



Instituto Politécnico de Tomar

Escola Superior de Tecnologia de Tomar

Renata Brites Pereira da Silva

**DEGRADAÇÃO BIOLÓGICA E FÍSICA DO
EDIFÍCIO DA SACRISTIA INCOMPLETA DO
CONVENTO DE CRISTO**

Relatório de Estágio

Orientado por:

Doutora Dina Mateus, IPT
Doutor João Coroado, IPT

Relatório de Estágio apresentado
ao Instituto Politécnico de Tomar
para cumprimento dos requisitos necessários
à obtenção do grau de Mestre em
Tecnologia Química

RESUMO

A pedra é um dos materiais de excelência para a construção de monumentos e obras de arte, porém sofre, inevitavelmente, processos de degradação que conduzem à perda de património histórico e cultural. Os microrganismos desempenham um papel primordial na alteração da rocha dos monumentos, interagindo com o próprio substrato e com factores externos em processos de carácter químico e físico. Para estabelecer estratégias de conservação e limpeza dos substratos pétreos urge que se conheçam os factores envolvidos na sua degradação. Neste projecto, fez-se uma caracterização dos microrganismos presentes em seis amostras retiradas por *swabbing* das paredes da Sacristia Incompleta do Convento de Cristo, em Tomar, recorrendo a técnicas de microbiologia clássica. Em seguida, utilizaram-se discos de papel embebidos em diferentes biocidas para avaliar a eficácia relativa dos mesmos através dos halos de inibição que provocam em placas de crescimento dos isolados bacterianos e fúngicos. Para as bactérias testaram-se dois biocidas: Biotin T e Cloreto de Benzalcónio e, para os fungos, os mesmos dois produtos e, ainda, um aditivo para tintas com poder algicida e fungicida fabricado pela Dyrup.

Verificou-se que existe uma grande variedade de microrganismos presentes nas amostras, com incidência nas zonas mais protegidas e que os biocidas actualmente em uso têm diferentes eficácias de acordo com o tipo de microrganismo que coloniza a pedra: o Cloreto de Benzalcónio é mais eficaz com os isolados bacterianos, enquanto que o Biotin T apresenta melhores resultados no caso dos isolados fúngicos. Desta forma, conclui-se que, antes de estabelecer uma estratégia de conservação e limpeza dos monumentos é necessário caracterizar cuidadosamente os factores que influem na sua degradação, a fim de escolher o método mais eficaz.

Palavras-chave: Deterioração da pedra; bioalteração; bactérias; fungos; biocidas

ABSTRACT

Stone is an excellent material for the construction of monuments and works of art, but it inevitably suffers weathering and degradation which lead to the loss of historical and cultural heritage. Microorganisms play a key role in the alteration of monuments, interacting with the substrate itself as well as with external factors in chemical and physical processes. In order to establish strategies for the maintenance of stony substrates it is important to identify the factors involved in their degradation. In this project, a characterization of the microorganisms present in six samples taken by swabbing from the walls of the Sacristia Incompleta of the Convento de Cristo in Tomar was made, using classical microbiology techniques. After isolation, the relative effectiveness of different biocides was evaluated by placing soaked paper disks in Petri dishes inoculated with the isolates and measuring the resulting inhibition halos. Bacteria were tested with Biotin T and Benzalkonium Chloride. Fungi were tested with the same two products and also with an additive for paints with algacide and fungicide properties made by Dyrup.

A wide variety of microorganisms was found to be present in the samples, especially on the more protected areas. It was also found that the biocides currently in use have different efficacies depending on the type of microorganisms that colonize the rock: Benzalkonium Chloride is more effective with the bacterial isolates, while Biotin T is best used in the case of fungal isolates. Therefore, we conclude that, before establishing a strategy for the conservation and cleaning of monuments, it is necessary to carefully define the factors that influence their degradation in order to choose the most effective method.

Keywords: Stone deterioration; bacteria, fungi, biocides

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus orientadores, Prof. Doutora Dina Mateus e Prof. Doutor João Coroado, pelo apoio e direcção na pesquisa, trabalho laboratorial e elaboração do relatório final. Uma palavra em especial para o Prof. Fernando Costa que, não tendo oficialmente o papel de orientador, em muito me ajudou e guiou, dando um “empurrão” inicial num tema que me era estranho: a pedra. Gostaria, igualmente, de agradecer às antigas alunas do programa Erasmus no IPT, Cristina Urro e Miriam Stara, do Departamento de Arte, Conservação e Restauro que, através do Prof. Fernando Costa, me facultaram o projecto da Sacristia Incompleta.

Reconheço, ainda, o auxilio prestado pelos técnicos do Departamento de Engenharia do Química e do Ambiente, Eng^a Isabel e Eng^o Alcino, pela orientação no laboratório, principalmente, nos primeiros dias de trabalho prático.

Em termos pessoais, gostaria de agradecer aos meus colegas de curso, Catarina, Joana, Ana, André e Miguel, pelo apoio, amizade e camaradagem na parte curricular do mestrado. Sem o bom humor, espírito de equipa e convivência que tivemos, este teria sido um passo bem mais difícil da minha vida.

Um agradecimento muito especial aos meus pais, Clara e António, pelo apoio de sempre, por estimularem o meu crescimento enquanto pessoa e espicaçarem em mim a curiosidade e vontade de saber. Também à melhor irmã que poderia ter desejado, Débora, pela amizade desde que nasci.

Finalmente, uma palavra em particular ao Vítor, meu marido mas mais do que isso, meu amigo, camarada, companheiro e amparo. Sem ti, nunca teria sequer começado esta viagem.

Obrigado!

Índices

Índice Geral:

	Pág
Capítulo I – Considerações Iniciais	1
1.1. Considerações gerais e objectivos	1
1.2. Convento de Cristo	3
1.3. A Rocha do convento de Cristo	7
Capítulo II - Processos de degradação da pedra	11
2.1. Processos Físicos	11
2.2. Processos Químicos	12
2.3. Processos Biológicos	17
2.3.1. Colonização Biológica:	19
2.3.1.1. Bactérias	20
2.3.1.2. Cianobactérias	21
2.3.1.3. Algas	22
2.3.1.4. Fungos	23
2.3.1.5. Líquenes	24
2.3.1.6. Musgos	24
2.3.1.7. Plantas superiores	25
2.3.1.8. Animais	25
2.3.2. Sucessão biológica	26
2.3.3. Biofilmes	27
Capítulo III - Limpeza da pedra e prevenção da degradação	31
3.1. Métodos Físicos e Mecânicos	33
3.2. Métodos Químicos	35
3.2.1. Tipos de Biocidas	36
3.2.1.1. Sais de amónia quaternária	36
3.2.1.2. Isotiazolinonas	37
3.2.1.3. Outros compostos organohalogenados	37

3.2.1.4. Triazinas	37
3.2.1.5. Compostos fenólicos	38
3.2.1.6. Agentes oxidantes	38
3.2.1.7. Aldeídos	38
3.2.1.8. Álcoois	38
3.2.1.9. Ácidos orgânicos e seus ésteres	39
3.2.2. Mecanismos de acção	39
3.3. Métodos Biológicos - Biorremediação	40
Capítulo IV - Materiais e Métodos	45
4.1. Recolha de amostras	45
4.2. Meios de Cultura	49
4.3. Isolamento de culturas puras (repicagem)	50
4.4. Testes de identificação dos isolados	51
4.4.1. Coloração de Gram	51
4.4.2. Teste para a presença de Catalase	53
4.4.3. Coloração de Endósporos	54
4.4.4. Coloração de Flagelos	55
4.4.5. Teste para a presença de Oxidase	56
4.5. Testes aos Biocidas	57
Capítulo V – Apresentação e Discussão dos Resultados	59
5.1. Identificação de microrganismos	59
5.1.1. Isolados Bacterianos	63
5.1.2. Isolados Fúngicos	69
5.2. Testes aos biocidas	75
5.2.1. Isolados Bacterianos	76
5.2.2. Isolados Fúngicos	78
Capítulo VI - Conclusão	81
Bibliografia/ Webgrafia	83

Índice de Figuras:

Figura		Pág
Figura 1	Convento de Cristo, Tomar (Google maps, 2011)	3
Figura 2	Imagem 3D do convento de Cristo, evidenciando a <i>Sacristia Incompleta</i> (Google maps, 2011)	6
Figura 3	Fotografia aérea da <i>Sacristia Incompleta</i>	6
Figura 4	Parque Natural da Serra D'Aire e Candeeiros	8
Figura 5	Calcário oolítico	10
Figura 6	Diagrama esquemático ilustrativo da conversão de SO ₂ em ácido sulfúrico e a reacção com rochas carbonatadas sujeitas a escorrência	14
Figura 7	Diagrama esquemático ilustrativo da conversão de NO _x em ácido nítrico e a reacção com rochas carbonatadas sujeitas a escorrência	15
Figura 8	Crescimento de musgo <i>Sacristia Incompleta</i> do Convento de Cristo	25
Figura 9	Esquema da formação de um biofilme	27
Figura 10	Estrutura geral dos compostos de amónia quaternária, em que R1,R2, R3 e R4 são grupos com carbono e X ⁻ é um anião (como cloro ou bromo)	36
Figura 11	Local de recolha das amostras	46
Figura 12	Recolha de amostra por <i>swabbing</i>	49
Figura 13	Amostra recolhida e pronta para transporte	49
Figura 14	Localização dos flagelos na célula bacteriana (A- Flagelo monótrico; B- Flagelos lofótricos; C- Flagelos anfítricos; D- Fagelos perítricos).	56
Figura 15	Exemplos de placas cultivadas de meio BBM (após 6 semanas)	60
Figura 16	Exemplo de bactérias Gram positivas	64
Figura 17	Exemplo de bactérias Gram negativas	64
Figura 18	Teste para a presença de Catalase (Esquerda – positivo; direita - negativo)	65
Figura 19	Tiras de teste para a presença de Oxidase (Tira de cima - positivo; tira do meio – negativo; tira de baixo – controlo)	65

Figura 20 Exemplos ilustrativos dos halos de inibição de crescimento provocados
pelos discos embebidos em biocidas

76

Índice de Tabelas:

Tabelas		Pág
Tabela 1	Mecanismos de acção dos biocidas	39
Tabela 2	Locais de recolha de amostras	47
Tabela 3	Composição dos meios de cultura utilizados	50
Tabela 4	Soluções utilizadas no método de Leifson	55
Tabela 5	Caracterização dos biocidas usados.	58
Tabela 6	Nomenclatura dos isolados bacterianos	62
Tabela 7	Nomenclatura dos isolados fungicos	62
Tabela 8	Resultados dos testes de identificação realizados aos isolados bacterianos	63
Tabela 9	Medição dos isolados bacterianos	66
Tabela 10	Identificação preliminar dos isolados bacterianos	68
Tabela 11	Resultados da observação macro e microscópica dos isolados fúngicos	69
Tabela 12	Identificação preliminar dos isolados fúngicos	74
Tabela 13	Halos de inibição de crescimento bacteriano em função dos biocidas	76
Tabela 14	Halos de inibição de crescimento fúngico em função dos biocidas	78

Índice de Gráficos:

Gráficos		Pág
Gráfico 1	Tipos de colónia em cada amostra, divididos por meio de cultura, após 96 horas de crescimento	60
Gráfico 2	Percentagem de Bactérias Gram negativas e Gram positivas	67
Gráfico 3	Comparação dos diâmetros dos halos de inibição provocados por cada um dos biocidas nos diferentes isolados bacterianos	78
Gráfico 4	Comparação dos diâmetros dos halos de inibição provocados por cada um dos biocidas nos diferentes isolados fúngicos	80

Lista de Abreviaturas e Siglas

Abreviatura/ Sigla	Significado
ADN	Ácido Desoxirribonucléico
BBM	<i>Bold Basal Medium</i>
EPS	<i>Extracellular Polymeric Substances</i> – Substâncias Poliméricas Extracelulares
Fig	Figura
ISCS	<i>International Scientific Committee for Stone</i>
NO _x	Óxidos de azoto
OIT	Octilisotiazolinona
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
SEM-BSE	<i>Back.Scattered Mode Scanning Electron Microscopy</i>
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
UNESCO	<i>United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization</i>
UV	Ultravioleta

Lista de Símbolos

Símbolo	Significado
γ	gama
$^{\circ}\text{C}$	graus Célsius
cm	centímetro
g	grama
ml	mililitro
nm	nanómetro
px	pixel
μg	micrograma
μm	micrómetro

