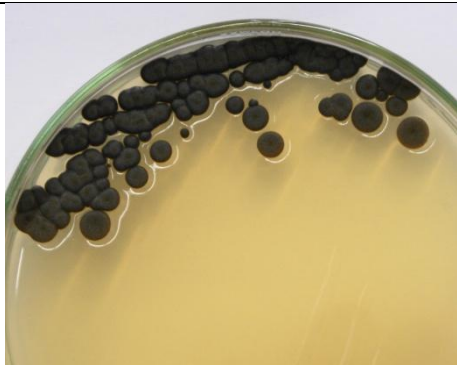
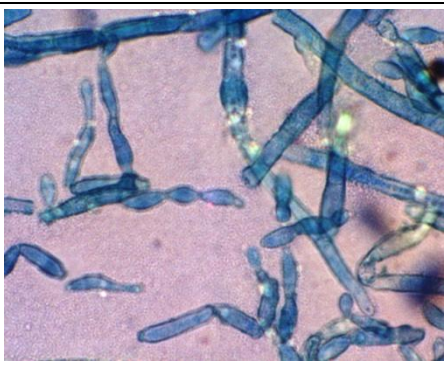
Desta forma, podemos concluir que existe uma variedade considerável de microrganismos na rocha. Porém, tal como se nota em Sainz-Jimenez, 2001, a existência de um determinado microrganismo numa amostra, não implica que este seja responsável pela biodeterioração do substrato, uma vez que a sua presença pode ser meramente

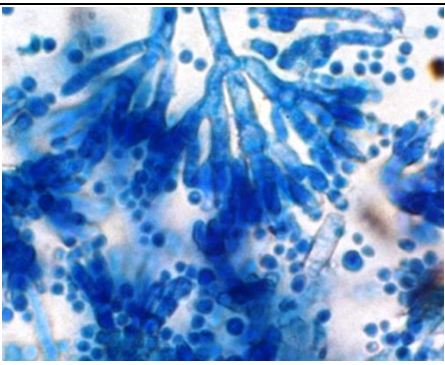
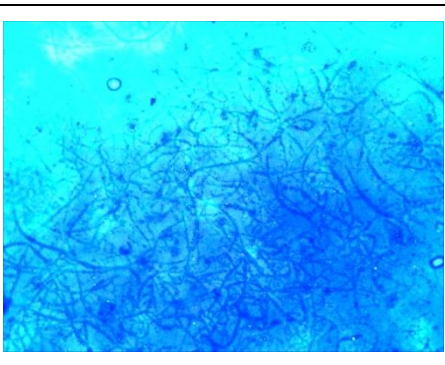
acidental. Da mesma forma, e principalmente quando se utilizam métodos clássicos, os microrganismos com crescimento mais rápido são privilegiados em detrimento daqueles que têm crescimento lento, fazendo com que apareçam sobre-representados. Assim, apesar de os microrganismos identificados se encontrarem nas amostras retiradas na Sacristia Incompleta do Convento de Cristo, seria necessário efectuar estudos adicionais para concluir definitivamente acerca da sua influência na alteração da pedra. Fontes referem a vantagem da utilização de microscopia electrónica de varrimento (SEM – *Scanning Electron Microscopy*) na compreensão das interacções microbianas na superfície pétrea, principalmente da SEM-BSE (*Back-Scattered Mode*) que permite a visualização *in situ* (de los Rios, 2005).

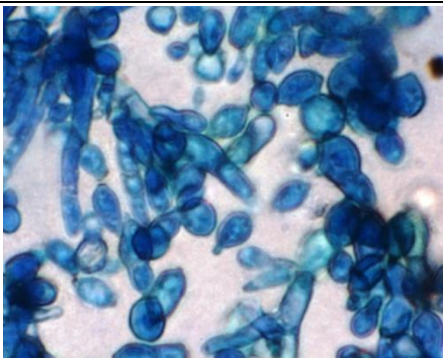
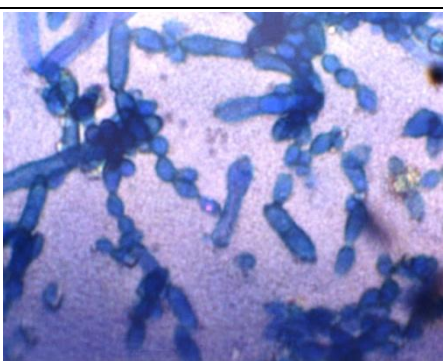
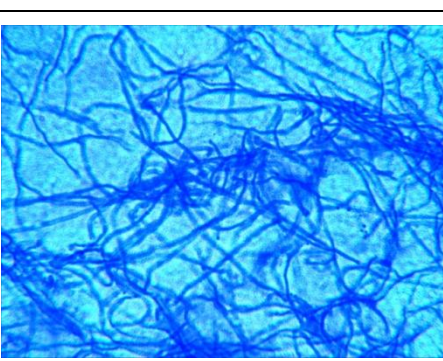
5.1.2. Isolados Fúngicos:

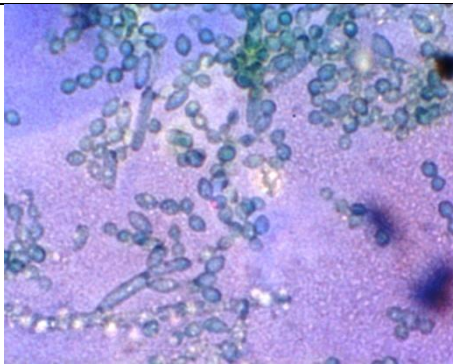
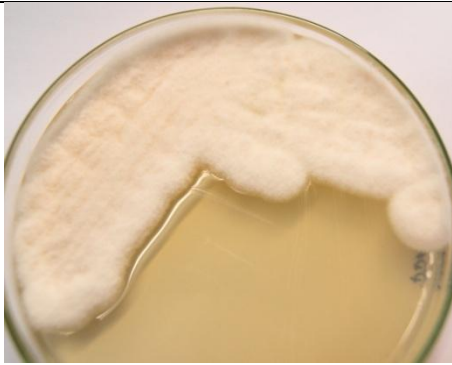
Para os isolados fúngicos, optou-se pela observação macro e microscópica das colónias, com particular atenção para as estruturas reprodutivas:

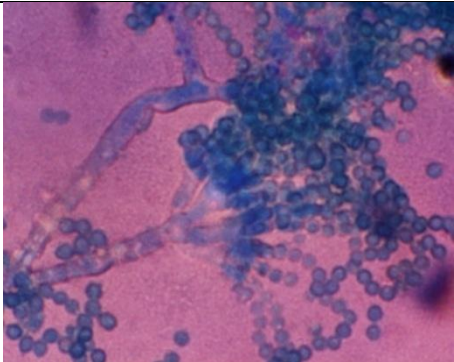
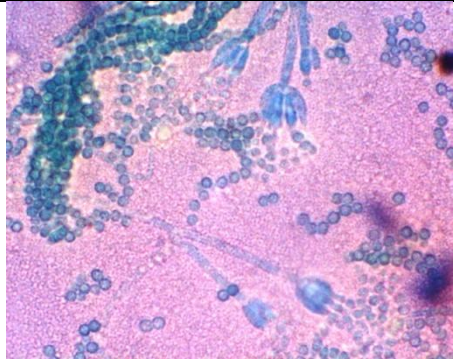
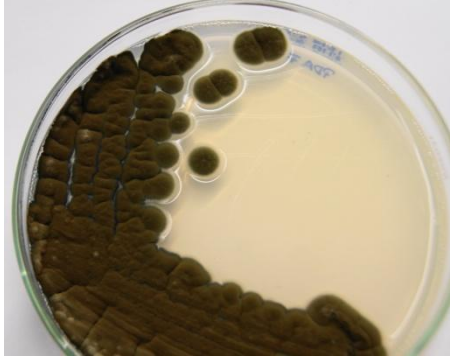
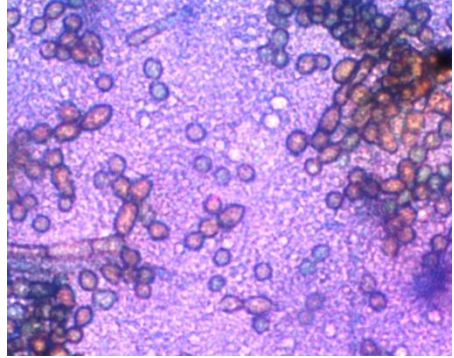
Tabela 11: Resultados da observação macro e microscópica dos isolados fúngicos.

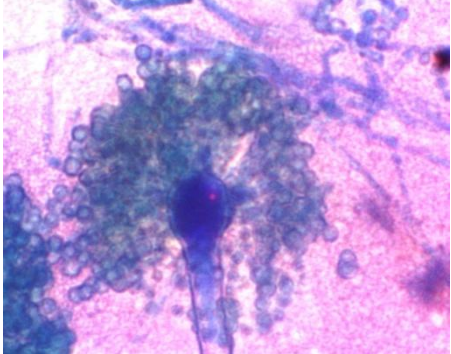
Isolado	Observação Macroscópica	Observação microscópica
TSA F1		

Isolado	Observação Macroscópica	Observação microscópica
TSA F2		
TSA F3		
TSA F4		
TSA F5		

Isolado	Observação Macroscópica	Observação microscópica
TSA F6		
TSA F7		
TSA F8		
TSA F9		

Isolado	Observação Macroscópica	Observação microscópica
PDAF1		
PDAF2		
PDAF3		
PDAF4		

Isolado	Observação Macroscópica	Observação microscópica
PDAF5		
PDAF6		
PDAF7		
PDAF8		

Isolado	Observação Macroscópica	Observação microscópica
PDAF9		

Obteve-se, então, a seguinte identificação preliminar:

Tabela 12: Identificação preliminar dos isolados fúngicos.

Isolado	Hifas	Identificação preliminar			
		Reino	Divisão	Sub-Divisão	Observações
TSA F1	Septadas	<i>Mycota</i>	<i>Eumycota</i>	<i>Deuteromycotina</i>	
TSA F2	Asseptadas	<i>Mycota</i>	<i>Eumycota</i>	<i>Zygomycotina</i>	
TSA F3	Septadas	<i>Mycota</i>	<i>Eumycota</i>	<i>Ascomycotina</i>	Possivelmente <i>Penicillium</i>
TSA F4	Septadas	<i>Mycota</i>	<i>Eumycota</i>	<i>Deuteromycotina</i>	
TSA F5		<i>Mycota</i>	<i>Eumycota</i>		
TSA F6	Septadas	<i>Mycota</i>	<i>Eumycota</i>	<i>Ascomycotina</i>	
TSA F7	Septadas	<i>Mycota</i>	<i>Eumycota</i>	<i>Ascomycotina</i>	Possivelmente <i>Penicillium</i>
TSA F8	Septadas	<i>Mycota</i>	<i>Eumycota</i>	<i>Ascomycotina</i>	
TSA F9		<i>Mycota</i>	<i>Eumycota</i>		
PDAF1	Septadas	<i>Mycota</i>	<i>Eumycota</i>	<i>Ascomycotina</i>	
PDAF2	Septadas	<i>Mycota</i>	<i>Eumycota</i>	<i>Zygomycotina</i>	
PDAF3	Asseptadas	<i>Mycota</i>	<i>Eumycota</i>	<i>Zygomycotina</i>	
PDAF4	Asseptadas	<i>Mycota</i>	<i>Eumycota</i>	<i>Zygomycotina</i>	
PDAF5	Septadas	<i>Mycota</i>	<i>Eumycota</i>	<i>Ascomycotina</i>	Possivelmente <i>Penicillium</i>
PDAF6	Septadas	<i>Mycota</i>	<i>Eumycota</i>	<i>Ascomycotina</i>	
PDAF7	Septadas	<i>Mycota</i>	<i>Eumycota</i>	<i>Ascomycotina</i>	Possivelmente <i>Penicillium</i>

Isolado	Hifas	Identificação preliminar			
		Reino	Divisão	Sub-Divisão	Observações
PDAF8	Septadas	<i>Mycota</i>	<i>Eumycota</i>	<i>Ascomycotina</i>	
PDAF9	Septadas	<i>Mycota</i>	<i>Eumycota</i>	<i>Ascomycotina</i>	Possivelmente <i>Aspergillus</i>

Tal como foi referido para as bactérias, a classificação dos fungos sugerida carece de confirmação. As espécies mencionadas são comumente referidas na literatura (Sterflinger, 2000) como degradadores da pedra, razão pela qual são nomeadas.

5.2. Testes aos biocidas:

Para a análise dos resultados relativos aos halos de inibição de crescimento bacteriano e fúngico causados pelos discos embebidos em biocidas (Fig.: 21 e 22), construíram-se gráficos que ilustram a comparação entre diferentes biocidas. Para efeitos gráficos, nos isolados em que não houve crescimento em toda a placa, considerou-se um halo de 10 centímetros (superior ao diâmetro da placa que é de, aproximadamente, 9 centímetros).

Uma vez mais se realça que as interações entre microrganismos e destes com a rocha podem ter efeitos sinérgicos ou antagonistas, pelo que a avaliação da eficácia dos biocidas não pode ser feita exclusivamente com recurso aos isolados, devendo, numa fase posterior, ser feita com toda a comunidade microbiana e num substrato similar ao do contexto real.

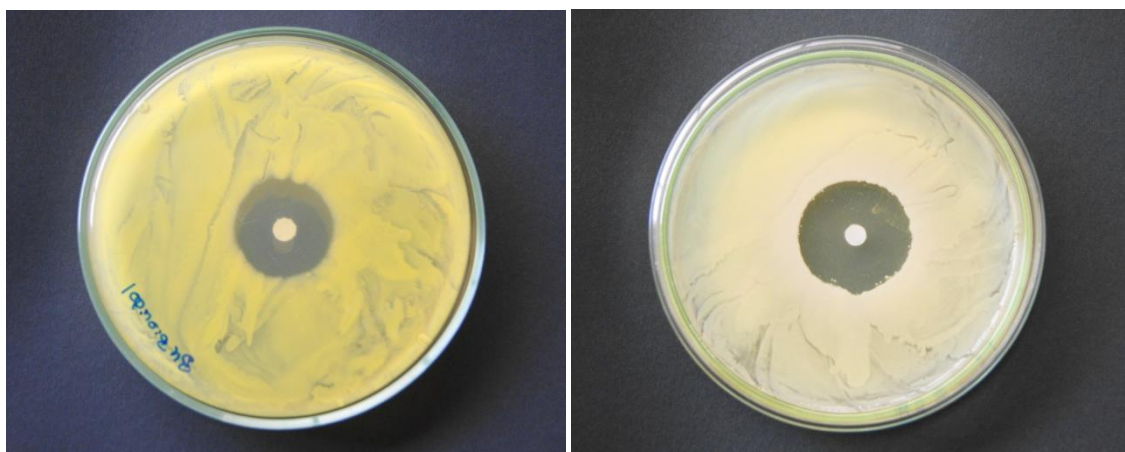


Fig. 20: Exemplos ilustrativos dos halos de inibição de crescimento provocados pelos discos embebidos em biocidas.

5.2.1. Isolados Bacterianos:

Os resultados dos halos de inibição para os isolados bacterianos estão plasmados na tabela abaixo:

Tabela 13: Halos de inibição de crescimento bacteriano em função dos biocidas.

Isolado	Halo (diâmetro em centímetros)		Média
	Biocida 1	Biocida 2	
TSA B1	2,7	2,5	2,6
TSA B2	3,1	3,1	3,1
TSA B3	3,0	2,8	2,9
TSA B4	2,3	2,6	2,5
TSA B5	Sem crescimento*	2,0	6,0
TSA B6	Sem crescimento*	3,8	6,9
TSA B7	3,0	4,0	3,5
TSA B8	-	-	-
TSA B9	-	-	-
TSA B10	-	-	-

TSA B11	Sem crescimento*	2,7	6,4
TSA B12	3,1	2,5	2,8
TSA B13	Sem crescimento*	3,3	6,7
TSA B14	2,7	2,5	2,6
TSA B15	2,8	3,0	2,9
TSA B17	3,0	-	1,5
TSA B18	2,4	1,5	2,0
TSA B19	2,4	3,0	2,7
Médias	3,92	2,18	3,05

*- Considerado como 10,0 centímetros

Para os isolados bacterianos, o biocida 2 provou-se menos eficiente, tanto em termos médios, como para a maioria dos isolados considerados separadamente. As excepções são os isolados TSA B4, TSA B7, TSA B15 e TSA B19, para os quais o biocida 2 suplanta o biocida 1. Este resultado contraria o esperado, uma vez que o biocida 2 combina 2 tipos de biocidas (izotiazolinona e amónia quaternária) e está actualmente a substituir o biocida 1 nos tratamentos da pedra.

Uma vez mais, se realça o facto de a escolha de um biocida em detrimento de outro deverá ser baseada em vários critérios, entre os quais o tipo de organismo a eliminar, razão pela qual é vital fazer uma caracterização da população microbiana antes escolher o processo a adoptar.

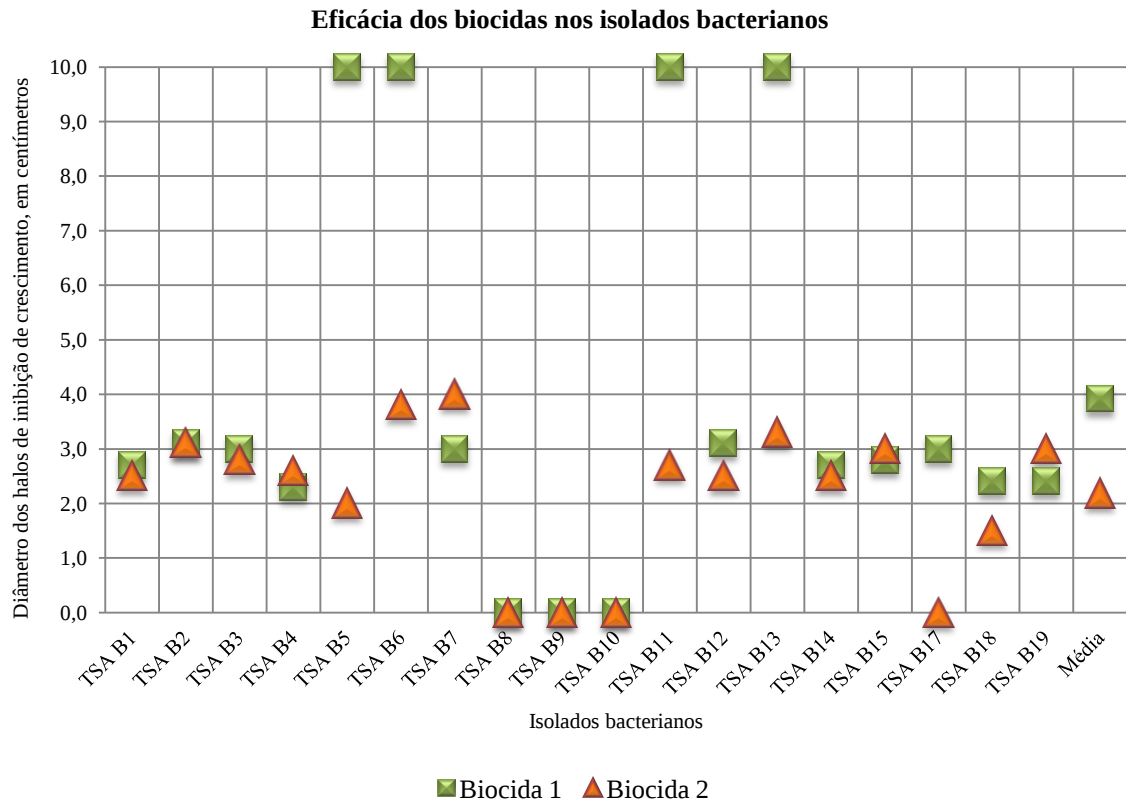


Gráfico 3: Comparação dos diâmetros dos halos de inibição provocados por cada um dos biocidas nos diferentes isolados bacterianos.

5.2.2. Isolados Fúngicos:

Para os fungos, e utilizando um procedimento semelhante ao usado para os isolados bacterianos, obtiveram-se os seguintes resultados:

Tabela 14: Halos de inibição de crescimento fúngico em função dos biocidas.

Agente	Halo (diâmetro em centímetros)			Média
	Aditivo para tintas	Biocida 1	Biocida 2	
TSA F1	4,2	3,0	4,6	3,93
TSA F2	-	Sem crescimento	Sem crescimento	Sem crescimento

Agente	Halo (diâmetro em centímetros)			Média
	Aditivo para tintas	Biocida 1	Biocida 2	
TSA F3	4,4	1,6	6,5	4,17
TSA F4	Sem crescimento	Sem crescimento	Sem crescimento	Sem crescimento
TSA F5	3,5	2,0	3,6	3,03
TSA F6	3,4	2,0	4,6	3,33
TSA F7	3,0	2,5	4,5	3,33
TSA F8	4,7	3,7	7,0	5,13
TSA F9	-	3,3	2,5	1,93
PDA F1	2,5	0,8	4,6	2,63
PDA F2	-	-	3,2	1,07
PDA F3	-	1,1	2,0	1,03
PDA F4	1,1	1,2	4,0	2,10
PDA F5	-	-	3,0	1,00
PDA F6	-	1,0	5,3	2,10
PDA F7	-	-	3,6	1,20
PDA F8	-	1,4	4,7	2,03
PDA F9	3,5	1,4	4,4	3,10
Média	2,79	2,50	4,89	3,40

Da análise do gráfico 4, percebe-se que para os isolados fúngicos, o biocida 2 é o mais eficaz, apresentando, não apenas o valor médio de halo de inibição mais elevado, como também, como também os maiores halos de inibição para praticamente qualquer um dos isolados individualmente. Este resultado é congruente com o esperado, dada a actual tendência para substituir o biocida 1 pelo 2.

A comparação entre o aditivo para tintas e o biocida 1 não é tão clara: ainda que em termos médios, o aditivo para tintas tenha um resultado ligeiramente superior, em alguns isolados, o biocida 1 apresenta resultados claramente superiores (TSA F9, PDA F3, PDA F4, PDA F6 e PDA F8).

Isto vem reforçar a ideia de que, antes de se escolher um tratamento para uma determinada zona afectada por microrganismos, é necessário fazer uma caracterização dos mesmos, por forma a escolher o melhor processo. Obviamente, para além da eficácia directa, é necessário ter em conta o espectro de acção - o aditivo para tintas é fungicida e

algicida, mas será, provavelmente, muito menos eficaz contra bactérias, o que poderá ditar o seu abandono caso a contaminação bacteriana seja elevada.

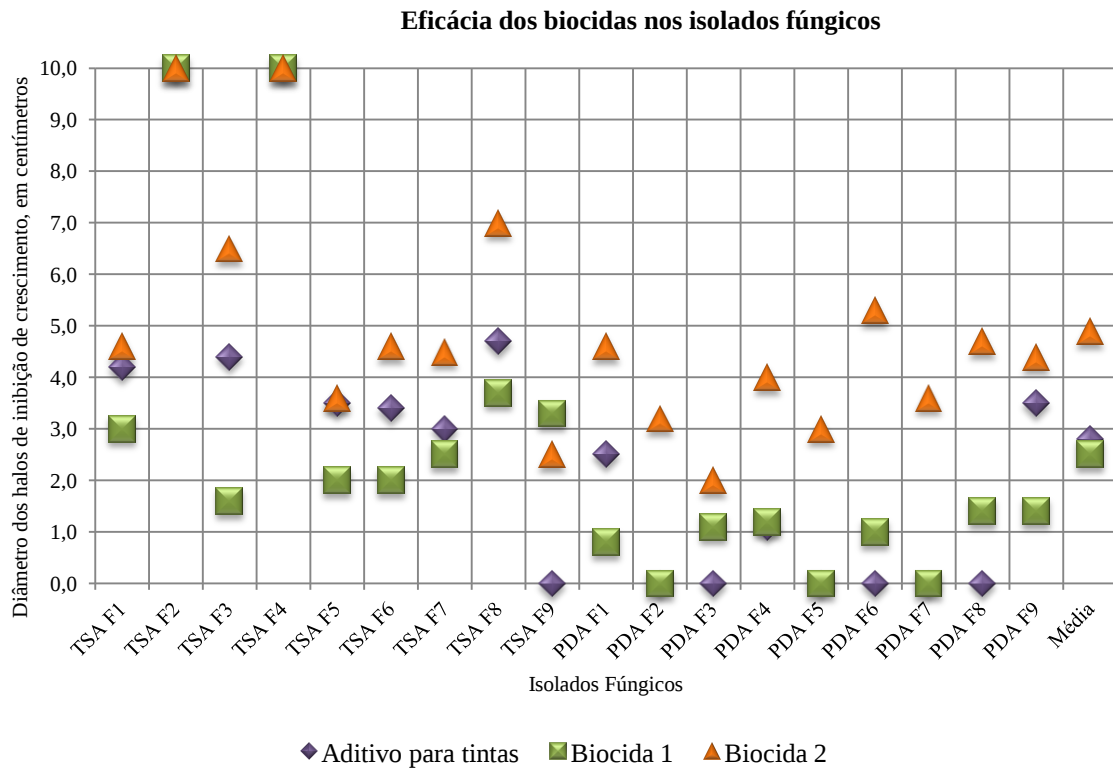


Gráfico 4: Comparação dos diâmetros dos halos de inibição provocados por cada um dos biocidas nos diferentes isolados fúngicos.

Capítulo VI – Conclusões

A utilização de rocha como material de construção em monumentos e obras de arte é uma prática antiga, sendo muito do nosso património edificado baseado neste tipo de material. Desta forma, a caracterização das patologias que afectam e causam alterações no substrato pétreo é um relevante passo para a sua conservação.

Muitos factores intervêm na degradação da pedra e, ainda que seja impossível dissociá-los, é importante caracterizar o impacto de cada um. O crescimento de seres-vivos, em particular de microrganismos, tem um impacto significativo na alteração do substrato, quer porque induz alterações físicas (como a expansão devido à variação do volume da água dos biofilmes contidos nos poros da rocha) e químicas (como a biossolubilização devido à produção de ácidos), quer pelo impacto inestético que pode ter.

Tal como se esperava, no decorrer deste projecto foi possível isolar vários tipos de microrganismo da superfície da rocha. Os autotróficos, de crescimento significativamente mais lento, não foram caracterizados, mas dentro dos heterotróficos, isolaram-se 19 tipos de bactérias e 18 tipos de fungos, a partir de um total de 6 amostras recolhidas. A distribuição da variedade de microrganismos denota uma clara tendência para uma maior colonização dos locais menos expostos às condições ambientais (vento, luz solar directa, etc), o que demonstra haver um efeito prejudicial destas sobre o crescimento de microbiota.

A identificação preliminar dos microrganismos aponta para a existência vários *Genera* de bactérias e fungos, contudo, não se pode afirmar peremptoriamente que a degradação biológica observável na pedra é da exclusiva responsabilidade destes, uma vez que as técnicas de cultivo laboratorial apenas permitem o isolamento de uma pequena parte dos microrganismos realmente presentes no local. Isto implica que haverá uma quantidade e variedade de organismos na pedra muito superior aos aqui demonstrados. Para além disso, o simples facto de um microrganismo ser existir numa amostra recolhida da superfície da pedra, não implica que ele seja, de facto, responsável pela alteração da mesma.

Quanto aos testes efectuados com agentes biocidas, o método utilizado permitiu uma comparação da susceptibilidade dos isolados aos diferentes químicos. Ressalva-se a necessidade de realizar testes adicionais, por forma a avaliar a eficácia dos biocidas nas comunidades microbianas como um todo e não apenas nos isolados e, também, as possíveis interacções com o substrato. Ainda assim, percebe-se uma marcada diferença nos resultados obtidos com os diferentes biocidas: para os fungos, o Biotin T, que conjuga 2 tipos de biocidas é claramente mais eficaz, enquanto que para as bactérias o cloreto de benzalcónio obteve melhores efeitos.

Daqui se compreende a necessidade de conhecer e avaliar os microrganismos envolvidos na alteração do substrato pétreo na elaboração de um plano de limpeza e conservação de monumentos que seja seguro e eficiente.

Bibliografia

1. AIRES-BARROS, L. – **As Rochas dos monumentos portugueses. Tipologias e patologias**. II Série, Nº 3, Cadernos IPPAR, 2001.
2. ALLSOPP, D., SEAL, K.; GAYLARD, C.– **Introduction to Biodeterioration**. 2^a Edição, Cambridge: Cambridge University Press, 2004.
3. ASCASO, C.; SANCHO, L.; RODRIGUES-PASCUAL, C. – **The weathering action of saxicolous lichens in maritime Antarctica**. Polar Biology, 11: 33-39, 1990.
4. ASCASO, C.; WIERZCHOS, J.; CASTELLO, R. - **Study of the biogenic weathering of calcareous litharenite stones caused by lichen and endolithic microorganisms**. International Biodeterioration and Biodegradation, 42: 29–38, 1998.
5. ASCASO, C.; DE LOS RIOS, A. – **Contributions of in situ microscopy to the current understanding of stone biodeterioration**. International Microbiology, 8: 181-188, 2005.
6. ASHURST, J.; DIMES, F. – **Conservation of Building and Decorative Stone**. 4^a edição, Oxford: Butterworth-Hinemann, 2001.
7. AZEVEDO, C. – **Biologia Celular**. 2^a edição, Lisboa: Lidel - Edições Técnicas, 1994.
8. BELLINZONI, A.; CANEVA, G.; RICCI, S.– **Ecological trends in travertine colonization by pioneer algae and plant communities**. International Biodeterioration and Biodegradation, 51: 203–210, 2003.
9. BENDRE, A.; KUMAR, A. – **A Text Book of Practical Botany 1**. Meeruk: Rastogi Publications, 2010.
10. BREED, R. et al – **Berguey's Manual of Determinative Bacteriology**. 7th Edition, Baltimore: The Williams and Wilkins Company, 1957.
11. CAPPELETTI, R. - **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, 2006.
12. CASSAN, F. – **Plants, algae and fungi**. Encyclopædia Britannica, Inc, 2008.

13. CHAROLA, A.; KORTH, G.; CEDROLA, M.; MAGADÁN, M.; KANAN, M.; JAMARILLO, M. – **Manual Básico de Conservação para as Missões Jesuíticas dos Guaraní**. Nova Iorque:World Monuments Fund, 2009.
14. CONVENTO DE CRISTO. Disponível em: <http://www.conventocristo.pt>. Acesso em 27 de Junho de 2011, 11:45.
15. COSENTINO, P, CAPIZZI, P.; FIANDACA, G.; MARTORANA, R.; MESSINA, P. – **Advances in Microgeophysics for Engeneering and Cultural Heritage**. Journal of Earth Science, 20: 623-639, 2009.
16. CRISPIM, C.; GAYLARD, C. – **Cyanobacteria and Biodeteriotation of Cultural Heritage: A Review**. Microbial Ecology, 49: 1-9, 2005.
17. CUTLER, N.; VILES, H.- **Eucaryotic Microorganisms and Stone Biodeteriotation**. Geomicrobiology Journal, 27: 6, 630-646, 2010.
18. DE LOS RIOS, A.; CAMARA, B.; CURA, M.; RICO, V.; GALVAN, V.; ASCASO, C. – **Deteriorating effects of lichen and microbial colonization of carbonate building rocks in Romanesque churches of Segovia (Spain)**. Science of the Total Environment, 407: 1123-1134, 2009.
19. DORNIEDEN, T.; GORBUSHINA, A.; KRUMBEIN, W. – **Biodecay of cultural heritage as a space/time- related ecological situation – as evaluation of a series of studies**. International Biodeterioration and Biodegradation, 46: 261-270, 2000.
20. EL-METWALLY, A.; RAMADAM, A.- **The role of air pollutants and sewage waste in acceleration of degradation of the Islamic cultural heritage of Cairo**. In: Linkov, I. - **Comparative Risk Assessment and Environmental Decision Making**, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, p. 363-370, 2004.
21. FEDERATION OF EUROPEAN MICROBIOLOGICAL SOCIETIES. Disponível em: <http://www.fems-microbiology.org>. Acesso em 05 de Julho de 2011, 12:10.
22. FERNANDES, P. – **Applied microbiology and biotechnology in the conservation of stone cultural heritage materials**. Applied Microbiology and Biotechnology, 73: 291-296, 2006.
23. FERREIRA, W.; SOUSA, J. – **Microbiologia, Volume I**. Lisboa, Porto, Coimbra: Lidel Edições Técnicas, 1998.

24. GAYLARD, C.; MORTON, G. – **Deteriogenic biofilms on buildings and their control: A review**. Biofouling, 14: 59-74, 1999.
25. GAYLARD, C.; GAYLARD, P. – **Biodeterioration of painted walls and its control**. First International RILEM Workshop on Microbial Impact on Building Materials, 2000.
26. GAYLARD, C.; GAYLARD, P. – **Biodeterioration of Historic Buildings in Latin America**. Proceedings of the 9th International Conference DBMC, Brisbane, 2002.
27. GLADIS, F.; EGGERT, A.; KARSTEN, U.; SCHUMANN, R. – **Prevention of biofilm growth on man-made surfaces: evaluation of antialgal activity of two biocides and photocatalytic nanoparticles**. Biofouling, 26: 89-101, 2009.
28. GOOGLE MAPS. Disponível em: <http://maps.google.pt/maps?tab=ml>. Acesso em 07 de Julho de 2011, 11:10.
29. HAUBNER, N.; SCHUMANN, R.; KARSTEN, U. – **Aeroterrestrial Microalgae Growing in Biofilms on Facades – Response to Temperature and Water Stress**. Microbial Ecology, 51: 285-293, 2006.
30. HIRSH, P., ECKHARDT, F.; PALMER, R. - **Methods for the study of rock-inhabiting microorganisms – A mini review**. Journal of Microbiological Methods, 23: 143-167, 1995.
31. INTERNATIONAL SCIENTIFIC COMMITTEE FOR STONE – **Illustrated Glossary on stone deterioration patterns**. ICOMOS, 2008.
32. JROUNDI, F.; FERNANDEZ-VIVAS, A.; RODRIGUES-NAVARRO, C.; BEDMAR, E.; GONZALEZ-MUNOZ, M. – **Bioconservation of Deteriorated Monumental Calcarene Stone and Identification of Bacteria with Carbonatogenic Activity**. Environmental Microbiology, 60: 39-54, 2010.
33. KONDRATYEVA, I.; GORBUSHINA, A.; BOIKOVA, A. – **Biodeterioration of Construction Materials**. Glass Physics and Chemistry, 32: 254-256, 2006.
34. LOPEZ, A.; RIVAS, T.; RAMIL, A.; YANEZ, A. – **Optimization of laser removal of biological crusts in granites**. Applied Physics, 100: 733-739, 2010.
35. LÓPEZ-ACEVEDO, V.; VIEDMA, C.; GONZALEZ, V.; LA IGLESIA, A. – **Salt crystallization in porous construction materials II. Mass transport and crystallization processes**. Journal of Crystal Growth, 182: 103-110, 1997.

36. MACEDO, M.; MILLER, Z.; DIONÍSIO, A.; SAINZ-JIMENEZ, C.-
Biodiversity of Cyanobacteria and green algae on Monuments in the Mediterranean Basin: an overview. Microbiology, 155: 3476-3490, 2009.
37. MANSCH, R.; BOCK, E. – **Biodeterioration of natural stone with special reference to nitrifying bacteria.** Biodegradation, 9: 47-64, 1998.
38. MARAVELAKI-KALAITZAKI, P. – **Black Crusts and Patina on Pentelic Marble from the Parthenon and Erechtheum (Acropolis, Athens): characterization and origin.** Analytica Chimica Acta, 532: 187-198, 2005
39. MILLER, A.; LAIZ, L.; DIONÍSIO, A.; MACEDO, M.; SAINZ-JIMENEZ, C.–
Growth of phototrophic biofilms from limestone monuments under laboratory conditions. International Biodeterioration and Biodegradation, 1-8, 2009a.
40. MILLER, A.; DIONÍSIO, A.; LAIZ, L.; MACEDO, M.; SAINZ-JIMENEZ, C.–
The influence of inherent properties of building limestones on their bioreceptivity to phototrophic microorganisms. Annals of Microbiology, 59: 705-713, 2009b.
41. MOHAMMADI, P.; KRUMBEIN, W. – **Biodeterioration of Ancient Stone Materials from the Persepolis Monuments (Iran).** Aerobiologia, 24: 27-22,, 2008.
42. NUHOGLU, Y., ORGUZ, E.; USLU, H.; OZBEK, A.; IPEKOGLU, B.; OCAK, I.; HASENEKOGLU, I. – **The accelerating effects of the microorganisms on biodeterioration of stone monuments under air pollution and continental-cold climatic conditions in Erzurum, Turkey.** Science of the Total Environment, 364: 272-283, 2006.
43. PAPIDA, S., MURPHY, W.; MAY, E. – **Enhancement of physical weathering of building stones by microbial populations.** International Biodeterioration and Biodegradation, 46: 305-317, 2000.
44. PARQUE NACIONAL DA SERRA DE AIRES E CANDEIROS. Disponível em:
<http://pnsac.blogspot.com/>. Acesso em 05 de Julho de 2011, 12:55.
45. PELCZAR, REID, CHAN – **Microbiologia – volume II.** 1ª edição, McGraw-Hill, 1981.
46. POLO, A.; CAPPITELLI, L.; BRUSETTI, L.; PRINCIPI, P.; VILLA, F.;

- GIACOMUCCI, L.; RANALLI, G.; SORLINI, C. – **Feasibility of Removing Surface Deposits in Stone using Biological and Chemical Remediation Methods**. Environmental Microbiology, 60: 1-14, 2010.
47. RANALLI, G.; ALFANO, G.; BELLI, C.; LUSTRATO, G.; COLOMBINI, M.; BONADUCE, I.; ZANARDINI, E.; ABBRUSCATO, P.; CAPPITELLI, F.; SORLINI, C. – **Biotechnology applied to cultural heritage: bio restoration of frescoes using viable bacterial cells and enzymes**. Journal of Applied Microbiology, 98: 73-83, 2005.
48. ROESELERS, M.; LOOSDRECHT, M.; MUYZER, G. – **Heterotrophic Pioneers Facilitate Phototrophic Biofilme Development**. Microbial Ecology, 54: 578-585, 2007.
49. ROGERS, K. – **Fungi, algae and Protists**. 1st Edition. New York: Britannica Educational Publishing, 2011.
50. SAIZ-JIMENEZ, C. – **Biodeterioration vs Biodegradation: the role of Microorganisms in the Removal of Pollutants Deposited on Historic Buildings**. International Biodeterioration and Biodegradation, 40: 225-232, 1997.
51. SAIZ-JIMENEZ, C. - **Biodeterioration: An Overview of the State-of-the-Art and Assessment of Future Directions**. Advances Research Centre for Cultural Heritage Interdisciplinary Projects: Bio-degradation of cultural heritage Workshops Proceedings, 2001.
52. SOCIEDADE PORTUGUESA DE MICROBIOLOGIA. Disponível em: <http://www.spmicrobiologia.pt>. Acesso em 05 de Julho de 2011, 12:00.
53. STARA, M.; URRU, C. – **Progetto di Conservazione e Restauro della “Casa do Capítulo Incompleto”**. Tomar: Instituto Politécnico de Tomar, 2010.
54. STERFLINGER, K. – **Fungi as Geological Agents**. Geomicrobiology Journal, 17: 97-124, 2000.
55. STERFLINGER, K. – **Fungi: Their role in deterioration of cultural heritage**. Fungal Biology Reviews, 24: 47-55, 2010.
56. THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. Disponível em: <http://www.asm.org/>. Acesso em 14 de Janeiro de 2011, 11:18.
57. URZÍ, C.; REALINI, M. – **Color changes of Noto’s calcareous sandstone as related to its colonization by microorganisms**. International Biodeterioration

- and Biodegradation, 42: 45-54, 1998.
58. URZÍ, C., VENDRELL, M.; PERNICE, A. – **Biomining Processes on Rock and Monument Surfaces Observed in Field and Laboratory Conditions**. Geomicrobiology Journal, 16: 39-54, 1999.
59. URZÍ, C.; DE LEO, F. – **Evaluation of the efficiency of water-repellent and biocide compounds against microbial colonization of mortars**. International Biodeterioration and Biodegradation, 60: 25-34, 2007.
60. WALKER, J.; SPEAR, J.; PACE, N. – **Geobiology of a microbial endolithic community in the Yellowstone geothermal environment**. Nature, 434: 1011-1014, 2005.
61. WARSCHEID, T.; BRAAMS, J. – **Biodeterioration of stone: a review**. International Biodeterioration and Biodegradation, 46: 343-368, 2000.
62. WARSCHEID, T. - **Prevention and Remediation against biodeterioration of building materials**. Proceedings of the Second International RILEM Workshop on Microbial Impact on Building Materials, 2004.
63. WEBSTER, A.; MAY, E. - **Bioremediation of weathered-building stone surfaces**. Trends in Biotechnology, 24: 255-260, 2006.
64. WIKTOR, V.; DE LEO, F.; URZÍ, C.; GUYONNET, R.; GROSSEAU, P.; GARCIA-DIAZ, E. – **Accelerated laboratory test to study fungal biodeterioration of cementitious matrix**. International Biodeterioration and Biodegradation, 63: 1061–1065, 2009.
65. ZANARDINI, E.; ABBRUSCATO, P.; GHEDINI, N.; REALINI, M.; SORLINI, C. – **Influence of atmospheric pollutants on the biodeterioration of stone**. International Biodeterioration and Biodegradation, 45: 35-42, 2000.