Diversidade microbiológica do edifício da Sacristia Incompleta do Convento de Cristo, em Tomar, e avaliação do seu controlo por biocidas

Dina M. R. Mateus^{1,2,*}

Renata B. Silva¹

Fernando M. C. Costa¹

João P. F. Coroado^{1,2}

¹Instituto Politécnico de Tomar, Campus da Quinta do Contador, Estrada da Serra, 2300-313 Tomar, Portugal

²GeoBiotec – Geobiociências, Geotecnologias e Geo-engenharias, Universidade de Aveiro

*dinamateus@ipt.pt

Resumo

Com o objetivo de caracterizar os microrganismos que colonizam as paredes calcárias da Sacristia Incompleta do Convento de Cristo, em Tomar, e estudar em laboratório o seu controlo por agentes biocidas, recolheram-se por *swabbing* amostras de seis locais e caracterizou-se a flora microbiana presente cultivável em laboratório, recorrendo a técnicas de microbiologia clássica. Verificou-se a presença de fungos, de bactérias heterotróficas e de microrganismos autotróficos em todas as amostras. Avaliou-se a eficácia relativa de diferentes biocidas através dos halos de inibição que provocam em placas de crescimento dos isolados bacterianos e fúngicos e testou-se o Biotin T, o cloreto de benzalcónio e, no caso dos fungos, também um aditivo para tintas. O cloreto de benzalcónio mostrou-se mais eficaz com os isolados bacterianos e o Biotin T com os isolados fúngicos.

Palavras-chave

Deterioração da pedra
Alteração biológica
Bactérias
Fungos
Biocidas

Microbiological diversity in the Unfinished Sacristy building of the Convent of Christ, Tomar, and evaluation of its biocide-based control

Abstract

This laboratory research aimed at characterizing the microorganisms that colonize the limestone walls of the Unfinished Sacristy of the Convent of Christ (Tomar, Portugal), as well as to study their control by means of biocidal agents. Six different locations were sampled through swabbing and the microorganisms were characterized using classical microbiology techniques. The presence of fungi, heterotrophic bacteria and autotrophic microorganisms was verified in all samples. The relative effectiveness of different biocides was tested through the analysis of the inhibition halos they caused in the growth plates of bacterial and fungal isolates. For bacteria, two currently used biocides were tested: Biotin T and benzalkonium chloride. For fungi, these same two biocides plus a paint additive were assessed. The biocides showed different levels of effectiveness for different microorganisms: the benzalkonium chloride was more effective on bacterial isolates, while Biotin T showed a better performance on fungal isolates.

Keywords

Stone decay
Biodeterioration
Bacteria
Fungi
Biocides

ISSN 2182-9942

Introdução

Os materiais pétreos são desde tempos imemoriais usados nas construções, em particular naquelas que hoje são consideradas património arquitetónico e histórico a preservar. Todos os materiais pétreos estão sujeitos a fenómenos de degradação, como a meteorização causada pela exposição aos elementos ambientais. As características da pedra calcária e a sua abundância em Portugal continental, principalmente no litoral centro, favorecem a sua utilização na edificação, quer como material estrutural quer como decorativo. Contudo, a susceptibilidade à alteração destes materiais obriga a diagnósticos e técnicas de conservação e restauro convenientemente sustentadas analiticamente. A falta de manutenção ou de limpeza adequada deixam marcas, muitas vezes irreversíveis. Neste trabalho, foi selecionado um exemplo particularmente crítico da degradação da pedra enquanto material de construção.

O Convento de Cristo é um complexo monumental histórico localizado na cidade de Tomar, em Portugal, 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 hectares. Estende-se do Castelo de Tomar até ao aqueduto dos Pegões, numa distância de mais de 7 quilómetros [1]. É neste complexo que se insere a Sacristia Incompleta, 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. É um edifício retangular, em pedra calcária, do Jurássico médio [2], proveniente da região, situado a

sudoeste do primeiro claustro. Possuía um teto abobadado plano, sustentado por pilares que, quando desapareceu deixou toda a estrutura exposta às condições atmosféricas. Atualmente é visível a colonização de todas as superfícies por variados organismos.

Os agentes físicos, químicos e biológicos atuam em conjunto, de forma antagonista ou sinérgica, na deterioração da pedra [2], estando intimamente ligados entre si. A alteração física e química das rochas deve-se à quebra das ligações físicas e a reações químicas, intercrystalinas e intracrystalinas, perda de coesão ou desmoronamento, por interação com as condições do meio, e inicia-se e progride de forma relativamente rápida após a extração e talhe dos blocos da pedreira. A alteração geralmente é influenciada pela atividade de microrganismos responsáveis pela degradação biológica. O corolário desta afirmação dita que a degradação química das rochas está intimamente relacionada com a composição química respetiva, mas também, com as condições exteriores a que estas estão expostas. Ou seja, para compreender o fenómeno é imprescindível conhecer o material pétreo mas, igualmente, as condições exógenas que regulam os fenómenos da transformação [2].

Cada monumento, sujeito ao clima local, pode ser considerado um *habitat* diferente de qualquer outro [3]. Contudo, efeitos microclimáticos podem promover 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 [4].

Os principais modelos de colonização da rocha consideravam que o organismo pioneiro era obrigatoriamente um fotoautotrófico: dado que estes requerem apenas luz solar, água e minerais para o seu crescimento assumia-se que estes abririam caminho para as bactérias heterotróficas, fungos e organismos superiores, promovendo o aparecimento de uma camada

Figura 1. Locais de recolha das amostras.

de alimento orgânico [5]. Desta forma, a biomassa dos microrganismos fotossintéticos pode ser utilizada por microrganismos heterotróficos como fontes de carbono e energia [6]. Atualmente, 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 [7] e Zanardini *et al.* [8] tornaram 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.

Tradicionalmente, os problemas relacionados com a biodeterioração são controlados pela simples aplicação de biocidas. Porém, esta atitude começa a mudar e surge a compreensão de que é necessária uma abordagem multidisciplinar que inclua os fatores ambientais e as propriedades do substrato para criar uma solução mais eficaz [9-11]. Considera-se também, 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 [12]. A falta de limpeza e de manutenção de edifícios e monumentos históricos é um dos fatores que contribui de forma mais decisiva para a colonização biológica e deterioração [13].

Atualmente, para além dos métodos de limpeza físicos ou mecânicos, como a escovagem, a microabrasão, o uso de jacto de areia [12] ou a aplicação de radiação [5], e dos métodos químicos, estão disponíveis novos métodos. Perspetivam-se vantagens para os métodos de biorremediação [10, 14-17], bem como para os métodos que envolvem a incorporação de materiais antimicrobianos com propriedades de autolimpeza, como os fotocatalisadores heterogêneos [18].

Materiais e métodos

Recolha de amostras

Foram recolhidas amostras de seis locais da abside da Sacristia Incompleta do Convento de Cristo, que se encontra voltada a Norte (Figura 1 e Tabela 1). As amostras 1, 2 e 3 foram recolhidas do lado direito (Oeste) e as amostras 4, 5 e 6 do lado esquerdo (Este). A escolha dos locais de recolha das amostras permitiu avaliar a diferença de colonização biológica com a diferente exposição aos elementos atmosféricos. O método usado foi o *swabbing*, com zaragatoas esterilizadas e mergulhadas em solução de Ringer para transporte (Figura 2). Optou-se pelo método de *swabbing* com zaragatoa por ser um método não invasivo da matriz de suporte e permitir grande versatilidade de escolha da zona de amostragem.

Isolamento e meios de cultura

Utilizaram-se três meios de cultura diferentes. Para os microrganismos heterotróficos foram usados dois meios:

Tabela 1

Locais de recolha de amostras

Amostra	Local de recolha	
1	Base da coluna direita
2	Coluna direita
3	Zona interior direita
4	Zona interior esquerda
5	Base da coluna esquerda
6	Coluna esquerda

Figura 2. Recolha de amostra por *swabbing*.

Tryptic Soy Agar (TSA), da Himedia, como meio específico para bactérias e *Potato Dextrose Agar* (PDA), também da Himedia, suplementado com clorotetraciclina para crescimento de fungos. Para os organismos autotróficos foi selecionado o meio *Bold Basal Medium* (BBM) [19] que, além do agar-agar, não contém compostos orgânicos, potenciando assim o crescimento de organismos autotróficos. Os crescimentos dos microrganismos heterotróficos foram realizados numa incubadora a 22 °C

sem luz e os dos microrganismos autotróficos foram conduzidos a 22 °C numa incubadora com fotoperíodo de luz natural.

Após crescimento das amostras inoculadas nestes meios, foram repicados microrganismos por forma a se obter o respetivo isolamento.

Caracterização dos isolados

Para se proceder à caracterização dos microrganismos isolados efetuaram-se vários testes e colorações. Para os isolados bacterianos, procedeu-se à coloração de Gram, coloração de flagelos pelo método de Leifson, coloração de endósporos pelo método de Schaeffer-Fulton, teste para a presença de catalase, teste para a presença de oxidase e medição do tamanho dos isolados. Os resultados dos testes e das colorações, em conjunto com o tamanho dos microrganismos obtido por microscopia, podem ser utilizados para efetuar a identificação dos microrganismos presentes nas amostras com recurso ao *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*.

Para os isolados fúngicos, foi feita a observação macro e microscópica dos isolados, com particular atenção às estruturas reprodutivas coradas com azul de metileno.

Testes aos biocidas

Após o isolamento dos microrganismos e da sua caracterização inicial, os isolados foram utilizados para testar alguns biocidas comerciais, por forma a se avaliar a sua eficácia. Foram selecionados dois agentes que já estavam a ser usados no monumento e normalmente utilizados em trabalhos de conservação e restauro, sendo-lhes apontadas as vantagens de apresentarem elevada eficiência e uma interferência mínima com o substrato pétreo. Utilizou-se ainda um terceiro biocida, com um princípio ativo diferente, normalmente não utilizado em substrato pétreo, mas como aditivo em tintas e vernizes comerciais aplicados em trabalhos de construção e de reabilitação urbana (Tabela 2).

Para a avaliação da eficácia dos diferentes biocidas, utilizaram-se pequenos discos de papel absorvente, embebidos no biocida a testar (soluções aquosas 3 % v/v). Colocaram-se os discos sobre placas previamente inoculadas, por espalhamento, com os microrganismos a testar. Os ensaios foram realizados em duplicado. Após 96 horas, fez-se a observação do crescimento, confirmando a

Tabela 2

Caracterização dos biocidas usados

Biocida (nome comercial)	Ação	Princípio activo
Biotin T	Largo espectro	Cloreto de didecil dimetilamónio (sal de amónio quaternário); 2-octil-2H-isotiazol-3-ona (isotiazolinona); ácido fórmico
Cloreto de benzalcónio	Largo espectro	Cloreto de alquil dimetil benzil amónio (sal de amónio quaternário)
Aditivo anti-algas e fungos, Dyrup	Fungicida e algicida	N-2-terbutil-N-4-etil-6-metiltio-1,3,5-triazina-2,4-diamina (triazina)

Figura 3. Exemplos de placas cultivadas de meio BBM (após 6 semanas).

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 suscetibilidade do microrganismo ao biocida em causa. Quanto maior o halo, mais eficaz será o biocida.

Apresentação e discussão dos resultados

Isolamento e caracterização de microrganismos

A abside encontrava-se colonizada de forma dispersa por líquenes e comunidades de algas e na altura do ano em que foi efetuada a amostragem (janeiro/fevereiro) apresentava elevada humidade. Não se observou a existência de briófitas, plantas superiores ou colonização animal. Não foi visível, a olho nu, uma diferença acentuada de colonização biológica entre o lado direito e esquerdo da abside.

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.

Da observação das placas de BBM inoculadas percebeu-se a presença de microrganismos fotossintéticos e a existência de algumas estruturas fúngicas. O crescimento foi visível em todas as placas (Figura 3), mas apenas ao fim de aproximadamente seis semanas.

Quanto aos microrganismos heterotróficos, verificou-se o aparecimento das primeiras colónias 24 h após a inoculação e uma marcada diferença quantitativa nas diferentes placas inoculadas com as amostras. Na Figura 4 apresenta-se uma contagem dos diferentes tipos de unidades formadoras de colónias ao fim de 4 dias. Da análise destes resultados percebe-se a existência de uma diferença nítida no número de diferentes microrganismos presentes nas amostras, sendo que as retiradas do lado direito da abside possuem, de modo geral, uma maior

Figura 4. Tipos de colónia em cada amostra, divididos por meio de cultura, após 4 dias de crescimento.

Tabela 3

Resultados dos testes aos isolados bacterianos

Isolado	Forma	Gram	Coloração das colónias	Tamanho das colónias	Catalase	Oxidase	Endósporos	Flagelos	Comprimento × largura (µm)
TSA B1	Bacilos	–	Amarela	Médio	+	+	–	–	2,58×0,75
TSA B2	Cocobacilo	–	Laranja	Pequeno	+	–	–	–	1,91×0,64
TSA B3	Cocobacilo	–	Verde/cinza	Espalhamento pela placa	+	+	–	–	2,34×1,21
TSA B4	Cocobacilo	–	Amarela	Muito pequeno	+	–	–	–	2,80×1,29
TSA B5	Cocobacilo	+	Amarela	Muito pequeno	–	–	–	–	1,80×1,17
TSA B6	Bacilo	–	Amarelo	Espalhamento pela placa	–	+	–	–	1,80×0,75
TSA B7	Coco	–	Rosa forte	Pequeno	+	–	–	–	0,90×0,90
TSA B8	Bacilo	–	Amarela	Espalhamento pela placa	+	+	–	–	3,29×1,21
TSA B9	Cocobacilo	+	Amarela	Espalhamento pela placa	–	+	–	–	1,65×1,27
TSA B10	Bacilo	+	Amarela	Pequeno	+	+	–	–	2,65×1,00
TSA B11	Cocobacilo	–	Amarela	Médio	+	+	–	–	–
TSA B12	Cocobacilo	–	Amarela	Espalhamento pela placa	+	+	–	–	1,90×1,09
TSA B13	Coco	–	Amarelo ténue	Médio	+	–	–	–	1,17×1,17
TSA B14	Bacilo	–	Amarela	Espalhamento pela placa	+	+	+	–	2,76×1,08
TSA B15	Cocobacilo	–	Amarela	Espalhamento pela placa	+	+	–	–	1,88×1,29
TSA B16	Cocobacilo	–	Amarela	Médio	+	–	–	–	–
TSA B17	Cocobacilo	–	Amarela	Pequeno	+	+	–	–	1,71×1,08
TSA B18	Bacilo	–	Rosa claro	Médio/grande	+	–	–	–	5,40×0,66
TSA B19	Bacilo	+	Rosa	Médio	+	+	–	–	7,44×1,56

contaminação. Dado que o material pétreo é o mesmo em ambos os lados da abside, é possível eliminar a hipótese de o maior nível de contaminação se dever a características do material, pelo que se pode postular que se deve 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 (locais menos expostos), a contaminação ser mais elevada.

Após repicagem, obtiveram-se 19 isolados bacterianos, aos quais foram realizados os testes supramencionados. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.

No caso dos fungos obtiveram-se 18 isolados com características diferentes, apresentados na Tabela 4, sendo a identificação preliminar quanto ao género apresentada na Tabela 5.

Observa-se assim que existe uma variedade considerável de microrganismos na rocha. Porém, tal como referido por Sainz-Jimenez [20], 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 não ser prejudicial. Da mesma forma, 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.

Testes aos biocidas

Utilizaram-se discos absorventes embebidos em solução aquosa do biocida a testar, sempre com uma concentração de 3 %. A decisão de usar esta concentração foi um compromisso entre a gama de concentrações normalmente utilizada em trabalhos de conservação e em estudos realizados por outros investigadores [18] e, por outro lado, a obtenção de halos de inibição mensuráveis face ao diâmetro das caixas de Petri utilizadas nos ensaios.

Para a análise dos resultados relativos aos halos de inibição de crescimento bacteriano e fúngico, causados pelos discos embebidos em biocidas (exemplo ilustrativo na Figura 5), construíram-se os gráficos apresentados, respetivamente nas Figuras 6 e 7, que ilustram a comparação entre os diferentes biocidas. Para efeitos gráficos, nos isolados em que não houve crescimento em toda a placa, considerou-se um halo de 10 cm (superior ao diâmetro da placa que é de, aproximadamente, 9 cm).

Tabela 4
Resultados da observação macro e microscópica dos isolados fúngicos

Isolado	Observação macroscópica	Observação microscópica	Isolado	Observação macroscópica	Observação microscópica
TSA F1			PDA F1
TSA F2			PDA F2
TSA F3			PDA F3
TSA F4			PDA F4
TSA F5			PDA F5
TSA F6			PDA F6
TSA F7			PDA F7
TSA F8			PDA F8
TSA F9			PDA F9

Tabela 5

Identificação preliminar dos isolados fúngicos

Isolado	Hifas	Identificação preliminar	
		Sub-Divisão	Gênero
TSA F1	Septadas	Ascomycotina	<i>Cladosporium</i>
TSA F2	Asseptadas	Zygomycotina	<i>Mucor</i>
TSA F3	Septadas	Ascomycotina	<i>Penicillium</i>
TSA F4	Septadas	Ascomycotina	<i>Fusarium</i>
TSA F5	–	–	–
TSA F6	Septadas	Ascomycotina	<i>Cladosporium</i>
TSA F7	Septadas	Ascomycotina	<i>Penicillium</i>
TSA F8	Septadas	Ascomycotina	<i>Cladosporium</i>
TSA F9	–	–	–
PDAF1	Septadas	Ascomycotina	<i>Cladosporium</i>
PDAF2	Asseptadas	Zygomycotina	<i>Mucor/Rhizopus</i>
PDAF3	Asseptadas	Zygomycotina	<i>Mucor</i>
PDAF4	Asseptadas	Zygomycotina	<i>Mucor</i>
PDAF5	Septadas	Ascomycotina	<i>Penicillium</i>
PDAF6	Septadas	Ascomycotina	<i>Cladosporium</i>
PDAF7	Septadas	Ascomycotina	<i>Penicillium</i>
PDAF8	Septadas	Ascomycotina	<i>Cladosporium</i>
PDAF9	Septadas	Ascomycotina	<i>Aspergillus</i>

Figura 5. Exemplo ilustrativo de um halo de inibição de crescimento provocado por um disco embebido em biocida.

Para os isolados bacterianos, o Biotin T provou-se menos eficiente, tanto em termos médios, como para a maioria dos isolados considerados separadamente. As exceções foram os isolados TSA B4, TSA B7, TSA B15 e TSA B19, para os quais o Biotin T suplantou o cloreto de benzalcônio. Este resultado contraria o esperado, uma vez que o Biotin T combina 2 tipos de biocidas (isotiazolinona e amônia quaternária) e está atualmente a substituir o cloreto de benzalcônio nos tratamentos da pedra.

Da análise da Figura 7 percebe-se que para os isolados fúngicos o Biotin T foi o mais eficaz, apresentando, não apenas o valor médio de halo de inibição mais elevado como também os maiores halos de inibição para praticamente qualquer um dos isolados. Este resultado é congruente com o esperado, dada a atual tendência para substituir o cloreto de benzalcônio pelo Biotin T.

Figura 6. Comparação dos diâmetros dos halos de inibição provocados por cada um dos biocidas nos diferentes isolados bacterianos.

Figura 7. Comparação dos diâmetros dos halos de inibição provocados por cada um dos biocidas nos diferentes isolados fúngicos.

A comparação entre o aditivo para tintas e o cloreto de benzalcónio não é tão clara. Em termos médios, o aditivo para tintas teve um efeito ligeiramente superior, mas em alguns isolados o cloreto de benzalcónio apresentou resultados claramente superiores (TSA F9, PDA F3, PDA F4, PDA F6 e PDA F8). 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.

Os resultados obtidos permitem reforçar a ideia de que, antes de se intervir num suporte com colonização biológica, se deve proceder à identificação das espécies presentes, bem como à sua suscetibilidade aos diferentes agentes biocidas. Obviamente, para além da eficácia direta, é necessário ter em conta o espectro de ação. A escolha dos biocidas parece atualmente ser ditada pela preocupação em controlar os agentes fúngicos e algas; no entanto deverá ter-se em atenção que as bactérias poderão também desempenhar um papel ativo na deterioração da pedra.

Conclusões

Muitos fatores intervêm na degradação da pedra e, ainda que seja impossível dissociá-los, é importante caracterizar a influência 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.

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 dos seis locais de recolha. A distribuição da variedade de microrganismos denota uma clara tendência para uma maior colonização dos locais menos expostos às condições ambientais (vento, luz solar direta, etc.), que implicam gradientes térmicos menores e condições de humidade mais elevadas.

A identificação dos microrganismos aponta para a existência de vários *genera* de bactérias e de fungos. Contudo, não se pode afirmar perentoriamente 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 ao aqui demonstrados. Para além disso, o simples facto de um microrganismo existir numa amostra recolhida da superfície da pedra não implica que ele seja, de facto, responsável pela alteração da mesma. Acresce ainda dizer que a classificação e identificação apresentada neste estudo é preliminar e sugere-se para trabalho futuro a sua confirmação, por exemplo através de técnicas de biologia molecular tal como já efetuado por alguns investigadores [6, 18].

Quanto aos testes efetuados com agentes biocidas, o método utilizado permitiu uma comparação da suscetibilidade dos isolados às diferentes substâncias ativas. Ressalva-se a necessidade de realizar testes adicionais no local, por forma a avaliar a eficácia dos biocidas nas comunidades microbianas como um todo e não apenas nos isolados, e, também, as possíveis interações com o substrato. Otimizar *in situ* a concentração de biocida a utilizar e monitorizar o seu efeito ao longo do tempo são operações necessárias em cada intervenção, as quais

devem ter em conta as condições ambientais do meio. Com o objetivo de simular as condições de campo, alguns investigadores efetuam também estudos laboratoriais em pedra colonizada com biofilmes estáveis em laboratório [6, 18, 21].

Ainda assim, percebe-se uma marcada diferença nos resultados obtidos com os diferentes biocidas: para os fungos, o Biotin T, que conjuga dois tipos de biocidas, é claramente mais eficaz, enquanto para as bactérias o cloreto de benzalcónio obteve melhores efeitos.

Agradecimentos

Agradece-se as facilidades concedidas pela Sr.^a Diretora do Convento de Cristo, Dr.^a Ana Carvalho Dias.

Referências

- 1 Convento de Cristo, <http://www.conventocristo.pt> (acesso em 27-7-2011).
- 2 Aires-Barros, L., *As Rochas dos Monumentos Portugueses. Tipologias e Patologias*, IPPAR, Lisboa (2001).
- 3 Mohammadi, P.; Krumbein, W., 'Biodeterioration of Ancient Stone Materials from the Persepolis Monuments (Iran)', *Aerobiologia* **24** (2008) 27-22. [crossref](#)
- 4 Bellinzoni, A.; Caneva, G.; Ricci, S., 'Ecological trends in travertine colonization by pioneer algae and plant communities', *International Biodeterioration and Biodegradation* **51** (2003) 203-210. [crossref](#)
- 5 Allsopp, D.; Seal, K.; Gaylard, C., *Introduction to Biodeterioration*, 2.^a ed., Cambridge University Press, Cambridge (2004).
- 6 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* **63** (2009) 860-867. [crossref](#)
- 7 Warscheid, T.; Braams, J., 'Biodeterioration of stone: a review', *International Biodeterioration and Biodegradation* **46** (2000) 343-368. [crossref](#)
- 8 Zanardini, E.; Abbruscato, P.; Ghedini, N.; Realini, M.; Sorlini, C., 'Influence of atmospheric pollutants on the biodeterioration of stone', *International Biodeterioration and Biodegradation* **45** (2000) 35-42. [crossref](#)
- 9 Warscheid, T., 'Prevention and Remediation against biodeterioration of building materials', in *Proceedings of the Second International RILEM Workshop on Microbial Impact on Building Materials*, ed. M. Ribas Silva, RILEM Publications SARL, Bagneux (2004).
- 10 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** (2010) 1-14. [crossref](#)
- 11 Miller, A. Z.; Dionísio, A.; Laiz, L.; Macedo, M. F.; Saiz-Jimenez, C., 'The influence of inherent properties of building limestones on their bioreceptivity to phototrophic microorganisms', *Annals of Microbiology* **59**(4) (2009) 705-713. [crossref](#)
- 12 Charola, A.; Korth, G.; Cedrola, M.; Magadán, M.; Kanan, M.; Jamarillo, M., *Manual Básico de Conservação para as Missões Jesuíticas dos Guaraní*, World Monuments Fund, Nova Iorque (2009).
- 13 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 *Comparative Risk Assessment and Environmental Decision Making*, ed. I. Linkov, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (2004) 363-370. [crossref](#)
- 14 Saiz-Jimenez, C., 'Biodeterioration vs Biodegradation: the role of Microorganisms in the Removal of Pollutants Deposited on Historic Buildings', *International Biodeterioration and Biodegradation* **40** (1997) 225-232. [crossref](#)
- 15 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: bioremediation of frescoes using viable bacterial cells and enzymes', *Journal of Applied Microbiology* **98** (2005) 73-83. [crossref](#)
- 16 Webster, A.; May, E., 'Bioremediation of weathered-building stone surfaces', *Trends in Biotechnology* **24** (2006) 255-260. [crossref](#)
- 17 Jroundi, F.; Fernandez-Vivas, A.; Rodrigues-Navarro, C.; Bedmar, E.; Gonzalez-Munoz, M., 'Bioconservation of deteriorated monumental calcarenite stone and identification of bacteria with carbonatogenic activity', *Environmental Microbiology* **60** (2010) 39-54. [crossref](#)
- 18 Fonseca, A. J.; Pina, F.; Macedo, M. F.; Leal, N.; Romanowska-Deskins, A.; Laiz, L.; Gómez-Bolea A.; Saiz-Jimenez, C., 'Anatase as an alternative application for preventing biodeterioration of mortars: Evaluation and comparison with other biocides', *International Biodeterioration and Biodegradation* **64** (2010) 388-396. [crossref](#)
- 19 Dayananda, C.; Sarada, R.; Usha Rani, M.; Shamala, T.R.; Ravishankar, G.A., 'Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media', *Biomass & Bioenergy* **31** (2007) 87-93. [crossref](#)
- 20 Saiz-Jimenez, C., *Advances Research Centre for Cultural Heritage Interdisciplinary Projects: Bio-degradation of cultural heritage Workshops Proceedings* (2001).
- 21 Pinheiro, A. C.; Macedo, M. F.; Juradoc, V.; Saiz-Jimenez, C.; Viegas C.; Brandão J.; Rosado L., 'Mould and yeast identification in archival settings: Preliminary results on the use of traditional methods and molecular biology options in Portuguese archives', *International Biodeterioration and Biodegradation* **65** (2011) 619-627. [crossref](#)

Recebido: 22 de Outubro de 2012

Revisto: 13 de Fevereiro de 2013

Aceite: 8 de Março de 2013

Online: 22 de Julho de 2013