

Diagnóstico da biodeterioração por fungos e bactérias nas pinturas murais da Casa de Fresco de Sanches Baena (Vila Viçosa, Portugal)

Microbial biodeterioration diagnosis of the 16th century frescoes from the Casa de Fresco de Sanches Baena (Vila Viçosa, Portugal)

M. R. Martins; S. Fialho

Departamento de Química e ICAM, Universidade de Évora,
Rua Romão Ramalho 59, 7000-676 Évora, Portugal,
mrm@uevora.pt

M. Lima

Departamento de Biologia, Universidade de Évora,
Rua Romão Ramalho 59, 7000-676 Évora, Portugal

S. Valadas; A. Candeias

Departamento de Química, Centro de Química de Évora e
Centro HERCULES Universidade de Évora,
Rua Romão Ramalho 59, 7000-676 Évora, Portugal

J. Mirão

Departamento de Geociências, Centro de Geofísica de Évora, e
Centro HERCULES Universidade de Évora,
Rua Romão Ramalho 59, 7000-676 Évora, Portugal

A. S. Silva

Departamento de Materiais, Laboratório Nacional de
Engenharia Civil, Av. Brasil, Lisboa, Portugal

D. Tavares; M. Botto

Direcção Regional de Cultura do Alentejo,
Rua de Burgos 5, 7000-863 Évora, Portugal

Resumo

A Casa de Fresco de Sanches Baena, situada em Vila Viçosa (Sudeste de Portugal), é uma pequena construção semi-subterrânea, de planta quadrangular, anexa à nora do antigo Palácio dos Sanches Baena. Os frescos que cobrem a sua abóbada e paredes apresentam cenas mitológicas ricas conjugadas com anjos musicais, conchas, porcelana e outros elementos decorativos, os quais fazem dela um exemplar especialmente rico e invulgar. As pinturas apresentam uma policromia intensa que sugere o uso de uma paleta rica composta por diferentes pigmentos. Infelizmente, devido ao abandono parcial e à falta de preservação, as pinturas estão num estado avançado de degradação sendo visível o destacamento de camadas pictóricas e argamassas, efluorescências salinas e uma abundante colonização microbiológica.

Com este trabalho pretende-se identificar as diferentes populações microbianas presentes e avaliar a sua importância na deterioração destas pinturas. O estudo microbiológico foi efectuado em amostras recolhidas de zonas visivelmente contaminadas, utilizando zaragatoas e bisturis estéreis, por cultura em meios selectivos e observação por microscopia óptica e electrónica. Este estudo permitiu isolar 32 estirpes bacterianas e 34 fúngicas nos quatro painéis de frescos. As estirpes bacterianas predominantes foram as estirpes Gram+ do género *Bacillus* existindo também um elevado número de estirpes Gram- do género *Pseudomonas*. Entre as estirpes fúngicas predominantes destacam-se as estirpes de *Cladosporium* spp. e *Penicillium* spp. Para avaliação da biodeterioração procedeu-se também à quantificação da actividade da desidrogenase em zonas de reboco degradadas, como biomarcador da presença de microrganismos vivos. Paralelamente, para caracterização da actividade da desidrogenase, procedeu-se à sua quantificação em culturas de uma das estirpes predominantes isolada de um dos painéis com deterioração. Nas zonas degradadas analisadas foi detectada uma forte actividade desidrogenase, pelo que esta enzima parece ser um bom marcador da biodeterioração.

Palavras-chave: Pinturas murais; Biodeterioração; Actividade da desidrogenase.

Abstract

The Casa de Fresco de Sanches Baena is located in Vila Viçosa (Southeast Portugal) and is a small semi-underground building constructed in a garden over a well and used as a cool refreshing place by the owners. The frescoes that cover the ceilings and the walls present rich mythological scenes together with musical angels, shells, porcelain and other decorative elements, which make them an especially rich and unusual example of this art form. The paintings possess an intense polychromy suggesting the use of a rich palette comprised of different pigments to obtain various colours and hues. Unfortunately, due to partial abandonment and lack of repair the paintings are in an advanced state of degradation exhibiting partial detachment of paint layers and mortars, salt efflorescence and abundant biological colonisations.

This work reports the study of the frescoes to allow the identification of the different microorganism populations and to assess their role in the deterioration of these paintings.

For the microorganism sampling, sterile cotton buds and stylets were used and the biological materials collected in sterile recipients. The microbiological study by optical microscopy and scanning electron microscopy allowed the isolation of 34 fungi strains and 32 bacterial strains in the four painted panels that compose the frescoes. The predominant bacterial strains were the Gram+ and Gram- strains from the genera *Bacillus* and *Pseudomonas*, respectively. As to the fungi populations, the dominant strains identified were from the genera *Cladosporium* spp. and *Penicillium* spp. The microbial activity in the 4 panels was assessed by enzymatic essays, namely, dehydrogenase (DHA). The results showed that the decayed areas of the painting present higher dehydrogenase activity and therefore this enzyme seems to be a good indicator of biodegradation.

Keywords: Mural paintings; Biodeterioration; Dehydrogenase activity.

■ Introdução

Desde a Antiguidade, o Homem tem usado como suporte das suas expressões artísticas elementos rígidos e duradouros. A pintura mural, representando cenas religiosas, políticas ou simplesmente decorativas, através de representações geométricas ou figurativas, constitui um meio dessa expressão artística neste tipo de suportes [1]. A pintura mural em estudo é designada de pintura a fresco, cuja técnica consiste na aplicação de determinados pigmentos dispersos em água ou em água de cal, sobre bases de aplicação contendo cal ainda fresca. Os pigmentos fixam-se pela carbonatação superficial da cal, o que permite uma fixação eficaz. Assim a cor permanece embutida numa camada superficial endurecida com uma durabilidade prolongada em determinadas condições [2].

Os factores que contribuem para a biodegradação podem ser classificados em físicos, químicos e biológicos. A biodegradação de pinturas murais tem sido estudada nos últimos anos devido ao impacto destes factores nas camadas pictóricas e no suporte [3-6]. Em paralelo com o crescente interesse pela conservação do Património artístico, e em particular, pelo estudo de pinturas/pigmentos, desenvolveram-se técnicas de análise altamente sofisticadas que têm sido utilizadas para o estudo da pintura mural [7-10].

A Casa de Fresco de Sanches Baena está situada junto à nora do antigo Palácio dos Sanches Baena, Vila Viçosa (Portugal). A pintura mural em estudo data do século XVI e cobre todo o tecto da casa de fresco. A estrutura, embora de pequenas dimensões, não impede a exemplificação, com uma grande elegância, de uma plêiade de soluções decorativas que se interligam na ornamentação da abóbada, integrando a pintura mural (Fig. 1) representações de grotescos, *putti* entrelaçados e anjos músicos, embrechados de conchas, escórias de ferro e fragmentos de porcelana da china, e estuques relevados em cartelas com representações de cenas mitológicas, formando um dos mais interessantes e invulgares exemplares de arquitectura civil da segunda metade do século XVI em Vila Viçosa. A pintura apresenta um estado de degradação elevado em determinadas áreas, sendo possível a visualização de biofilmes, eflorescências, empolamento das camadas pictóricas e, ainda, degradação ao nível das argamassas. Este estudo insere-se num projecto mais alargado de caracterização de pinturas murais em risco e envolveu um conjunto de métodos de investigação e de técnicas de análise que permitem a caracterização macro e microestrutural das pinturas murais. Procedeu-se à caracterização química dos pigmentos dos frescos, ao isolamento e identificação dos microrganismos e à determinação da actividade enzimática da desidrogenase em argamassas recolhidas de zonas deterioradas como biomarcador da actividade microbiana [11-13].

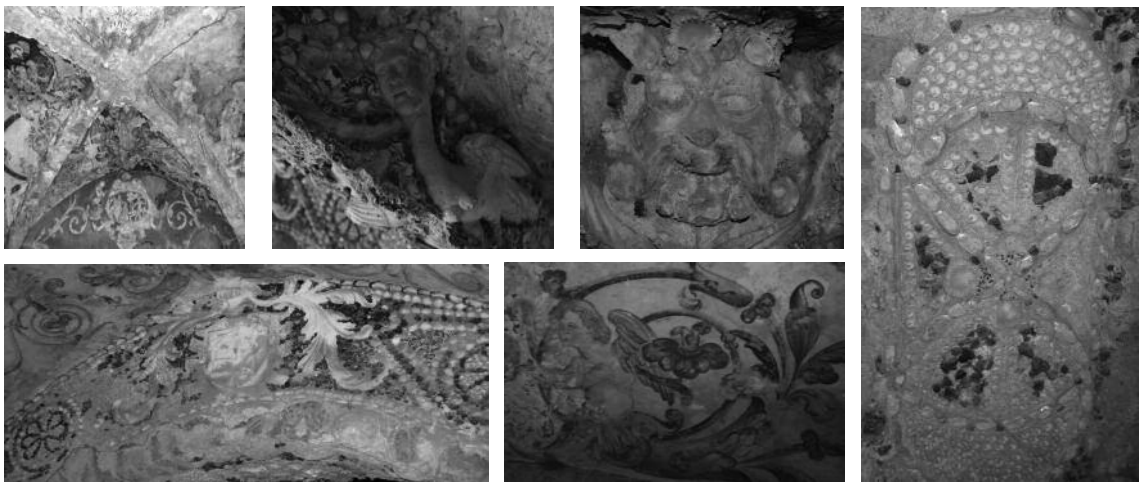


Fig. 1 Pormenores das pinturas murais da Casa de Fresco de Sanches Baena.

■ Materiais e Métodos

■ ■ Amostragem

Tendo em conta o inestimável valor artístico das pinturas, as amostras foram recolhidas utilizando um estilete e zaragoas estéreis de modo representativo da paleta de cores usadas e do perfil de contaminação microbiana, respectivamente, tendo-se considerado 4 painéis (Fig. 2). Procedeu-se, ainda, à recolha de três amostras de argamassa com o auxílio de um estilete, previamente esterilizado, para a análise da actividade da desidrogenase. Estas amostras foram recolhidas para recipientes estéreis com rosca e conservadas a 4 °C até ao momento da análise. As recolhas foram coordenadas por uma conservadora-restauradora da Direcção Regional de Cultura do Alentejo e as quantidades e dimensões das amostras recolhidas foram as mínimas necessárias para as diversas análises; os locais onde se visualizou colonização microbiana e/ou alteração dos pigmentos foram os seleccionados para amostragem.

■ ■ Preparação das amostras

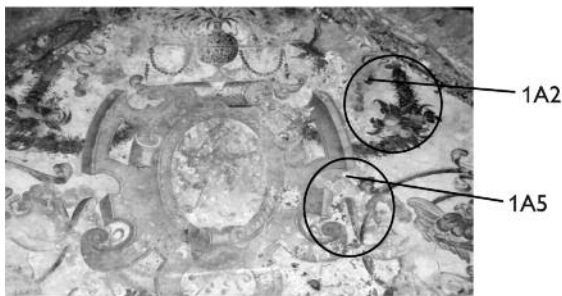
As técnicas de análise aplicadas *in vitro* a microfragmentos extraídos das pinturas murais envolvem previamente um conjunto de operações químicas/físicas para a preparação das amostras em estudo.

Para a preparação das amostras estas foram observadas à lupa binocular, sendo seleccionado o microfragmento mais representativo da amostra. Em seguida foram englobadas em resina epóxida. Numa fase final, a amostra foi desgastada e polida obtendo-se superfícies polidas para posterior registo ao microscópio óptico de reflexão.

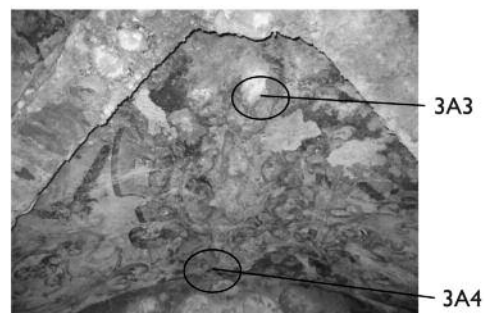
■ ■ Estudo microbiológico

Após a recolha das amostras nos locais onde se visualizou colonização microbiana e/ou alteração dos pigmentos (Fig. 2), as zaragoas foram colocadas em 1 mL de meio adequado para o transporte (*Maximum Recovery*

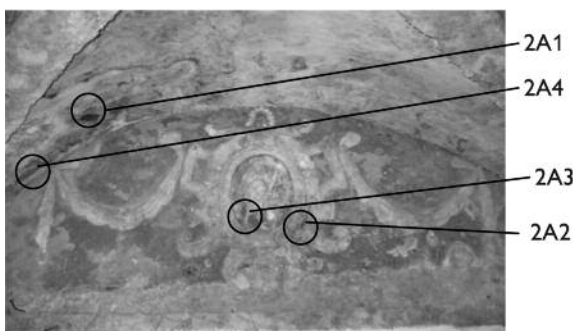
Painel 1



Painel 3



Painel 2



Painel 4

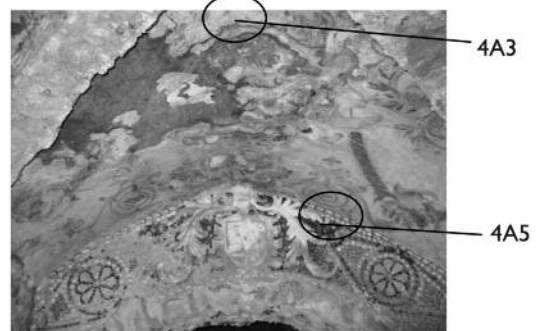


Fig. 2 Identificação dos locais de recolha das amostras biológicas.

Diluent, Merck) e conservadas a 4 °C até à inoculação em meios de cultura específicos para o isolamento de bactérias e fungos. Para cultura das bactérias foram utilizados os meios *Nutrient Broth* (Oxoid) e *Nutrient Agar* (Oxoid) e para culturas de fungos os meios *Malt Extract Broth* (Oxoid), *Malt Extract Agar* (Oxoid) e *Cook Rose Bengal with Chloramphenicol* (Merck). As culturas foram incubadas a 28 °C durante 48 h para isolamento de bactérias e leveduras ou 5 dias para isolamento dos fungos filamentosos.

A morfologia das colónias foi observada macroscopicamente e ao microscópio óptico em preparações a fresco. A coloração de Gram e outros testes para caracterização das estirpes bacterianas (catalase, oxidase e teste da esporulação) foram efectuadas segundo o *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* [14]. As estirpes fúngicas foram identificadas por observação macroscópica e microscópica de acordo com metodologias standard e com base nas suas características morfológicas, como diâmetro da colónia, textura, coloração do micélio e esporos, dimensões e morfologia das hifas e estruturas reprodutoras (para os isolados esporulados) [15].

■ ■ Doseamento da desidrogenase

Para avaliação da actividade microbiana na biodeterioração procedeu-se à quantificação da actividade enzimática da desidrogenase nas argamassas, utilizando como substrato o cloreto de 2-(p-iodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazolio (INTF), utilizando uma mistura extractante de etanol - DMF (1:1), com quantificação do INTF a 490 nm [11]. O ensaio foi efectuado em triplicado para cada uma das amostras em estudo. Neste estudo procederam-se a algumas modificações, nomeadamente no intervalo de concentrações de produto utilizado para a construção da curva de calibração e no peso de argamassa utilizada, de modo a aumentar a sensibilidade do método e a reduzir a quantidade de amostra utilizada, uma vez que as amostras recolhidas foram as mínimas possíveis de forma a não destruir bens patrimoniais.

Paralelamente, procedeu-se à caracterização da actividade da desidrogenase numa cultura de um dos fungos predominantes, *Penicillium* sp.1. Para o efeito prepararam-se culturas *batch* em frasco agitado em meio líquido mínimo contendo 10^8 esporos.mL⁻¹, incubadas a 25 °C em agitador orbital a 180 rpm, com quantificação diária

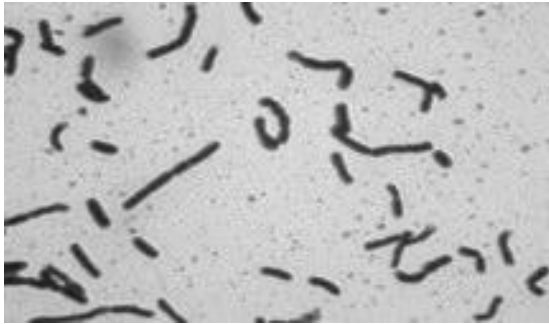
da actividade da desidrogenase durante 5 dias. Para cada dia foram efectuadas duas culturas, das quais se determinou a actividade da desidrogenase em triplicado da fracção celular. Após centrifugação das culturas a 15000 g, durante 30 min a 4 °C, o sedimento (fracção celular) foi lavado com soro fisiológico e procedeu-se à lise das células utilizando uma sonda de ultra-sons (Branson). Determinou-se igualmente o perfil de crescimento das culturas, determinando o seu peso seco em intervalos periódicos: 12 h, 24 h, 2, 3, 4 e 5 dias.

■ Resultados e Discussão

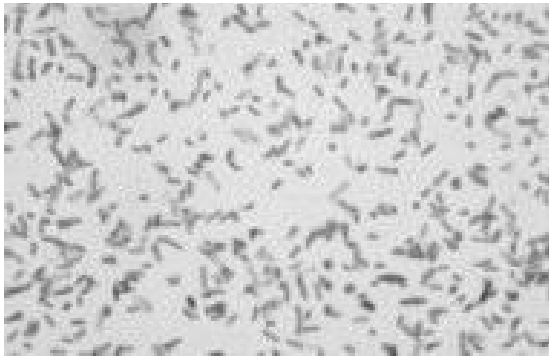
■ ■ Análise microbiológica

Para uma melhor compreensão sobre a influência dos microrganismos na biodegradação das pinturas murais da Casa de Fresco de Sanches Baena procedeu-se ao isolamento e quantificação das estirpes bacterianas e fúngicas e à identificação dos géneros das estirpes predominantes. O estudo microbiológico permitiu isolar 32 estirpes bacterianas e 34 estirpes fúngicas. Entre as estirpes bacterianas predominaram os *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. (ver Fig. 3), embora também tenham sido isolados alguns *Actinomyces*. Entre as estirpes fúngicas predominaram os *Cladosporium* spp. e *Penicillium* spp., embora também tenham sido isoladas outras estirpes, nomeadamente *Aspergillus* spp., *Acremonium* sp., *Sporotrix* sp. e *Trichoderma* sp., para além de vários micélios isolados que não apresentaram estruturas reprodutivas, designados por micélios estéreis. No Quadro 1 estão apresentadas as características morfológicas das estirpes bacterianas predominantes em cada um dos painéis em estudo. Nos Quadros 2A e 2B estão apresentadas algumas características morfológicas e as estruturas reprodutoras dos isolados fúngicos predominantes. O local onde se observou maior colonização quer de bactérias quer de fungos foi o painel 2, embora se tenha observado elevada colonização nos quatro painéis, nomeadamente nos locais mais deteriorados (Quadros 1 e 2).

Os resultados estão de acordo com os obtidos noutros estudos de biodeterioração que referem as estirpes de *Bacillus* spp. e de *Pseudomonas* spp. como as estirpes bacterianas mais identificadas em pinturas murais degradadas [5, 16-18]. A predominância de bactérias do género



Bacillus spp.



Pseudomonas spp.

Fig. 3 Observações microscópicas das estirpes bacterianas predominantes.

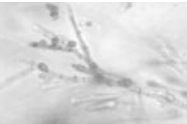
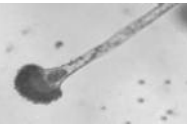


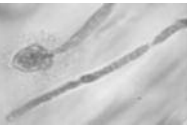
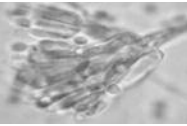

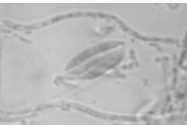



Bacillus, de *Actinomyces* e de fungos filamentosos nas amostras pode ser explicada pela elevada capacidade que estas estirpes apresentam para sobreviver por meio de esporos e pela facilidade de proliferação através de hifas, no caso dos *Actinomyces* e dos fungos filamentosos, podendo contaminar uma maior área das pinturas e/ou dos monumentos [19]. Ao contrário das bactérias, que raramente são observadas *in situ*, os fungos filamentosos e os esporos são numerosos nas camadas pictóricas e são visíveis devido à sua coloração [19].

Os fungos identificados pertencem ao grupo dos *Deuteromycota*, que representa, aproximadamente, 75 % de todos os fungos descritos presentes na natureza [15]. Este grupo inclui a maioria dos fungos associados a algas, formando líquenes e a maioria dos fungos que, morfológicamente, não possuem reprodução sexuada. Os géneros mais conhecidos de fungos filamentosos pertencentes à divisão são o *Aspergillus*, o *Penicillium* e o *Cladosporium*, os quais foram identificados nas pinturas em estudo. Os *Deuteromycota* são fungos heterotróficos que obtêm nutrientes a partir de organismos vivos ou mortos e em ambientes húmidos e, como saprófitos que são, consomem quase todos os substratos carbonatados, incluindo pinturas. Assim, pode-se dizer que os fungos do filo *Deuteromycota*, devido às suas características específicas referidas, são propícios a desenvolverem-se em pinturas murais causando a sua biodegradação.



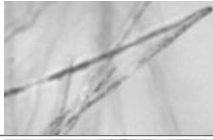
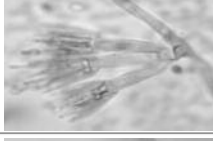

Quadro 1 Caracterização dos isolados bacterianos predominantes nos vários painéis.

Painel	Id.	Características morfológicas	Identificação
1	1A5a	Bacilos médios, agrupados em cadeias, com esporos, Gram +, catalase +.	<i>Bacillus</i> sp.1
	1A5b	Bacilos individuais, pequenos, Gram -, oxidase +.	<i>Pseudomonas</i> sp.1
	1A5c	Bacilos pequenos, Gram -, oxidase +.	<i>Pseudomonas</i> sp.2
2	2A1a	Bacilos pequenos, Gram -, oxidase +.	<i>Pseudomonas</i> sp.3
	2A1c	Bacilos muito pequenos, Gram -, oxidase +.	<i>Pseudomonas</i> sp.4
	2A2d	Bacilos médios, agrupados aos pares e em cadeias, com esporos, Gram +, catalase +.	<i>Bacillus</i> sp.2
	2A3b	Bacilos médios, agrupados aos pares e em cadeias, com esporos, Gram +, catalase +.	<i>Bacillus</i> sp.3
	2A3d	Bacilos pequenos, Gram -, oxidase +.	<i>Pseudomonas</i> sp.5
	2A4a	Bacilos pequenos, Gram -, oxidase +.	<i>Pseudomonas</i> sp.6
3	3A3 a	Bacilos médios, agrupados em cadeias, com esporos, Gram +, catalase +.	<i>Bacillus</i> sp.5
	4A3 a	Cadeias formando longas hifas, Gram +,	<i>Actinomyces</i>
4	4A3 c	Bacilos médios, individuais ou agrupados aos pares, com esporos, Gram +, catalase +.	<i>Bacillus</i> sp.6
	4A5 c	Bacilos médios, agrupados aos pares e em cadeias, com esporos, Gram +, catalase +.	<i>Bacillus</i> sp.7

Quadro 2A Caracterização dos isolados fúngicos predominantes nos painéis 1 e 2.

Painel	Ref.	Aspecto macroscópico (MEA, 5 dias/28 °C)	Observação m. o. (400 ×)	Identificação
1	A2 a	Colónias verde azeitona. Verso: verde -escuro.		<i>Cladosporium</i> sp.1
	A2 b	Colónias verdes acinzentadas. Verso: creme.		<i>Aspergillus</i> sp.
	A5 a	Colónias brancas e sulcadas, liberta pigmento solúvel rosa. Verso: violeta.		Micélio estéril 1
	A5 b	Colónias verde-escuras, sulcadas e enrugadas. Verso: verde -escuro.		<i>Cladosporium</i> sp.2
2	A1 b	Colónias brancas e sulcadas. Verso: amarelo claro e rugoso.		<i>Acremonium</i> sp.1
	A1 f	Colónias verdes acinzentadas. Verso: violeta.		<i>Penicillium</i> sp. 1
	A2 b	Colónias brancas e sulcadas. Verso: amarelo e rugoso.		Micélio estéril 2
	A2 c	Micélio rosa. Verso: rosa claro.		<i>Acremonium</i> sp.2
	A3 a	Micélio branco e rugoso com conídios acinzentados. Verso: creme.		<i>Penicillium</i> sp. 2
	A3 b	Colonias brancas e sulcadas. Verso: rosa.		Micélio estéril 3
	A4 a	Micélio branco e flocoso. Verso: castanho opaco.		<i>Sporotrix</i> sp.

Quadro 2B Caracterização dos isolados fúngicos predominantes nos painéis 3 e 4.

Painel	Ref.	Aspecto macroscópico (MEA, 5 dias/28 °C)	Observação m. o. (400 x)	Identificação
3	A3	Micélio branco. Verso: creme.		Micélio estéril 4
	A4	Micélio branco e conídios cinzentos. Verso: rosa.		<i>Trichoderma</i> sp.
4	A3 d	Micélio branco. Verso: creme.		Micélio estéril 5
	A3 e	Micélio branco e conídios cinzentos. Verso: verde acinzentado.		<i>Penicillium</i> sp. 3
	A5	Micélio branco e conídios cinzentos. Verso: verde acinzentado.		<i>Penicillium</i> sp. 4

Apesar de a maioria dos estudos sobre biodeterioração em pinturas murais referirem principalmente a presença de bactérias, actualmente alguns dos estudos relatam a presença de fungos filamentosos em pinturas murais como os principais responsáveis pela biodeterioração [19-25]. Alguns autores referem que os fungos colonizadores de pinturas murais pertencem principalmente aos géneros *Aspergillus* e *Cladosporium*, podendo, também, encontrar-se fungos dos géneros *Acremonium*, *Penicillium*, *Trichoderma*.

O papel de microrganismos heterotróficos, que requerem a disponibilidade de compostos orgânicos de carbono, na biodegradação de monumentos tem sido pouco estudado. No entanto, alguns estudos confirmam que os monumentos são atacados por ácidos carbónicos e orgânicos, os quais resultam geralmente da decomposição da matéria orgânica por acção microbiana [16]. A biodegradação dos monumentos é o resultado da interacção entre factores físicos, químicos e biológicos.

Inúmeros estudos demonstraram a complexidade da relação entre os organismos, os monumentos e as pinturas murais e entre os microrganismos entre si. Um dos factores biológicos mais estudados e com um maior potencial de mecanismo de biodegradação é a excreção de compostos orgânicos por bactérias e fungos [19-25].

Para avaliar a actividade microbiana em zonas deterioradas, procedeu-se à quantificação da actividade da desidrogenase em três amostras de argamassa, uma recolhida do painel 2 e duas do painel 3, de zonas que apresentavam grande estado de deterioração. A actividade da desidrogenase nas três amostras variou entre $1,023 \pm 0,049 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ e $1,777 \pm 0,036 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$. Os valores de actividade nas três amostras são elevados e da mesma escala de grandeza, o que é indicativo de um processo acentuado de biodegradação nos locais de recolha das argamassas. A presença de desidrogenase nas argamassas tem sido descrita como um marcador importante na detecção da actividade de microrganismos,

permitindo avaliar a influência dos microrganismos na biodegradação, uma vez que a desidrogenase só está presente em células vivas, sendo também descrita como indicador de biodeterioração em argamassas e pinturas murais [11, 13].

Paralelamente, com o objectivo de caracterizar a actividade da desidrogenase e avaliar a capacidade de produção por uma das estirpes predominantes no painel onde foi isolado maior número de microrganismos, procedeu-se à quantificação desta actividade em culturas de *Penicillium* sp.1 em vários dias de cultura. As culturas apresentaram um crescimento exponencial até às 72 h, com uma taxa específica de crescimento (μ) de $0,0455 \pm 0,004 \text{ h}^{-1}$. Observou-se um aumento da actividade da desidrogenase durante a fase exponencial de crescimento do microrganismo, tendo-se obtido o valor máximo de actividade na fracção no 2.º dia de crescimento ($0,00241 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa seca). No sobrenadante das culturas o valor de actividade foi residual, o que era esperado uma vez que a desidrogenase é uma enzima intracelular de membrana [12]. O aumento da actividade durante a fase exponencial de crescimento pode ser explicado porque a desidrogenase é uma enzima intracelular, presente nas células vivas, pelo que pode ser referida como um bom indicador da actividade microbiana, no solo e também nalguns estudos de monumentos e pinturas murais [11-13, 26].

■ Conclusões

O estudo microbiano revelou uma elevada densidade microbiana generalizada em toda a pintura mural, tendo sido isoladas 32 estirpes bacterianas e 34 estirpes fúngicas, embora o painel 2 tenha sido o que apresentou maior colonização. As estirpes predominantes isoladas pertencem aos géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*. A elevada actividade da desidrogenase detectada nos materiais em análise indica-nos a presença de grande número de microrganismos activos presentes nesses locais o que pode explicar a grande deterioração observada, sendo que no local onde se obteve uma maior actividade (3A4) já nem existem as camadas pictóricas. Nas culturas de *Penicillium* sp.1 observou-se um crescimento exponencial até às 72 h coincidente com o valor máximo de actividade verificado nos extractos

celulares, mostrando que a desidrogenase é, essencialmente, um produto do metabolismo primário destes organismos, enzima de membrana presente nas células vivas. Os resultados mostram existir conformidade entre a actividade microbiana, bacteriana e fúngica, e a degradação dos materiais pictóricos e que a quantificação da actividade da desidrogenase é um bom marcador para a avaliação da degradação.

■ Agradecimentos

Este trabalho foi realizado no âmbito das actividades do projecto *HERCULES - Herança Cultural, Estudos e Salvaguarda* financiado pelo mecanismo de financiamento europeu EEA Grants.

■ Referências

- 1 Ribeiro, A. F.; Eusébio, M. I., 'Tintas inorgânicas: tintas de cal e de silicatos', in *Cadernos de Edifícios n.º 2*, LNEC, Lisboa (2002) 117-137.
- 2 Taft, W. S.; Mayer, J. W., *The Science of Paintings*, Springer, New York (2000).
- 3 Gómez-Alarcón, G.; Cilleros, B.; Flores, M.; Lorenzo, J., 'Microbial communities and alteration processes in monuments at Alcalá de Henares, Spain', *The Science of the Total Environment* **167** (1995) 231-239.
- 4 Flores, M.; Lorenzo, J.; Gómez-Alarcón, G., 'Algae and bacteria on historic monuments at Alcalá de Henares, Spain', *International Biodeterioration & Biodegradation* **40**(2-4) (1997) 241-246.
- 5 Saiz-Jimenez, C.; Laiz, L., 'Occurrence of halotolerant/halophilic bacterial communities in deteriorated monuments', *International Biodeterioration & Biodegradation* **46** (2000) 319-326.
- 6 Stomeo, F.; Laiz, L.; Gonzalez, J.M.; Saiz-Jimenez, C., 'Microbial diversity on paintings and engravings in Doña Trinidad Cave (Ardales, Spain)', in *Heritage, Weathering and Conservation*, ed. R. Fort, M. Alvarez de Buergo, M. Gomez-Heras, C. Vazquez-Calvo, Taylor & Francis, London (2006) 355-360.
- 7 Ajò, D.; Casellato, U.; Fiorin, E.; Vigato, P. A., 'Ciro Ferri's frescoes: a study of painting materials and technique by SEM-EDS microscopy, X-ray diffraction, micro FT-IR and photoluminescence spectroscopy', *Journal of Cultural Heritage* **5**(4) (2004) 333-348.
- 8 Katsibiri, O.; Boon, J. J., 'Investigation of the gilding technique in two post-Byzantine wall paintings using micro-analytical techniques', *Spectrochimica Acta Part B* **59**(10-11) (2004) 1593-1599.
- 9 Karydas, A.G., 'Importance of in-situ EDXRF measurements in the preservation and conservation of material culture', in *X-Rays for Archaeology*, ed. M. Uda, G. Demortier, I. Nakai, Springer, Dordrecht (2005) 27-53.

- 10 Civici, N., 'Non-destructive identification of inorganic pigments used in 16-17th century Albanian icons by total reflection X-ray fluorescence analysis', *Journal of Cultural Heritage* **7**(4) (2006) 339-343.
- 11 Camiña, F.; Trasar-Cepeda, C.; Gil-Sotres, F.; Leirós, C., 'Measurement of dehydrogenase activity in acid soils rich in organic matter', *Soil Biology & Biochemistry* **30**(8-9) (1998) 1005-1011.
- 12 Taylor, J. P.; Wilson, B.; Mills, M. S.; Burns, R. G., 'Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils and subsoils using various techniques', *Soil Biology & Biochemistry* **34** (2002) 387-401.
- 13 Warscheid, T.; Petersen, K.; Krumbein W.E., 'A rapid method to demonstrate and evaluate microbial activity on decaying sandstone', *Studies in Conservation* **35**(3) (1990) 137-147.
- 14 Krieg, N. R.; Holt, J. G., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore (1984).
- 15 Domsch, K. H.; Gams, W.; Anderson, T. H., *Compendium of Soil Fungi*, Academic Press, London (1980).
- 16 Petushkova, J. P.; Lyalikova, N. N., 'Microbiological degradation of lead-containing pigments in mural paintings', *Studies in Conservation* **31**(2) (1986) 65-69.
- 17 Akatova, E.; Laiz, L.; Gonzalez, J. M.; Saiz-Jimenez, C., 'Natural re-colonization of restored mural paintings', in *Heritage, Weathering and Conservation*, ed. R. Fort, M. Alvarez de Buergo, M. Gomez-Heras, C. Vazquez-Calvo, Taylor & Francis, London (2006) 381-386.
- 18 Sarró, M. I.; García, A. M.; Rivalta, V. M.; Moreno, D. A.; Arroyo, I., 'Biodeterioration of the Lions Fountain at the Alhambra Palace, Granada (Spain)', *Building and Environment* **41** (2006) 1811-1820.
- 19 Gorbushina, A. A.; Heyrman, J.; Dornieden, T.; Gonzales-Delvalle, M.; Krumbein, W. E.; Laiz, L.; Petersen, K.; Saiz-Jimenez, C.; Swings, J., 'Bacterial and fungal diversity and biodeterioration problems in mural painting environments of St. Martin's church (Greene-Kreienzen, Germany)', *International Biodeterioration & Biodegradation* **53** (2004) 13-24.
- 20 Shirakawa, M. A.; Gaylarde, C. C.; Gaylarde, P. M.; John, V.; Gambale, W., 'Fungal colonization and succession on newly painted buildings and the effect of biocide', *FEMS Microbiology Ecology* **39** (2) (2002) 165-173.
- 21 Saad, D. S.; Kinsey, G. C.; Paterson, R.; Gaylarde, C., 'Ergosterol analysis or the quantification of fungal growth on paint films. Proposal for a standard method', *Surface Coatings International. Part B: Coatings Transactions* **86**(2) (2003) 131-134.
- 22 Jestin, A.; Libert, M.; Thouvenot, P.; Sellier, R.; Bournazel, J. P., 'Biodégradation de matrices cimentaires', *Revue Française de Génie Civil* **8** (2004) 1087-1104.
- 23 Gaylarde, C. C.; Gaylarde, P. M., 'A comparative study of the major microbial biomass of biofilms on exteriors of buildings in Europe and Latin America', *International Biodeterioration & Biodegradation* **55** (2005) 131-139.
- 24 Galván, V.; De los Rios, A.; Ascaso, C., 'Reevaluating the cultural value of Segovia's Romanesque churches through biodiagnosis', in *Heritage, Weathering and Conservation*, ed. R. Fort, M. Alvarez de Buergo, M. Gomez-Heras, C. Vazquez-Calvo, Taylor & Francis, London (2006) 305-310.
- 25 Hoppert, M.; König, S., 'The succession of biofilms on building stone and its possible impact in biogenic weathering', in *Heritage, Weathering and Conservation*, ed. R. Fort, M. Alvarez de Buergo, M. Gomez-Heras, C. Vazquez-Calvo, Taylor & Francis, London (2006) Vol. I 311-315.
- 26 Mathew, M.; Obbard, J. P., 'Optimization of the dehydrogenase assay for measurement of indigenous microbial activity in beach sediments contaminated with petroleum', *Biotechnology Letters* **23** (2001) 227-230.

Recebido: 19 de Março de 2009

Versão revista: 3 de Julho de 2009

Aceite: 6 de Julho de 2009