

A deterioração microbiológica de espécies fotográficas com emulsão de gelatina: isolamento de microrganismos contaminantes de três colecções

Microbial deterioration of gelatine emulsion photographs: isolation of contaminant microorganisms from three collections

Miguel José Laiginha Lourenço
José Paulo Sampaio

Centro de Recursos Microbiológicos - Secção Autónoma de Biotecnologia (CREM-SABT)
Faculdade de Ciências e Tecnologia/ Universidade Nova de Lisboa (FCT/UNL)
Quinta da Torre, 2829-516 Caparica, Portugal
mjll@fct.unl.pt

Resumo

A deterioração microbiológica afecta frequentemente as colecções fotográficas e é considerada uma das principais formas de deterioração da gelatina fotográfica. Contudo, são raros os estudos de isolamento de microrganismos contaminantes. Este trabalho teve como objectivo isolar e identificar os microrganismos contaminantes de espécies fotográficas com emulsão de gelatina. Foram investigadas três colecções fotográficas de diferentes instituições da cidade de Lisboa: a colecção Bourdin de Macedo, do Arquivo Fotográfico Municipal, a colecção Horácio Novais, do Arquivo de Arte da Fundação Calouste Gulbenkian, e a colecção da Sociedade Portuguesa de Geografia. Foram testados vários métodos de amostragem. Dos 60 estirpes isoladas a partir de 131 amostras, os fungos dos géneros *Penicillium* (35%) e *Aspergillus* (23%) foram os mais comuns, seguidos pelos do género *Cladosporium* (12%). Os resultados são discutidos cruzando informação relacionada com a constituição das espécies fotográficas estudadas, das colecções de proveniência e com os microrganismos isolados.

Palavras-chave

Fotografia; emulsão de gelatina; biodeterioração; deterioração microbiológica; fungos.

Abstract

Microbial deterioration frequently affects photographic collections, and has been considered a major cause of gelatine deterioration. However, there are no detailed studies of this topic. The goal of this study was to isolate and to identify the microbial contaminants of gelatine emulsion photographs belonging to three Lisbon collections: Bourdin de Macedo collection from the city council archive, Horacio Novais collection from the Calouste Gulbenkian Foundation Art Archive, and the collection from the Portuguese Geographical Society. Several isolation methods were tested. In about 60 strains isolated from 131 samples, the most common fungi belong to the genera *Penicillium* (35%) and *Aspergillus* (23%), followed by the genus *Cladosporium* (12%). The microorganisms identified were discussed in relation to the photographic materials affected and the collections.

Keywords

Photographs; gelatine emulsion; biodeterioration; microbial deterioration; fungi.

■ Introdução

A deterioração microbiológica afecta frequentemente as colecções fotográficas e é considerada uma das principais formas de deterioração da gelatina fotográfica [1,2]. A bibliografia sobre este tema é escassa e são raros os estudos de isolamento de microrganismos contaminantes [3]. O objectivo deste trabalho foi o isolamento e a identificação de microrganismos contaminantes de espécies fotográficas com emulsão de gelatina. Foram analisadas três colecções fotográficas de diferentes instituições da cidade de Lisboa: a colecção Bourdin de Macedo do Arquivo Fotográfico Municipal, a colecção Horácio Novais do Arquivo de Arte da Fundação Calouste Gulbenkian e a colecção da Sociedade Portuguesa de Geografia. Estas colecções estavam em fase de tratamento na altura da amostragem (2003) e os documentos fotográficos contaminados que serviram para este estudo não tinham sofrido intervenções. Na colecção Bourdin de Macedo a amostragem incidiu sobre negativos e provas a preto e branco (P&B), na colecção da Sociedade Portuguesa de Geografia sobre diapositivos a P&B em vidro, e na colecção Horácio Novais sobre diapositivos a cor em película. Este estudo fez parte do projecto de final de licenciatura em conservação e restauro realizado no CREM-SABT na FCT/UNL no ano de 2003.

■ Procedimento

■ ■ Amostragem

Inicialmente foram testados vários métodos de amostragem, dos quais a maioria é referida na bibliografia consultada [4-7]. As principais condicionantes para a escolha do método de amostragem foram a impossibilidade de utilização de métodos invasivos que provocassem danos nos materiais ou deixassem algum tipo de resíduos, e a impossibilidade dos documentos fotográficos contaminados saírem das respectivas instituições. Os métodos de amostragem testados encontram-se descritos no Quadro 1.

A amostragem foi feita à medida que se observaram as caixas e os documentos fotográficos de cada colecção. No decorrer desse processo identificaram-se as

espécies fotográficas que apresentavam contaminação, independentemente dos materiais constituintes afectados. Foi adoptado um sistema de catalogação em que se utilizou uma numeração sequencial, com o nome da colecção e respectiva instituição proprietária. Normalmente foram efectuados três ou quatro amostragens na mesma zona contaminada. Registaram-se ainda dados específicos que se julgaram de algum modo relevantes para a interpretação dos resultados. As colecções da Sociedade Portuguesa de Geografia e Bourdin de Macedo estavam em início de tratamento pelo que não estavam inventariadas e catalogadas. Não havia um conhecimento preciso acerca das espécies fotográficas e materiais presentes, bem como do tipo de deteriorações que as afectava. Na colecção Horácio Novais apenas se teve acesso a diapositivos a cor que estavam em tratamento na altura. Deste modo não foi possível levar a cabo uma amostragem com uma representação igual de amostras recolhidas de cada tipo de material e espécie fotográfica.

Antes da amostragem efectuou-se uma apreciação preliminar das espécies fotográficas das colecções que foram objecto de estudo. Concluiu-se que a maior parte do crescimento microbiano era devido a fungos, visto que se notou frequentemente a existência de micélio (estruturas vegetativas filamentosas). As contaminações na sua maioria estavam pouco desenvolvidas.

O procedimento de amostragem foi quase sempre feito nas salas de arquivo das colecções. Considerou-se que a inoculação das amostras em meio de cultura deveria ser efectuada em laboratório e não nas salas de arquivo, de modo a evitar contaminações provocadas pelos conídios existentes no ar.

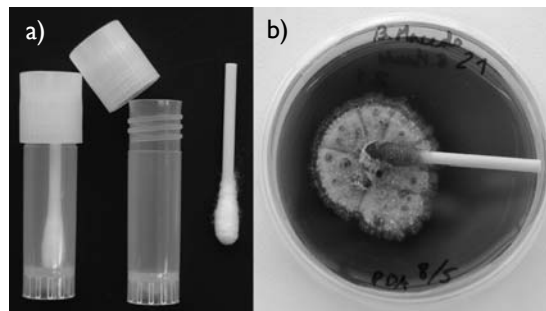


Fig. 1 Método de amostragem com cotonete colocada sobre meio de cultura. a) cotonete para amostragem e cápsula plástica. b) placa com cotonete e fungo já desenvolvido.

Quadro 1 Procedimentos de amostragem testados

Métodos de Amostragem	Descrição	Vantagens	Desvantagens
Inoculação directa	Retirar pequena amostra de microrganismo contaminante com ansa de repicagem e transferir directamente para placa com meio de cultura (inoculação).	Rapidez do processo; menor probabilidade de alteração da amostra (contaminação e perda de viabilidade).	O microrganismo contaminante terá de estar suficientemente desenvolvido para ser possível retirar a amostra sem danificar o documento; a inoculação directa necessita de condições de assepsia só existentes em laboratório.
Amostragem directa	Retirar pequena amostra de microrganismo contaminante e transferir para recipiente estéril.	Possibilidade de armazenar a amostra num recipiente e inocular depois.	O microrganismo contaminante terá de estar suficientemente desenvolvido para ser possível retirar a amostra sem danificar o documento; necessário esterilizar a ansa entre cada repicagem; maior manipulação da amostra.
Amostragem com cotonete	Tocar na zona contaminada com cotonete previamente esterilizada e transferir para placa com meio de cultura.	É possível tirar amostra de microrganismos pouco desenvolvidos sem danificar a superfície do documento.	Possibilidade de haver alguma perda da quantidade de amostra visto que há um “substrato secundário” para transferência; maior manipulação da amostra; maior cuidado na interpretação dos resultados da inoculação.
Amostragem indirecta – materiais associados ao acondicionamento de fotografias contaminadas	Utilização de bolsas de plástico ou de papel que servem para acondicionamento, e que por vezes surgem contaminadas juntamente com as espécies fotográficas.	Manipulação mínima da espécie fotográfica; possibilidade de armazenar a amostra de material contaminado num recipiente e experimentar vários métodos de inoculação depois.	Nem sempre é possível utilizar este método, porque as espécies fotográficas nem sempre estão acondicionadas deste modo; maior cuidado na interpretação dos resultados da inoculação.

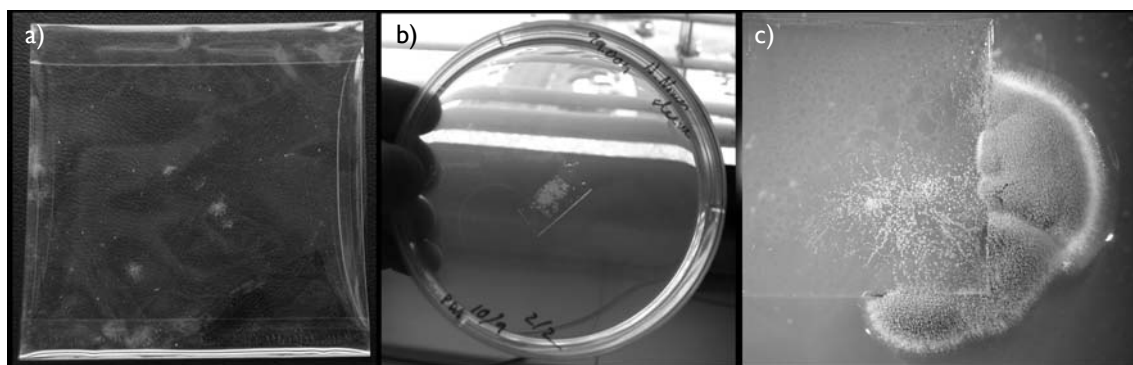


Fig. 2 Colocação de pequenos pedaços de sleeve contaminados em meio de cultura. a) aspecto de uma sleeve com pontos de contaminação; b) pedaço contaminado de sleeve colocado em meio de cultura; c) desenvolvimento inicial de um fungo.

Por isso foi utilizada uma cotonete com cápsula plástica, capaz de suportar a esterilização em autoclave (20 minutos a 120 °C) (Fig. 1). Considerou-se que este instrumento de amostragem com recipiente era apto para guardar, transportar e catalogar cada amostra.

Na colecção Horácio Novais também se utilizou um método de amostragem indirecta. Vários diapositivos a cor desta colecção possuíam bolsas plásticas transparentes como invólucro, vulgarmente designadas por *sleeves*. Nalguns casos, as contaminações dos diapositivos passaram para as *sleeves*. Através de amostras das *sleeves* tentou-se saber quais os microrganismos que contaminavam os diapositivos. A colocação directa de pequenos pedaços de *sleeve* contaminada em meio de cultura revelou-se o melhor procedimento de inoculação (Fig. 2).

■ ■ Isolamento dos microrganismos

Tendo em conta o leque de microrganismos que se esperava encontrar (maioritariamente fungos), o meio de cultura utilizado foi o PDA – *Potato Dextrose Agar*. O isolamento dos microrganismos deve ser feito com recurso a meios sólidos para que possam ser observadas as características das colónias de microrganismos (cor, consistência, tamanho e forma) [6]. O PDA é um meio de cultura sólido e é adequado para o cultivo de fungos e outros microrganismos heterotróficos. Tem sido utilizado em estudos na área da biodeterioração de materiais de arquivo [4,5,8-10]. Cada uma das amostras estudadas foi colocada no centro de uma caixa de Petri com PDA. O tempo decorrido entre a recolha das amostras e a sua colocação em meio de cultura nunca foi superior a vinte e quatro horas. Todas as operações de manuseamento de microrganismos foram realizadas cuidadosamente, segundo as técnicas de assepsia comuns na prática microbiológica.

As placas com amostras foram incubadas à temperatura ambiente (19-24°C). O tempo de incubação foi variável, mas, regra geral, não ultrapassou vinte dias. As culturas obtidas durante o isolamento foram transferidas para o mesmo meio e, posteriormente, foi feita a identificação de cada microrganismo.

■ ■ Caracterização dos microrganismos

A descrição e comparação da morfologia das estruturas celulares características dos microrganismos foi realizada recorrendo a um microscópio óptico com várias ampliações (150x, 600x e 1500x) e a bibliografia especializada.

A identificação dos fungos baseou-se quase exclusivamente na morfologia dos esporos assexuados (também designados por conídios) e das estruturas que os produzem (conidióforos), bem como no modo como são produzidos (conidiogénese) [1]. Para as bactérias apenas se efectuou a coloração de Gram.

Inicialmente a classificação dos fungos foi levada até ao género, observando-se apenas as principais características morfológicas dos conidióforos [11,12]. Depois de identificados os géneros mais comuns foram estabelecidas prioridades devido a condicionantes de tempo e de meios para classificar todos os fungos até ao nível da espécie. Aprofundou-se a identificação dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium* [13,14]. Dada a complexidade da identificação dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium* até à espécie, apenas se efectuou uma caracterização até ao nível do subgénero e secção.

■ ■ Resultados e discussão

A lista das estirpes isoladas, bem como a sua classificação e distribuição pelas colecções de proveniência, é apresentada no Quadro 2. Verifica-se que apenas 60 das 131 amostras recolhidas tiveram um resultado positivo, isto é, desenvolveram crescimento microbiano. Nas restantes amostras ou não houve desenvolvimento microbiano, ou ocorreu contaminação da placa antes de ser possível visualizar o crescimento. O maior número de estirpes surgiu na colecção Bourdin de Macedo (31), seguindo-se a colecção Horácio Novais (19), e por último a colecção da Sociedade Portuguesa de Geografia (10).

A distribuição das estirpes por género ou grupo é apresentada na Figura 3. Verifica-se que a grande maioria pertence ao grupo dos fungos e apenas 10% são bactérias. No caso dos fungos, os géneros *Penicillium* (35%) e *Aspergillus* (23%) são os mais comuns, seguidos pelo género *Cladosporium* (12%). Deste modo, 70% dos fungos isolados pertencerão ao

Quadro 2 Número de estirpes isoladas, consoante a sua classificação e colecção de proveniência.

	Bourdin de Macedo	Horácio Novais	S. P. Geografia	Totalidade das colecções
Fungos	26	19	9	54
<i>Aspergillus</i>	13	0	1	14
Subgénero <i>Nidulantes</i> Secção <i>Versicolores</i>	12	0	1	13
Subgénero <i>Circumdati</i> Secção <i>Nigri</i>	1	0	0	1
<i>Penicillium</i>	5	14	2	21
Subgénero <i>Penicillium</i> Secção <i>Penicillium</i>	3	1	2	6
Subgénero <i>Biverticillium</i> Secção <i>Simplicia</i>	1	9	0	10
Subgénero <i>Furcatum</i> Secção <i>Furcatum</i>	1	0	0	1
Subgénero <i>Aspergilloides</i> Secção <i>Aspergilloides</i>	0	4	0	4
<i>Cladosporium</i> spp.	2	4	1	7
<i>Basipetospora</i>	1	0	0	1
Não identificados	5	1	5	11
Leveduras	1	0	0	1
Bactérias	4	0	1	5
Gram +	4	0	0	4
Gram –	0	0	1	1
Total	31	19	10	60
N.º de amostras	54	52	25	131

filos Ascomycota, ainda que apenas se tenha observado o seu estado anamórfico ou assexual.

Constata-se que a maioria dos fungos do género *Penicillium* proveio da colecção Horácio Novais (espécies a cor, cromogéneas), enquanto que quase todos os fungos do género *Aspergillus* pertencem à colecção Bourdin de Macedo (espécies a P&B). Estas colecções têm histórias e proveniências distintas. Por isso, é possível que diferentes condições ambientais dos locais

de armazenamento estejam na base destas diferenças e que as populações de fungos que colonizaram estas colecções efectivamente sejam distintas. Como os fungos dos géneros *Aspergillus* e *Penicillium* são saprófitas ubíquos e frequentemente são isolados de vários materiais em ambiente interior [3], nada sugere que as diferenças de contaminação estejam relacionadas com a diferente constituição material das espécies fotográficas das colecções Bourdin de Macedo e Horácio Novais.

Quadro 3 Número de estirpes isoladas, consoante os materiais fotográficos e as colecções de proveniência *.

	Materiais fotográficos			
	Emulsão de gelatina	Películas – lado oposto à emulsão	Suporte de papel em provas	Vidro de diapositivos
Bourdin de Macedo (películas e provas em papel a P&B)	13	11	6	1
Horácio Novais (diapositivos a cor em película)	4	0	0	0
S. P. Geografia (diapositivos P&B de vidro, com pequena moldura de papel preto)	4	0	1	3
Total	23	11	7	4

* Não foram contabilizadas 15 estirpes isoladas das sleeves da colecção Horácio Novais. Não foi possível saber qual o diapositivo que correspondia a cada sleeve e por isso foi impossível saber quais os lados contaminados.

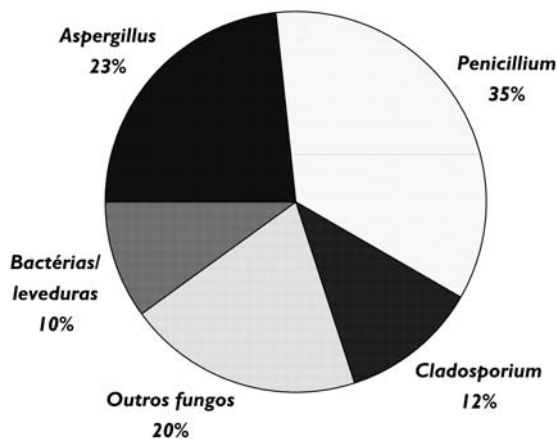


Fig. 3 Percentagem de estirpes isoladas, consoante o género ou o grupo.

As bactérias também foram quase todas isoladas de espécies fotográficas da colecção Bourdin de Macedo. É possível que as condições ambientais do local de

armazenamento estejam relacionadas com esta situação. Tendo em atenção as maiores necessidades de água das bactérias [15,16], provavelmente terão existido aí elevados teores de humidade.

No Quadro 3 são contabilizadas as estirpes segundo o tipo de material fotográfico de proveniência. Verifica-se que a maioria provém de emulsões contaminadas. Tanto no caso das espécies a P&B como a cor, e em qualquer dos suportes, a emulsão surge sempre como o material de onde foram isolados mais estirpes. Seguidamente surgem as películas P&B contaminadas do lado do suporte, pertencentes à colecção Bourdin de Macedo. Salienta-se que estes resultados são apenas indicativos pois existem condicionantes na amostragem que não permitem uma interpretação directa dos dados.

Conclusão

Na globalidade os resultados obtidos neste estudo vão no mesmo sentido do que é referido na bibliografia. As estirpes isoladas provêm maioritariamente de emulsões contaminadas, o que está de acordo com a ideia de que a emulsão é um dos constituintes fotográficos mais susceptíveis ao ataque microbiológico. Os fungos parecem ser os principais responsáveis pela deterioração microbiológica de espécies fotográficas, especialmente os

fungos dos géneros *Penicillium* e *Aspergillus*, que são dois dos géneros mais comumente isolados neste tipo de estudos.

■ Agradecimentos

Miguel J. L. Lourenço agradece à Prof. Isabel Spencer Martins pelo acolhimento no CREM-SABT para a realização deste estudo; ao Arquivo de Arte da Fundação Calouste Gulbenkian, Arquivo Fotográfico Municipal de Lisboa, e Sociedade Portuguesa de Geografia pelo acesso às colecções fotográficas; ao Eng. Luís Pavão pelo apoio prestado, pelas facilidades no acesso às colecções Bourdin de Macedo e Horácio Novais; ao Prof. Alan Philips por todo o apoio no trabalho laboratorial, pela utilização do seu equipamento óptico e informático, e por toda a informação disponibilizada; à Prof. Filomena Macedo pela ajuda e troca de informação; a Laura Pol pela ajuda no trabalho laboratorial e pela troca de informação e experiências; a Teresa Santos pelas facilidades de acesso à colecção da Sociedade Portuguesa de Geografia; a Sónia Casquicho e Filipa Valadares pela ajuda no acesso à colecção Horácio Novais.

■ Referências

- 1 Bard, C. C. 'Biodeterioration of photographs', in *Biodeterioration 6: Papers presented the 6th International Biodeterioration Symposium, Washington, D.C., August 1984*, ed. S. Barry, D. R. Houghton, G. C. Llewellyn, C. E. O'Rear, CAB International, Wallingford (1986) 379–382.
- 2 Eastman Kodak Company, *Conservation of Photographs*, ed. G. T. Eaton, Kodak, Rochester-New York (1985).
- 3 Lourenço, M., 'A deterioração microbiológica de espécies fotográficas com emulsão de gelatina: um resumo bibliográfico', submetido.
- 4 Czerwinska, E.; Kowalik, R., 'Microdeterioration of Audiovisual Collections, Part 1. Protection of Audiovisual Records Against Destructive Microflora', *Restaurator: International Journal for the Preservation of Library and Archival Material* 3(1–2) (1979) 63–70.
- 5 Czerwinska, E.; Kowalik, R., 'Contribution to the protection of audiovisual records against destructive microflora', in *ICOM Committee for Conservation Preprints. 5th Triennial meeting, ICOM, Zagreb* (1978) 78/14/15.
- 6 Kyi, C. P., 'The significance of appropriate sampling and cultivating techniques in the effective assessment of biodeterioration', *International Conference on biodeterioration of cultural property* 5 (2001) 73-77.
- 7 Zysca, B. J.; Cieplik, Z. T.; Wojcik, A. R.; Kozłowska, R., 'Microbial deterioration of historic glass plate negatives', *Biodeterioration* 7, *Selected papers presented the 7th international biodeterioration symposium*, Elsevier Applied Science, London (1987) 428-435.
- 8 Czerwinska, E.; Kowalik, R., 'Microbiodeterioration of Audiovisual Collections, Part 2. Microbial Problems in Photographic Print Collections', *Restaurator: International Journal for the Preservation of Library and Archival Material* 3(1–2) (1979) 70–80.
- 9 Czerwinska, E.; Kowalik, R., 'Microbial Problems in Photographic Print Collections', *ICOM Committee for Conservation Preprints. 5th triennial meeting, ICOM, Zagreb* (1978) 78/14/14.
- 10 Szczepanowaska, H. M.; Lovett, C. M., Jr., 'A study of the removal and prevention of fungal stains on paper', *Journal of the American Institute for Conservation* 31 (1992) 147-160.
- 11 Phillips, A. J., CREM/ SABT, 'Mycology – An Introduction to the Fungi', não publicado (2000).
- 12 Barnett, H. L.; Hunter, B.B., *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 4th edition, The American Phytopathological Society, Minnesota (1998).
- 13 Klich, M. A., *Identification of Common Aspergillus Species*, Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands (2002).
- 14 Pitt, J. I., *A Laboratory Guide to Common Penicillium Species*, 3rd edition, Food Science Australia, Australia (2000).
- 15 Caneva, G.; Nugari, M. P.; Salvadori, O., *Biology in the Conservation of Works of Art*, ICCROM, Rome (1991).
- 16 Kowalik, R., 'Microbiodeterioration of Library Materials, Part 1, Microbiodecomposition of basic organic library materials', *Restaurateur* 4(2) (1980) 99-114.