

Universidade de Évora - Instituto de Investigação e Formação Avançada

Programa de Doutoramento em Bioquímica

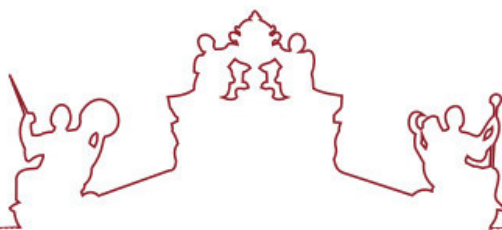
Tese de Doutoramento

**Biodeterioração de bens patrimoniais - uma abordagem
molecular**

Inês Santos Silva

Orientador(es) | Ana Miller
Ana Teresa Caldeira
C Salvador

Évora 2026



Universidade de Évora - Instituto de Investigação e Formação Avançada

Programa de Doutoramento em Bioquímica

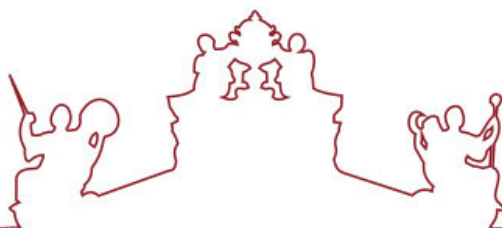
Tese de Doutoramento

**Biodeterioração de bens patrimoniais - uma abordagem
molecular**

Inês Santos Silva

Orientador(es) | Ana Miller
Ana Teresa Caldeira
C Salvador

Évora 2026



A tese de doutoramento foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor do Instituto de Investigação e Formação Avançada:

Presidente | António Manuel Pereira (Universidade de Évora)

Vogais | Ana Teresa Caldeira (Universidade de Évora) (Orientador)
José Carlos Pereira Roseiro (LNEG - Laboratório Nacional de Energia e Geologia)
Maria Amélia Alves Rangel Dionísio (Universidade de Lisboa - Instituto Superior Técnico)
Maria do Rosário Caeiro Martins (Universidade de Évora)
Sara Gutiérrez Patricio (CSIC - Consejo Superior de Investigaciones Científicas)

Esta Tese teve o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e a
Tecnologia (FCT) (Bolsa de Doutoramento, **UI/BD/153582/2022**)



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu
de Desenvolvimento Regional



Este trabalho foi financiado por fundos nacionais através da FCT — Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito da unidade I&D HERCULESLab (DOI: 10.54499/UIDB/04449/2020) e Laboratório Associado IN2PAST (DOI: 10.54499/LA/P/0132/2020).

Quero agradecer ainda às instituições Direcção-Geral do Património Cultural (em especial à Doutora Antónia Tinturé), Fundação Eugénio de Almeida e Museu Nacional de Arte Antiga, por terem permitido a realização dos estudos, bem como a David Teves Reis, pela colaboração técnica prestada, nomeadamente na medição da humidade relativa e na cedência do equipamento necessário.



UNIVERSIDADE DE ÉVORA
INSTITUTO DE INVESTIGAÇÃO
E FORMAÇÃO AVANÇADA



LABORATÓRIO
HERCULES
HERANÇA CULTURAL, ESTUDOS E SALVAGUARDA



IN2PAST
PATRIMÓNIO | ARTE | SUSTENTABILIDADE | TERRITÓRIO

*"Se vi mais longe, foi por estar sobre os ombros
de gigantes"*

Isaac Newton

Agradecimentos

Ao concluir esta tese de doutoramento, quero compartilhar os meus genuínos agradecimentos a todas as pessoas e instituições que, de tantas maneiras, ajudaram a tornar este sonho em realidade, pois o doutoramento, apesar de ser uma viagem solitária, de dúvidas, de autoconhecimento e de muito crescimento pessoal, não se faz de todo sozinho, muito pelo contrário. Só com as pessoas que menciono de seguida, é que consegui chegar onde cheguei.

Agradeço desde já à minha orientadora Professora Doutora Ana Teresa Caldeira, por todo o incansável apoio que me prestou, e por todo o esforço e dedicação a este projeto de Doutoramento. Pela confiança que sempre depositou no meu trabalho, pela amizade e compreensão em todas as situações. Agradecer por ter partilhado todo o conhecimento e experiências comigo - para que aprendesse com elas - guiando o meu trabalho para que tudo corresse da melhor forma possível e para que terminasse esta jornada com sucesso.

À minha coorientadora Professora Doutora Cátia Salvador, por estar sempre presente durante todo o percurso, pelo apoio, companheirismo e transmissão de conhecimentos. Ofereceu toda a disponibilidade sempre que precisei da sua ajuda, quer fosse sobre metodologia de trabalho, revisão, escrita, sugestões ou mesmo palavras de incentivo e encorajamento em momentos de incerteza e aperto. E à minha coorientadora Doutora Ana Miller, que mesmo longe, se mostrou disposta a ajudar e me felicitou pelo trabalho desenvolvido.

Queria agradecer igualmente ao Professor Doutor António Candeias que sempre se prontificou a ajudar em tudo, inclusive em ensaios laboratoriais e técnicas relevantes para o meu trabalho, em que precisei de auxílio, e por todas as viagens que fizemos em busca de recolher amostras para o meu estudo.

À Doutora Sílvia Arantes, que desempenhou um papel crucial na fase inicial do meu doutoramento, tornando possível a aprendizagem de técnicas convencionais de cultura e utilização de antimicrobianos, indispensáveis para concretizar algumas tarefas da minha investigação.

Agradeço profundamente ao Laboratório HÉRCULES, instituição que me acolheu incrivelmente bem, que valorizou o meu trabalho e que disponibilizou o espaço, bem como cada equipamento que precisava para concretizar todas as tarefas. Tornou igualmente possível, pela cedência de verbas, a participação e divulgação do meu trabalho de investigação em eventos e congressos de carácter científico.

E porque o Laboratório HÉRCULES me mostrou, não só que trabalhar em equipa é mais fácil, como é mais prazeroso quando se o faz com as pessoas certas, dirijo também os meus genuínos agradecimentos a todos os docentes e investigadores que fazem parte desta equipa, pelos ensinamentos, pela generosidade e por contribuírem para que me sentisse bem, segura e acompanhada no laboratório.

Expresso um agradecimento e carinho especial a algumas destas pessoas que acompanharam e que contribuíram ativamente para o desenvolvimento de algumas etapas do meu doutoramento. Nomeadamente: ao Doutor Luís Dias, que permitiu as minhas análises de microscopia eletrónica de varrimento, me transmitiu os conhecimentos base dessa técnica e possibilitou ter imagens espetaculares para colocar na minha tese; à Doutora Sara Valadas, que me ajudou na recolha e documentação de algumas amostras; ao Doutor Fábio Sitzia, que disponibilizou as provetes de pedra calcária no Laboratório de Geologia e que permitiu que os meus ensaios de simulação decorressem com o material apropriado; à Doutora Teresa Reis, que me falou da sua experiência, me aconselhou e me facilitou toda a informação que precisava de saber sobre o projeto *Old Goa Revelations*, projeto esse que permitiu a análise microbiana da minha parte, e que constituiu um dos subcapítulos da minha tese; à Vera Palma, que desempenhou um papel fundamental no desenvolvimento do trabalho da Unidade Curricular Investigação Bioquímica, ajudando-me desde a preparação das amostras até à interpretação final dos resultados e me ensinou o que sabia sobre técnicas laboratoriais que não eram do meu domínio; e ao Doutor Sérgio Martins, que vinha tantas vezes com conversas engraçadas, palavras de motivação e incentivo.

Agradeço às técnicas de laboratório D. Anabela, que me deu constantemente apoio na Fase III do Colégio Luís António Verney da Universidade de Évora, na preparação de meios de cultura, na esterilização dos materiais necessários e me facultou sempre tudo aquilo de que necessitava; e à Dora Boieiro, por tornar toda a logística mais fácil no Laboratório HÉRCULES.

Não poderia deixar de expressar a minha gratidão ao meu grupo de colegas do laboratório, António Carrapiço, Maria João Penetra, Ricardo Estevinho e Patrícia Gatinho pela amizade, companheirismo e por não deixarem que duvidasse de mim; por partilharem comigo não só o conhecimento que iam adquirindo também, como as suas inseguranças e medos, para que nos pudéssemos apoiar mutuamente.

Obrigada aos estagiários de Licenciatura em Bioquímica e Biotecnologia que colaboraram comigo em determinados casos de estudo e que me ajudaram a crescer

como investigadora, melhorando a minha capacidade de me expressar, de me fazer ouvir e de transmitir conhecimento aos outros.

Nunca me esqueceria de agradecer muito às minhas amigas mais próximas Mariana, Sofia e Ana, pelo suporte diário, pelos sorrisos e felicitações que refletiam conquistas mas também pelas conversas de desabafo e frustrações ao longo destes anos. E à minha amiga Lénia, que sabe sempre o que dizer, e quando dizer, e foi incansável a falar comigo e a aconselhar-me em momentos de maior fraqueza.

À minha família mas principalmente aos meus pais, que me deram uma educação exímia, que me transmitiram os princípios e os melhores valores que carrego comigo hoje e que me fazem ter orgulho na pessoa que me tornei. À minha mãe que esteve sempre presente, que tinha constantemente uma palavra amiga, um abraço e que fez sempre tanta coisa por mim quando eu estava cansada física e mentalmente; e ao meu pai, de quem nunca faltou uma palavra encorajadora, um aplauso de pé, a expressão do seu orgulho por mim e que arranjou formas de explorar inúmeras ferramentas e informações que me pudessem ser úteis, ajudando à minha linha de pensamento.

Para o meu namorado e melhor amigo Pedro Deus, não há palavras que consiga encontrar (por muito que as procure) para agradecer o incansável apoio, presença e constante incentivo que me deu. Fez-me levantar a cabeça vezes sem conta, lembrou-me todos os dias o quanto eu sou capaz, e sempre acreditou mais em mim do que eu em mim própria. Foi força, paz, amor, fôlego e alento para suportar esta fase, como em todas da minha vida, e a ele devo uma gratidão do tamanho do mundo.

Sem vocês nada disto teria sido possível. OBRIGADA!

Resumo

A conservação do Património Cultural impõe desafios complexos que envolvem uma profunda compreensão dos mecanismos bioquímicos subjacentes à sua deterioração. Este trabalho aborda os processos de biodeterioração microbiana através de uma perspetiva bioquímica, centrando-se na caracterização da interação substrato-ambiente-microbioma, com base em vários casos de estudo, em diferentes tipologias patrimoniais, nomeadamente monumentos pétreos e pinturas de cavalete de origens geográficas distintas.

O presente trabalho desenvolveu uma abordagem multidisciplinar integrando a análise da materialidade, das condições ambientais e da colonização microbiana, procurando esclarecer o impacto das comunidades nos processos de biodeterioração.

Nos sistemas pictóricos, foi observada uma predominância de fungos dos géneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Cladosporium*, associados à degradação enzimática de aglutinantes proteicos e polisacarídicos, e à alteração de pigmentos sensíveis a variações de pH. Nos monumentos pétreos, destacaram-se bactérias halotolerantes e pigmentadas, assim como fungos melanizados e líquenes, cuja atividade metabólica promove a dissolução de minerais, a formação de biofilmes e a modificação das propriedades físico-químicas da pedra, incluindo alterações no pH local e solubilização de iões metálicos.

Este estudo contribuiu para o aprofundamento do conhecimento bioquímico dos mecanismos microbianos envolvidos na biodeterioração de materiais patrimoniais, fornecendo fundamentos científicos para o desenvolvimento de estratégias de conservação e preservação.

Palavras-chave: Património Cultural; biodeterioração; interações microbianas com substratos artísticos; monumentos em pedra; pinturas de cavalete; metagenómica filogenética; mecanismos bioquímicos de deterioração.

Biodeterioration of heritage assets - a molecular approach

Abstract

The conservation of Cultural Heritage presents complex challenges that require a deep understanding of the biochemical mechanisms underlying their deterioration. This work addresses microbial biodeterioration processes from a biochemical perspective, focusing on the characterization of substrate–environment–microbiome interactions, based on several case studies involving different heritage typologies, namely stone monuments and easel paintings of diverse geographical origins.

A multidisciplinary approach was developed, integrating the analysis of material composition, environmental conditions, and microbial colonization, in order to elucidate the impact of microbial communities on biodeterioration processes.

In pictorial systems, a predominance of fungal genera *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Cladosporium* was observed, associated with the enzymatic degradation of proteinaceous and polysaccharide-based binding media, as well as with the alteration of pigments sensitive to pH variations. In stone monuments, halotolerant and pigmented bacteria, together with melanized fungi and lichens, were predominant. Their metabolic activity promotes mineral dissolution, biofilm formation, and modifications to the physicochemical properties of the stone, including local pH shifts and metal ion solubilization.

This study contributed to a deeper biochemical understanding of the microbial mechanisms involved in the biodeterioration of heritage materials, providing scientific foundations for the development of conservation and preservation strategies.

Keywords: Cultural Heritage; biodeterioration; microbial interactions with artistic substrates; stone monuments; easel paintings; phylogenetic metagenomics; biochemical mechanisms of deterioration.

Índice

Agradecimentos	vii
Resumo	xi
Abstract	xiii
Índice de Figuras	xxi
Índice de Tabelas	xxv
Abreviaturas	xxvii
Unidades de medida	xxxii
Publicações relacionadas	xxxiii
Nota Introdutória	1
Capítulo 1 – Estado da arte	7
1.1. Biodeterioração microbiana no Património Cultural	7
1.1.1. Principais mecanismos de biodeterioração	9
1.1.1.1. Formação de biofilmes	9
1.1.1.2. Alteração de cor	12
1.1.1.3. Formação de eflorescências salinas	14
1.1.1.4. Biocorrosão	16
1.1.1.5. Penetração física de microrganismos	18
1.1.2. Microrganismos envolvidos na biodeterioração	19
1.1.2.1. Bactérias	19
1.1.2.2. Cianobactérias e algas	21
1.1.2.3. Fungos	23
1.1.2.4. Líquenes	24
1.1.3. Biodeterioração de Substratos	26
1.1.3.1. Pedra	26
.....	31
1.1.3.2. Pintura de cavalete	31
1.1.4. Detecção de agentes de biodeterioração	35
1.1.4.1. Técnicas dependentes de cultura	36
1.1.4.2. Técnicas Independentes de Cultura	37
1.1.4.2.1. Sequenciação de Nova Geração (NGS)	37
1.1.4.2.2. Sequenciação de Terceira Geração	42
1.1.5. Estratégias de mitigação	44
.....	51
Capítulo 2 – Biodeterioração em Pintura Antiga	53

2.1. Estudo de comunidades microbianas em retratos históricos da Galeria dos Vice-Reis da Índia	54
2.1.1. Metodologia	54
2.1.1.1. Amostragem	54
2.1.1.2. Extração de DNA.....	57
2.1.1.3. Análise metagenómica por NGS	58
2.1.1.3.1. Quantificação do DNA.....	58
2.1.1.3.2. Amplificação.....	58
2.1.1.3.3. Indexação	60
2.1.1.3.4. Preparação da biblioteca de fragmentos e sequenciação	60
2.1.2. Resultados e Discussão	62
2.1.2.1. Caracterização e identificação da microbiota colonizadora dos retratos 62	
2.1.2.1.1. Comunidades eucariotas.....	62
2.1.2.1.2. Comunidades procariotas	69
2.2. Perfil microbiano e estratégias de mitigação em pinturas das reservas do Museu Nacional de Arte Antiga (MNAA)	77
2.2.1. Metodologia	77
2.2.1.1. Amostragem	77
2.2.1.2. Detecção de contaminação microbiana	80
2.2.1.3. Métodos dependentes de cultura	80
2.2.1.3.1. Isolamento dos microrganismos.....	80
2.2.1.3.2. Extração do DNA fúngico isolado	81
2.2.1.3.3. Quantificação do DNA.....	81
2.2.1.3.4. Amplificação e Sequenciação Sanger do DNA dos fungos.....	82
2.2.1.4. Análise metagenómica por NGS	82
2.2.1.4.1. Extração e Sequenciação de DNA	82
2.2.1.5. Determinação da atividade antimicrobiana <i>in-vitro</i>	83
2.2.2. Resultados e Discussão	84
2.2.2.1. Interação microrganismos-substrato	84
2.2.2.2. Identificação e caracterização dos isolados fúngicos	85
2.2.2.3. Caracterização da microbiota por métodos independentes de cultura 87	
2.2.2.3.1. Comunidades eucariotas.....	87
2.2.2.3.2. Comunidades procariotas	90
2.2.2.4. Avaliação da eficácia antimicrobiana	92
2.3. Estudo de comunidades microbianas de duas pinturas da Galeria de Arte da Universidade Silpakorn na Tailândia.....	95
2.3.1. Metodologia	95

2.3.1.1. Amostragem	95
2.3.1.2. Extração e Sequenciação de DNA.....	96
2.3.2. Resultados e Discussão	97
2.3.2.1. Identificação e caracterização dos microrganismos colonizadores das pinturas	97
2.3.2.1.1. Comunidades procariotas	97
2.3.2.1.2. Comunidades eucariotas.....	102
2.4. Reflexões finais sobre os casos de estudo	107
Capítulo 3 – A Casa de Fresco do Palácio Condes de Basto em Évora: Caracterização da Comunidade Microbiana e Testes Antimicrobianos para Conservação	113
3.1. Introdução ao caso de estudo: A Casa de Fresco do Palácio Condes de Basto	114
3.2. Metodologia	115
3.2.2. Microscopia de fluorescência	117
3.2.3. Métodos dependentes de cultura e identificação de isolados fúngicos .	117
3.2.4. Avaliação da atividade antifúngica.....	117
3.2.5. Identificação das comunidades microbianas por NGS.....	118
3.2.5.1. Extração do DNA	118
3.2.5.2. Sequenciação do DNA.....	119
3.3. Resultados e Discussão.....	119
3.3.1. Detecção de contaminação microbiológica	119
3.3.2. Caracterização e identificação da população cultivável.....	121
3.3.3. Caracterização da microbiota nos materiais pétreos da Casa de Fresco por NGS	124
3.3.3.1. Comunidades eucariotas	124
3.3.3.2. Comunidades procariotas	129
3.3.4. Determinação da eficácia antimicrobiana	135
3.4. Considerações finais.....	136
Capítulo 4 – Processos de Biodeterioração em Monumentos de Pedra do Património Mundial da UNESCO: Convento de Cristo, Mosteiro da Batalha e de Alcobaça.....	141
4.1. Convento de Cristo.....	142
4.1.1. Metodologia	143
4.1.1.1. Amostragem	143
4.1.1.2. Identificação e caracterização da microbiota colonizadora	144
4.1.1.2.1. Extração e Sequenciação do DNA.....	144
4.1.2. Resultados e Discussão: comunidades microbianas – efeitos do seu metabolismo na biodeterioração	144
4.1.2.1. Na Fachada Norte do monumento.....	145

4.1.2.1.1. Microrganismos eucariotas	145
4.1.2.1.2. Microrganismos procariotas	148
4.1.2.2. Nos Elementos Figurativos da Janela Manuelina	150
4.1.2.2.1. Microrganismos eucariotas	151
4.1.2.2.2. Microrganismos procariotas	156
4.2. Mosteiro da Batalha	159
4.2.1. Metodologia	160
4.2.1.1. Amostragem	160
4.2.1.2. Métodos dependentes de cultura.....	161
4.2.1.2.1. Isolamento bacteriano.....	161
4.2.1.2.2. Extração de DNA dos isolados bacterianos.....	162
4.2.1.2.3. Identificação dos isolados por Sequenciação Sanger	162
4.2.1.3. Métodos independentes de cultura.....	163
4.2.1.3.1. NGS.....	163
4.2.1.3.2. Sequenciação de Terceira Geração	163
4.2.2. Resultados e Discussão: comunidades microbianas – efeitos do seu metabolismo na biodeterioração	164
4.2.2.1. Identificação dos isolados procariotas	164
4.2.2.2. Identificação das comunidades procariotas por NGS	167
4.2.2.2.1. Comunidades procariotas	167
4.2.2.2.2. Comunidades eucariotas	171
4.2.2.3. Identificação dos microrganismos por Sequenciação de Terceira Geração	173
4.3. Mosteiro de Alcobaça	175
4.3.1. Metodologia	176
4.3.1.1. Amostragem	176
4.3.1.2. XRD	178
4.3.1.3. SEM-EDS.....	178
4.3.1.4. Análise metagenómica	179
4.3.2. Resultados e Discussão: comunidades microbianas – efeitos do seu metabolismo na biodeterioração	179
4.3.2.1. Caracterização das eflorescências salinas	179
4.3.2.2. Detecção de contaminação microbiana.....	180
4.3.2.3. Caracterização da microbiota por NGS	182
4.3.2.3.1. Comunidades procariotas	182
4.3.2.3.2. Comunidades eucariotas	189
4.4. Reflexões finais sobre os casos de estudo	192

Capítulo 5 – Formação de biofilmes avermelhados de origem bacteriana em monumentos de pedra: Ensaio de simulação e estratégias de mitigação	197
5.1. Metodologia: Testes de biocolonização	198
5.1.1. Seleção dos microrganismos com potencial de formação de biofilmes	198
5.1.2. Inoculação dos modelos de pedra	198
5.1.3. Colorimetria	199
5.1.4. Espectroscopia RAMAN	199
5.1.5. Avaliação da capacidade de remoção de pigmentos	200
5.1.5.1. Ensaio de otimização	200
5.1.5.2. Ensaio de limpeza nos modelos de pedra	201
5.1.6. Avaliação da capacidade de inibição do crescimento bacteriano	201
5.1.6.1. <i>In-vitro</i>	201
5.1.6.2. <i>In-situ</i>	201
5.1.7. Ensaio de viabilidade celular	202
5.1.7.1. Quantificação de ATP	202
5.1.7.2. Atividade de enzimas desidrogenases	203
5.2. Resultados e Discussão	203
5.2.1. Determinação da capacidade de formação de biofilmes	203
5.2.2. Avaliação da produção de pigmentos bacterianos e a sua caracterização	205
5.2.2.1. Parâmetros colorimétricos dos biofilmes	206
5.2.2.2. Detecção de pigmentos associados aos biofilmes bacterianos	208
5.2.3. Otimização das condições de tratamento para remoção de pigmentos	212
5.2.4. Avaliação da eficácia da limpeza na remoção dos carotenos bacterianos produzidos	216
5.2.4.1. Ensaio de viabilidade pós-limpeza dos pigmentos	219
5.2.5. Avaliação da inibição do crescimento bacteriano	222
5.2.5.1. <i>In-vitro</i>	222
5.2.5.2. <i>In-situ</i>	224
5.2.5.2.1. Avaliação dos parâmetros colorimétricos	224
5.2.5.2.2. Avaliação da viabilidade celular em biofilmes sobre pedra após tratamentos antimicrobianos	229
.....	235
Capítulo 6 – Padrões e Contrastes nos Processos de Biodeterioração: Análise Comparativa e Integração dos Resultados em Pintura e Monumentos de Pedra	237
6.1. Metodologia	238
6.2. Resultados e Discussão	238
6.2.1. Comparação dos perfis microbianos - Procaríotas	238

Índice

6.2.1.1. Alfa diversidade	238
6.2.1.2. Beta diversidade	243
6.2.1.3. Análise integrada das comunidades procariotas: diferenças taxonómicas e padrões de abundância.....	249
6.2.2. Comparação dos perfis microbianos – Eucariotas	256
6.2.2.1. Alfa diversidade	256
6.2.2.2. Beta diversidade	259
6.2.2.3. Análise integrada das comunidades eucariotas: diferenças taxonómicas e padrões de abundância.....	263
Capítulo 7 – Síntese e Perspetivas Futuras	275
Referências	283
Anexos	319
Anexo A: Parâmetros colorimétricos e medição de ΔE pelo sistema CIELAB.....	319
Anexo B: Análise estatística referente às comparações múltiplas entre locais do Capítulo 6.....	323

Índice de Figuras

Figura 1.1: Estágios de formação dos biofilmes microbianos.....	10
Figura 1.2: Evidências de biodeterioração da pedra: no Convento de Cristo (a,d,e), com notável colonização de líquenes; nas colunas do Mosteiro da Batalha (b) e do Mosteiro de Alcobaça (c), visualizando-se a presença de pigmentação nas paredes com presença de biofilmes	31
Figura 1.3: Fluxo de trabalho da técnica NGS (adaptado de Biorender.com).....	40
Figura 1.4: Tecnologia de Sequenciação MinION	44
Figura 2.1: Processo de amostragem no retrato de Pedro Lencastre (Créditos imagem: Laboratório HERCULES, cortesia: Archaeological Survey of India)	55
Figura 2.2: Retratos dos Vice-Reis analisados no estudo (a,b) Vasco da Gama; (c,d) Lopo Vaz de Sampaio; (e,f) Matias de Albuquerque; (g,h) Pedro da Silva; (i) Pedro Almeida; (j) José Horta e Costa; (l) Bispo.	56
Figura 2.3: Filos (a) e famílias (b) eucariotas predominantes nos retratos	62
Figura 2.4: Géneros eucariotas predominantes nos retratos.....	63
Figura 2.5: Filos (a) e famílias (b) procariotas predominantes nos retratos	69
Figura 2.6: Géneros procariotas predominantes nos retratos.....	70
Figura 2.7: Microamostra do suporte da pintura 1252 para análise FEG-SEM.....	80
Figura 2.8: Micrografias de FEG-SEM da colonização fúngica no microfragmento analisado do suporte da pintura 1252: (a) corpo de frutificação fúngico; (b) pormenor de uma hifa; (c, e) agregados de células microbianas; (d) colonização massiva por cabeças reprodutiva.....	84
Figura 2.9: Filos (a) e Famílias (b) eucariotas predominantes nas pinturas selecionadas do MNAA	87
Figura 2.10: Géneros eucariotas maioritários nas pinturas selecionadas do MNAA....	88
Figura 2.11: Filos (a) e Famílias (b) procariotas predominantes nas pinturas selecionadas do MNAA.....	90
Figura 2.12: Géneros procariotas maioritários nas pinturas selecionadas do MNAA ..	91
Figura 2.13: Pinturas (a) F - Faith analisadas e (b) T - Titanic e processo de amostragem	96
Figura 2.14: Filos procariotas predominantes na pintura (a) F - Faith e (b) T - Titanic.	97
Figura 2.15: Famílias procariotas predominantes na pintura (a) F - Faith e (b) T - Titanic	98
Figura 2.16: Géneros procariotas maioritários identificados na pintura F	99
Figura 2.17: Géneros procariotas maioritários identificados na pintura T	100
Figura 2.18: Filos eucariotas predominantes na pintura (a) F – Faith e (b) T - Titanic	102
Figura 2.19: Famílias eucariotas predominantes na pintura (a) F – Faith e (b) T - Titanic	103
Figura 2.20: Géneros eucariotas maioritários identificados na pintura F	104
Figura 2.21: Géneros eucariotas maioritários identificados na pintura T	106
Figura 3.1: Casa de Fresco localizada no Palácio Condes de Basto (Évora, Portugal) com pormenores do processo de amostragem. Os círculos vermelhos representam o local exato de recolha	115
Figura 3.2: Filos gerais predominantes (a) e filios específicos de cada amostra (b) da população eucariota presente na Casa de Fresco	124
Figura 3.3: Famílias gerais predominantes (a) e famílias específicas de cada amostra (b) da população eucariota presentes na Casa de Fresco	125

Figura 3.4: Géneros eucariotas predominantes; (*) representam os géneros de fungos liquenizados; (**) destaca o fotobionte associado aos líquenes identificados no estudo	126
Figura 3.5: Filos gerais predominantes e filios específicos de cada amostra da comunidade procariota nas amostras do interior (a,b) e do exterior (c,d) da Casa de Fresco	130
Figura 3.6: Famílias gerais predominantes e famílias específicas de cada amostra da comunidade procariota nas amostras do interior (a,b) e do exterior (c,d) da Casa de Fresco	132
Figura 3.7: Géneros procariotas dominantes nas amostras do interior (a) e do exterior (b) da Casa de Fresco	133
Figura 4.1: Processo de amostragem no Convento de Cristo (Tomar)	144
Figura 4.2: Filos (a) e Famílias (b) eucariotas predominantes no conjunto das amostras da fachada norte	145
Figura 4.3: Géneros eucariotas predominantes em cada uma das amostras da fachada norte	146
Figura 4.4: Filos (a) e Famílias (b) procariotas predominantes no conjunto das amostras da fachada norte	148
Figura 4.5: Géneros procariotas predominantes nas amostras da fachada norte.....	149
Figura 4.6: Filos (a) e Famílias (b) eucariotas predominantes nos elementos da Janela	151
Figura 4.7: Géneros eucariotas predominantes nos elementos figurativos da Janela	152
Figura 4.8: Filos procariotas predominantes nos elementos figurativos da Janela	156
Figura 4.9: Géneros procariotas predominantes nos elementos figurativos da Janela	157
Figura 4.10: Alterações superficiais dos elementos arquitetónicos em pedra no interior (a,d) da Capela do Fundador e (b,c) na igreja do Mosteiro da Batalha	160
Figura 4.11: Processo de amostragem no Mosteiro da Batalha	161
Figura 4.12: Filos (a) e Famílias (b) procariotas predominantes nos biofilmes do Mosteiro da Batalha	167
Figura 4.13: Géneros procariotas predominantes nos biofilmes cor-de-rosa. O símbolo (*) representa as amostras recolhidas na igreja do mosteiro.....	168
Figura 4.14: Filos (a) e Famílias (b) eucariotas predominantes nos biofilmes do Mosteiro da Batalha	171
Figura 4.15: Géneros eucariotas predominantes nos biofilmes do Mosteiro da Batalha	172
Figura 4.16: Identificação das espécies procariotas predominantes pela tecnologia da ONT	173
Figura 4.17: Evidências de biodeterioração no Mosteiro de Alcobaça: (a) fenómeno distinto observado no altar da igreja; (b) biofilmes cor-de-rosa nas paredes; (c) presença de eflorescências salinas	176
Figura 4.18: Processo de amostragem no Mosteiro de Alcobaça.....	177
Figura 4.19: Difractograma de XRD das eflorescências salinas dos microfragmentos pétreos com identificação dos principais sinais de nitrato de potássio (n).....	180
Figura 4.20: Análise de microfragmentos de pedra do Mosteiro de Alcobaça por observação SEM em modo eletrónico secundário (a1) e mapas elementares EDS 2D (a2-a3) com distribuição de elementos individuais (b) de carbono (C), azoto (N), oxigénio (O), enxofre (S), potássio (K) e sódio (Na).....	181
Figura 4.21: Micrografias SEM da população microbiana que prospera em áreas alteradas da pedra do mosteiro	182

Figura 4.22: Filos (a) e famílias (b) procariotas predominantes no Mosteiro de Alcobaça	183
Figura 4.23: Géneros predominantes discriminados por zona de amostragem no Mosteiro de Alcobaça.....	184
Figura 4.24: Géneros procariotas predominantes na zona de amostragem (1).....	185
Figura 4.25: Géneros procariotas predominantes na zona de amostragem (2).....	186
Figura 4.26: Géneros bacterianos predominantes na zona de amostragem (3).....	188
Figura 4.27: Filos (a) e famílias (b) eucariotas predominantes no Mosteiro de Alcobaça	189
Figura 4.28: Géneros eucariotas predominantes no Mosteiro de Alcobaça.....	190
Figura 5.1: Crescimento bacteriano do isolado CCLBMBatB3 em meio líquido HS ..	199
Figura 5.2: Esquematização do ensaio de otimização com beta caroteno	200
Figura 5.3: Esquematização dos testes de viabilidade celular e aplicação de antimicrobianos. (*) representa a primeira medição, correspondente a 100% de viabilidade, antes da aplicação dos compostos; t representa o tempo em semanas.	202
Figura 5.4: Formação de biofilmes em microplaca pelo isolado do género <i>Gordonia</i>	204
Figura 5.5: Determinação da capacidade de formação de biofilmes para cada isolado. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de 16 réplicas	204
Figura 5.6: Produção de pigmentos no modelo de pedra: (a) controlo negativo não inoculado, (b) pedra inoculada mantida no escuro, e (c) pedra inoculada exposta à luz solar.....	205
Figura 5.7: Espetro de cores CIELAB e representação dos parâmetros colorimétricos dos biofilmes corados	207
Figura 5.8: Espetro de Raman da cultura in-vitro do isolado <i>Gordonia</i>	208
Figura 5.9: Espectros de Raman in-situ da pedra mantida no escuro, considerando as escalas (a) 930 – 1270 cm^{-1} e (b) 1160 – 1560 cm^{-1} . A conotação (*) representa picos atribuídos à calcite e consistentes com a presença deste mineral	209
Figura 5.10: Espetro de Raman in-situ da pedra exposta à luz solar. A conotação (*) representa picos atribuídos à calcite e consistentes com a presença deste mineral .	210
Figura 5.11: Medição em escala colorimétrica na (a) pedra-controlo e (b) pedra com caroteno a utilizar no ensaio	212
Figura 5.12: Medição da Refletância (%) para as várias concentrações de solução de limpeza no ensaio com beta caroteno.....	213
Figura 5.13: Medição de Refletância (%) para as várias concentrações de solução de limpeza no ensaio com a pedra não corada.....	215
Figura 5.14: Efeito da limpeza nas pedras com os biofilmes pigmentados sujeitas a diferentes concentrações de tratamento: (a, b) pedra mantida no escuro, antes e depois da limpeza; (c, d) pedra exposta à luz solar, antes e depois da limpeza.	216
Figura 5.15: Medição da Refletância (%) na (a) pedra mantida no escuro e na (b) pedra mantida sob exposição solar, para as várias concentrações de solução de limpeza utilizadas.....	218
Figura 5.16: Ensaio de viabilidade celular: atividade de enzimas desidrogenases....	219
Figura 5.17: Viabilidade celular (%) da população bacteriana, monitorizado mensalmente durante 1 ano (t = meses), em função da concentração (%) da solução de limpeza aplicada na pedra sob exposição solar (a) e mantida no escuro (b).	220
Figura 5.18: Amostras de pedra calcária inoculadas com o isolado bacteriano CCLBMBatB3. (a) e (b) representam as pedras de controlo positivo e negativo, respetivamente; (c-f) representam as pedras destinadas à aplicação dos antimicrobianos Preventol, Biotin-T, Solução de limpeza e biocida Syra-Óleovictis, respetivamente.	224

Figura 5.19: Espectro de cores CIELAB e representação comparativa entre as pedras coradas e as pedras-controlo.....	225
Figura 5.20: Amostras de pedra após aplicação dos biocidas (a) Preventol, (b) Biotin-T, (c) Solução de limpeza e (d) Biocida Syra-Óleovictis.....	226
Figura 5.21: Espectro de cores CIELAB que representa o efeito dos tratamentos antimicrobianos na coloração da pedra: (a) valores iniciais para as pedras-controlo e pedras tratadas. As restantes figuras mostram as alterações de cor ao longo do tempo com cada biocida (b) Preventol; (c) Biotin-T; (d) Solução de Limpeza e (e) Biocida OES, Syra-Óleovictis.....	227
Figura 5.22: Viabilidade celular (%) ao longo do tempo, após aplicação de biocidas, por quantificação de ATP; t representa o tempo em semanas.....	229
Figura 5.23: Viabilidade celular (%) ao longo do tempo, após aplicação dos antimicrobianos, por medição da atividade das desidrogenases; t representa o tempo em semanas.....	231
Figura 6.1: Comparação da alfa diversidade procariota entre locais. A representação gráfica em boxplot ilustra o índice de Shannon para cada local, agrupados por (a) Género e (b) Família.....	240
Figura 6.2: Comparação dos valores de Índice de Shannon das comunidades procariotas nas localidades amostradas para os níveis taxonómicos de (a) Família e (b) Género.....	241
Figura 6.3: Gráfico de PCoA referente à beta diversidade das comunidades procariotas ao nível da (a) Família e (b) Género.....	245
Figura 6.4: Heatmap da abundância relativa das principais famílias procariotas. A intensidade da cor vermelha é proporcional à abundância do táxon. As amostras foram agrupadas por localidade na barra superior.....	250
Figura 6.5: Heatmap da abundância relativa dos principais géneros procariotas. A intensidade da cor vermelha é proporcional à abundância do táxon. As amostras foram agrupadas por localidade na barra superior.....	251
Figura 6.6: Comparação da alfa diversidade eucariota entre locais. A representação gráfica em boxplot ilustra o índice de Shannon para cada local, agrupados por (a) Família e (b) Género.....	257
Figura 6.7: Gráfico de PCoA referente à beta diversidade das comunidades eucariotas ao nível de (a) Família e (b) Género.....	260
Figura 6.8: Heatmap da abundância relativa das principais famílias eucariotas. A intensidade da cor vermelha é proporcional à abundância do táxon. As amostras foram agrupadas por localidade na barra superior.....	263
Figura 6.9: Heatmap da abundância relativa dos principais géneros eucariotas. A intensidade da cor vermelha é proporcional à abundância do táxon. As amostras foram agrupadas por localidade na barra superior.....	264

Índice de Tabelas

Tabela 2.1: Descrição da amostragem e identificação das pinturas analisadas em Goa	56
Tabela 2.2: Sequência de primers utilizados na amplificação do DNA	59
Tabela 2.3: Processo de amostragem nas pinturas selecionadas do MNAA	78
Tabela 2.4: Identificação dos fungos isolados no MNAA através de sequenciação da região ITS complementada com características macro e microscópicas de cada um ..	86
Tabela 2.5: Efeito dos antimicrobianos contra as comunidades fúngicas das pinturas do MNAA	92
Tabela 3.1: Registo fotográfico de cada zona de amostragem na Casa de Fresco ...	116
Tabela 3.2: Observação dos microfragmentos de pedra por microscopia de fluorescência	120
Tabela 3.3: Características macroscópicas dos isolados fúngicos da Casa de Fresco com respetiva identificação por Sequenciação Sanger	121
Tabela 3.4: Efeito dos compostos comerciais contra as comunidades microbianas da Casa de Fresco	135
Tabela 3.5: Medição dos halos de inibição (mm) para cada zona de amostragem....	136
Tabela 4.1: Características macroscópicas e identificação dos isolados do Mosteiro da Batalha	164
Tabela 5.1: Efeito dos compostos comerciais (mm) contra o isolado bacteriano CCLBMBatB3	223
Tabela 6.1: Comunidades procariotas - integração entre o perfil microbiano, o tipo de substrato, o local e as condições ambientais	255
Tabela 6.2: Comunidades eucariotas - integração entre o perfil microbiano, o tipo de substrato, o local e as condições ambientais	269
Tabela A.1: Medição de parâmetros colorimétricos dos biofilmes corados utilizando o sistema CIELAB.....	319
Tabela A.2: Medição de parâmetros colorimétricos: ensaio de limpeza com caroteno comercial	319
Tabela A.3: Medição de parâmetros colorimétricos: ensaio de limpeza na pedra-controlo	320
Tabela A.4: Efeito da limpeza nas pedras pigmentadas pela medição de parâmetros colorimétricos.....	320
Tabela A.5: Medição de parâmetros colorimétricos nas pedras destinadas aos ensaios antimicrobianos, utilizando o sistema CIELAB e determinação de ΔE	321
Tabela A.6: Medição dos parâmetros colorimétricos ao longo do tempo após tratamento dos modelos de pedra com os respetivos antimicrobianos	322
Tabela B.1: Resultados do teste estatístico post-hoc para a comparação de alfa diversidade procariota entre locais de amostragem. São apresentados os p-value e os valores de FDR. As linhas destacadas indicam a comparação com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).	323

Tabela B.2: Análise estatística comparativa entre localidades para a beta diversidade, aos níveis de Género e Família procariotas. As linhas destacadas indicam a comparação com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). 324

Tabela B.3: Resultados da análise estatística ANOVA para a identificação de géneros e famílias procariotas que apresentaram diferenças estatisticamente significativas (p-value, FDR $< 0,05$)..... 325

Tabela B.4: Resultados do teste estatístico post-hoc para a comparação de alfa diversidade para a comunidade eucariota entre locais de amostragem. São apresentados os p-value e os valores de FDR. As linhas destacadas indicam a comparação com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). 326

Tabela B.5: Análise estatística comparativa entre localidades para a beta diversidade, aos níveis de Género e Família eucariotas. As linhas destacadas indicam a comparação com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). 327

Tabela B.6: Resultados da análise estatística ANOVA para a identificação de géneros e famílias eucariotas que apresentaram diferenças estatisticamente significativas (p-value, FDR $< 0,05$)..... 327

Abreviaturas

A - Adenina

Abs – Absorvância

AMP – Adenosina monofosfato, do inglês *Adenosine monophosphate*

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato, do inglês *Adenosine triphosphate*

a_w – Atividade da água

C – Citosina

CIELAB - Sistema de cor definido pela *Commission Internationale de l'Éclairage*

ddNTPs – Didesoxinucleotídeos, do inglês *Dideoxynucleotide triphosphates*

DMSO - Dimetilsulfóxido, do inglês *Dimethyl sulfoxide*

DNA - Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic acid*

dNTPs - Desoxinucleotídeos trifosfato, do inglês *Deoxynucleotide triphosphates*

dsDNA - DNA de cadeia dupla, do inglês *Double-stranded DNA*

EDS - Espectroscopia de raios-X de dispersão de energia, do inglês *Energy dispersive X-ray spectroscopy*

EPS – Exopolissacarídeos, do inglês *Extracellular polymeric substances*

FDR – Taxa de falsas descobertas, do inglês *False Discovery Rate*

FEA – Fundação Eugénio de Almeida

FEG-SEM - Microscópio Eletrônico de Varrimento com Canhão de Emissão de Campo, do inglês *Field Emission Gun Scanning Electron Microscope*

FITC - Isotiocianato de fluoresceína, do inglês *Fluorescein Isothiocyanate*

G – Guanina

HR - Humidade relativa

HTS – Sequenciação de elevado rendimento, do inglês *High throughput sequencing*

Abreviaturas

ITS - Espaçador de transcrição interno, do inglês *Internal transcribed spacer*

MEA – Malte extrato agár, do inglês *Malt extract agar*

MNAA – Museu Nacional de Arte Antiga

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, do inglês *3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*

NGS – Sequenciação de Nova Geração, do inglês *Next Generation Sequencing*

OD – Densidade ótica, do inglês *Optical density*

OEs - Óleos essenciais

ONT - *Oxford Nanopore Technologies*

OTUs - Unidades taxonómicas operacionais, do inglês *Operational taxonomic units*

pb - Par de bases, do inglês *base pair - bp*

PCoA – Análise de coordenadas principais, do inglês *Principal coordinate analysis*

PCR - Reações em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase chain reaction*

pH - Potencial hidrogeniónico

QACs - Compostos de amónio quaternário, do inglês *Quaternary ammonium compounds*

RNA – Ácido ribonucleico, do inglês *Ribonucleic acid*

RNase – Ribonuclease

ROS – Espécies reativas de oxigénio, do inglês *Reactive oxygen species*

rRNA - Ácido ribonucleico ribossómico, do inglês *Ribosomal ribonucleic acid*

SEM – Microscopia eletrónica de varrimento, do inglês *Scanning electron microscopy*

SRB – Bactérias redutoras de sulfato, do inglês *Sulfate-reducing bacteria*

ssDNA - DNA de cadeia simples, do inglês *Single-stranded DNA*

T - Timina

Taq - Polimerase termoestável isolada a partir de uma bactéria termofílica *Thermus aquaticus*

TE - Tampão de extração

TRITC - Isotiocianato de tetrametilrodamina, do inglês *tetramethylrhodamine isothiocyanate*

UNESCO - Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura

UV - Ultravioleta, do inglês *Ultravioleta*

XRD - Difração de raios-X, do inglês *X-ray diffraction*

WME – *Wood Moisture Equivalent*

Unidades de medida

% - Percentagem

cm, mm, nm – Centímetro, milímetro, nanómetro

eV – Elétron-volt

g - Aceleração gravítica

g, mg - Grama, miligrama

h, min, s - Horas, minutos, segundos

L, mL, μ L - Litros, mililitros, microlitros

M, mM - Molar, milimolar

mA, pA – Miliampere, picoampere

°C - Graus Celsius

R – Refletância

rpm - Rotações por minuto

UFC - Unidades formadoras de colónias

V, kV – Volts, kilovolt

λ – Comprimento de onda

Publicações relacionadas

Silva, I.; Salvador, C.; Miller, A.Z.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. Addressing Biodeterioration at UNESCO Stone Monuments: Tomar Convent and Batalha Monastery. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2025**, 205, 106188, doi:10.1016/j.ibiod.2025.106188.

Dias, L.; Gil, M.; Silva, I.; Candeias, A.; Caldeira, A.T.. Assessment of microbial communities affecting Almada Negreiros' mural paintings at a Maritime Station in Lisbon. *npj Herit. Sci.* **2025**, 13, 67, doi: 10.1038/s40494-025-01656-4.

Silva, I.; Salvador, C.; Arantes, S.; Miller, A.Z.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. The Decorated Garden Grotto of Condes de Basto Palace in Évora, Portugal: Microbial Community Characterization and Biocide Tests for Conservation. *Micro* **2024**, 4, 117–131, doi:10.3390/micro4010008.

Silva, I.; Dias, L.; Salvador, C.; Miller, A.Z.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. Microbial Induced Stone Discoloration in Alcobaça Monastery: A Comprehensive Study. *J. Cult. Herit.* **2024**, 67, 248–257, doi:10.1016/j.culher.2024.03.011.

Silva, I.; Salvador, C.; Miller, A.Z.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. The Role of Bacteria in Pink Stone Discoloration: Insights from Batalha Monastery. *Micro* **2024**, 4 (4), 778-797, doi: 10.3390/micro4040048.

Sequeira, S.; Pasnak, E.; Viegas, C.; Gomes, B.; Dias, M.; Cervantes, R.; Pena, P.; Twarużek, M.; Kosicki, R.; Viegas, S.; Caetano, L.A.; Penetra, M.J.; Silva, I.; Caldeira, A.T.; Pinheiro, C. Microbial Assessment in a Rare Norwegian Book Collection: A One Health Approach to Cultural Heritage. *Microorganisms* **2024**, 12, 1215, doi:10.3390/microorganisms12061215.

Caldeira, A.T.; Silva, I.; Salvador, S.; Arantes, S. Estudo das Comunidades Microbianas presentes na Casa de Fresco pp 76-90 / Study of Microbial Communities Present in Casa de Fresco, pp 166-170 (English version) **2023**, In A Casa de Fresco do Paço de São Miguel: A Ciência ao Serviço da Arte, Fundação Eugénio de Almeida (eds), Évora, Portugal, ISBN: 978-989-53620-2-8 (**capítulo de livro**)

Bastos-amador, P., Leclerc, E., Torres, J., Teresa Caldeira, A., Silva, I., Salvador, C., Assunção, R., Alvito, P., & Ferreira, M. Maternal dietary exposure to mycotoxin aflatoxin B1 promotes intestinal immune alterations and microbiota modifications increasing infection susceptibility in mouse offspring. *Food and Chemical Toxicology Journal* **2023**, 173, 113–596, doi: 10.1016/j.fct.2022.113596.

Nota Introdutória



Nota Introdutória

O Património Cultural representa um elo vital entre o passado e o presente. Por ser único e insubstituível, a sua preservação é uma prioridade essencial para garantir a continuidade para as gerações futuras. Este património abrange uma ampla variedade de materiais e tipologias – desde monumentos em pedra a objetos em madeira, fotografias, filmes, livros e pinturas – todos vulneráveis a processos de degradação.

Além dos fatores de deterioração intrínsecos, estes objetos enfrentam uma constante exposição a agentes abióticos (como a radiação ultravioleta (UV), temperatura e humidade) e bióticos, com destaque para os microrganismos. Estes últimos estão na origem de processos de biodeterioração, podendo vir a causar alterações estéticas e estruturais provocadas pelo crescimento e atividade metabólica de comunidades microbianas. Estes processos podem comprometer gravemente a integridade dos materiais patrimoniais.

A identificação dos agentes microbianos envolvidos, e dos mecanismos bioquímicos de degradação que mobilizam, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e conservação. Atualmente, os estudos metagenómicos podem ser aplicados para estimar a contaminação microbiana desses objetos, na tentativa de compreender os fenómenos de degradação, destacar as propriedades funcionais dos microrganismos e o seu papel nos mecanismos biológicos e, por outro lado, utilizar a informação obtida para implementar estratégias de mitigação e controlo, através do desenvolvimento de medidas de proteção adequadas.

Este estudo centra-se na compreensão das interações entre a materialidade dos objetos patrimoniais, as condições ambientais em que se inserem e os processos de colonização microbiana, com especial atenção ao papel das comunidades microbianas na biodeterioração dos materiais.

A investigação teve como base casos de estudo selecionados no âmbito do Património edificado e móvel, permitindo explorar diferentes contextos materiais, ambientais e históricos. Recorreu-se a uma abordagem multidisciplinar que integrou metodologias analíticas não invasivas para a caracterização dos substratos com técnicas genómicas de alta resolução e marcadores bioquímicos, visando a identificação das comunidades microbianas e a compreensão dos mecanismos de biodeterioração. Esta conjugação de métodos permitiu aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos de degradação biológica em contexto patrimonial.

O trabalho desenvolveu-se em torno de cinco eixos principais: levantamento do estado atual do conhecimento sobre biodeterioração microbiana; seleção dos objetos patrimoniais a estudar; identificação dos microrganismos presentes nos materiais colonizados; caracterização dos processos de biodeterioração observados; e realização de ensaios laboratoriais de colonização em condições controladas.

A estrutura do estudo assentou em várias linhas de ação complementares, essenciais para aprofundar a compreensão dos fenómenos analisados:

- ✓ Levantamento do estado atual do conhecimento relativo à biodeterioração dos materiais colonizados por microrganismos;
- ✓ Seleção dos objetos patrimoniais biodeteriorados;
- ✓ Caracterização dos agentes biodeteriogénicos mediante técnicas de sequenciação massiva;
- ✓ Cultura e seleção de microrganismos a utilizar para ensaios de colonização em laboratório;
- ✓ Caracterização física, química e mineralógica dos substratos selecionados;
- ✓ Inoculação e incubação das amostras com os microrganismos em condições controladas;
- ✓ Análise do desenvolvimento dos microrganismos nas amostras colonizadas em laboratório;
- ✓ Avaliação dos parâmetros ambientais e propriedades intrínsecas dos materiais que influenciam o desenvolvimento dos microrganismos nas amostras;
- ✓ Avaliação dos processos de alteração dos substratos causados pelo desenvolvimento dos microrganismos nas amostras;
- ✓ Desenvolvimento de um banco de dados/biblioteca das populações microbianas presentes.

A tese encontra-se estruturada em sete capítulos. O Capítulo 1 estabelece o enquadramento teórico, reunindo o estado da arte sobre a biodeterioração do Património Cultural, com particular foco nos microrganismos envolvidos, nos mecanismos e principais danos por eles causados, bem como as principais técnicas utilizadas neste trabalho.

Segue-se, no Capítulo 2, uma abordagem mais centrada em pintura de cavalete antiga, onde se exploram três casos de estudo, com pinturas de reserva e de exposição

de museus e galerias, e se estudam os principais mecanismos de degradação biológica neste tipo de suporte. O Capítulo 3 apresenta um estudo realizado na Casa de Fresco do Palácio Condes de Basto, em Évora, e inclui a caracterização da comunidade microbiana presente no local e a avaliação de tratamentos antimicrobianos com potencial aplicação conservativa. A investigação prossegue, no Capítulo 4, com a análise da biodeterioração em monumentos de pedra classificados como Património Mundial da UNESCO (Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura), procurando identificar a causa de contaminações por bactérias, fungos e líquenes e padrões de colonização biológica.

Complementando essa abordagem, o Capítulo 5 descreve ensaios experimentais de simulação realizados em laboratório, cujo objetivo é mimetizar as condições reais, estudando o comportamento de microrganismos *in-situ* e *in-vitro* e visando testar e validar diferentes tratamentos.

Para integrar os diversos dados obtidos ao longo da investigação, o Capítulo 6 apresenta uma análise comparativa entre os diferentes casos de estudo, permitindo uma reflexão crítica sobre os microrganismos com potencial deteriógeno e os substratos que colonizam.

Por último, o Capítulo 7 propõe uma síntese dos principais resultados, destacando o seu contributo para a área da conservação e sugerindo direções futuras de investigação.

Capítulo 1

Estado da Arte: Biodeterioração microbiana no Património Cultural



Capítulo 1 – Estado da arte

1.1. Biodeterioração microbiana no Património Cultural

O Património Cultural é constituído por quase todo o tipo de materiais produzidos pela natureza, e utilizados pelo homem para construir vários tipos de artefactos desde monocomponentes muito simples até estruturas complexas, integrando matérias orgânicas e inorgânicas. O interesse em preservar e herdar o valor cultural para as gerações futuras acompanha a humanidade desde a antiguidade. Atualmente, entende-se que o Património Cultural se refere a múltiplos aspetos com implicações a vários níveis. Pode ser definido como “uma expressão dos modos de vida desenvolvidos por uma comunidade e transmitidos de geração em geração, incluindo costumes, práticas, lugares, objetos, expressões artísticas e valores” [1].

O Património Cultural “tangível” ou físico, está em constante estado de transformação química e equilíbrio com as condições ambientais circundantes, e processos bioquímicos seletivos aceleram a transformação química dos materiais subjacentes devido à colonização por microrganismos. Inúmeros grupos microbianos seletivos realizam importantes reações de transformação bioquímica com elevada especificidade, regulada por genes relevantes e as enzimas/proteínas correspondentes [2]. Por outras palavras, os objetos culturais, mesmo sendo feitos de materiais altamente resistentes, são influenciados por parâmetros ambientais e microbiológicos, que podem modificar a sua estrutura e composição [1,3].

Assim, a **biodeterioração** é o resultado de interações entre organismos vivos, suporte material e condições ambientais, particularmente definida por Hueck (2001) como “qualquer modificação indesejada nas propriedades de um determinado material pela atividade vital de organismos microbianos” [1,4–6]. A atividade biológica de microrganismos, particularmente bactérias, cianobactérias, archaea, fungos, microalgas e líquenes, contribui para a deterioração dos bens culturais, sendo esse processo promovido pelo próprio microrganismo de forma direta, utilizando o material do substrato como nutriente ou de forma indireta, pelos metabolitos produzidos por ele, causando *stress* físico ou fornecendo compostos para reações químicas secundárias. A exposição dos materiais patrimoniais ao ar livre agrava frequentemente esta vulnerabilidade, devido às flutuações constantes das condições ambientais e, por vezes, à ausência de estratégias de manutenção preventiva eficazes [4,7–10].

Vários tipos de micro e macro organismos encontram frequentemente um habitat adequado para o seu crescimento, seja em artefactos culturais (materiais orgânicos ou inorgânicos, históricos ou modernos, objetos de arte - feitos de diferentes tipos de material como papel, tecidos, vidro, madeira, metal, têxteis, cerâmica, plástico - e edifícios históricos, pinturas, cerâmicas, livros e manuscritos etc.) e em ambientes internos (museus públicos, coleções particulares de arte, igrejas, grutas e catacumbas), bem como em ambientes externos (monumentos de pedra, superfícies arquitetónicas) tendo isso um efeito direto na sua conservação [10–12]. A biodeterioração causada por microrganismos não só resulta na perda irreversível e irreparável da força física dos materiais, aparência estética, valor e informação mas também pode culminar, ocasionalmente, na destruição da integridade estrutural do valioso bem patrimonial [13]. Considerando o carácter único e insubstituível do Património Cultural, os danos causados pela degradação microbiana representam uma perda cultural e, frequentemente, monetária, de difícil quantificação [2,4,14].

Esta degradação microbiana é complexa e derivada da atividade metabólica dos vários microrganismos envolvidos e pode ser classificada como: (i) física ou mecânica, que ocorre quando os microrganismos causam microrroturas, perda de coesão e desagregação ou deformação do substrato, por crescimento ou movimento; (ii) estética, como resultado da libertação de pigmentos microbianos que conduzem à alteração da cor do material ou no que diz respeito à presença de camadas superficiais formadas por conjuntos de microrganismos – biofilmes; (iii) assimilatória bioquímica, quando os microrganismos utilizam diretamente o material histórico como fonte de nutrientes, através de produtos de atividade enzimática, para crescimento e produção de energia, e (iv) dissimilatória bioquímica, em que o material é afetado por danos químicos, devido à segregação de ácidos e produtos residuais pelos microrganismos, redução de alcalinidade ou processos enzimáticos que podem interferir e danificar o próprio material, cujos danos são frequentemente irreversíveis [12,15–17].

Estas diferentes formas de ataque manifestam-se frequentemente de forma combinada, resultando nos danos visíveis e estruturais observados em monumentos e obras de arte. Entre os mais comuns incluem-se a formação de biofilmes, o aparecimento de fissuras, o colapso ou desprendimento de material, a acidificação e corrosão, a formação de crostas (por vezes biomineralizadas - bioincrustação) e as já mencionadas descolorações ou manchas [3,8].

Por outro lado, a totalidade das propriedades ou características de um material que controla a sua probabilidade de ser colonizado por um ou mais grupos de

microrganismos vivos é chamada de biorreceptividade [18]. A intensidade da biodeterioração que os microrganismos provocam é determinado por fatores como (i) tipo e dimensão do microrganismo envolvido; (ii) composição química e a natureza do próprio material, a sua porosidade, dureza, permeabilidade, pH e estado de conservação; (iii) exposição do objeto às várias condições ambientais, nomeadamente luminosidade, humidade e temperatura, sendo que áreas com clima quente e húmido proporcionam condições ambientais favoráveis para o crescimento da maioria dos organismos; (iv) nível e tipos de poluentes atmosféricos, salinidade, vento, chuva e regime hídrico; (v) localização geográfica e projeto arquitetónico dos monumentos ou esculturas; (vi) parâmetros microclimáticos específicos (por exemplo, orientação, exposição à sombra, humidade capilar permanente, etc.); (vii) frequência da manutenção feita nos monumentos e obras de arte [4,10,19–21].

A compreensão integrada destes fatores é essencial para avaliar o risco de biodeterioração e para definir estratégias de conservação e intervenção adequadas.

1.1.1. Principais mecanismos de biodeterioração

Para compreender em profundidade como se manifesta a deterioração no património, é fundamental conhecer os mecanismos específicos que a impulsionam, pois este conhecimento é essencial para o diagnóstico e posterior intervenção correta. Estes mecanismos de deterioração explicam as vias pelas quais os materiais se alteram e perdem as suas características originais através da atividade microbiana. Serão, por isso, detalhados nos subpontos seguintes os principais mecanismos identificados nos casos de estudo que compõe esta tese.

1.1.1.1. Formação de biofilmes

Devido à crescente conscientização sobre a importância da preservação do Património Cultural nos últimos anos, os biofilmes microbianos, que crescem por exemplo nas superfícies expostas dos monumentos, têm sido intensamente estudados nas últimas décadas, estando geralmente associados à atividade conjunta de vários tipos de microrganismos [22].

O **desenvolvimento de biofilmes**, descritos como coleções de células microbianas e substâncias poliméricas extracelulares (EPS - *extracellular polymeric substances*; como polissacáridos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, pigmentos e enzimas), aderidas a uma superfície sólida, amplificam significativamente os processos de biodeterioração de diversos materiais, ao mesmo tempo que conferem maior resistência a compostos biocidas [2,23].



Figura 1.1: Estágios de formação dos biofilmes microbianos

A formação do biofilme ocorre em quatro fases, como esquematizado na Figura 1.1: (i) fixação microbiana à superfície; (ii) formação de micro-colónias; (iii) desenvolvimento inicial e maturação do biofilme e (iv) dispersão das células no ambiente circundante para, finalmente, retornar ao estado planctónico [20].

A colonização dos microrganismos à superfície é favorecida por certas condições ambientais como poluentes do ar, componentes do solo, infiltração de água e matéria orgânica e inorgânica etc. Estas condições favorecem a adesão de colonizadores autotróficos (cianobactérias e algas), cuja fixação inicial é reversível e ocorre com a ajuda da motilidade e das forças físico-químicas dos microrganismos. Após os primeiros colonizadores primários, ocorre a colonização secundária com o auxílio de microrganismos heterotróficos (bactérias e fungos). Esses microrganismos, que necessitam de compostos orgânicos complexos para crescer, utilizam para esse efeito, produtos ou resíduos libertados e deixados pelos primeiros colonizadores. Com a ajuda de EPS ou matéria orgânica, ocorre a co-adesão de células, para formar micro-colónias, constituindo esta, a ligação irreversível entre os microrganismos, a segunda fase de formação dos biofilmes [5,23]. Esta fase é realizada através da hidrofobicidade da superfície celular bacteriana, ligações de hidrogénio, ligações covalentes, ligações iónicas e interações dipolo-dipolo [24].

A síntese de células bacterianas e a segregação de EPS é o terceiro estágio de formação dos biofilmes. O substrato de EPS é hidrofóbico e forma pontes iónicas, o que possibilita a condensação bacteriana e adesão do biofilme. Assim, a função dos EPS - constituídos principalmente por polissacáridos, proteínas, DNA (*deoxyribonucleic acid*) e também pigmentos, lípidos, restos de células mortas, água e partículas transportadas

pelo ar – é facilitar a fixação das células a uma superfície sólida, constituindo o estágio crítico que leva ao estabelecimento de um biofilme estável. Permite a adesão celular, aprisionamento de partículas transportadas pelo ar, produção de pigmentos, iões metálicos, minerais e compostos orgânicos e contribui para a descoloração de monumentos, bem como para a perda de propriedades de coesão da pedra [20]. Para além disso, pode afetar o reconhecimento mútuo entre células, o sistema de transdução de sinal, a aquisição de nutrientes, a manutenção celular e a troca de informações genéticas, desempenhando um papel crucial em vários aspetos [24].

A dispersão é a etapa final do desenvolvimento de um biofilme. À medida que o biofilme amadurece, a sua estrutura pode enfraquecer ou sofrer alterações, levando à libertação de microrganismos. Estes, por sua vez, podem colonizar áreas vizinhas e dar origem a novos biofilmes, contribuindo para a sua propagação e persistência no ambiente [24].

Ou seja, os biofilmes microbianos podem causar vários danos nas superfícies dos vários materiais, incluindo: *(i)* pigmentação causada por pigmentos libertados ou contidos nos microrganismos (ação estética); *(ii)* biocorrosão do suporte mineral por processos de corrosão acidolítica e oxidorreductiva gerados por produtos do metabolismo microbiano (ação bioquímica) e *(iii)* danos físicos causado pela pressão mecânica exercida pela biomassa microbiana durante o seu crescimento (ação física) [22,25]. Por exemplo, em substratos pétreos, a formação de biofilmes intensifica o ataque microbiano pelo enfraquecimento da rede mineral através de repetidos ciclos de humidade e secagem, e subsequente expansão e contração, podendo alterar o tamanho dos poros, densidade, teor da água, dureza superficial e peso da pedra. A água é prontamente absorvida pelo biofilme e não evapora tão rapidamente quanto em superfícies rochosas que não contenham biofilmes. Esta água pode facilitar reações químicas que levam ao processo de degradação da pedra, o que em condições secas não aconteceria. Os biofilmes têm uma condutividade térmica mais baixa do que a pedra, o que pode levar a uma transferência de calor desigual dentro do substrato [26,27].

Os microrganismos que têm capacidade de formar este tipo de estruturas, extremamente difíceis de erradicar, apresentam adaptações de atividade xerofílica, halofílica ou celulolítica, que lhes permitem que eles cresçam e preservem a atividade nos objetos históricos, levando a alterações estruturais [8,9].

Possivelmente o fator mais importante para a persistência dos biofilmes nos vários substratos é a sua natureza protetora. As células microbianas geralmente preferem

existir na forma de biofilme, pois isso permite-lhes sobreviver melhor em condições ambientais adversas - como dessecação, temperaturas extremas, *stress* osmótico, radiação UV e produtos químicos tóxicos - e onde a interação dos microrganismos entre si é facilitada através de um processo chamado *quorum sensing* - comunicação célula-célula. Existe uma cooperação metabólica nos biofilmes que não está presente quando estão em estado planctónico, ou seja, a associação simbiótica dentro do biofilme garante esforços coordenados na degradação do substrato, que organismos individuais seriam incapazes de alcançar [5,20,26,28].

Por exemplo, as cianobactérias formam biofilmes como defesa contra mudanças ambientais, incluindo elevadas temperaturas, secas e exposição prolongada à luz. Proliferam facilmente na pedra, formando pátinas e incrustações coloridas devido à sua natureza fototrófica e à pequena quantidade de nutrientes de que necessitam para crescer (dióxido de carbono, água e alguns sais inorgânicos). Possuem também a capacidade de extrair e mobilizar iões, como cálcio e potássio, presentes em obras de arte, utilizando-os para facilitar o seu desenvolvimento [13].

De forma sintetizada, o aumento da capacidade de colonização dos microrganismos, devido à resistência proporcionada pelos biofilmes, é causado principalmente: (i) pelo EPS, que constituindo uma barreira física, permite somente a penetração lenta ou incompleta das substâncias antimicrobianas e dificulta o seu contacto com as células microbianas; e (ii) pelo facto de as células dentro de um biofilme terem tendência a permanecer em fase estacionária e, portanto, o seu metabolismo não é altamente ativo. Os biocidas e outras substâncias antimicrobianas tendem a interromper os processos microbianos e, portanto, precisam de alguma atividade metabólica para serem eficazes; assim, organismos em fase estacionária são, portanto, menos suscetíveis a esses compostos [26].

1.1.1.2. Alteração de cor

A alteração de cor é uma das manifestações mais visíveis e esteticamente impactantes da biodeterioração no Património Cultural. Este fenómeno resulta diretamente da presença e atividade de microrganismos colonizadores, que produzem ou contêm uma variedade de pigmentos – como melaninas, carotenóides e compostos fotossintéticos – capazes de modificar significativamente a aparência original das superfícies, incluindo a de obras de arte policromadas [26].

As diferentes cores observadas em monumentos e edifícios afetados pela biodeterioração raramente é uniforme. Pelo contrário, está intimamente ligada a uma interação complexa de fatores: aos tipos de materiais, localização geográfica, dinâmicas de desenvolvimento da comunidade microbiana, variações sazonais e as condições ambientais gerais. As diferenças na aparência da cor são, em grande parte, resultado dos diferentes grupos microbianos, em diferentes fases do seu crescimento fisiológico e desenvolvimento, no tipo específico de material que colonizam. Os monumentos do Patrimônio Cultural e os edifícios históricos apresentam, frequentemente, cores diferentes por microrganismos e também plantas visíveis em condições naturais. Por exemplo, comunidades de cianobactérias podem exibir uma evolução na intensidade da sua cor verde, passando de tons claros a brilhantes e, eventualmente, a escuros, à medida que a biomassa amadurece e se acumula [28].

A pigmentação das superfícies dos materiais, resultante da deposição de pigmentos biogênicos pode ser subdividida em (i) manchas pretas (frequentemente associadas à produção de melanina e melanoidinas, podendo também resultar da acumulação de produtos de degradação da clorofila ou da biomineralização de óxidos de ferro e manganês), (ii) manchas verdes e esverdeadas (assinatura típica de organismos fotossintéticos, como algas e cianobactérias), (iii) manchas amarelo-laranja-acastanhadas (tonalidade associada à presença de carotenos e carotenóides e produtos de degradação da clorofila, como ficobiliproteínas), bem como (iv) manchas laranja brilhante, rosa e vermelhas derivadas de pigmentos de bactérias quimioorganotróficas (halofílicas) e produtos de degradação de cianobactérias e algas com enriquecimento de ferro [29].

De entre estes compostos, os **carotenóides** têm sido recentemente alvo de maior atenção no contexto da biodeterioração de bens culturais. São pigmentos lipossolúveis responsáveis por muitas das cores vibrantes (amarelos, laranjas, vermelhos) observadas a olho nu e desempenham funções cruciais para a sobrevivência dos microrganismos que os produzem, especialmente bactérias [30].

Os carotenóides na natureza são tipicamente tetraterpenóides C40, que são formados por oito unidades isoprenóides C5 unidas cabeça a cauda, com uma ligação cauda-a-cauda no centro, resultando numa estrutura simétrica. São compostos por uma cadeia central, que se alterna sequencialmente entre ligações duplas e simples, conferindo a estas moléculas as capacidades antioxidantes e as qualidades de absorção de luz responsáveis pelas suas cores. Os carotenóides podem ser acíclicos ou apresentar um anel em uma ou ambas as extremidades da molécula e podem ser

divididos em duas classes: carotenos e xantofilas. Os carotenos (por exemplo β -caroteno e licopeno) são constituídos puramente por hidrocarbonetos, enquanto as xantofilas (por exemplo astaxantina, zeaxantina e β -criptoxantina) também possuem oxigênio na sua constituição [31].

Para além da coloração, atuam como fotoprotetores contra danos induzidos pela luz, como antioxidantes que neutralizam espécies reativas de oxigênio (ROS), e contribuem para a estabilização das membranas celulares. Esta estabilização é vital para regular a fluidez da membrana e a transferência de nutrientes, permitindo a adaptação a condições ambientais desfavoráveis como temperaturas extremas, hipersalinidade ou radiação ionizante [32–35].

No entanto, é fundamental reconhecer que este não é apenas um problema estético. A alteração da cor da superfície modifica as suas propriedades térmicas, nomeadamente a sua capacidade de absorver radiação solar. Áreas escurecidas por pigmentos biológicos tendem a absorver mais energia do que as áreas circundantes mais claras, resultando num aquecimento diferencial significativo – diferenças de temperatura que podem atingir vários graus Celsius (como os 8°C já medidos em pedra, em estudos realizados por outros autores) [26]. Estes gradientes térmicos induzem tensões mecânicas no material devido aos ciclos repetidos de expansão e contração. Este *stress* físico, embora subtil a curto prazo, pode contribuir cumulativamente para o enfraquecimento do material, o desenvolvimento de microfissuras e a aceleração da sua desagregação física a longo prazo.

Deste modo, o fenómeno de pigmentação no Património Cultural, embora muitas vezes percebido inicialmente como uma questão visual, possui implicações que vão além da estética. Ele é um indicador da atividade biológica e, simultaneamente, pode atuar como um fator que agrava a deterioração física do material. Compreender as causas e as consequências destas alterações de cor é, por isso, essencial para um diagnóstico completo e para a definição de estratégias de conservação eficazes.

1.1.1.3. Formação de eflorescências salinas

O fenómeno de deterioração induzido por sais, frequentemente designado por "*salting*", ou manifestando-se como eflorescências/subflorescências, é amplamente reconhecido como um dos processos mais prejudiciais e ubíquos que afetam a conservação de materiais porosos no Património, particularmente a pedra. A sua origem reside nas transições de fase (dissolução/precipitação e hidratação/desidratação) que

os sais solúveis, de proveniência natural ou antropogénica, sofrem dentro do sistema poroso do material em resposta a flutuações nas condições ambientais, principalmente de humidade e temperatura.

O mecanismo fundamental de dano é de natureza predominantemente física. Ciclos repetidos de cristalização de sais a partir de soluções supersaturadas (durante a evaporação da água) ou de hidratação de sais anidros (quando a humidade aumenta) geram pressões mecânicas consideráveis dentro dos espaços confinados dos poros. Estas tensões internas, quando excedem a resistência coesiva do material, levam progressivamente ao enfraquecimento, microfissuração, desagregação granular, formação de bolhas, descamação e, eventualmente, à perda significativa de material e destacamentos da superfície.

Embora a presença de sais possa derivar de fontes ambientais (maresia, solo) ou dos próprios materiais de construção e intervenções anteriores, a atividade microbiana pode também desempenhar um papel significativo neste processo, estabelecendo uma interação complexa e muitas vezes sinérgica com os sais [36]. Microrganismos, especialmente aqueles que formam biofilmes, podem produzir ácidos orgânicos (e por vezes inorgânicos) como subprodutos do seu metabolismo. Estes ácidos reagem com os minerais constituintes do substrato (por exemplo, carbonatos na pedra calcária), libertando cations que se podem combinar com anions presentes (sulfatos, nitratos - frequentemente de origem biológica ou poluição) para formar novos sais solúveis. Estes sais biogénicos podem então migrar com a água através da rede porosa e cristalizar à superfície (eflorescência) ou logo abaixo dela (subflorescência), contribuindo para os ciclos de pressão [37].

Além disso, as próprias eflorescências salinas criam ambientes hipersalinos que selecionam e favorecem o crescimento de microrganismos especializados: os halotolerantes e os halófilos [38]. Estes organismos não só conseguem sobreviver, como prosperam nestas condições extremas. A sua presença pode contribuir para a retenção de humidade na superfície, prolongando os períodos em que os sais estão dissolvidos e podem migrar ou sofrer transições de fase. Alguns podem igualmente produzir pigmentos (como carotenóides), levando a descolorações adicionais da superfície, como as manchas rosadas frequentemente observadas em monumentos afetados por sais e colonizados por bactérias halofílicas (exemplos incluem géneros como *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Paenibacillus* e *Arthrobacter*). A sua própria biomassa e produtos metabólicos podem interagir quimicamente com o substrato ou com os sais [20,26].

Em suma, a deterioração por sais é um processo complexo e multifatorial que ameaça gravemente a integridade do Património construído. Resulta primariamente de *stresses* físicos gerados por ciclos de cristalização e hidratação salina, impulsionados por variações ambientais. Contudo, a atividade microbiana interage de forma significativa com este processo, podendo contribuir para a formação de sais, criar microambientes para organismos halofílicos que causam alterações estéticas e, potencialmente, agravar os ciclos de humidade e os danos resultantes. Compreender como os sais, as condições ambientais, as características do material e a atividade biológica interagem é fundamental para diagnosticar corretamente os danos e definir estratégias de conservação e dessalinização eficazes.

1.1.1.4. Biocorrosão

A biocorrosão refere-se aos processos de deterioração química associados à atividade metabólica de microrganismos, que afetam uma grande variedade de materiais, desde metais a não-metals como pedra, betão, madeira e plástico, sendo a sua ocorrência em materiais pétreos especialmente relevante, em contexto patrimonial [39]. Este fenómeno complexo resulta frequentemente de interações sinérgicas entre as superfícies do material, eventuais produtos de corrosão abiótica preexistentes, as próprias células microbianas (frequentemente organizadas em biofilmes) e os seus metabolitos excretados [23]. Os principais mecanismos através dos quais os microrganismos promovem a biocorrosão envolvem a produção de substâncias quimicamente agressivas ou a alteração das condições químicas na interface material-microrganismo.

Um dos principais mecanismos de biocorrosão é a acidólise, na qual ocorre o ataque químico por ácidos inorgânicos biogénicos. Este processo está fortemente associado à atividade de bactérias quimiolitotróficas, como as nitrificantes (*Nitrosomonas*, *Nitrobacter*) e as oxidantes de enxofre (*Thiobacillus*). Estes microrganismos obtêm energia oxidando compostos inorgânicos (amónia, nitrito, compostos reduzidos de enxofre) e, como consequência disso, produzem ácidos fortes como o ácido nítrico (HNO_3) e o ácido sulfúrico (H_2SO_4) [40]. Estes ácidos reagem vigorosamente com componentes minerais sensíveis a ácidos, como os carbonatos (presentes em calcários, mármore, argamassas), causando a sua dissolução e a formação de sais mais solúveis, como nitratos e sulfatos. A presença de poluentes atmosféricos como óxidos de azoto e dióxido de enxofre pode, aliás, fornecer os

substratos ou nutrientes necessários para a proliferação destes microrganismos acidogênicos, exacerbando o processo [13,20].

Outro mecanismo fundamental é a complexólise, que envolve a ação de ácidos orgânicos e outras moléculas quelantes (ou ligandos) produzidas por uma vasta gama de microrganismos, incluindo fungos, líquenes e muitas bactérias heterotróficas [41]. Compostos como o ácido oxálico, cítrico, glucônico, láctico, acético, fumárico, entre outros, são excretados e atuam de duas formas principais: (i) como ácidos, contribuindo também para a dissolução de minerais (acidólise orgânica), e (ii) como agentes quelantes, que têm a capacidade de se ligar fortemente a cátions metálicos (como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+}) presentes na estrutura mineral do material. Este processo de quelação "sequestra" os cátions, destabilizando a rede cristalina e promovendo a sua extração e solubilização, mesmo em condições de pH neutro ou ligeiramente alcalino [13,20].

A produção destes ácidos e quelantes tem consequências diretas e indiretas. A nível químico, leva à **dissolução progressiva do material**, alterando a sua composição e textura superficial. A nível estético, pode causar **manchas e formação de crostas**, como as películas de oxalato de cálcio (resultantes da reação do ácido oxálico produzido por líquenes e fungos com o carbonato de cálcio da pedra), que podem adquirir tonalidades verdes ou castanhas com o tempo. A nível estrutural, a perda de minerais essenciais e a alteração da química dos poros podem **enfraquecer a matriz do material**. Por exemplo, a reação de ácidos como o láctico e o acético com o hidróxido de cálcio (presente em argamassas de cal) forma sais de cálcio solúveis que são facilmente lixiviados pela água, levando à perda de ligante, diminuição do pH nos poros e eventual desintegração. Além disso, os sais solúveis formados por ambos os processos (acidólise inorgânica e orgânica), como sulfatos, nitratos e alguns oxalatos, podem posteriormente cristalizar dentro dos poros, gerando as **pressões físicas** associadas à deterioração por sais (discutida anteriormente), criando assim um ciclo vicioso de degradação químico-física [13,20].

Neste sentido, a biocorrosão representa uma via importante de degradação química do Património, impulsionada pela diversidade metabólica dos microrganismos. Através da produção de ácidos inorgânicos, orgânicos e agentes quelantes, os microrganismos são capazes de dissolver, alterar e extrair componentes minerais essenciais dos materiais, comprometendo não só a sua aparência estética, mas também a sua integridade estrutural a longo prazo.

1.1.1.5. Penetração física de microrganismos

Para além dos processos de deterioração química, os microrganismos colonizadores podem provocar danos significativos ao Património através de mecanismos simplesmente físicos ou biomecânicos. A principal via para este tipo de dano é a intrusão e penetração de estruturas biológicas nos poros, fissuras e linhas de fraqueza dos materiais, nomeadamente a pedra, mas também outros constituintes de bens culturais.

Os fungos, em particular, utilizam frequentemente esta estratégia, combinando ferramentas físicas e químicas para penetrar nos materiais sólidos [42]. O seu crescimento na forma de micélio permite que explorem pontos de fraqueza na superfície da rocha ou dos grãos. As hifas possuem tigmotropismo (orientação pelo contacto), seguindo contornos como riscos, saliências, sulcos e pequenas fissuras, penetrando ativamente em poros e túneis, possivelmente resultantes de meteorização abiótica anterior. Uma vez estabelecidas, elas exercem uma pressão de crescimento bastante forte nas paredes dos espaços em que se instalam, funcionando como uma cunha que alarga progressivamente as descontinuidades, podendo ainda ser responsável pela formação de novas microfissuras [43].

Esta intrusão ao longo dos planos de clivagem ou entre grãos desestabiliza a textura do material, aumenta a porosidade e contribui para a perda de coesão. Além da pressão de crescimento direta, os ciclos de expansão e contração das hifas, devido às variações de humidade (humedecimento/secagem) e temperatura (congelamento/descongelamento), também impõem stress mecânico repetido ao material. Adicionalmente, a formação de minerais secundários induzida pelos fungos dentro das fissuras pode exercer mais pressão, e a incorporação de fragmentos minerais no talo (no caso dos líquenes) também contribui para a desagregação física [44,45].

Um exemplo distinto deste tipo de dano ocorre frequentemente na colonização de rochas calcárias por cianobactérias. Inicialmente, as células fixam-se e crescem dentro de pequenas fissuras preexistentes na superfície da pedra. À medida que a colónia se desenvolve, a absorção de água pelas células e pelas EPS, que frequentemente produzem, leva a uma expansão da biomassa. Esta expansão exerce uma pressão hidrostática e mecânica considerável nas paredes da fissura. Podem ocorrer processos secundários, como a precipitação de carbonatos ou oxalatos causada pela atividade microbiana ao redor das células, mas a pressão física de expansão continua a ser o principal fator. Esta pressão pode alargar a fissura, permitindo a entrada de poeira, pólen

e outros detritos, e criando condições para o estabelecimento secundário de outros microrganismos (bactérias heterotróficas, fungos). O aumento continuado da pressão interna exercida pela biomassa em expansão sobre a camada superficial da pedra pode, em última instância, levar ao seu descolamento (*spalling*) [26].

Portanto, os danos físicos induzidos biologicamente representam uma ameaça relevante para a integridade estrutural do património. Através da pressão exercida pelo crescimento de hifas e rizóides, ou pela expansão higroscópica de colónias inteiras, os microrganismos podem desagregar mecanicamente os materiais, aumentar a sua suscetibilidade a outros agentes de deterioração (como a água e os sais) e acelerar a perda de material. Este tipo de dano biomecânico muitas vezes atua em sinergia com os processos de biocorrosão química, resultando numa degradação global mais rápida e severa dos bens culturais.

1.1.2. Microrganismos envolvidos na biodeterioração

Conhecer detalhadamente a identidade dos microrganismos é crucial, dado que aqueles capazes de degradar o Património têm um papel central nos estudos de preservação. A biodeterioração não é um processo que ocorre de forma homogênea; resulta da atividade de diferentes grupos taxonómicos – como bactérias, fungos, algas ou líquenes – cada um com as suas particularidades fisiológicas e ecológicas. Estas diferenças traduzem-se em mecanismos específicos de cada um deles (produção de ácidos, enzimas, pigmentos, biofilmes, penetração física, etc.) e em distintas manifestações visuais e estruturais no material degradado. Assim, conhecer os vários tipos de microrganismos permite não só compreender a causa específica da patologia observada, mas também inferir sobre as condições ambientais que favorecem a sua proliferação, sendo um passo essencial para um diagnóstico preciso e uma intervenção informada. Os principais grupos de microrganismos que afetam frequentemente o Património serão discutidos nos pontos seguintes.

1.1.2.1. Bactérias

As bactérias representam um grupo microbiano vasto e metabolicamente diverso, desempenhando papéis significativos na biodeterioração de vários substratos. Uma forma útil de compreender as suas diferentes contribuições para a degradação é classificá-las com base nas suas estratégias nutricionais e metabólicas, que ditam onde prosperam e como interagem com os materiais. Podemos distinguir principalmente três

grandes grupos: fotoautotróficos, quimiolitoautotróficos e quimioorganotróficos (ou quimioheterotróficos).

O primeiro conjunto engloba as bactérias autotróficas, capazes de produzir o seu próprio alimento a partir de fontes inorgânicas. O grupo das fotoautotróficas, como as cianobactérias, utilizam a luz como fonte de energia e o CO₂ como fonte de carbono. Por outro lado, as quimiolitoautotróficas obtêm energia da oxidação de compostos inorgânicos reduzidos (como amónia, nitrito ou compostos de enxofre) e usam CO₂ como fonte de carbono. Exemplos incluem as bactérias nitrificantes (*Nitrosomonas*, *Nitrobacter*) e as bactérias oxidantes de enxofre (*Thiobacillus*).

Devido às suas necessidades nutricionais e ecológicas relativamente simples (requerendo frequentemente apenas luz ou compostos inorgânicos, CO₂, água e minerais), estes microrganismos são frequentemente colonizadores primários, desenvolvendo-se facilmente em superfícies expostas de monumentos ao ar livre [17]. A sua atividade pode levar à formação de biofilmes, alterações estéticas (pigmentação) e, no caso dos quimiolitotróficos, à produção de ácidos fortes (nítrico e sulfúrico) que corroem quimicamente os substratos, como argamassas e pedra [23].

O segundo grande grupo é o das bactérias quimioheterotróficas (frequentemente englobadas nos quimioorganotróficos), que necessitam de fontes de carbono orgânico para energia e biomassa. Este grupo inclui uma vasta diversidade de bactérias, como as actinobactérias e géneros como *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Microbacter*. Muitas destas bactérias são saprófitas, decompondo matéria orgânica.

Um subgrupo funcionalmente importante são as bactérias redutoras de sulfato (SRB), que tipicamente utilizam compostos orgânicos simples ou hidrogénio molecular como fonte de energia, enquanto reduzem sulfato a sulfeto em condições anaeróbicas [23].

As bactérias heterotróficas tendem a prevalecer em ambientes onde há acumulação de matéria orgânica ou em condições mais protegidas e estáveis, como ambientes hipógeos (grutas, catacumbas) ou interiores (frescos, pinturas), caracterizados por elevada humidade relativa (> 90%), temperatura constante e baixa luminosidade. As actinobactérias, por exemplo, podem desenvolver-se onde já existe crescimento prévio de algas ou outras bactérias [13]. A sua atividade é crucial na degradação de componentes orgânicos do Património (presentes em pinturas, têxteis, papel, etc.) através da produção de uma vasta gama de enzimas extracelulares, como lipases, proteases e oxidoredutases [17]. Além disso, os produtos do seu metabolismo, como ácidos orgânicos ou o sulfeto produzido pelas SRB, podem causar danos

químicos significativos. As SRB, pela sua capacidade de interagir com iões metálicos e produzir sulfeto corrosivo, são particularmente relacionadas à biocorrosão de metais [23].

Resumidamente, as bactérias contribuem para a biodeterioração do Património através de múltiplos mecanismos, que podem incluir: a formação de biofilmes (que alteram a aparência, retêm humidade e criam microambientes agressivos), a produção de pigmentos (causando manchas), a excreção de ácidos inorgânicos e orgânicos (levando à dissolução e corrosão química), a atividade enzimática (degradando componentes orgânicos) e processos redox (como a redução de sulfato, contribuindo para a corrosão de metais). A predominância de um grupo ou mecanismo dependerá das características do material e, crucialmente, das condições ambientais do local.

1.1.2.2. Cianobactérias e algas

Os microrganismos fototróficos, como as cianobactérias (por exemplo *Gloeocapsa*, *Phormidium*, *Chroococcus*) e algas (por exemplo os géneros *Chlorella*, *Stichococcus* and *Chlorococcum*), são dos grupos de microrganismos que mais se encontram envolvidos na biodeterioração de materiais patrimoniais.

As cianobactérias são um grupo morfológicamente diverso de procaríotas fototróficos, que engloba espécies filamentosas unicelulares e multicelulares, sendo a estrutura celular muito idêntica à das bactérias Gram-negativas, incluindo uma camada de peptidoglicano e uma membrana externa. Graças particularmente à sua capacidade fotossintética, esse grupo de procaríotas transformou a atmosfera da Terra num ambiente de vida complexa, adequado para o metabolismo aeróbico (transição de uma atmosfera redutora de oxigénio para uma oxidante), sendo produtores primários numa ampla gama de habitats terrestres [46]. Podem encontrar-se em água doce e na água do mar, mas também no solo e nas rochas; além disso, são capazes de se desenvolver em ambientes físicos e químicos sob *stress* ambiental, incluindo ecossistemas pobres em nutrientes, hipersalinos, calcificados, dessecados e de elevada irradiância [46,47].

Têm a capacidade de sintetizar os pigmentos clorofila-a e ficobilina e não necessitam de substratos orgânicos para crescer, sendo conhecidos por serem resistentes à radiação solar intensa (incluindo UV) e a temperaturas elevadas, com capacidade de utilizar eficientemente baixa intensidade de luz e capazes de sobreviver a repetidos ciclos de secagem e reidratação. Por causa da sua resistência a ambientes com condições extremas, são provavelmente de maior importância ecológica como organismos pioneiros em superfícies de construção patrimonial do que quaisquer outros

microrganismos, tendo capacidade de colonizar diversos tipos de materiais, causando danos estéticos e indiretamente favorecendo o crescimento de outras espécies, pela sua coexistência (muitas vezes, mas não exclusivamente, na forma de simbiose) com outros organismos aos quais fornecem nitrogénio [17,46,47].

A taxonomia de algas e cianobactérias envolvidas na colonização de superfícies é muito diversa e depende da biorreceptividade ambiental, climática e intrínseca dos materiais [17]. A capacidade de colonizar esses substratos deve-se em parte à produção de polissacáridos exocelulares, permitindo a formação de biofilmes. Desta forma, as cianobactérias podem causar danos estéticos aos materiais constituintes do Património Cultural, caracterizados maioritariamente por uma pigmentação escura nos substratos. Por serem resistentes contra a radiação UV, esses pigmentos permitem a persistência das cianobactérias mesmo em superfícies expostas a elevadas intensidades de luz [47]. Nomeadamente, em condições mais secas, os biofilmes são geralmente de cor cinza, enquanto em áreas mais húmidas são frequentemente verdes. Esse processo é iniciado principalmente pela fixação de esporos e células transportadas pelo ar da atmosfera, onde ocorrem juntamente com partículas de poeira, conhecidas como aeroplâncton [22].

Juntamente com as cianobactérias, as algas estão profundamente envolvidas no fenómeno da biodeterioração, sendo mais evidentes onde a humidade atmosférica é elevada ou a superfície é húmida. Elas formam pigmentos distintos que os tornam diferentes em cores de azul brilhante, azul-esverdeado escuro, preto, verde escuro e claro e vermelho alaranjado [23,48]. A diferença de cor induzida levará principalmente à alteração estética, embora também altere o albedo das superfícies rochosas e, portanto, as propriedades térmicas.

Resumidamente, a colonização dos microrganismos fotossintéticos nos materiais patrimoniais está relacionada à formação de biofilmes, segregação corrosiva de ácidos orgânicos e inorgânicos resultando em (i) deterioração mecânica (devido aos ciclos alternados de encolhimento e distensão do biofilme) indesejável; (ii) coloração inestética dos monumentos (por segregação de ácidos, pigmentos e bioprodutos metabólicos); (iii) alargamento dos poros (devido à penetração de filamentos); (iv) alteração no tamanho dos poros, distribuição e permeabilidade à água dos minerais (por deposição de EPS com propriedades surfactantes) e (v) intemperismo (como consequência da absorção de cálcio, precipitação de sais de cálcio e formação mineral) [13].

1.1.2.3. Fungos

Os fungos são microrganismos omnipresentes e quimioheterotróficos caracterizados pela presença de hifas unicelulares ou multicelulares e têm desempenhado um papel considerável na cultura humana e na evolução da sociedade humana há milhares de anos, essencialmente como saprotróficos, simbiontes mutualistas ou parasitas [49]. São particularmente ativos quando as condições ambientais são adequadas, ou seja, quando as temperaturas rondam 25 a 30°C, humidade relativa a 70-75%, e quando a biorreceptividade do substrato e as suas propriedades físico-químicas são compatíveis com as necessidades de crescimento do fungo [49]. Devido à sua enorme atividade enzimática – produção de celulases, glucanases, lacases, fenolases, queratinases, mono-oxigenases e muitas mais - versatilidade metabólica (maior que todos os outros biodeteriogenos) e capacidade de crescer em baixos valores de atividade da água (a_w), os fungos são capazes de habitar e deteriorar uma ampla variedade de substratos (devido também ao elevado número de esporos microscópicos que produzem de forma assexuada) como pinturas, tecidos, papel, pergaminho, couro, óleo, caseína, cola e outros materiais usados para objetos de arte histórica, sendo reconhecidos como um dos principais agentes causadores de deterioração de edifícios e monumentos patrimoniais [15]. A sua aptidão para suportar condições ambientais extremas, estabelecer associação mutualística com cianobactérias e algas, como líquenes, e adotar várias estratégias estruturais e morfológicas aumenta ainda mais a sua adaptabilidade, aumentando significativamente o seu potencial de biodeterioração [50]. Quando as condições ideais para o seu crescimento não se verificam, os fungos diminuem a sua capacidade degradativa e podem iniciar processos reprodutivos, diferenciar outras estruturas somáticas, ou eventualmente, morrer; se as condições se tornarem favoráveis novamente, o crescimento do fungo começará a partir dos esporos existentes ou de outras estruturas disponíveis no substrato [49].

Os géneros fúngicos predominantes, frequentemente identificados em vários tipos de objetos biodeteriorados do Património Cultural, são *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma*, manifestando uma acentuada predominância do filo Ascomycota [51]. O crescimento destes géneros causa frequentemente deterioração estética severa devido à formação de colónias e pigmentos fúngicos. Por exemplo, alguns fungos produzem pigmentos escuros que lhes conferem proteção contra períodos mais secos, dessecação e enzimas hidrolíticas libertadas por algumas bactérias e artrópodes [23]. Os substratos habitados por esses

fungos aparecem manchados ou mesmo completamente cobertos por camadas pretas devido à forte melanização das paredes celulares desses fungos [15]. Para além das formas microcoloniais, muitas espécies de fungos melânicos podem ser associadas ao ambiente exterior, como rochas e minerais, superfícies pintadas, etc. Além disso, os EPS produzidos por esses microrganismos facilitam a formação de biofilmes fúngicos e a sua fixação, aumentando a pressão mecânica, causando encolhimento e extensão do substrato e levando, conseqüentemente, à formação de fissuras no mesmo [52].

Também a intrusão de hifas fúngicas ao longo do plano cristalino, no interior dos materiais, por alguns fungos, é conhecida por desestabilizar a textura do material, resultando na sua deterioração mecânica [13,23]. Esta penetração fúngica permite simultaneamente o transporte de água e nutrientes através do substrato, facilitando a colonização interna [17]. Outra forma de causarem danos mecânicos resulta da contração e expansão alternadas do talo sob condições de humidade ambiental variável. Alguns fungos endolíticos causam corrosão alveolar ("*biopitting*"), na superfície da pedra, formando pequenos orifícios com cerca de até 2 cm de diâmetro e profundidade [13].

Devido às suas paredes celulares espessas e melanizadas, os fungos resistem ao ataque químico e são dificilmente erradicados por biocidas ou outros tratamentos antimicrobianos. Esta resistência, combinada com a diversidade de danos que podem causar, reforça a sua posição como um dos principais desafios na conservação de bens culturais [50].

1.1.2.4. Líquenes

Os líquenes são uma associação mutualística entre um fungo heterotrófico e uma alga fotossintética (ou uma cianobactéria) que dá origem a estruturas morfológicamente distintas de qualquer um dos seus componentes microbianos, com propriedades fisiológicas distintas e peculiares. O componente fúngico do líquen é chamado de **micobionte** (Ascomycetes, Deuteromycetes e Basidiomycetes), enquanto o organismo capaz de realizar fotossíntese é chamado de **fotobionte**, de que são exemplos os géneros de algas *Trebouxia*, *Asterchloris*, *Trentepohlia* e os géneros de cianobactérias *Nostoc* e *Stigonema*. O membro fotobionte, através da fotossíntese, é responsável pela produção de compostos orgânicos (como açúcares) que servem de alimento essencial para toda a simbiose, sustentando o metabolismo de ambos os parceiros; pode também fornecer outras substâncias vitais, como vitaminas.

Por outro lado, o micobionte desempenha múltiplas funções cruciais. Ele confere a estrutura principal ao líquen (o talo), que serve de suporte e proteção física. É responsável pela absorção de água e de nutrientes minerais essenciais a partir do ambiente ou do substrato onde o líquen se encontra. Além disso, o micobionte protege o fotobionte de condições ambientais potencialmente adversas, como a radiação UV excessiva, a desidratação (criando um microambiente mais húmido) ou a exposição a substâncias tóxicas. Um aspeto distintivo da atividade do micobionte é a produção de uma vasta gama de metabólitos secundários, incluindo os característicos ácidos liquénicos, que desempenham diversas funções, entre as quais se destaca a capacidade de ajudar a solubilizar e a tornar disponíveis os elementos minerais presentes no substrato, facilitando a sua absorção e utilização pela simbiose [53].

Esta eficiente parceria simbiótica, dependente de um parceiro fotossintético para a nutrição carbónica, confere aos líquenes necessidades nutricionais externas muito reduzidas, e por este motivo, são capazes de prosperar em substratos inorgânicos (por exemplo, telhas ou vidro) onde outros microrganismos são incapazes de crescer [5].

Os líquenes são capazes de sobreviver em condições ecológicas extremas, tendo capacidade de se adaptar a temperaturas extremas, secas, inundações, elevada salinidade, elevadas concentrações de poluentes do ar e ambientes pobres em nutrientes ou altamente nitrificados. Essas condições específicas em que os líquenes vivem são a razão para a produção dos metabolitos referidos anteriormente, pois fornecem boa proteção contra várias influências físicas e biológicas negativas [54].

No contexto da biodeterioração do Património, esta resiliência e capacidade de colonização traduzem-se num potencial de degradação significativo, que se manifesta através de mecanismos químicos e físicos. A deterioração química resulta principalmente da excreção dos já mencionados ácidos liquénicos e de outros produtos metabólicos, como o ácido oxálico. Estes compostos podem reagir com os minerais do substrato, causando corrosão, dissolução seletiva de certos componentes, quelação de cationes metálicos (como Ca, Mg, Fe) e a formação de novas fases minerais (por exemplo oxalatos de cálcio), alterando a composição química e a integridade da superfície do material. A deterioração física ou mecânica ocorre através da penetração das hifas fúngicas (do micobionte) nos poros e microfissuras do substrato, especialmente no caso dos líquenes endolíticos, que crescem parcial ou totalmente embebidos no material [55]. Esta penetração física exerce *stress* mecânico, podendo alargar fissuras preexistentes e desagregar os grãos do material. Mesmo os líquenes epilíticos, que crescem predominantemente à superfície [55], exercem pressão através das suas estruturas de

fixação (como rizinas) e pelas repetidas expansões e contrações do talo devido aos ciclos de humedecimento e secagem, o que também contribui para a desagregação superficial.

A forma de crescimento do líquen (por exemplo crustáceo, firmemente aderido e por vezes parcialmente endolítico; foliáceo, com aspeto de folha e fixação mais localizada; ou fruticoso, arbustivo e pendente) influencia o tipo e a intensidade destas interações. Independentemente da forma, a sua presença pode também alterar as propriedades hídricas da superfície, retendo humidade por mais tempo, o que pode favorecer outros processos de degradação [56].

Assim, os líquenes, apesar da sua fascinante biologia simbiótica, são agentes de biodeterioração relevantes nos substratos patrimoniais devido à sua combinação única de autossuficiência nutricional, extrema resistência ambiental e capacidade de interagir química e fisicamente com os substratos que colonizam. A sua ação pioneira e os danos que podem infligir, tanto a nível estético como estrutural, justificam a atenção dedicada ao seu estudo e controlo em estratégias de conservação.

1.1.3. Biodeterioração de Substratos

A análise da degradação patrimonial tem maior especificidade quando aplicada aos materiais constituintes. No âmbito da presente investigação, o foco recai sobre dois substratos de particular relevância: a pedra, enquanto suporte estrutural ou ornamental, e a pintura enquanto elemento de expressão artística/informativa. A escolha destes materiais deve-se à sua centralidade nos casos de estudo analisados nesta tese. Como tal, as subsecções seguintes apresentam uma introdução essencial a cada um destes materiais, abordando as suas características principais, de modo a contextualizar a análise posterior das suas vulnerabilidades e processos de degradação específicos.

1.1.3.1. Pedra

A pedra é um material resistente e de grande valor, que faz parte essencial do Património Cultural construído e esculpido em todo o mundo. Desde a antiguidade, tem sido escolhida para erguer monumentos e obras marcantes, pela sua beleza e pelas suas qualidades naturais. Mas, tal como outros materiais de construção, também a pedra sofre desgaste ao longo do tempo, o que traz grandes desafios à sua conservação e restauro. Quando se degrada, pode ocorrer perda de coesão e consequente diminuição da resistência mecânica, perda de pormenores esculpidos e até alteração

da forma como a obra foi originalmente pensada pelo seu autor. Esta deterioração resulta da interação complexa entre o material e fatores ambientais externos (como poluição atmosférica, ciclos de humidade e temperatura, ação do vento e da chuva) e, de forma muito significativa, pela atividade de microrganismos [57].

A suscetibilidade de uma pedra à colonização biológica não é uniforme, dependendo crucialmente da sua biorreceptividade, um conceito definido por Guillitte (1995) como “a aptidão de um material para ser colonizado por um ou mais grupos de organismos vivos”. Esta propriedade intrínseca é determinada por um conjunto de características petrofísicas e petroquímicas do material, como a rugosidade superficial, a estrutura do espaço poroso (porosidade total, distribuição do tamanho dos poros, conectividade) e a sua composição mineralógica [58]. Juntamente com as condições ambientais, estes fatores ditam o potencial e o tipo de colonização microbiana que ocorrerá. Os principais elementos que influenciam a colonização e biodeterioração de monumentos de pedra incluem, assim:

(i) O tipo de rocha e as características da sua superfície: A composição mineral (p. ex. presença de carbonatos, silicatos) e propriedades como porosidade, permeabilidade e rugosidade determinam a retenção de água, a disponibilidade de nutrientes e a facilidade de adesão e penetração microbiana.

(ii) A disponibilidade de água: É frequentemente o fator limitante mais crítico, sendo controlada tanto pelas propriedades do material (porosidade, permeabilidade) como pelas condições ambientais (precipitação, humidade relativa, condensação, escorrência) [22].

(iii) A disponibilidade de nutrientes: Microrganismos necessitam de fontes de carbono, azoto, fósforo e outros elementos. Estes podem provir da própria rocha (lixiviação de minerais), de deposição atmosférica (poeiras, poluição) ou da atividade de outros organismos [22].

(iv) A presença de biomassa preexistente: A atividade de microrganismos pioneiros, especialmente fototróficos, pode modificar a superfície e enriquecê-la com matéria orgânica, facilitando a colonização subsequente por heterotróficos [22].

(v) A poluição antropogénica: Poluentes atmosféricos (SO_x , NO_x , material particulado) podem fornecer nutrientes essenciais (N, S), alterar o pH da superfície e contribuir para a formação de crostas, que por sua vez podem ser colonizadas [22,29].

É importante notar que as alterações climáticas podem exacerbar a vulnerabilidade da pedra, por exemplo, aumentando a precipitação e o vento, que pode

levar a um aumento da porosidade e rugosidade, favorecendo a colonização microbiana. Por exemplo, Vázquez-Nion *et al.* (2018) sugeriram que o granito tem menor biorreceptividade do que mármore, calcários, argamassas e muitos arenitos devido à sua menor porosidade [59]. Superfícies de textura mais áspera são mais vulneráveis à colonização microbiana porque apresentam sulcos e depressões superficiais para acomodar e proteger as células aderentes [18].

As superfícies rochosas dos edifícios e monumentos, apesar de parecerem inóspitas, constituem na verdade substratos minerais que suportam o crescimento de uma vasta diversidade de microrganismos adaptados a condições frequentemente extremas (baixa atividade de água, flutuações de temperatura, elevada radiação, escassez de nutrientes). Estes organismos exibem frequentemente elevada plasticidade fenotípica, adaptando a sua morfologia e fisiologia às condições prevalentes [60]. A identificação dos membros-chave ativos nestas comunidades microbianas e a compreensão dos mecanismos bioquímicos específicos através dos quais causam deterioração continuam a ser questões centrais na investigação do património pétreo [61].

A colonização microbiana da pedra inicia-se frequentemente com organismos fototróficos pioneiros (cianobactérias e microalgas). Estes autotróficos são resistentes a condições ambientais severas e, através da fotossíntese, produzem matéria orgânica. A formação de biofilmes e a produção de pigmentos são as manifestações mais óbvias destes microrganismos, sendo frequentemente observados como manchas esverdeadas. A matriz de EPS que formam pode proteger as células da dessecação e radiação, mas também reter humidade na superfície da pedra, alterar as propriedades hídricas e exercer stress mecânico devido a ciclos de expansão/contração [23,48,62–64]. Além disso, podem excretar enzimas, quelantes e ácidos, contribuindo para a meteorização química e facilitando o estabelecimento de uma comunidade mais complexa, incluindo bactérias heterotróficas, fungos e protozoários, atraídos pela matéria orgânica acumulada. No entanto, o estabelecimento de uma microbiota heterotrófica também pode ocorrer diretamente, sem a etapa fototrófica pioneira, utilizando nutrientes orgânicos depositados pela atmosfera (poluição, poeiras) ou lixiviados da própria rocha [22].

Essa microbiota utiliza diferentes mecanismos de colonização e deterioração, consoante o grupo taxonómico. Para além das cianobactérias, de entre os principais agentes de biodeterioração em pedra, destacam-se particularmente os fungos demáceos de que são exemplo os géneros cosmopolitas *Alternaria*, *Cladosporium*,

Ulocladium e *Epicoccum*. A maioria dos representantes destes gêneros produzem intensamente melaninas de cor escura, causando alterações estéticas significativas, que fornecem proteção contra radiação ambiental excessiva (radiação UV, raios X e γ) e fatores de *stress* químico [50]. Este tipo de fungos provoca, além disso, danos mecânicos pela penetração das hifas nos poros e fissuras (intrusão física), e danos químicos pela excreção de ácidos orgânicos (com propriedades quelantes que extraem cátions da rede mineral) e sideróforos (quelantes específicos para ferro) [52].

Também os fungos liquenizados são importantes colonizadores de substratos pétreos (Figura 1.2 (a), (d) e (e)). A sua notável capacidade de prosperar em superfícies rochosas, mesmo em ambientes extremos, deve-se em grande parte à sua elevada tolerância a variações de temperatura e disponibilidade de água, incluindo a capacidade poiquilohídrica de suportar ciclos de dessecação e reidratação entrando em estados de dormência (criptobiose) [65]. Esta resiliência permite-lhes persistir e interagir com a pedra por longos períodos, participando ativamente na sua deterioração [5].

A nível físico, os líquenes exercem um impacto mecânico direto sobre a pedra. Utilizando estruturas especializadas como as hifas (em líquenes crustáceos, que se aderem firmemente) e os rizóides (em líquenes foliáceos e fruticosos, para ancoragem), penetram nos poros, microfissuras e linhas de fratura do material [13]. Esta penetração causa danos estruturais pela pressão exercida durante o crescimento. Adicionalmente, a água retida pelo talo liquénico provoca ciclos sazonais ou mesmo diários de expansão (quando húmido) e contração (quando seco), gerando tensões repetidas que podem desagregar os grãos minerais e alargar fissuras preexistentes [5]. Os líquenes endolíticos, que crescem parcial ou totalmente no interior da pedra, são particularmente eficazes neste tipo de dano mecânico interno, penetrando mais profundamente que outros microrganismos [65].

A nível químico, a atividade metabólica dos líquenes resulta na libertação de substâncias agressivas para o substrato pétreo. Produzem diversos ácidos orgânicos carboxílicos, como o ácido oxálico, que é altamente corrosivo e reage com minerais como o carbonato de cálcio (presente em calcários e mármore), dissolvendo-os e frequentemente levando à formação de pátinas de oxalato de cálcio [5,13]. Além destes, os líquenes produzem compostos únicos, os ácidos liquénicos (polifenólicos), que atuam como potentes agentes quelantes, capazes de extrair cátions metálicos (como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+}) da rede cristalina dos minerais, desestabilizando-a [13,65]. Esta ação química é potenciada pela capacidade do talo liquénico de absorver e reter água na superfície da pedra, o que aumenta o tempo de contacto entre os metabolitos

agressivos e o substrato mineral, facilitando as reações de dissolução e quelação [65]. O resultado combinado destas ações físicas e químicas é a progressiva desagregação e alteração da superfície pétreo, que pode manifestar-se como esfoliação, formação de incrustações ou perda geral de material.

Por outro lado, as bactérias mais frequentemente detetadas em monumentos de pedra com evidências de biodeterioração pertencem aos filos *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Cloroflexi* e *Deionococcus-Thermus*. As actinobactérias dominam frequentemente a comunidade microbiana nas pedras que são usadas em construções, pois têm uma grande capacidade de se adaptar e sobreviver a ambientes extremos, podendo resistir à dessecação, à radiação UV e a elevados teores de salinidade [66,67]. Sabe-se que várias actinobactérias produzem estruturas semelhantes a hifas que podem penetrar nas pedras e aumentar a área superficial de formação de biofilmes [68]. Géneros predominantemente identificados incluem *Arthrobacter*, *Rubrobacter* e membros da família *Geodermatophilaceae* (*Blastococcus*, *Modestobacter* e *Geodermatophilus*), que se sugere contribuir para a deterioração sobretudo através de formação de pátinas coloridas e *bio-pitting*. Por exemplo, *Rubrobacter* e *Arthrobacter* podem causar pigmentação avermelhada em monumentos e especialmente em paredes com presença de eflorescências salinas [69]. O género *Arthrobacter* sugere-se que também poderá desempenhar um papel importante na precipitação de carbonato de cálcio [70].

Sintetizando, a **biodeterioração da pedra** manifesta-se através de uma combinação de processos: (i) formação de biofilmes que alteram a estética e as propriedades hídricas/térmicas; (ii) alterações de cor e formação de manchas (Figura 1.2 (b) e (c)) devido a pigmentos biogénicos (clorofilas, carotenóides, melaninas); (iii) ataque químico (biocorrosão) por ácidos e quelantes (acidólise, complexólise); (iv) deterioração física/mecânica pela penetração e pressão de crescimento de hifas/rizóides e pela expansão/contração de biomassa/EPS; e (v) interações com sais, seja pela produção biogénica de sais ou pela colonização de eflorescências preexistentes (incrustação, danos por cristalização) [13].

Neste contexto geral da biodeterioração da pedra, o **calcário** merece atenção particular, sendo este o principal tipo de pedra estudado na presente tese. O calcário é uma rocha sedimentar definida pela sua elevada concentração de carbonato de cálcio (CaCO_3). Devido às suas propriedades e abundância, especialmente em Portugal, tem sido historicamente um material de eleição para construção e elementos decorativos/escultóricos [71]. No entanto, a sua composição química, rica em

carbonatos, torna-o particularmente suscetível à dissolução ácida, um dos principais mecanismos da biocorrosão (tanto por ácidos inorgânicos fortes produzidos por bactérias quimiolitotróficas, como por ácidos orgânicos produzidos por fungos, líquenes e outras bactérias).

Assim, os calcários apresentam geralmente uma elevada biorreceptividade intrínseca, sendo propensos à colonização microbiana e aos fenómenos de biodeterioração associados. Um exemplo notável no contexto português é o calcário de Ançã, frequentemente utilizado em monumentos e classificado como um calcário macio, puro e uniforme, o que o torna altamente sensível à atividade biológica [72]. A compreensão dos processos de biodeterioração neste tipo específico de pedra é, por isso, crucial para a preservação de uma parte significativa do Património Cultural.

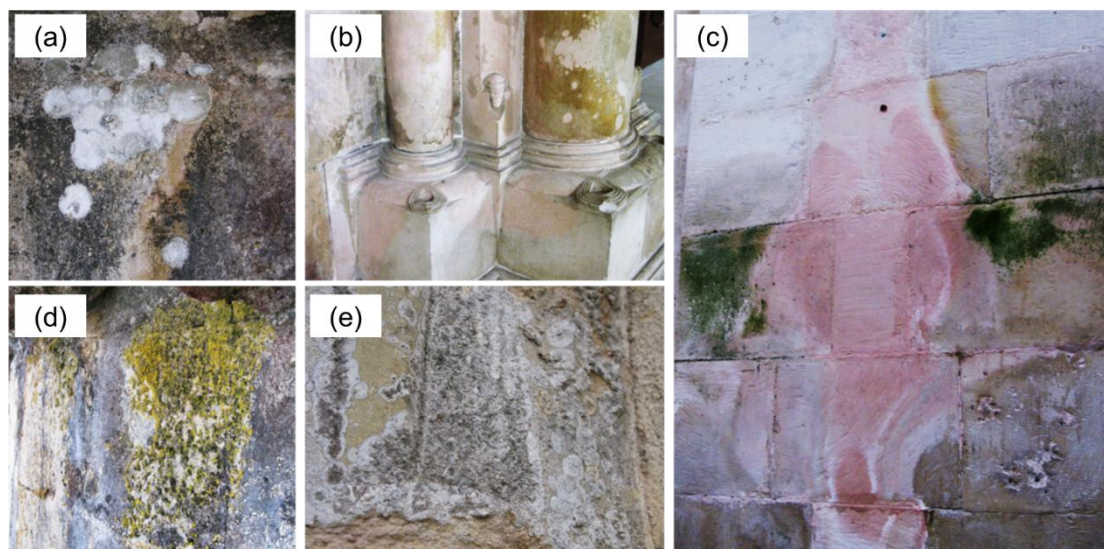


Figura 1.2: Evidências de biodeterioração da pedra: no Convento de Cristo (a,d,e), com notável colonização de líquenes; nas colunas do Mosteiro da Batalha (b) e do Mosteiro de Alcobaça (c), visualizando-se a presença de pigmentação nas paredes com presença de biofilmes

1.1.3.2. Pintura de cavalete

As pinturas de cavalete são um Património Cultural de valor incalculável, cuja preservação a longo prazo é essencial. A integridade destas obras de arte é frequentemente comprometida por condições inadequadas de exposição ou armazenamento, manutenção insuficiente ou intervenções humanas inadequadas, podendo resultar em danos permanentes e irreversíveis [73]. A interação com agentes biológicos é um fator de risco significativo, cuja intensidade e consequências dependem

crucialmente das condições ambientais – particularmente humidade relativa elevada, temperatura moderada, disponibilidade de oxigénio e presença de poluentes – e das características intrínsecas da própria obra [74].

Quimicamente, as pinturas de cavalete são sistemas complexos e estratificados, compostos por uma variedade de materiais orgânicos e inorgânicos, incluindo: (i) um suporte mecânico, que pode ser de natureza diversa, sendo a tela (geralmente linho ou algodão, ricos em celulose) e a madeira (composta por celulose, hemiceluloses e lignina) os mais comuns no contexto deste estudo; (ii) uma camada de preparação (como gesso, cré, cola animal, ou emulsões) para criar uma superfície lisa e adequada à pintura; (iii) a camada pictórica propriamente dita, contendo pigmentos dispersos num ligante (óleos secantes, gema de ovo, caseína, gomas, resinas sintéticas); e frequentemente (iv) uma camada de verniz protetora final [75].

Esta composição, rica em materiais orgânicos – as fibras puramente celulósicas do suporte de tela ou a estrutura mais complexa, lignocelulósica (celulose, hemiceluloses, lignina) da madeira, juntamente com colas proteicas, lípidos dos óleos, polissacáridos de gomas nos estratos superiores – torna as pinturas substratos potencialmente nutritivos para uma vasta gama de microrganismos heterotróficos [76]. Quando as condições ambientais se tornam favoráveis, especialmente com humidade relativa elevada, estes microrganismos podem colonizar a obra e iniciar processos de biodeterioração.

Os danos resultantes manifestam-se como alterações estéticas (descoloração, manchas coloridas por pigmentos microbianos, biofilmes) e estruturais, embora ambos estejam interligados. Os danos estruturais podem envolver fissuração, pulverulência, formação de bolhas, esfoliação ou destacamento das camadas, e a degradação do próprio suporte, manifestando-se de forma distinta: na tela, como perda de resistência e integridade das fibras (fragilidade, rasgões); na madeira, frequentemente como podridão (perda de massa e coesão interna) e deformações significativas (empenamento, fissuração) [76].

A colonização pode ocorrer tanto na face frontal como no verso da pintura. No verso, a contaminação inicia-se frequentemente pela hidratação das fibras do suporte (particularmente higroscópicas em telas), levando ao enfraquecimento das camadas adjacentes. A penetração mecânica de hifas fúngicas que seguem os interstícios do tecido na tela ou a estrutura anatómica (lúmens, pontuações) na madeira, criando vias para mais humidade e crescimento. Na face frontal, a colonização começa geralmente com a deposição de esporos (fúngicos e bacterianos) transportados pelo ar. Se

encontrarem umidade e nutrientes suficientes (provenientes do verniz, ligante, poeiras acumuladas), estes esporos germinam, formando uma comunidade que degrada os materiais constituintes [75,77].

No que respeita à deterioração deste tipo de materiais, prevalecem normalmente grupos selecionados de microrganismos heterotróficos, caracterizados por uma elevada atividade enzimática e baixas exigências nutricionais [78].

Os fungos filamentosos são agentes particularmente eficazes na deterioração de pinturas devido à sua versatilidade metabólica, atividade enzimática e capacidade de crescer com umidade relativamente baixa [73]. Causam danos estéticos (através da produção de pigmentos), físicos (pela penetração de hifas levando à fissuração e desintegração da superfície pintada, formando bolhas e degradação do suporte) e bioquímicos (pela libertação de enzimas e ácidos orgânicos) [79]. A sua atividade enzimática é crucial e diferenciada pelo suporte:

- Em **tela**, predominam normalmente fungos com forte atividade celulolítica. Enzimas como as celulasas quebram as longas cadeias de celulose das fibras, causando a sua despolimerização, perda drástica de resistência mecânica e libertação de açúcares simples, que sustentam um maior crescimento microbiano [80].
- Em **madeira**, além das celulasas, atuam fungos capazes de degradar hemiceluloses e, crucialmente, a lignina (um polímero fenólico muito resistente). Fungos de podridão branca (*white-rot*), de que são exemplo os géneros *Trametes*, *Pleurotus*, *Ganoderma*, *Bjerkandera* e *Pleurotus*, degradam todos os componentes da madeira (incluindo lignina), e atuam de forma a mineralizar as porções de lignina, transformando a madeira numa biomassa de coloração branca e textura fibrosa [81,82]. Por outro lado, os de podridão castanha (*brown-rot*), como *Gloeophyllum*, *Coniophora*, *Postia*, *Laetiporus* e *Serpula*, degradam principalmente a celulose e a hemicelulose, deixando a lignina quase intacta, pelo que resulta numa madeira que se torna acastanhada, quebradiça e em blocos, devido à preservação da lignina [83]. Os fungos de podridão mole (*soft-rot*), de que são exemplo os géneros *Chaetomium*, *Ceratocystis*, *Phialophora* e *Lecythophora* causam uma degradação estrutural profunda e específica da madeira, comprometendo a sua integridade e provocando o aparecimento de uma coloração cinza-escuro, sobretudo em condições de elevada umidade [84].

Géneros fúngicos comuns em ambos os suportes incluem *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Chaetomium* e *Stachybotrys* [78], conhecidos pela sua capacidade de romper as fibras de celulose, afetando o grau de polimerização,

o comprimento da cadeia, a cristalinidade e a orientação, aumentando assim a sua suscetibilidade à biodegradação por enzimas celulolíticas. A atividade metabólica destes eucariotas demonstrou em estudos anteriores contribuir para a alteração de vários tipos de materiais pictóricos, pertencentes ao suporte, à camada pictórica ou aos vernizes protetores, contribuindo significativamente para várias alterações observadas em pinturas [85].

A interação com a água também difere consoante o material de suporte utilizado. A tela responde muito rapidamente às variações de humidade, sofrendo ciclos frequentes de tensão que afetam negativamente as camadas pictóricas. A madeira responde mais lentamente às variações de humidade, mas sofre mudanças dimensionais maiores e em direções diferentes ao longo do grão. Estas alterações provocam tensões mecânicas significativas, causando empenamentos, fissuras na madeira e destacamentos das camadas de tinta, muitas vezes seguindo o sentido do grão.

Da mesma forma que os fungos, também bactérias, cianobactérias e algas que crescem em pinturas expostas à luz, podem causar danos consideráveis e podem atuar sinergicamente com os fungos para contribuir para a sua decomposição. Além dos danos estéticos causados pela formação de pátinas coloridas que cobrem as porções pintadas, esses organismos podem causar desgaste das camadas superficiais, acelerando o desprendimento de porções da camada de tinta. Para além disso, as cianobactérias e algas podem fornecer uma importante fonte de material orgânico sobre o qual bactérias e fungos heterotróficos podem desenvolver-se, causando danos estéticos adicionais e estruturais às pinturas [73,79]. As cianobactérias e algas raramente se encontram em elevada abundância na parte inversa da pintura, provavelmente devido à ausência de luz, bem como a outras condições mais favoráveis no lado exposto das pinturas, como luz solar ou luz artificial, humidade, calor e nutrientes inorgânicos. Este grupo de microrganismos é capaz de produzir pigmentos que as protegem dos efeitos nocivos dos raios UV e estão adaptadas para sobreviver a ciclos de secagem e re-hidratação [77].

Os géneros *Bacillus*, *Serratia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Sporosarcina*, *Paenibacillus*, *Reyranella*, *Staphylococcus*, *Acinetobacter* e *Agrococcus* são dos microrganismos procariotas mais frequentemente identificados em pinturas deterioradas e o seu potencial biodeteriorativo é frequentemente associado à atividade de endocelulases, esterases, esterases lipases, fosfolipases ou proteases [73].

Assim, a biodeterioração de pinturas de cavalete é um processo complexo resultante da interação entre a estrutura multicomponente da obra (com destaque para a natureza do suporte – tela ou madeira), as condições ambientais e a atividade de uma comunidade microbiana diversificada. Os danos resultantes, tanto estéticos como estruturais, podem comprometer irreversivelmente o valor histórico e artístico destas peças, sublinhando a importância de medidas preventivas e de estratégias de intervenção informadas pela compreensão destes processos biológicos.

1.1.4. Detecção de agentes de biodeterioração

O reconhecimento do valor histórico da civilização e dos objetos, promove a necessidade de preservação da cultura e do Património para a sua conservação e proteção [2].

Assim, muitos esforços têm sido direcionados tanto para identificar microrganismos prejudiciais, e os mecanismos que utilizam, quanto para neutralizar o seu impacto na deterioração de qualquer item do Património tangível que esteja ameaçado [12]. Em relação à **identificação microbiana**, duas abordagens principais podem ser distinguidas: (i) Análises meta-ómicas independentes de cultura, nas quais toda a comunidade microbiana é analisada usando, entre outras, metagenómica, metatranscriptómica, metabolómica, metaproteómica, *amplicons* de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e sequenciação shotgun; (ii) Isolamento de microrganismos e técnicas de cultura convencionais, bem como testes diversos de atividade sob diferentes condições (pH, temperatura, etc.) [1].

Como uma terceira abordagem de identificação, mudanças na estrutura e composição do material degradado podem ser examinadas por análises físico-químicas. Estas incluem, entre outros, microscopia eletrónica de varrimento (acoplada com espectroscopia de raios-X por dispersão de energia), microscopia eletrónica de transmissão, microscopia de fluorescência, espectroscopia Raman e espectroscopia de infravermelho. Alguns desses métodos não ajudam apenas a monitorizar os níveis de contaminação microbiana, mas também podem revelar o estado real de danos da obra de arte analisada [1].

Nos subpontos seguintes é feita uma caracterização e distinção entre as principais técnicas de identificação microbiana (dependentes e independentes de cultura) utilizadas no decorrer dos vários casos de estudo que compõe a presente tese.

1.1.4.1. Técnicas dependentes de cultura

As abordagens dependentes da cultura baseiam-se em cultivar isolados naturais que podem ser selecionados para atividades de interesse, por exemplo, atividades enzimáticas, atividades antimicrobianas ou resistência a antibióticos. Embora esta abordagem não possibilite uma caracterização completa da comunidade microbiana, uma vez que alguns microrganismos não têm a capacidade de crescer em condições *in-vitro*, é extremamente importante, pois dá uma primeira visão de qual a microbiota cultivável e permite obter uma elevada densidade de células para ensaios de simulação ou testes com antimicrobianos, essenciais para o desenvolvimento de metodologias de conservação adequadas [71].

A sequenciação Sanger, ou tecnologia de sequenciação de primeira geração, é um método para determinar a sequência de nucleótidos do DNA. O método foi desenvolvido por Frederick Sanger e a sua equipa em 1977 [86].

É uma técnica de sequenciação que utiliza *primers* de oligonucleótidos para procurar regiões específicas de DNA. Este método começa com a desnaturação do DNA de cadeia dupla (dsDNA). O DNA de cadeia simples (ssDNA) é então emparelhado com *primers* de oligonucleótidos e alongado usando uma mistura de dNTPs (*deoxynucleotide triphosphates*), que fornecem os nucleótidos de adenina (A), citosina (C), timina (T) e guanina (G) necessários para construir a nova estrutura de cadeia dupla. Além disso, uma pequena quantidade de ddNTPs (*dideoxynucleotide triphosphates*) para cada nucleótido é incluída. A extensão da sequência continuará com os dNTPs até que um ddNTP seja incorporado pela DNA polimerase. Como os dNTPs e ddNTPs têm a mesma probabilidade de se ligar à sequência, cada sequência terminará em comprimentos variados. Cada ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) também inclui um marcador fluorescente. Quando um ddNTP é anexado à sequência de alongamento, a base irá emitir fluorescência de acordo com o nucleótido associado. Por convenção, A é indicado por fluorescência verde, T por vermelho, G por preto e C por azul. A informação do *laser* é capturada por tubos fotomultiplicadores para gerar um cromatograma, que representa a sequência única, mostrando os picos fluorescentes de cada nucleótido [87,88].

No entanto, apenas uma pequena minoria de microrganismos de uma amostra ambiental pode ser cultivada por técnicas padrão - muitas vezes em meios de cultura convencionais em placas de Petri - e normalmente, apenas 0,1 a 3,0% das bactérias ambientais e até 70% dos fungos (com grande variabilidade dependendo do género) são cultiváveis usando este tipo de métodos. A incultivabilidade das bactérias pode dever-se a muitos fatores, incluindo a falta de nutrientes específicos, o nível de oxigénio,

a temperatura, o pH e as condições osmóticas, bem como a falta de fatores de crescimento, possivelmente produzidos por outros organismos da comunidade. A cultura irá sempre favorecer os organismos que melhor se adaptam às condições aplicadas no laboratório, e estes organismos não são necessariamente os organismos mais dominantes ou ecologicamente importantes no ambiente em questão [12,89].

Assim, a utilização exclusiva de métodos dependentes de cultura não é suficiente para caracterizar completamente as comunidades microbianas, detetando apenas uma pequena fração da diversidade total existente numa amostra. Isto acontece não só porque as condições de crescimento de muitas espécies são desconhecidas, ou de difícil reprodução, mas também pela existência de microrganismos em estados inativos (viáveis, mas não cultiváveis) [71]. Por este motivo, estudos anteriores [90–94] nas mais variadas áreas, demonstram que uma abordagem combinada com análises moleculares fornece resultados mais confiáveis, realistas e abrangentes da biodiversidade presente nas amostras em estudo.

1.1.4.2. Técnicas Independentes de Cultura

1.1.4.2.1. Sequenciação de Nova Geração (NGS)

Atualmente, os estudos metagenômicos são frequentemente aplicados para estimar a contaminação microbiana de objetos do Património Cultural, na tentativa de compreender os fenómenos de degradação e prevenir que os mesmos aconteçam. A metagenômica é descrita como “a extração de todo o material genético diretamente de amostras ambientais para permitir a análise da biodiversidade dos microrganismos presentes” [10,25]. A diversidade de bactérias e fungos em análises patrimoniais é analisada frequentemente por NGS. Esta tecnologia permite a caracterização da diversidade microbiana, mas também um melhor conhecimento sobre as funções, atividades e dinâmicas das comunidades microbianas que prosperam nos seus ambientes naturais, bem como possibilita determinar a sua atividade metabólica, uma vez que os níveis de RNA (*ribonucleic acid*) numa célula são proporcionais à necessidade dessa célula de sintetizar proteínas necessárias ao metabolismo [50]. Assim, este tipo de estudos detalhados é essencial para produzir conjuntos de dados confiáveis e reprodutíveis sobre a composição filogenética e a diversidade funcional das comunidades microbianas em estudo [80].

Nos últimos 4-5 anos, as potencialidades desta metodologia têm sido exploradas em bens patrimoniais como pinturas, materiais de madeira, pedra, pergaminhos, livros etc. para fazer a caracterização da microbiota [95], uma vez que este método (*i*) é

independente de cultura, ou seja, a construção da biblioteca a sequenciar e a amplificação clonal do DNA são realizadas *in-vitro*, possibilitando a identificação da fração cultivável e não cultivável de microrganismos presentes numa amostra; (ii) tem aplicabilidade a várias amostras provenientes dos mais variados contextos e ambientes; (iii) inclui a possibilidade de sequenciação de várias amostras simultaneamente (multiplexação), que permite reduzir o tempo de análise; (iv) permite revelar a diversidade microbiana e a composição de todo o microbioma, com elevada precisão e profundidade, mesmo os microrganismos que se encontrem em baixa abundância relativa; (v) possibilita extrair informações ao nível dos genes e das funções bioquímicas numa comunidade microbiana para um melhor entendimento dos mecanismos utilizados pelos microrganismos para degradar os materiais históricos; (vi) requer uma quantidade menor de DNA, o que constitui uma grande vantagem em alguns ambientes específicos estudados, como é o caso de objetos de arte, de forma a preservar inteiramente a sua integridade; e (vii) facilita estudos longitudinais, permitindo o acompanhamento de mudanças na microbiota ao longo do tempo [11,12,96–98].

Por outro lado, as limitações da técnica prendem-se principalmente no facto de não possibilitar determinar se o DNA deriva de microrganismos vivos ou mortos, bem como não permitir distinguir entre microrganismos responsáveis pelos danos observados e aqueles que não contribuem para a deterioração [79]. Para além disso, (i) tem um custo elevado, quer dos reagentes quer das infraestruturas de bioinformática, e requer elevados requisitos de armazenamento de dados; (ii) existe um grande risco de contaminação, pois a elevada sensibilidade pode levar à deteção de contaminantes; (iii) a complexidade dos dados e a interpretação dos resultados podem revelar-se desafiantes; (iv) os bons resultados podem estar dependentes da qualidade das amostras, pois a qualidade do DNA extraído é crucial para resultados mais precisos [99].

Os marcadores taxonómicos mais comuns, utilizados para sequenciação massiva e em paralelo, são fragmentos de genes que codificam o rRNA (*ribosomal ribonucleic acid*). O sucesso deste biomarcador é baseado no enorme banco de dados de sequências de genes de rRNA e o facto de todos os microrganismos terem rRNAs semelhantes o suficiente para que possam ser reconhecidos como a “mesma molécula”, mas diferentes o suficiente para que as diferenças sejam uma boa medida da distância evolutiva.

Relativamente à identificação de procariotas, o gene 16S rRNA é considerado o melhor marcador molecular e, com o desenvolvimento de métodos de sequenciação de elevado rendimento (HTS), a sequenciação deste gene tornou-se uma ferramenta

fundamental para a caracterização da diversidade bacteriana e da estrutura da comunidade proveniente da maioria dos ambientes, em que a discriminação de espécies diferentes ocorre quando dois organismos apresentam, por convenção, menos de 97% de identidade desse gene [100].

O próprio gene 16S rRNA tem aproximadamente 1500 pares de bases (pb) de tamanho e a sua estrutura genética compreende 9 regiões altamente conservadas e 9 regiões hipervariáveis (V1-V9). As sequências conservadas permitem o alinhamento adequado dos *primers* (usados para amplificação), enquanto as regiões variáveis fornecem diferenças suficientes para distinguir entre diferentes espécies procariontas [99].

No caso da identificação de procariontas num microbioma em particular, a região V3-V4 do gene 16S rRNA tem sido uma escolha preferencial em muitos estudos, particularmente quando se procura obter uma identificação detalhada e precisa das comunidades bacterianas. A escolha por esta região deve-se principalmente pelo equilíbrio entre conservação e variabilidade, elevada precisão taxonómica, robustez e eficiência. Para além disso, oferece uma cobertura taxonómica abrangente, permitindo a identificação de uma ampla gama de bactérias, mostrando-se eficaz na sua discriminação a níveis taxonómicos baixos, como género e espécie [101–105].

Para estudar a composição e diversidade da comunidade fúngica (eucariotas) presente num determinado habitat, utiliza-se frequentemente a região ITS (*internal transcribed spacer*). Esta região é uma sequência de DNA não codificante que fica entre os genes ribossomais 18S, 5.8S e 28S, incluindo duas sub-regiões principais, ITS1 e ITS2. As regiões ITS são altamente variáveis, o que as tornam amplamente utilizadas para a identificação de fungos, já que essa variabilidade permite uma discriminação mais precisa entre diferentes espécies. Geralmente, a utilização da região ITS2 é preferida, pois foi demonstrado que a utilização de ITS1 pode levar a superestimação da diversidade e riqueza, quando comparado à região ITS2 [10,25]. O gene 18S rRNA também pode ser utilizado para identificação de eucariotas. À semelhança do 16S rRNA, faz parte do RNA ribossomal da pequena subunidade e é principalmente utilizado em estudos de filogenia e taxonomia para a distinção e caracterização de níveis taxonómicos mais elevados, onde a variabilidade genética é menor [99].

Desta forma, este tipo de sequenciação é indiscutivelmente uma ferramenta molecular central para descrever as comunidades que colonizam materiais e objetos do património, e várias plataformas estão atualmente disponíveis para este fim. *Illumina*

MiSeq é uma dessas plataformas, tendo já fornecido resultados relevantes sobre a diversidade e composição de microrganismos em diferentes materiais [80].

A tecnologia utilizada pela plataforma de sequenciação *Illumina* é baseada na sequenciação por síntese, que possibilita uma sequenciação rápida, precisa e de elevado rendimento. Com esta plataforma, os fragmentos de DNA das bibliotecas são submetidos a uma amplificação clonal por PCR em ponte, seguida de sequenciação por terminação reversível utilizando um nucleótido terminador reversível.

A metodologia desta sequenciação inclui as seguintes etapas principais (Figura 1.3): extração de DNA; preparação da biblioteca e controlo de qualidade; amplificação (PCR em ponte) – geração de clusters; sequenciação por síntese; análise dos dados por bioinformática.

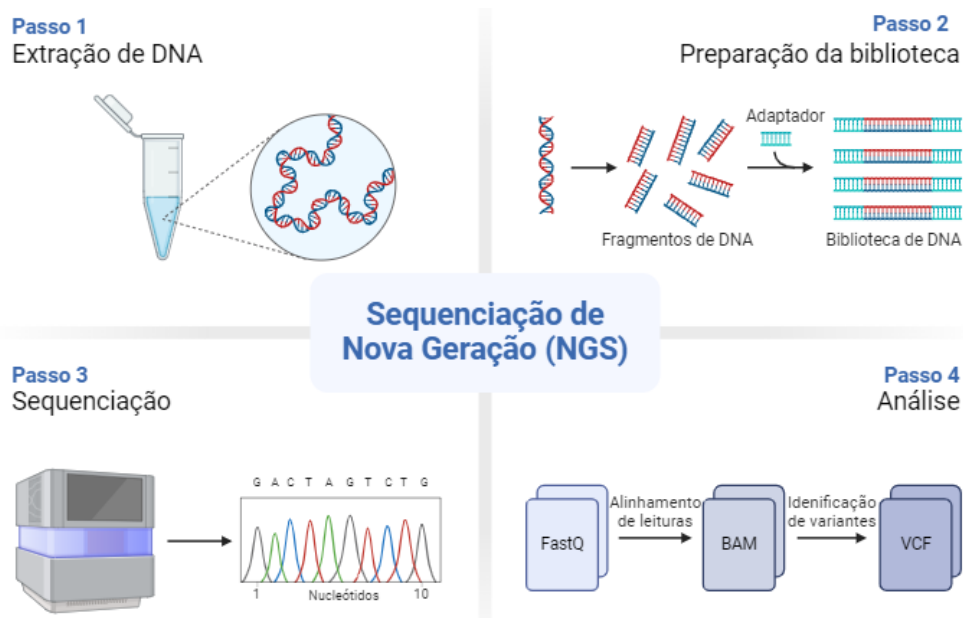


Figura 1.3: Fluxo de trabalho da técnica NGS (adaptado de Biorender.com)

A preparação da biblioteca refere-se ao processo de preparação do DNA para utilização numa plataforma de sequenciação. Embora estejam disponíveis muitos métodos, todos eles resultam na fragmentação do DNA e na adição de adaptadores às suas extremidades. Esses adaptadores são sequências únicas, conhecidas e complementares às sequências dos oligonucleótidos fixados na superfície da célula de fluxo, possibilitando assim a ligação entre ambos [106].

A geração de clusters ocorre através da amplificação por PCR em ponte - uma reação de amplificação que ocorre na superfície de uma célula de fluxo, ou seja, é o

processo em que cada fragmento da biblioteca é clonado em milhares de cópias idênticas. Este método ocorre no interior de uma célula de fluxo em vidro, ou materiais semelhantes, revestida por uma camada funcionalizada de acrilamida, para permitir que os adaptadores do DNA se liguem e formem clusters durante a amplificação *in-situ*.

Na amplificação, a extremidade livre de cada fragmento de DNA dobra e hibrida com um segundo oligonucleótido complementar na superfície da célula de fluxo, formando uma estrutura em "ponte". A DNA polimerase gera o novo DNA a partir do oligonucleótido ligado à superfície, criando uma cópia do DNA original. As duas cadeias de DNA recém-formadas são desnaturadas (separadas) termicamente, ficando ambas ligadas à superfície da célula de fluxo. A repetição desse processo leva à formação de milhões de cópias clonais de cada fragmento original de DNA, designados clusters [107].

Após a amplificação clonal, segue-se a sequenciação por síntese que utiliza a incorporação passo a passo de nucleótidos reversivelmente fluorescentes e bloqueados. Esses são modificados de duas maneiras: (i) cada nucleótido é reversivelmente ligado a uma única molécula fluorescente com comprimentos de onda de emissão únicos, e (ii) cada nucleótido também é bloqueado reversivelmente garantindo que apenas um único nucleótido será incorporado por ciclo. Todos os quatro nucleótidos (A, T, C, G) são adicionados ao *chip* de sequenciação e, após a incorporação do nucleótido, as bases de DNA restantes são lavadas. O sinal fluorescente é lido e indica qual o nucleótido que foi adicionado em cada *cluster*, sendo depois registado; a molécula fluorescente e o grupo terminador são então fragmentados e removidos. Este processo é repetido até que a reação de sequenciação seja concluída [108].

Dado que este tipo de sequenciação massiva produz um grande volume de dados, a análise simplificada dos dados de bioinformática e a sua gestão são essenciais para a implementação destas tecnologias. A análise de dados é normalmente subdividido em análises primária, secundária e terciária. A análise primária é geralmente realizada pelo *software* do instrumento após a sequenciação e envolve a identificação de bases para cada fragmento de DNA amplificado clonalmente, seguindo-se uma fase de controlo de qualidade. A qualidade da execução da sequenciação é avaliada através de três indicadores: densidade de clusters, percentagem de clusters que passam nos filtros e percentagem de chamadas de base com uma pontuação de qualidade de pelo menos Q30. Na análise secundária, o alinhamento das leituras e construção dos fragmentos de DNA fornecem a sequência completa para uma amostra, a partir da qual as variantes genéticas podem ser determinadas. Por último, numa análise terciária, a partir do alinhamento e dados da sequência, pode utilizar-se a exploração de dados

biológicos e ferramentas de interpretação para comparar a amostra com genomas de referência [109].

As plataformas *Illumina* são das únicas capazes de fazer sequenciação emparelhada, ou seja, sequenciação que ocorre em ambas as extremidades de um fragmento de DNA, gerando dados de seqüências de elevada qualidade com uma cobertura profunda e um elevado número de leituras, uma vez que há um aumento da probabilidade de alinhamento a uma referência [108].

1.1.4.2.2. Sequenciação de Terceira Geração

A empresa *Oxford Nanopore Technologies* (ONT) representa um avanço significativo na tecnologia de sequenciação de DNA, ao introduzir uma abordagem de terceira geração que utiliza nanoporos como biossensores para sequenciar moléculas de ssDNA e longas (Figura 1.4).

No centro do dispositivo MinION™, criado pela ONT, há uma membrana artificial que contém pequenos poros nanométricos, podendo estes nanoporos ser de origem biológica (como proteínas porosas) ou sintética. As atuais células de fluxo MinION™ – ou seja, os locais onde as bibliotecas de DNA são inseridas - contém 2048 nanoporos de proteínas individuais organizadas em 512 canais, cada um contendo quatro poros. Cada canal mede o sinal gerado por um dos quatro poros de uma vez, permitindo processar até 512 moléculas de DNA simultaneamente [110].

Para sequenciar o dsDNA este é preparado adicionando às suas extremidades dois adaptadores com proteínas motoras. O adaptador principal vai guiar os fragmentos de dsDNA para a vizinhança dos poros e o processo de sequenciação começa quando a proteína motora descompacta o dsDNA, permitindo que a primeira cadeia (modelo) passe através do nanoporo, uma base de cada vez. Numa solução eletrolítica, é aplicada uma voltagem constante para produzir uma corrente iônica através do nanoporo, de modo que as moléculas de ssDNA com carga negativa sejam conduzidas através do nanoporo do lado 'cis' (com carga negativa) para o lado 'trans' (com carga positiva). A velocidade de translocação é controlada por uma proteína motora que impulsiona a molécula de ácido nucleico através do nanoporo. Cada um dos quatro nucleótidos (A, T, C, G) contidos no DNA causa uma alteração característica na corrente elétrica devido às suas diferentes propriedades químicas. Este processo é sensível o suficiente para detetar diferenças muito pequenas nas mudanças de corrente, o que permite identificar cada nucleótido conforme ele passa pelo poro. Por outras palavras, as alterações da corrente iônica durante a translocação correspondem à seqüência de

nucleótidos presente na região de detecção e são decodificadas através de algoritmos computacionais, permitindo a sequenciação em tempo real de moléculas únicas. Além de controlar a velocidade de translocação, a proteína motora possui atividade de helicase, permitindo que o DNA de cadeia dupla sejam desenrolados em moléculas de cadeia simples que passam através do nanoporo [111].

Para além das várias vantagens associadas como portabilidade, facilidade de utilização, geração de dados em tempo real (o que permite tomar decisões no decorrer da sequenciação), simplicidade e velocidade de sequenciação, possibilita sequenciar o gene 16S rRNA completo, recuperando o conteúdo de informação de todas as nove regiões hipervariáveis (V1-V9); isto gera comprimentos de leitura mais longos e oferece um nível mais elevado de resolução taxonómica e filogenética para identificação microbiana. É um pequeno dispositivo portátil, permitindo o processamento de amostras no local sem a necessidade de infraestruturas laboratoriais elaboradas sendo a sua principal desvantagem a precisão de leituras relativamente baixa em comparação com várias outras plataformas, embora este fator esteja em constante melhoria [100,112].

Tendo em conta todos estes fatores em conjunto, a tecnologia de sequenciação Nanopore, e especialmente o dispositivo MinION™, pode obviamente oferecer algumas vantagens por razões práticas em estudos de contexto patrimonial, principalmente a relação custo-benefício, maior simplicidade e acessibilidade, diversidade nas análises e ainda, se necessário, análises no local em museus, galerias e monumentos, possibilitando um diagnóstico rápido da colonização microbiana [113].

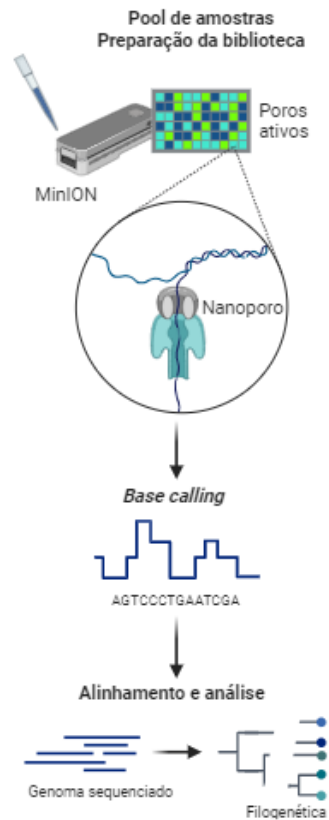


Figura 1.4: Tecnologia de Sequencição MinION

1.1.5. Estratégias de mitigação

A preservação do Património Cultural, enquanto testemunho material insubstituível da história, é essencial para manter o seu valor cultural, artístico e científico. Tendo em conta que os processos de biodeterioração assumem um papel importante e frequentemente complexo que contribui para uma variedade de danos aos bens patrimoniais, a investigação no controlo dessa colonização microbiana tem sido sustentada por esta necessidade e pelo conhecimento cada vez maior sobre os processos que conduzem a este fenómeno [114]. Ignorar ou negligenciar a componente biológica da deterioração pode comprometer não só a aparência e a informação histórica contida no bem cultural, mas também a sua integridade estrutural a longo prazo, tornando intervenções futuras mais difíceis, dispendiosas e potencialmente mais invasivas. Acresce ainda, em certos casos (por exemplo fungos produtores de micotoxinas), um potencial risco para a saúde de conservadores-restauradores e visitantes [115].

Assim, o controlo eficaz da biodeterioração constitui um pilar essencial e um desafio constante nas práticas de conservação-restauro, visando a remediação dos danos visíveis, e, de forma crucial, a gestão da atividade microbiana subjacente para assegurar a estabilidade e a longevidade do património.

As estratégias de intervenção podem ser divididas em duas abordagens principais, frequentemente complementares. A primeira foca-se na **limpeza e remoção física** da biomassa microbiana acumulada, dos seus subprodutos visíveis (como pigmentos e biofilmes) e de eventuais depósitos associados. O objetivo primordial da limpeza é restaurar a legibilidade estética da superfície, eliminar focos de nutrientes e remover a massa biológica que pode reter humidade e exercer stress mecânico. Os métodos variam amplamente em função da natureza do substrato e do tipo de contaminação, desde técnicas mecânicas controladas (por exemplo, a utilização de laser) até à aplicação de agentes químicos de limpeza, como soluções aquosas, solventes orgânicos ou misturas destes – por exemplo, o uso de soluções hidroalcoólicas, como as investigadas nesta tese de doutoramento para a remoção simulada de pigmentos bacterianos, que aliam a capacidade solvente do álcool à ação da água.

O álcool isopropílico possui diversas propriedades que o tornam particularmente adequado para a preservação do Património. A sua eficácia como solvente, pois tem capacidade de dissolver uma vasta gama de compostos orgânicos, e a sua baixa toxicidade (em comparação com outros solventes), são fatores-chave que potenciam a sua aplicação na preservação de diversos objetos culturais [116,117]. Também conhecido como isopropanol, algumas outras vantagens da sua utilização incluem: a compatibilidade e segurança comprovadas, uma vez que a utilização de misturas com este álcool tem sido comum em diferentes materiais (pedra, nanopartículas, papel); e a versatilidade e o controlo, permitindo alterar a concentração, combinando-se com água ou outros solventes, e de fácil aplicação com zaragatoa, por exemplo.

Contudo, a limpeza por si só, embora essencial esteticamente, raramente é suficiente para um controlo duradouro. Muitas vezes, não elimina totalmente as células microbianas viáveis (especialmente as que penetraram no material ou formam estruturas resistentes como esporos) nem impede a rápida recolonização se as condições ambientais favoráveis persistirem.

É por esse motivo que é necessária, frequentemente, uma segunda abordagem: o controlo microbiano direto, que visa inibir o crescimento ou erradicar os microrganismos viáveis, atuando sobre a causa biológica da deterioração. O objetivo é

quebrar o ciclo de crescimento e degradação, prolongando os efeitos da intervenção e minimizando a necessidade de tratamentos frequentes. A ferramenta habitualmente empregue para este fim na conservação do património é a **aplicação de agentes antimicrobianos**, genericamente designados por biocidas, cuja legislação europeia descreve como “uma substância química destinada a destruir, neutralizar, tornar inofensivo ou exercer um efeito de controlo sobre qualquer organismo prejudicial, através de mecanismos químicos ou biológicos” [118]. Estas substâncias químicas são selecionadas pela sua capacidade de interferir com processos celulares essenciais dos microrganismos-alvo (por exemplo, danificando membranas celulares, inativando enzimas vitais, interferindo com a replicação do DNA), levando à sua morte (efeito biocida) ou à inibição do seu crescimento e reprodução (efeito biostático) [119]. A atividade dos antimicrobianos é afetada por vários fatores, principalmente a concentração, o período de contacto, o pH, a temperatura e a presença de matéria orgânica ou outros compostos interferentes ou intensificadores, e a natureza, número, localização e tipo de microrganismos [120].

A escolha de um biocida eficaz e seguro para aplicação em bens culturais é, no entanto, uma tarefa complexa, que exige a ponderação cuidada de múltiplos fatores críticos, nomeadamente:

- **Eficácia e Espectro de Ação:** O biocida deve ser comprovadamente eficaz contra os tipos específicos de microrganismos (bactérias, fungos, algas) identificados como responsáveis pela deterioração no objeto em questão. Alguns biocidas têm um espectro de ação largo, enquanto outros são mais específicos.
- **Compatibilidade com o Substrato:** É absolutamente crucial que o biocida não reaja quimicamente com os materiais constitutivos da obra (pigmentos, ligantes, pedra, madeira, etc.), não cause alterações de cor, não modifique as propriedades físicas do material (como porosidade e hidrofobicidade) nem deixe resíduos indesejados a longo prazo [121].
- **Durabilidade e Efeito Residual:** Idealmente, o biocida deve oferecer alguma proteção residual contra a recolonização, mas sem persistir indefinidamente no ambiente ou no objeto, o que poderia levar a problemas de toxicidade ou resistência. O equilíbrio entre eficácia a curto prazo e proteção duradoura é delicado.
- **Segurança e Impacto Ambiental:** A toxicidade para o aplicador (conservador-restaurador) e para o ambiente (ecotoxicidade, persistência, bioacumulação) é uma preocupação crescente. Muitos biocidas tradicionais são tóxicos e requerem precauções rigorosas durante a aplicação e eliminação.

- **Reversibilidade e Retratabilidade:** Embora dificilmente se possa falar em reversibilidade total para um tratamento biocida, deve-se privilegiar formulações que permitam futuras intervenções sem criar interferências ou produtos de degradação problemáticos.

De forma geral, os biocidas podem atuar como agentes eletrofílicos (eletrófilos, p.ex., aldeídos, carbamatos, e oxidantes, p. ex., cloro, bromo, ozono, peróxidos) ou como agentes ativos de membrana (líticos, p. ex., compostos de amónio quaternário (QACs), fenóis, álcoois, e protonóforos, p. ex., ácidos fracos, parabenos, piritonas). Os agentes eletrofílicos reagem com enzimas essenciais para inibir o crescimento e o metabolismo, resultando na morte celular após várias horas de contacto, enquanto os agentes ativos de membrana tendem a afetar diretamente as membranas celulares [120].

Embora muitos biocidas e técnicas de aplicação tenham sido desenvolvidos recentemente, as formulações contendo QACs e isotiazolinonas são ainda muito utilizadas na conservação do Património. Produtos como o Preventol® e o Biotin-T® são exemplos de formulações com historial de uso no Património, selecionados pela sua eficácia demonstrada em muitos contextos e que foram incluídos nos ensaios desta tese.

O Preventol® inclui diferentes formulações comerciais, sendo frequentes as versões à base de QACs. Estes compostos atuam sobretudo ao nível da membrana citoplasmática, provocando a desorganização da bicamada fosfolipídica, aumento da permeabilidade e consequente lise celular. A sua elevada afinidade por superfícies permite a formação de uma película antimicrobiana persistente, prolongando o efeito protetor. Por outro lado, o Biotin-T®, embora possa igualmente conter QACs na sua composição, é tipicamente formulado à base de isotiazolinonas (compostos heterocíclicos com atividade biocida de largo espectro) e o seu mecanismo de ação envolve a inibição de enzimas essenciais ao metabolismo celular e a desestabilização de membranas, levando à morte microbiana [122].

De facto, o Preventol® e o Biotin-T® continuam a ser os compostos químicos mais utilizados pelos restauradores e conservadores, pois embora alguns ingredientes destas formulações sejam atualmente considerados tóxicos, são aplicados em baixas concentrações, o que não compreende riscos significativos para o ser humano ou para o ambiente [118].

Ainda assim, o uso destes e de outros biocidas sintéticos continua a levantar questões importantes sobre a sua toxicidade a longo prazo, o potencial desenvolvimento

de estirpes microbianas resistentes e o seu impacto ecológico, motivando uma intensa procura por alternativas mais seguras e sustentáveis que possibilitem, na mesma medida, eliminar, inibir ou prevenir contaminação microbiológica [123].

É neste cenário que emergem com crescente interesse as **alternativas de origem natural**, com destaque para os óleos essenciais (OEs). Extraídos de diversas partes de plantas (folhas, flores, cascas, raízes), os OEs são misturas complexas de compostos orgânicos voláteis (terpenos, terpenóides, fenilpropanóides, etc.) com reconhecidas propriedades antimicrobianas, antifúngicas, e por vezes antivirais e inseticidas. À temperatura ambiente, são líquidos, límpidos, raramente coloridos e solúveis em lípidos e solventes orgânicos, geralmente com densidade inferior à da água. A sua origem natural, a percepção de menor toxicidade (embora nem sempre verdadeira, exigindo avaliação caso a caso) e a sua biodegradabilidade tornam-nos candidatos atrativos para uma conservação mais sustentável [114]. Normalmente, um ou dois compostos químicos representam a maior parte do peso percentual do óleo (por vezes até mais de 90%), enquanto os outros componentes são apenas vestigiais e estão presentes em baixas concentrações [124]. Devido ao elevado número de constituintes, os OEs parecem não possuir alvos celulares específicos, pelo que podem ser considerados biocidas com atividades de largo espectro. Sendo lipofílicos, conseguem atravessar a parede celular e a membrana citoplasmática, alterando a estrutura das camadas de polissacáridos e permeabilizando a membrana, mas podem também visar proteínas, enzimas e DNA. Além disso, foram demonstradas outras propriedades biológicas, como a indução de mutação citoplasmática, indução genética e efeitos antígenotóxicos [125].

Acredita-se que a sua complexidade química, com múltiplos componentes atuando sinergicamente em diferentes alvos celulares, possa dificultar o desenvolvimento de resistência microbiana. A exploração de um biocida formulado à base de OEs, como realizado neste trabalho, insere-se nesta linha de investigação promissora. O biocida Syra-Óleovictis[®], elaborado a partir de OEs (dos quais geraniol e limoneno), foi escolhido para realizar alguns testes laboratoriais que constam nesta tese, uma vez que é frequentemente utilizado em materiais pétreos, incluindo a pedra calcária, e não tem cloro, compostos orgânicos voláteis nem QACs na sua composição; é eficaz contra uma variedade muito ampla de microrganismos; e é ainda de fácil utilização.

Os estudos para o desenvolvimento deste tipo de produtos visam criar alternativas que, ao longo do tempo, substituam os biocidas convencionais, que sejam respeitadores do ambiente e do material e, ao mesmo tempo, económicos e eficazes [126]. Contudo,

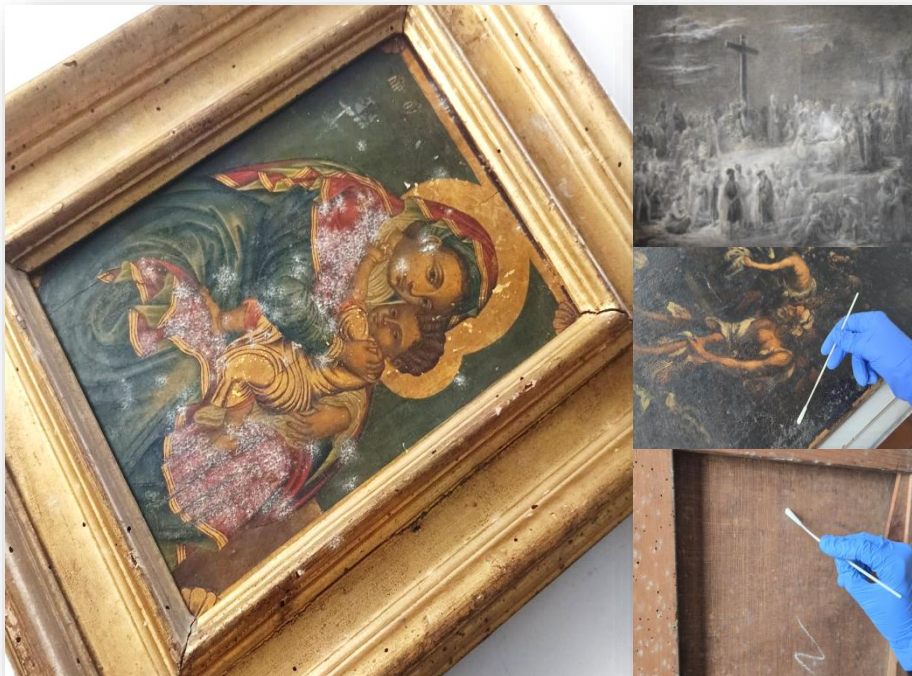
a aplicação de OEs na conservação também acarreta limitações significativas: a sua composição química pode variar dependendo da origem botânica, método de extração e condições de crescimento, o que se traduz na falta de uma padronização, dificultando a comparação de resultados entre investigações; a sua volatilidade pode limitar a durabilidade do efeito; a sua eficácia *in-situ* em matrizes complexas como a pedra ou a pintura necessita de validação rigorosa; e potenciais interações com os materiais do Património (como a solubilização de vernizes, indução de manchas, etc.) devem ser cuidadosamente avaliadas [127].

Desse modo, a decisão sobre a estratégia de controlo microbiano a adotar num determinado caso de conservação – seja ela uma limpeza mecânica ou química, a aplicação de um biocida comercial de eficácia comprovada mas com potenciais riscos, a exploração de uma alternativa natural promissora mas com mais incertezas, ou uma combinação destas – exige um diagnóstico prévio rigoroso (identificação dos microrganismos e dos danos), uma avaliação criteriosa dos riscos e benefícios de cada opção, e um conhecimento profundo da interação entre os tratamentos, os microrganismos e os materiais constitutivos do bem cultural [128].

Assim, a Bioquímica desempenha um papel central no estudo do Património, pois permite compreender os mecanismos moleculares subjacentes às interações entre os microrganismos e os materiais históricos. Recorrendo à caracterização de pigmentos, metabolitos e enzimas através de diferentes técnicas complementares, a Bioquímica possibilita a identificação das reações que estão na origem da descoloração, das alterações químicas e dos danos físicos observados nos materiais, constituindo assim um suporte essencial para a compreensão destes processos. Esta perspetiva molecular permite não só diagnosticar melhor os processos de deterioração, como também pensar em formas de prevenir e controlar a sua progressão.

Capítulo 2

Biodeterioração em Pintura Antiga



Capítulo 2 – Biodeterioração em Pintura Antiga

O estudo da ação fisiológica dos microrganismos em materiais artísticos é atualmente um dos campos mais relevantes na investigação sobre biodeterioração. A literatura já documenta amplamente a colonização microbiana em monumentos de pedra, pinturas murais e frescos, e tem vindo também a explorar cada vez mais as comunidades microbianas presentes em pinturas de cavalete, tanto em tela como em painéis de madeira.

Este tipo de pintura é das mais importantes expressões artísticas com valor histórico e cultural, podem apresentar uma diversidade de materiais orgânicos e isso explica porque é que estas obras de arte são afetadas pela contaminação microbiana que, entre outros fatores, pode ser responsável por diferentes alterações estéticas e estruturais.

Neste sentido, o presente capítulo dedica-se ao estudo detalhado de três casos de estudo de pinturas com características distintas: a Galeria dos Vice-Reis da Índia, em Goa, que reúne retratos antigos de grande valor histórico e simbólico; as pinturas em reserva do Museu Nacional de Arte Antiga, em Lisboa, representativas da diversidade de obras conservadas no Património português; e as pinturas da Universidade de Silpakorn, na Tailândia, que oferecem um contexto ambiental e cultural diferente. A escolha destes casos permite analisar a biodeterioração em diferentes realidades, desde coleções em reserva até obras expostas, explorando a relação entre os materiais artísticos, as condições ambientais e a colonização microbiana.

Assim, o estudo integrado destes três casos de estudo servirão como base para identificar os fatores que contribuem para a colonização microbiana, identificar os tipos de danos mais comuns associados a diferentes organismos e suportes (tela e madeira), e refletir sobre as implicações para a preservação a longo prazo destas valiosas obras de arte.

2.1. Estudo de comunidades microbianas em retratos históricos da Galeria dos Vice-Reis da Índia

A Índia é uma enorme referência no que respeita a sítios históricos pelos seus imensos princípios culturais e é considerada o sexto maior país, com 40 locais de valor patrimonial [129]. A galeria dos Vice-Reis e Governadores da Índia Portuguesa, iniciada em 1547 por ordem do Vice-Rei D. João de Castro, encontra-se atualmente exposta no primeiro piso do *Archaeological Survey of India Museum*, situado no edifício do antigo Convento de São Francisco, em Velha Goa, dentro do complexo de monumentos religiosos classificados como Património da Humanidade pela UNESCO desde 1986 [130]. É uma coleção única que representa a história de Portugal e da Índia, sobretudo pelo valor documental e iconográfico associado às pessoas retratadas. Assim, a importância dos retratos é, sem dúvida, a razão dos seus restauros periódicos para fazer face aos efeitos adversos do clima subtropical sobre a estrutura de madeira que suporta algumas das pinturas.

Para este estudo foram analisados os retratos da Galeria dos Vice-Reis da Índia que apresentavam alterações superficiais de modo a tentar compreender a origem e a dinâmica da microbiota colonizadora associada, através de uma abordagem metagenómica filogenética, ferramenta poderosa para a compreensão da dinâmica das comunidades envolvidas em processos de deterioração. A identificação das comunidades microbianas associada com os diferentes materiais e a compreensão do papel desses microrganismos sobre os processos de biodeterioração são cruciais para a prevenção e/ou remediação dos problemas relacionados com essa deterioração.

2.1.1. Metodologia

2.1.1.1. Amostragem

O processo de amostragem (Figura 2.1) foi realizado no *Archaeological Survey of India Museum*, em alguns retratos selecionados dos Vice-Reis (Figura 2.2), ao abrigo do projeto “*Old Goa Revelations Project – New Insights on the Viceroy's portrait gallery* (2022.10305.PTDC)”, um projeto colaborativo criado a nível transnacional para desenvolver ferramentas para a interpretação destes retratos e, por conseguinte, para a sua preservação.

As microamostras dos retratos foram recolhidas utilizando métodos não invasivos e microinvasivos, em condições semi-estéreis, recorrendo a zaragatoas estéreis nas

zonas com evidências de deterioração microbiana (como biofilmes superficiais visíveis, presença de manchas e pigmentos ou ainda alterações estruturais do suporte da pintura) para posterior avaliação da contaminação microbiana por análise metagenômica. A recolha foi feita em pinturas guardadas nas reservas e pinturas que se encontravam expostas na galeria (Tabela 2.1). Na maioria dos quadros foi feita uma recolha da parte da frente (F) e das costas (C) do quadro, para se fazer uma análise comparativa. A amostragem foi feita de acordo com a ética da conservação, recolhendo a quantidade mínima necessária para os ensaios, próximo a lacunas, bordas ou fissuras, evitando assim danos estruturais e estéticos à obra. A utilização de métodos microinvasivos (como o uso de bisturis estéreis) foi permitida apenas em fragmentos que não podem ser conservados ou não podem ser reunidos, e partes que seguramente serão eliminadas em possíveis restauros. As microamostras foram conservadas a 4°C durante o transporte até ao laboratório e até à sua utilização.

Paralelamente à recolha, procedeu-se à avaliação da humidade relativa da madeira dos quadros das pinturas e da parede da reserva, utilizando um medidor de humidade Protimeter SurveyMaster™ (Amphenol Advanced Sensors, EUA). As medições foram realizadas em modo por pinos para obtenção de valores em *Wood Moisture Equivalent* (WME), sendo considerada uma superfície seca entre 7–16,9%, em risco entre 17–19,9% e muito húmidos acima de 20%, de acordo com a classificação do fabricante.



Figura 2.1: Processo de amostragem no retrato de Pedro Lencastre

(Créditos imagem: Laboratório HERCULES, cortesia: Archaeological Survey of India)



Figura 2.2: Retratos dos Vice-Reis analisados no estudo (a,b) Vasco da Gama; (c,d) Lopo Vaz de Sampaio; (e,f) Matias de Albuquerque; (g,h) Pedro da Silva; (i) Pedro Almeida; (j) José Horta e Costa; (l) Bispo.

(Créditos imagem: Laboratório HERCULES, cortesia: Archaeological Survey of India)

Tabela 2.1: Descrição da amostragem e identificação das pinturas analisadas em Goa

Localização	Nº retrato	Identificação pintura	Descrição material	WME (%) ¹
Reservas	61 F	Matias de Albuquerque	Pintura sobre madeira	17,2
	61 C			
	132 F	Pedro da Silva	Pintura sobre madeira	18,1
	132 C			
	156 F	José Horta e Costa	Pintura sobre tela	
	156 C			
	160 F	Retrato de bispo (não pertence à coleção dos vice-reis)	Pintura sobre tela colada em madeira	13,6
	160 C			
	PR	Parede degradada da reserva		100
MR	Madeira degradada da reserva	Costas dos quadros		

¹Humidade relativa média, medida em WME (%), considerando diferentes pontos do quadro

(continua)

Tabela 2.1 (continuação)

Localização	Nº retrato	Identificação pintura	Descrição material	WME (%) ¹
Exposição	150	Pedro Almeida	Pintura sobre madeira – Costas c/mancha preta	12,6
	115 F	Pedro Lencastre	Pintura sobre madeira – Manchas brancas na parte inferior	12,8
	115 C			
	49	Lopo Vaz de Sampaio	Pintura sobre madeira	14
	41	Vasco da Gama	Pintura sobre madeira – Manchas brancas na parte inferior	9,12 (costas)

¹Humidade relativa média, medida em WME (%), considerando diferentes pontos do quadro

2.1.1.2. Extração de DNA

Para o estudo de comunidades microbianas complexas sem isolamento prévio de microrganismos, o DNA metagenómico foi extraído utilizando o Kit OMNI Soil DNA Purification Kit (Kennesaw, GA, EUA). As amostras foram colocadas a incubar em agitação, durante 48 h, com 700 µL de soro fisiológico. Após esse período, agitaram-se os tubos levemente no vórtex e retiraram-se 500 µL da solução de amostra para o tubo que já contém as esferas, adicionando-se então 725 µL XLSM Buffer. Agitaram-se as amostras no vórtex (*Bead Ruptor Bead Mill Homogenizer*, OMNI Internacional) durante 5-10 min e adicionou-se 72 µL SD Buffer, voltando a agitar. Incubou-se a 70°C por 10 min, agitando brevemente o tubo uma vez durante a incubação. As amostras foram centrifugadas a 10 000 g por 5 min, transferindo-se 400 µL do sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL. Adicionou-se 135 µL de tampão PS2 que estava já previamente no gelo e utilizou-se o vórtex para misturar bem. Incubou-se no gelo por 3 minutos e centrifugou-se a 13 000 g por 1 min. Seguidamente transferiu-se cuidadosamente o sobrenadante para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Adicionou-se 200 µL de Reagente RTH, misturou-se no vórtex e deixou-se descansar à temperatura ambiente por 2 min. Após uma centrifugação de 13 000 g durante 1 min, transferiu-se o sobrenadante limpo para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e adicionou-se 200 µL de PX1 buffer, agitando no vórtex. Inseriu-se uma coluna (*OMNI DNA Mini Column*) num tubo coletor de 2 mL, transferiu-se toda a amostra anterior para a mini coluna e centrifugou-se a mesma a 10 000 g por 1 min à temperatura ambiente. Descartou-se o filtrado e reutilizou-se o tubo coletor para, posteriormente, adicionar 500 µL de tampão CBH para a minicoluna de DNA. Após uma centrifugação a 10 000 g por 1 min, descartou-se o filtrado e o tubo coletor, transferindo-se a coluna para um novo tubo coletor de 2 mL. Adicionou-se 700 µL de tampão de lavagem à minicoluna,

centrifugou-se a 10 000 g por 1 min e descartou-se o filtrado, reutilizando o tubo coletor. Repetiram-se os passos anteriores, para uma segunda etapa de lavagem. De forma a remover o etanol residual, centrifugou-se a Mini Coluna de DNA vazia a 13 000 g por 2 min à temperatura ambiente e, posteriormente, transferiu-se para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Adicionou-se 60 µL de tampão de eluição aquecido a 70°C, diretamente no centro da coluna e incubou-se à temperatura ambiente durante 2 minutos. Centrifugou-se a 13 000 g por 1 min e o filtrado resultante, foi colocado novamente na mesma minicoluna para uma segunda centrifugação igual. Por fim, armazenou-se o DNA eluído a - 20°C.

2.1.1.3. Análise metagenômica por NGS

2.1.1.3.1. Quantificação do DNA

O DNA foi quantificado por fluorimetria através do equipamento Quantus™ Fluorometer (E6150, Promega, Madison, WI, EUA) com QuantiFluorKit® One dsDNA System (E4870, Promega, Madison, WI, EUA). As amostras foram preparadas com 199 µL de QuantiFluor® ONE dsDNA Dye e com 1 µL da amostra, agitadas no vórtex e incubadas durante 5 min à temperatura ambiente no escuro. A concentração das amostras foi determinada com a calibração interna do equipamento com um branco preparado com 1 µL de tampão 20X TE (pH 7,5) e um padrão com 1 µL de padrão Lambda DNA (400 ng/µL).

2.1.1.3.2. Amplificação

As comunidades microbianas foram caracterizadas por sequenciação *Illumina* para a região 16S rRNA V3-V4 e região ITS, para organismos procariotas e eucariotas, respetivamente. O DNA foi amplificado para as regiões hipervariáveis com primers específicos e posteriormente re-amplificado num PCR de ciclo limitado para adicionar adaptadores de sequenciação.

Foram utilizados os *primers* descritos na Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Sequência de primers utilizados na amplificação do DNA

	Primer	Sequência 5'-3'
Análise de Bactérias	341F	CCTACGGGNGGCWGCAG
	805R	GACTACHVGGGTATCTAATCC
Análise de Fungos	ITS3NGS1_F	CATCGATGAAGAACGCAG
	ITS3NGS2_F	CAACGATGAAGAACGCAG
	ITS3NGS3_F	CACCGATGAAGAACGCAG
	ITS3NGS4_F	CATCGATGAAGAACGTAG
	ITS3NGS5_F	CATCGATGAAGAACGTGG
	ITS3NGS10_F	CATCGATGAAGAACGCTG
	ITS3NGS001_R	TCCTSCGCTTATTGATATGC

Para a reação de amplificação de DNA dos microrganismos procariotas foram utilizados 5 µL de *primer* direto, 341F (1 nM) e 5 µL de *primer* reverso, 805R (1 nM), 10 µL de MyTaq™ HS Mix 2X (Bioline, Taunton, MA, EUA) e, por fim, 5 µL de cada amostra foram adicionados aos tubos PCR, perfazendo um volume total de 25 µL em cada tubo. As condições de PCR envolveram um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 1 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, polimerização a 55°C por 15 s, extensão a 72°C por 10 s e extensão final à mesma temperatura anterior, durante 2 min, após os quais as amostras foram mantidas a 4°C.

Para a reação de amplificação de DNA de microrganismos eucariotas, 10 µL de MyTaq™ HS Mix 2X (Bioline, Taunton, MA, EUA), 6,5 µL de água RNase Free, 3,5 µL do pool de *primers* para análise fúngica sem *overhangs* e 5 µL de cada amostra foram adicionados aos tubos de PCR, fazendo um volume total de 25 µL. As condições para amplificação consistiram num ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, seguido de polimerização a 55°C por 30 s, extensão a 72°C por 20 s e extensão final na mesma temperatura anterior, por 2 min, após os quais as amostras foram mantidas a 4°C. Controlos negativos foram incluídos para todas as reações de amplificação e realizados no termociclador MJ Mini™ Gradiente Termal Cycler (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, United States).

Os fragmentos amplificados V3-V4 (~490 pb) e ITS2 (~390 pb) foram separados eletroforéticamente em gel de agarose a 2% (p/v) em tampão Tris-Borato-EDTA 0,5X concentrado, contendo 5 µL de corante *GreenSafe Premium* (NZYTech). O gel foi submetido a uma voltagem de 90 V durante 45 min (na cuba de eletroforese para DNA

Mini-Sub®, Sub-Cell, ReadyAgarose™, *Bio-Rad*) e, após este período, foi visualizado a 366 nm, utilizando um transiluminador UV (Bio-Rad Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ Imaging System, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA) acoplado ao Image Lab™ Software (*Bio-Rad*), para a obtenção e tratamento de imagem.

Os fragmentos foram purificados utilizando o kit High Prep™ PCR Clean-up System Kit (MagBio Genomics, Gaithersburg, MD, EUA). Foram adicionados numa placa de 96 poços, 24 µL de esferas magnéticas com 20 µL da amostra de DNA e, após 5 min de incubação à temperatura ambiente, os tubos foram colocados no suporte magnético durante 3 min até a solução ficar transparente. O sobrenadante foi removido e descartado com a pipeta. Procedeu-se a uma dupla lavagem do DNA com etanol a 80%, durante 30 s. Depois de garantido que todo o álcool foi evaporado, os tubos foram retirados do suporte magnético e adicionaram-se 10 µL de tampão Tris pH 8. Estes foram incubados 5 min e foram novamente colocados no suporte durante cerca de 3 min, até a solução ficar transparente. O DNA eluído foi transferido para uma nova placa de 96 poços.

2.1.1.3.3. Indexação

O processo de indexação das amostras foi feito pela adição de indexes e adaptadores de sequenciação a ambas as extremidades da região alvo amplificada adicionando-se 25 µL de MyTaq™ HS Mix 2X (Bioline, Taunton, MA, EUA), 5 µl de cada índice (i7 e i5) (Nextera XT Index Kit, Illumina, San Diego, CA, EUA), 10 µL de água RNase Free e 5 µl do primeiro produto de PCR para um volume total de 50 µL. As condições de PCR envolveram uma desnaturação de 3 min a 95°C, seguida por 8 ciclos de 95°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 30 s, e uma extensão final a 72°C por 5 min.

Os produtos Amplicon PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% (p/v) e os fragmentos amplificados foram purificados, quantificados por fluorimetria e reunidos em concentrações equimolares e emparelhados no MiSeq® de acordo com as instruções do fabricante (*Illumina*) na Genoinseq.

2.1.1.3.4. Preparação da biblioteca de fragmentos e sequenciação

Para a preparação da biblioteca de fragmentos, foi preparado um Pool das amostras indexadas e um controlo de sequenciação (PhiX Control v3, *Illumina*, San Diego, CA, EUA), ambos na concentração de 4 nM.

Desnaturaram-se o Pool e o controlo adicionando NaOH 0,2 M a ambos os tubos e incubando 5 min à temperatura ambiente. Foram realizadas diluições do Pool e do controlo desnaturados para uma concentração final de 10 pM com tampão HT1 (*Hybridization Buffer, Illumina, San Diego, CA, EUA*), de forma a garantir a concentração adequada para que ocorra ligação à célula de fluxo. A biblioteca final foi obtida combinando 510 µL do Pool com 90 µL do controlo. Incubou-se durante 2 min a 96°C, inverteu-se o microtubo duas vezes e manteve-se 5 min no gelo.

A corrida foi realizada usando o MiSeq Reagent nano Kit V2 no Illumina MiSeq System, onde a sequenciação foi realizada utilizando uma configuração 2 × 250 emparelhada; a análise de imagem e a chamada de base foram conduzidas pelo MiSeq Control Software (MCS) diretamente no instrumento MiSeq (*Illumina, San Diego, CA, EUA*). Os *amplicons* foram multiplexados automaticamente pelo sequenciador Miseq® usando o pacote CASAVA (*Illumina, San Diego, CA, EUA*) e filtrados por qualidade com o software PRINSEQ usando os seguintes parâmetros: (a) bases com qualidade média inferior a Q25 numa janela de 5 bases e (b) leituras com menos de 220 bases foram descartadas para amostras V3 – V4 e menos de 100 bases para amostras ITS2. As leituras direta e inversa foram então combinadas por sobreposição de leituras emparelhadas usando o software AdapterRemoval v2.1.5 com parâmetros padrão. O pacote QIIME v1.8.0 foi usado para a geração das OTUs (unidades taxonómicas operacionais), identificação taxonómica e cálculo dos índices de riqueza e diversidade das amostras. Os IDs da amostra foram atribuídos às leituras combinadas e convertidos para o formato rápido (*split_libraries_fastq.py, QIIME*). As leituras combinadas quiméricas foram detectadas e removidas usando o UCHIME contra o banco de dados Greengenes v13.8 para as amostras V3-V4 e UNITE/QIIME ITS v12.11 para amostras ITS2 (*script subscribe_chimeric_seqs.py, QIIME*). As OTUs foram selecionadas num limite de similaridade de 97% usando a estratégia de referência aberta. Primeiro, as leituras combinadas foram pré-filtradas removendo sequências com similaridade inferior a 60% em relação ao banco de dados Greengenes v13.8 para amostras V3-V4 e o banco de dados UNITE/QIIME ITS v12.11 para amostras ITS2; as leituras combinadas restantes foram então agrupadas com 97% de similaridade com os mesmos bancos de dados mencionados anteriormente. As leituras combinadas que não foram agrupadas na etapa anterior, foram agrupadas novamente em OTUs com 97% de similaridade e aquelas com menos de duas leituras foram removidas da tabela. Uma sequência representativa de cada OTU foi então selecionada para atribuição da taxonomia (*pick_rep_set.py, assign_taxonomy.py; QIIME*).

2.1.2. Resultados e Discussão

2.1.2.1. Caracterização e identificação da microbiota colonizadora dos retratos

2.1.2.1.1. Comunidades eucariotas

A microbiota do ar das reservas e galerias de exposição, onde as pinturas são armazenadas e exibidas, respetivamente, tem demonstrado, em estudos anteriores, uma boa correlação com as comunidades fúngicas observadas na superfície das pinturas, indicando a origem aérea das contaminações [60]. Os fungos produzem esporos que podem permanecer aderidos na parte exposta da pintura por longos períodos de tempo, constituindo uma comunidade subaérea que se acumula e pode iniciar a degradação dos seus constituintes [77].

Apresentam-se de seguida os resultados da análise metagenómica feita para os organismos eucariotas, através da sequenciação da região ITS.

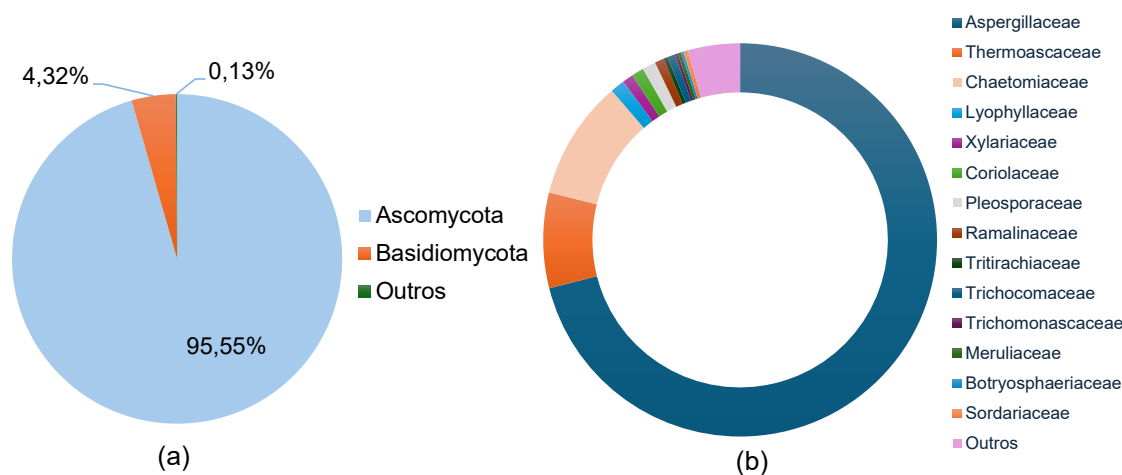


Figura 2.3: Filos (a) e famílias (b) eucariotas predominantes nos retratos

Considerando o conjunto de todas as amostras, ao nível do Filo (Figura 2.3 (a)), Ascomycota foram os microrganismos identificados com maior predominância (95,55%), seguidos de Basidiomycota (4,32%). Os microrganismos com menor representatividade foram classificados em 0,13%.

Relativamente ao nível taxonómico da família (Figura 2.3 (b)), identificaram-se as seguintes: Aspergillaceae (71,04%), Chaetomiaceae (9,83%), Thermoascaceae (7,84%), Lyophyllaceae (1,18%), Pleosporaceae (1,10%), Coriolaceae (1,01%), Xylariaceae (0,89%), Ramalinaceae (0,76%), Trichocomaceae (0,62%), Sordariaceae (0,37%), Tritirachiaceae (0,35%), Meruliaceae (0,29%), Trichomonascaceae (0,25%), Botryosphaeriaceae (0,21%), e 4,26% das famílias foram consideradas como “outros”.

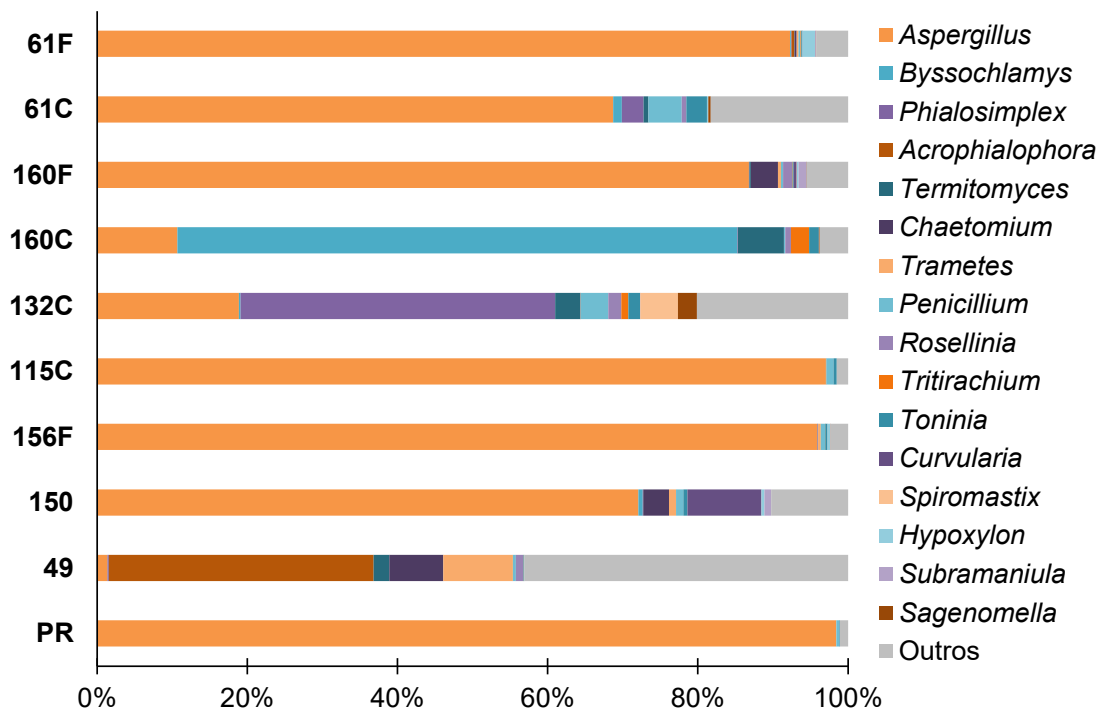


Figura 2.4: Gêneros eucariotas predominantes nos retratos

Considerando o conjunto de todas as amostras, os microrganismos predominantemente identificados (Figura 2.4) nos retratos da Galeria dos Vice-Reis da Índia pertencem ao gênero *Aspergillus* (64,23%). Outros gêneros eucariotas identificados incluíram *Byssochlamys* (7,67%), *Phialosimplex* (4,53%), *Acrophialophora* (3,57%), *Chaetomium* (1,46%), *Termitomyces* (1,24%), *Penicillium* (1,21%), *Trametes* (1,12%), *Curvularia* (1,03%), *Toninia* (0,73%), *Rosellinia* (0,54%), *Spiromastix* (0,50%), *Tritirachium* (0,36%), *Sagenomella* (0,30%), *Hypoxylon* (0,28%) e *Subramaniula* (0,21%). 11,02% dos gêneros foram considerados como minoritários, inseridos na categoria “outros”.

• Quadros da Reserva

Ao nível do gênero, o retrato de **Matias de Albuquerque** (61F, 61C) – pintura sobre madeira - é colonizado majoritariamente pelo gênero *Aspergillus*, constituindo 92,28 e 68,73% da parte exposta e parte inversa do quadro, respectivamente, sendo, portanto, a contaminação por este gênero superior na parte observável da pintura. Estes resultados não são surpreendentes pois este gênero faz parte do conjunto de fungos mais frequentemente documentados em superfícies pintadas, telas e molduras de madeira. A maior densidade e diversidade das comunidades fúngicas na parte exposta

da pintura pode ser resultado da maior quantidade da propagação fúngica por via aérea, que fica depositada na superfície pintada [60].

Este é um género fúngico com elevada capacidade enzimática e com elevado poder de biodeterioração, por isso, representa uma ameaça à conservação dos bens do Património Cultural. As espécies de *Aspergillus* são produtoras de diversas enzimas extracelulares que têm como alvo diferentes substratos entre as quais as ligninases que hidrolisam a lignina (deterioração da madeira) e enzimas celulolíticas responsáveis pela dissolução das fibras de celulose, entre muitas outras. Para além disso, *Aspergillus* spp. têm capacidade de degradar colas e aglutinantes, dissolvendo as tintas e contribuindo para alterações cromáticas das superfícies pintadas e desprendimento do suporte [60]. Há um grande número de espécies deste género que podem crescer em diferentes temperaturas ou condições de humidade relativa, com baixas atividades de água ou na presença de elevadas concentrações de solutos, como o sal [131].

Neste retrato identificaram-se algumas espécies eucariotas do género *Aspergillus* relevantes, como *A. elongatus*, *A. rambellii*, *A. nomius*, *A. pseudonomius*, e *A. piperis*. A título de curiosidade, *A. elongatus* está descrito na literatura como uma nova espécie fúngica detetada pela primeira vez em solos alcalinos de Lucknow, na Índia [132].

Dos restantes géneros, cujas diferenças são consideravelmente menos notórias tem-se *Phialosimplex*, *Penicillium* e *Toninia*. O potencial biodeteriorativo de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., frequentemente originários do ar do interior de locais de conservação do Património, têm sido atribuídos à produção proteolítica, celulolítica e à secreção de pigmentos extracelulares [73].

O género *Hypoxylon*, identificado na parte exposta da pintura (1,68%), também é um género de particular interesse pois é conhecido por ter um crescimento rápido e por ser um colonizador comum de madeira degradada. Faz parte dos fungos ascomicetes pertencentes à família Xylariaceae, de cor preta acastanhada, amplamente distribuído e ecologicamente diverso, que pode desempenhar um papel importante na biodeterioração de madeira, comprometendo a sua integridade estrutural [133–136].

Ao nível do género, verifica-se que o **Retrato de Bispo** – pintura sobre tela colada em madeira - tem diferenças notórias no que respeita aos géneros maioritários colonizadores da parte da frente (160F) e das costas do quadro (160C). As costas do quadro são colonizadas maioritariamente pelo género *Byssochlamys*, com uma abundância relativa de 74,56%. *Byssochlamys* spp. (da família Trichocomaceae) são fungos extremófilos, adaptáveis a condições ambientais adversas, amplamente distribuídos em solos e com elevada capacidade de sobreviver numa ampla gama de

pH e sob condições de baixas pressões de oxigénio [137]. Para além disso, os membros deste género produzem ascósporos que são resistentes ao calor e sobrevivem a períodos consideráveis acima de 85°C [138]. Deste género, identificou-se a espécie *B. spectabilis*, considerado um importante contaminante em ambientes interiores e conhecido por ser identificado em madeira em decomposição. Já foi descrito como estando presente, por exemplo, na superfície de objetos patrimoniais de madeira deteriorados do Museu de Tianjin, através de métodos dependentes e independentes de cultura [139].

Por outro lado, no que diz respeito à parte observável do quadro, o género maioritário, e o único que se destaca, é *Aspergillus* (86,80%), seguido do género *Chaetomium* (3,61%). Destes géneros foram identificadas as espécies *A. nomius*, *A. pseudonomius*, *A. pseudotamarii*, *A. piperis* e *Ch. grande*.

Nas costas do retrato de **Pedro da Silva** (132C), composto por madeira, identificaram-se os géneros maioritários *Phialosimplex* (41,88%) e *Aspergillus* (18,90%).

A presença dominante de *Phialosimplex salinarum* (espécie identificada pelo mesmo método de sequenciação) nesta pintura deteriorada pode ser justificada pelas condições ambientais únicas do local. Goa fica localizada numa zona costeira, o que sugere que apresente elevados níveis de humidade e salinidade, que podem favorecer o crescimento deste fungo halófilo. É frequente que a humidade elevada do ar se infiltre nas paredes do museu e suba por capilaridade, trazendo sais dissolvidos do solo. A infiltração de sais nas paredes e na própria pintura, combinada com a presença de matéria orgânica nos materiais da obra, cria um ambiente propício para a colonização e desenvolvimento de *P. salinarum*. Apesar da falta de estudos específicos sobre este fungo em contexto patrimonial, a literatura existente sobre fungos halófilos e a microbiota de pinturas [75] sugere que estes microrganismos podem desempenhar um papel importante na deterioração de obras de arte em ambientes propícios.

A título de curiosidade, antes de os retratos estarem nesta galeria estiveram no Palácio do Governador, também este monumento perto do mar.

As amostras 156F (pertencente à parte da frente do retrato **José Horta e Costa**) e PR (que corresponde a uma amostra de parede degradada das reservas), ambos relatados no momento da amostragem como estando em mau estado de conservação, devido principalmente à elevada humidade (HR = 100%) do sítio onde se encontravam, exibem um perfil eucariota muito semelhante, sendo o género *Aspergillus* aquele que foi dominante, com uma abundância relativa de 95,93% e 98,43%, respetivamente.

- **Quadros em Exposição**

No retrato de **Lopo Vaz de Sampaio**, com a identificação nº 49 (pintura sobre madeira), ao nível do género, predomina *Acrophialophora* (35,25%), sendo que *Chaetomium* (7,19%) e *Trametes* (9,28%) também estão representados.

Através de sequenciação da região ITS rRNA foi igualmente possível identificar uma espécie do género maioritário, *A. fusispora*, que é um fungo termotolerante ainda pouco estudado, frequentemente encontrado no solo, ar e várias plantas. Tem capacidade de produzir grandes quantidades de celulases e xilanases [140]. O fungo foi identificado como um microrganismo patogénico de plantas e animais e foi recentemente reconhecido como um microrganismo patogénico humano oportunista. Curiosamente, segundo Ghosh *et al.* (2020), *A. fusispora* tem preferência por solos mais profundos (30-45 cm) na Índia e já foi identificada nesse mesmo país em vários casos clínicos como causadora de ceratite, infeções pulmonares e infeções do sistema nervoso central [141].

Os membros da família Chaetomiaceae (e género *Chaetomium*) são sugeridos como o terceiro contaminante fúngico de ambientes interiores mais comum, identificado em edifícios com elevado teor de humidade, causando problemas tanto a nível da própria estrutura edificada como problemas de saúde humana. Quanto a este último, tem sido descrito como importante alérgeno inalante, contribuindo para o desenvolvimento dos sintomas de rinite e asma, devido à produção de micotoxinas, e compostos orgânicos voláteis microbianos, bem como a libertação de ascósporos e fragmentos de hifas em ambientes interiores [142]. Como fungos que degradam a celulose, possuem a capacidade de degradar materiais de construção celulósicos com teor de humidade elevado, como madeira e contraplacado, e materiais de construção sintéticos, como plástico ou gesso. Os materiais de construção húmidos ficam dominados pela colonização e origina-se um micélio denso que cobre a maior parte dos materiais, danificando assim a sua estrutura [143].

Na literatura está documentada a capacidade de *Chaetomium* sp. de colonizar amostras de tinta produzindo micélios, conídios e corpos de frutificação. *In-vitro*, esses fungos exibiram elevado potencial para utilizar a fina camada de tinta poliacrílica e atividades enzimáticas significativas de celulase, lipase e urease que podem desempenhar um papel importante na degradação da tinta [144]. *Chaetomium* está, segundo a literatura, entre os agentes de deterioração mais comuns em pinturas. Sendo proteolíticos e celulolíticos, favorecidos por substratos ricos em nutrientes, foram descritos como os microfungos mais frequentes nos frescos do Mosteiro de São Damião

em Assis (Itália) e em frescos de uma igreja sérvia. Além disso, uma comunidade de espécies de *Chaetomium* foi identificada em pinturas murais medievais na Estíria (Áustria), formando manchas de cores diferentes [145].

Além de colonizar materiais de construção, os membros do género *Chaetomium* também são conhecidos por produzir mais de 500 metabólitos bioativos, dos quais são exemplo as micotoxinas [143].

Muitas espécies de fungos *white-rot* têm ganho destaque, tanto em áreas académicas quanto industriais, devido às suas atividades ligninolíticas na natureza. O género *Trametes*, que constitui 9,28% desta amostra, é um dos organismos modelo para a degradação da madeira, tendo capacidade de decompor a celulose, hemicelulose e lignina na madeira, e produção de enzimas lignocelulolíticas, particularmente a lacase, tendo uma distribuição ubíqua em todos os continentes [146,147].

O retrato de **Pedro Almeida**, com a identificação nº 150, é uma pintura sobre madeira, e as costas do quadro apresentavam uma mancha preta no momento da amostragem. Ao nível do género, é claramente perceptível a predominância do género *Aspergillus*, que constitui 72,1% do microbioma das costas do retrato, bem como *Curvularia* (9,84%) e *Chaetomium* (3,46%) igualmente presentes.

Das espécies identificadas neste quadro inclui-se *Aspergillus pseudotamarii* e *Aspergillus piperis*. A espécie fúngica *A. piperis* pertence à seção de fungos de *Aspergillus* pretos Nigri [148]. *A. pseudotamarii* pertence à seção de fungos Flavi e é caracterizado por uma coloração castanho a castanho-escuro [149]. Dado as características destes dois fungos identificados nesta amostra, e tendo em conta que as costas do quadro apresentavam manchas pretas, sugere-se que a contaminação observada possam ser biofilmes fúngicos e que seja uma possível explicação para o aparecimento desta coloração.

Por fim, a amostra das costas do quadro de **Pedro Lencastre** (115C) é maioritariamente constituído pelo género *Aspergillus* (97,06%).

Analisando as diferenças observadas entre as obras em exposição e em reserva, estas parecem estar associadas às condições ambientais e ao tipo de suporte. Nos quadros em exposição (150, 49, 115), caracterizados por valores de humidade mais baixos (12,6-14,0%), verificou-se maior dominância de *Aspergillus*, com exceção do quadro 49, que apresentou maior diversidade de géneros. Já nas obras em reserva (156, 160, 132, 61), expostas a um ambiente com elevada humidade relativa - chegando a 100% na parede da reserva - e com valores de humidade interna mais altos em alguns

casos (17,2% no 61 e 18,1% no 132), registou-se uma comunidade microbiana mais variável, incluindo predominância de *Byssochlamys* e *Phialosimplex*, ambos géneros associados a tolerância ou preferência por condições mais húmidas.

Quanto ao tipo de suporte, os quadros sobre madeira mostraram tendência para predominância de *Aspergillus*, possivelmente favorecida pela estabilidade física e menor retenção de água do suporte, enquanto os quadros sobre tela exibiram padrões mais distintos: o retrato 156, que apresenta baixa diversidade, foi quase exclusivamente dominado por *Aspergillus*, enquanto o 160 apresentou um perfil diverso e dominância de *Byssochlamys*, compatível com o seu teor de humidade intermédio (13,6%) e com a maior permeabilidade do suporte têxtil. Estes resultados sugerem que a elevada humidade no ambiente de reserva, combinada com as propriedades físicas do suporte, influencia fortemente a composição microbiana, promovendo a emergência de géneros mais adaptados a condições húmidas.

Curiosamente, também é de destacar que há muitos fungos identificados nestas pinturas anteriormente descritas, que são produtores de micotoxinas (metabolitos secundários), entre os quais *A. nomius* [150,151], *A. piperis* [152], *A. pseudonomius* [153], *A. pseudotamarii* [154], *A. rambellii* [155] e *B. spectabilis* [155].

As **micotoxinas** têm sido sugeridas como uma das principais causas possíveis dos problemas de saúde observados em edifícios monumentais biodeteriorados por fungos [156].

Estas são metabólitos secundários alergénicos e/ou toxigénicos conhecidos por serem mutagénicos, imunossupressores, teratogénicos, carcinogénicos ou citotóxicos. A sua produção depende do tipo de substrato disponível, temperatura, humidade, entre outros. Esses metabólitos são excretados no substrato ou podem estar presentes nas células fúngicas e podem ser transportados pelo ar na poeira ou dentro de conídios ou fragmentos de esporos. Vários estudos abordaram a ocorrência de micotoxinas no interior dos edifícios, principalmente aqueles com problemas de humidade, mas poucos relatos têm sido focados em ambientes contaminados do Património Cultural, como bibliotecas, museus e galerias [115]. É de destacar que, sendo metabólitos secundários fúngicos, significa que a sua produção não está necessariamente correlacionada com o crescimento e proliferação das espécies produtoras, por isso, embora alguns fungos possam crescer em quase todos os materiais de construção naturais ou sintéticos, a produção de micotoxinas ocorre preferencialmente em materiais que permitem o crescimento desses fungos e fornecem as condições para a produção destes metabólitos [157].

O impacto da toxicidade do ar no interior dos monumentos é frequentemente negligenciada. As micotoxinas podem estar presentes no ar, ligadas a esporos de fungos ou a fragmentos desses microrganismos, por exemplo, conídios e hifas fragmentadas. Essas partículas podem permanecer suspensas no ar por muito tempo e a sua inalação pelos humanos já demonstrou provocar doenças alérgicas (asma, rinite alérgica, pneumonite de hipersensibilidade), infecciosas e tóxicas, causando uma disfunção significativa do sistema imunitário do indivíduo [158,159].

Assim, a libertação destes metabolitos secundários pelas espécies referidas anteriormente pode constituir um risco acrescido à saúde dos visitantes e trabalhadores da galeria, caso ocorra efetivamente a produção e libertação destes metabolitos secundários.

Embora ainda não existam muitos estudos que comprovem que as micotoxinas podem ter influência destrutiva nos materiais do património, sabe-se que a biodeterioração química dissimilatória inclui processos nos quais o material é danificado como resultado da produção e libertação de produtos metabólicos pelos microrganismos [160,161]. Dado que as micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por fungos, não se exclui a hipótese de que possam contribuir para a deterioração, embora ainda sejam necessários mais estudos nesta área.

2.1.2.1.2. Comunidades procariotas

Os resultados de metagenómica referentes às comunidades procariotas que colonizam os retratos encontram-se representados na Figura 2.5 - mostrando a diversidade microbiana ao nível do Filo (a) e Família (b) - e na Figura 2.6, que evidencia a distribuição por géneros, a abundância relativa e os grupos predominantes.

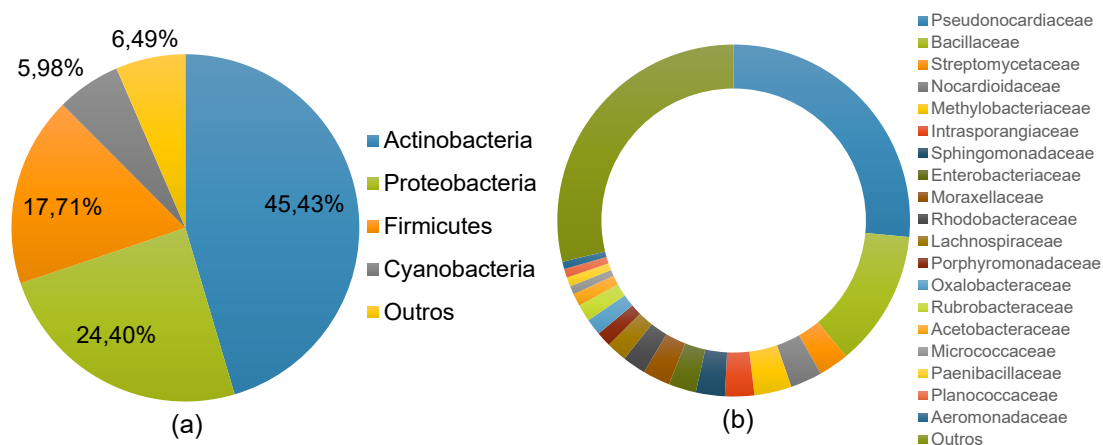


Figura 2.5: Filos (a) e famílias (b) procariotas predominantes nos retratos

Considerando o conjunto de todas as amostras consideradas para o estudo, o filo procariota predominantemente identificado (Figura 2.5 (a)) foi Actinobacteria (45,43%), seguido de Proteobacteria (24,40%), Firmicutes (17,71%), Cyanobacteria (5,98%) e 6,49% dos filios foram considerados como “outros” (designação genérica utilizada para referir os microrganismos com reduzida representatividade).

As principais famílias procariotas identificadas (Figura 2.5 (b)) foram Pseudonocardiaceae (26,50%), Bacillaceae (12,52%), Methylobacteriaceae (3,42%), Nocardioideaceae (2,91%), Streptomycetaceae (2,76%), Intrasporangiaceae (2,68%), Sphingomonadaceae (2,66%), Enterobacteriaceae (2,52%), Moraxellaceae (2,51%), Rhodobacteraceae (2,16%), Lachnospiraceae (1,88%), Rubrobacteraceae (1,56%), Oxalobacteraceae (1,52%), Porphyromonadaceae (1,37%), Acetobacteraceae (1,15%), Paenibacillaceae (0,85%), Planococcaceae (0,80%), Micrococcaceae (0,78%) e Aeromonadaceae (0,68%). 28,77% das famílias foram consideradas como “outros”.

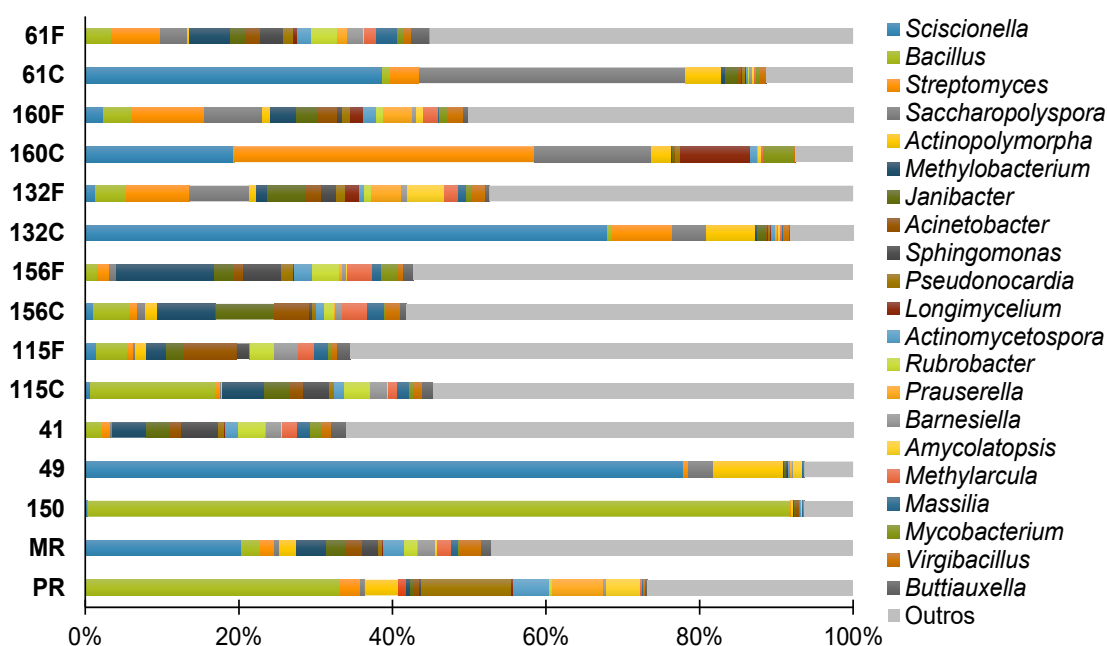


Figura 2.6: Gêneros procariotas predominantes nos retratos

Sciscionella (15,45%) foi o principal gênero procariota identificado (Figura 2.6). *Bacillus* (11,27%), *Streptomyces* (5,67%), *Saccharopolyspora* (5,34%), *Methylobacterium* (3,26%), *Actinopolymorpha* (2,33%), *Janibacter* (2,32%), *Acinetobacter* (1,80%), *Sphingomonas* (1,57%), *Rubrobacter* (1,48%), *Pseudonocardia* (1,38%), *Actinomycetospora* (1,36%), *Methylarcula* (1,30%), *Prauserella* (1,13%), *Virgibacillus* (1,04%), *Barnesiella* (1,03%), *Longimycelium* (0,96%), *Massilia* (0,94%), *Amycolatopsis* (0,88%), *Buttiauxella* (0,81%) e *Mycobacterium* (0,79%) foram

igualmente identificados e 37,89% foram considerados como “outros” gêneros minoritários.

- **Quadros das Reservas**

Como dito anteriormente, o quadro 61 corresponde ao retrato de **Matias de Albuquerque** (pintura sobre madeira). Observa-se notoriamente que a frente (61F) e as costas do quadro (61C) são constituídos por gêneros bacterianos distintos e que a sua percentagem de abundância relativa varia consideravelmente.

Os gêneros *Sciscionella* e *Saccharopolyspora* são os principais colonizadores da parte inversa do quadro, constituindo 38,7% e 34,7% da amostra, respetivamente. Pelo contrário, a parte da frente é maioritariamente constituída pelo género *Streptomyces* (6,4%) e *Methylobacterium* (5,4%).

Do género predominante neste retrato, a sequenciação da região V3-V4 do gene 16S rRNA permitiu identificar também a espécie *Sciscionella marina*, uma espécie bacteriana marinha, novo membro da família Pseudonocardiaceae, isolado de uma amostra de sedimento marinho; é uma espécie Gram-positiva e aeróbica, cujas colónias são amarelo-esbranquiçadas na maioria dos meios testados [162].

Também o quadro da amostra 132, que representa o retrato de **Pedro da Silva**, é constituído por madeira dos 2 lados do quadro.

As costas do quadro (132C) são colonizadas maioritariamente pelo género *Sciscionella*, que representa 68,0% do microbioma. Destacaram-se também os gêneros *Streptomyces* (7,9%), *Saccharopolyspora* (4,4%) e *Actinopolymorpha* (6,4%). Por outro lado, na parte da frente do quadro (132F) alguns dos gêneros identificados incluíram *Bacillus* (4,0%), *Streptomyces* (8,2%), *Saccharopolyspora* (7,8%), *Methylobacterium* (1,4%), *Acinetobacter* (2,1%), *Janibacter* (5,0%), *Amycolatopsis* (4,9%), *Prauserella* (4,0%) e *Virgibacillus* (1,9%).

Virgibacillus halodenitrificans é uma espécie halotolerante e anaeróbia identificada na parte da frente do quadro [163] que, segundo Favez *et al.* (2022), é uma potente bactéria produtora de carotenóides, já demonstrando anteriormente produzir algumas colónias com coloração alaranjada, enquanto outras apresentaram coloração creme e rosada. A técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa confirmou que os carotenóides examinados eram compostos de β -caroteno e luteína [164].

V. halodenitrificans foi uma das bactérias halofílicas identificadas como colonizadora de materiais das Catacumbas dos Capuchinhos em Palermo (Itália). Para além de ter sido demonstrada uma elevada atividade proteolítica, este microrganismo produziu colónias amarelas, deteriorando os materiais pelo aparecimento de manchas dessa mesma coloração [165]. No estudo de López-Miras *et al.* (2013), *Virgibacillus* sp. foi detetado na parte exposta da pintura 'Cristo de la Paciencia', no convento de San Antón (Granada, Espanha), que apresentava sinais de biodeterioração [166].

Relativamente ao quadro 160 do **Retrato de Bispo**, constituído por tela colada em madeira, nas costas do quadro (160C) predomina o género bacteriano *Streptomyces* (39,11%). Os géneros *Sciscionella* (19,25%), *Saccharopolyspora* (15,20%) e *Longimycelium* (9,23%) têm igualmente uma abundância relativa considerável. Na parte observável do quadro (160F), os dois géneros identificados como predominantes foram *Streptomyces* (9,47%) e *Saccharopolyspora* (7,53%).

Streptomyces é um dos géneros bacterianos relatados com maior potencial biodeteriogeno no Património Cultural, incluindo pinturas. Estes actinomicetes são caracterizados pela capacidade de obter nutrientes de fontes ostensivamente pobres devido à sua capacidade de produzir uma ampla gama de enzimas que podem decompor polímeros naturais complexos, fornecendo assim uma fonte rica de carbono e nitrogénio para o seu crescimento e colonização. Um dos principais mecanismos usados na deterioração por esta espécie é a produção de biopigmentos. *Streptomyces* spp. resistem a condições ambientais adversas, como hipersalinidade e falta de nutrientes, produzindo este tipo de pigmentos que causam manchas coloridas nas pinturas. Geralmente, estas espécies são capazes de produzir: melanina com cores que vão do castanho ao verde-oliva; carotenóides com as cores vermelha, violeta, rosa e ainda pigmentos azuis relacionados à actinorodina. Além de alterarem a cor da superfície, esses biopigmentos resistem à degradação química e enzimática, sendo considerados inaceitáveis do ponto de vista estético numa pintura [167].

Neste retrato, identificaram-se espécies bacterianas marinhas como *Streptomyces nanshensis*, *Sciscionella marina* e *Saccharopolyspora ghardaiensis*.

S. ghardaiensis é uma bactéria extremamente halofílica cujo desenvolvimento se evidencia na presença de 15–25% (p/v) de NaCl, sendo que a ausência de NaCl inibe o desenvolvimento bacteriano. Produz um micélio aéreo abundante, bem desenvolvido e fragmentado, que forma longas cadeias de esporos em forma de bastonete. O micélio do substrato é de cor laranja avermelhado escuro [168]. Este género é conhecido pela

sua relevância na indústria farmacêutica e é frequentemente descrito em sedimentos costeiros e marinhos [169].

De acordo com Duan *et al.* (2017), cujo estudo se baseou nas características da comunidade microbiana de antigas esculturas pintadas em Maijishan Grottoes (China), o género *Saccharopolyspora* foi dos mais frequentemente identificados como biodeteriogenos das pinturas [170]. Gurtner *et al.* (2000) identificaram igualmente *Saccharopolyspora* em pinturas murais deterioradas na capela de um castelo austríaco (Herberstein, Áustria) e de uma igreja alemã (Greene, Alemanha) [171].

A parte da frente e a parte inversa do quadro 156, correspondente ao retrato de **José Horta e Costa**, constituído por tela dos dois lados, têm uma composição microbiana muito semelhante, cujo principal género identificado foi *Methylobacterium*, com 12,77% e 7,58% de abundância relativa, na parte da frente e nas costas do retrato, respetivamente. Outros géneros de destaque são *Bacillus*, *Janibacter*, *Sphingomonas*, *Rubrobacter* e *Methylarcula*.

Membros do género *Methylobacterium* são omnipresentes e desempenham funções cruciais em ambientes naturais e artificiais. Este género possui uma enorme capacidade de produção de biofilmes, são microrganismos produtores de pigmentos e frequentemente colonizadores de bens patrimoniais. Outros estudos demonstraram que este género apresenta elevada tolerância a diversos fatores de *stress* (como resistência a elevadas temperaturas, secagem, salinizações e agentes desinfetantes), principalmente em condições de extrema limitação de nutrientes, dificultando a remoção de biofilmes já formados por esses microrganismos [172–174].

Relativamente às **amostras MR e PR**, correspondem à madeira degradada das reservas e à parede degradada que se recolheu, respetivamente. As comunidades procariotas são consideradas dos principais agentes de deterioração de materiais em madeira, de importância histórica e cultural, particularmente aquelas recuperadas de ambientes com pouca disponibilidade de oxigénio [175]. Os principais microrganismos colonizadores da madeira degradada foram do género *Sciscionella* (20,3%), enquanto na parede degradada, predominaram os géneros *Bacillus* (33,4%) e *Pseudonocardia* (11,8%).

A importância da análise da madeira que compõe as costas dos quadros está relacionada aos restauros periódicos para fazer face aos efeitos adversos do clima subtropical sobre a estrutura de madeira que suporta as pinturas.

Quando falamos de deterioração de materiais de madeira por microrganismos procariotas, devemos ter em conta as identidades dos fungos que também a degradam, pois atualmente existem evidências de que os fungos influenciam fortemente a comunidade bacteriana. Por outro lado, foi sugerido anteriormente noutros estudos que a atividade bacteriana nas primeiras fases de decomposição torna a madeira mais acessível aos fungos [176]. As bactérias envolvidas na degradação da madeira podem dividir-se em vários grupos, dependendo do papel que desempenham na deterioração da mesma: (i) aquelas que afetam a permeabilidade, mas geralmente não causam perda de resistência (como *Bacillus* e *Methylobacterium*); (ii) aquelas que atacam a estrutura da madeira, degradando celulose ou outros polímeros (*Streptomyces*, *Saccharopolyspora*); (iii) aquelas que atuam sinergicamente com outras bactérias ou fungos para decompor a madeira (*Bacillus*, *Actinopolymorpha*, *Pseudonocardia*); e (iv) colonizadores passivos que não degradam diretamente a madeira, mas podem modular a comunidade microbiana, competindo ou produzindo compostos (*Rubrobacter*, *Sphingomonas*) [177].

- **Quadros em Exposição**

No retrato de **Pedro Lencastre** (amostra 115), o principal género colonizador é o género *Bacillus*, onde reside a principal diferença de abundância relativa entre as costas (16,3%) e a frente (4,0%) do quadro, seguido dos géneros *Methylobacterium*, *Acinetobacter* e *Rubrobacter*.

O género *Bacillus* é reportado na literatura como tendo potencial significativo de degradação de vários componentes que fazem parte da constituição de pinturas de cavalete [77,178]. As bactérias pertencentes a este género são conhecidas pela sua capacidade de formar endósporos resistentes a condições ambientais adversas, tornando-as particularmente ubíquas e persistentes em diversos ambientes, incluindo aqueles associados a obras de arte, como as pinturas de cavalete [179]. Algumas espécies podem metabolizar componentes orgânicos, como aglutinantes (óleos, gomas, proteínas), pigmentos orgânicos, vernizes e adesivos. A sua atividade metabólica pode levar à alteração da cor, perda de adesão, formação de biofilmes e degradação da matriz polimérica. Por outro lado, o seu metabolismo pode gerar produtos ácidos ou alcalinos, capazes de corroer pigmentos inorgânicos. Além disso, a formação de biofilmes por estes microrganismos pode reter humidade e sujidade na superfície da pintura, criando microambientes que favorecem o desenvolvimento de outros microrganismos com potencial de deterioração, como os fungos [85,180].

O único género de maior destaque no quadro de **Pedro de Almeida** (amostra 150) é o género *Bacillus*, constituindo 91,5% da microbiota bacteriana presente na pintura. A espécie identificada deste género foi *Bacillus aryabhatai*, uma espécie resistente à radiação UV e halotolerante [181], com capacidade de formar biofilmes em condições de elevada salinidade [182].

O género com maior abundância relativa no retrato de **Lopo de Vaz Sampaio** (amostra nº 49) foi identificado como *Sciscionella* (77,9%), seguido de *Actinopolymorpha* (9,0%) e *Saccharopolyspora* (3,3%).

E, por fim, no quadro de **Vasco da Gama** (amostra 41) foram identificados principalmente os géneros procariotas *Bacillus* (2,11%), *Methylobacterium* (4,50%), *Janibacter* (2,98%), *Sphingomonas* (4,77%), *Rubrobacter* (3,42%), *Barnesiella* (2,06%) e *Methylarcula* (2,00%). Curiosamente, este quadro foi restaurado nos anos 50 do século XX, com aplicação de ceras ou cera-resina e no momento da amostragem, apresentava manchas esbranquiçadas na zona inferior.

Deve-se observar que os componentes utilizados nos restauros históricos, como ceras ou resinas, envelhecem com o passar do tempo, o que pode levar ao aparecimento de manchas ou eflorescências superficiais, resultantes da migração de componentes para a superfície ou de alterações físico-químicas dos próprios materiais originando depósitos esbranquiçados.

A análise metagenómica revelou a presença dos géneros citados em cima, que são microrganismos muitas vezes associados a ambientes ricos em compostos orgânicos e, em determinados casos, eles estão associados à biodeterioração de pintura, de camadas protetoras e de materiais sintéticos. Esses microrganismos podem adaptar-se e crescer em superfícies revestidas por ceras ou resinas, utilizando-as como substrato alimentar, principalmente em ambientes com elevada humidade, como é o caso desta galeria. Assim, é provável que as manchas observadas resultem de uma combinação de fatores: alterações físico-químicas das ceras/resinas envelhecidas e colonização microbiana subsequente, sendo que as ceras aplicadas no restauro poderão ter funcionado como substrato para o desenvolvimento dos géneros detetados.

Por fim, se compararmos os retratos do ponto de vista do tipo de suporte e do local onde se encontram, observa-se que esses fatores podem ter alguma influência nas comunidades procariotas, pois existem algumas diferenças a ter em conta.

Nos procariotas, os quadros em exposição apresentaram comunidades menos diversas (com predominância de um ou dois gêneros específicos, como é o caso da amostra 150 e 49) frequentemente dominadas por um número reduzido de táxons, em especial nas obras com valores de humidade mais baixos, entre 9,12–14,0%. Apenas algumas peças expostas, como o quadro 41, exibiram uma composição mais equilibrada entre diferentes grupos bacterianos.

Nos quadros de reserva, observou-se maior heterogeneidade, com perfis microbianos que variaram entre predominância marcada de um único grupo (como 132C) e distribuições mais diversificadas, como por exemplo as amostras 160 e 156. Esta variação parece estar relacionada com os níveis de humidade: peças com valores mais elevados (18,1 e 17,2% para os retratos 132 e 61, respetivamente) apresentaram comunidades distintas e potencialmente mais adaptadas a condições húmidas, enquanto amostras associadas a substratos com humidade extrema (100%), como a parede da reserva, exibiram perfis muito específicos e diferentes dos restantes.

Quanto ao tipo de suporte, os retratos sobre madeira tenderam a apresentar comunidades mais estáveis e menos diversas, possivelmente devido à menor permeabilidade e retenção de água deste material. Já os retratos sobre tela (amostras 156 e 160) mostraram uma composição mais variável, incluindo a presença de actinobactérias (*Streptomyces*, *Actinopolymorpha*), o que poderá estar associado à maior porosidade do suporte, favorecendo diferentes grupos bacterianos consoante as condições ambientais. Estes resultados reforçam a influência combinada da humidade e do suporte na estrutura das comunidades microbianas.

Resumidamente, o estudo das pinturas da Galeria dos Vice-Reis mostrou que tanto o tipo de suporte como as condições ambientais influenciam a composição das comunidades microbianas. Demonstrou-se claramente a predominância de fungos com elevado potencial de deterioração, sobretudo do filo Ascomycota, em interação com bactérias adaptadas ao contexto ambiental de Goa. Estes resultados reforçam a relevância da caracterização microbiológica como base para compreender os riscos de biodeterioração em coleções expostas e em reserva.

2.2. Perfil microbiano e estratégias de mitigação em pinturas das reservas do Museu Nacional de Arte Antiga (MNA)

O MNA situado em Lisboa (Portugal) encontra-se no palácio conhecido como Palácio de Alvor-Pombal, que remonta aos finais do século XVII, mandado construir por D. Francisco de Távora, primeiro conde de Alvor. Este museu alberga a mais relevante coleção pública portuguesa de obras de referência do património artístico mundial, entre pintura, escultura, ourivesaria e artes decorativas. Composto por mais de 40 000 itens, o acervo do MNA compreende o maior número de obras classificadas pelo Estado como “tesouros nacionais”. Isso recorda-nos o valor histórico, icónico e artístico destas obras, sublinhando a importância de estudos como este para colaborar na sua conservação e garantir a sua fruição pelas gerações futuras.

O presente caso de estudo teve como objetivo caracterizar a comunidade microbiana presente em algumas pinturas selecionadas do MNA, confirmando a contaminação através de Microscopia Eletrónica de Varrimento com Canhão de Emissão de Campo (FEG-SEM) e avaliar o seu impacto na integridade das mesmas. Adicionalmente, foram realizados ensaios com antimicrobianos para fornecer informação que possa auxiliar os conservadores-restauradores numa eventual intervenção de preservação dessas obras.

2.2.1. Metodologia

2.2.1.1. Amostragem




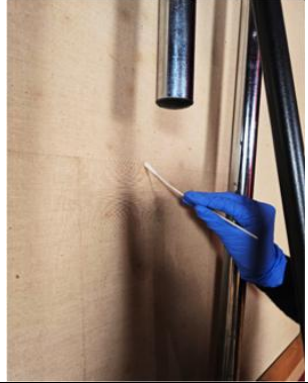
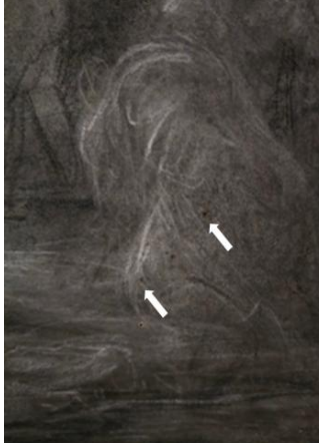

O processo de amostragem foi realizado no MNA, localizado em Lisboa, Portugal (38° 42' 16,6" N, 9° 09' 42,5" O), em algumas pinturas selecionadas (Tabela 2.3), com evidências de biodeterioração, pertencentes às reservas do museu.

As microamostras foram recolhidas através de métodos não invasivos, em condições controladas de semi-esterilidade, utilizando zaragatoas estéreis nas áreas com sinais visíveis de deterioração microbiana, como biofilmes superficiais, manchas, alterações de pigmento ou deformações do suporte da pintura. A amostragem seguiu princípios de ética na conservação, recolhendo apenas a quantidade mínima necessária, de forma a não comprometer a integridade estrutural ou estética da obra. Procedimentos microinvasivos, como a utilização de bisturis estéreis, foram aplicados exclusivamente em fragmentos do suporte das pinturas que não podiam ser

Biodeterioração em Pintura Antiga









preservados. Após a recolha, as microamostras foram armazenadas a 4°C durante o transporte e até ao momento da análise laboratorial.

Tabela 2.3: Processo de amostragem nas pinturas selecionadas do MNAA

Pintura	Amostra	Evidência biodeterioração	Amostragem
“A Descida da Cruz”, de Domingos Sequeira (Pintura de papel colado em tela)	MNAA_A1 (frente)		
	MNAA_A4 (verso)		
“Adoração aos Reis Magos”, de Domingos Sequeira (Pintura de papel colado em tela)	MNAA_AM1 (frente)		

(continua)

Tabela 2.3 (continuação)

Pintura	Amostra	Evidência biodeterioração	Amostragem
<p>“Adoração aos Reis Magos”, de Domingos Sequeira (Pintura de papel colado em tela)</p>	<p>MNAA_AM2 (frente)</p>		
<p>Nossa Senhora Com o Menino (Pintura sob tábua)</p>	<p>1727_A1 (frente)</p>		
<p>Santa Isabel Da Hungria Curando Tínicosos (Pintura sob madeira)</p>	<p>1252_A1 (frente)</p> <p>1252_A3 (verso)</p>	 	 

2.2.1.2. Detecção de contaminação microbiana

A deteção de contaminação microbiana nos microfragmentos do suporte recolhidos da pintura nº 1252 (Figura 2.7), foi realizada utilizando um FEG-SEM Tescan Clara (Tescan, Brno, República Checa), após as amostras terem sido previamente metalizadas com crómio. A observação foi feita nas seguintes condições: tensão de aceleração de 5 kV, corrente do feixe de 130 pA, alto vácuo no interior da câmara, distância de trabalho de 10 mm e aquisição de imagens recorrendo ao detetor de eletrões secundários (Everhart-Thornley).



Figura 2.7: Microamostra do suporte da pintura 1252 para análise FEG-SEM

2.2.1.3. Métodos dependentes de cultura

2.2.1.3.1. Isolamento dos microrganismos

As amostras recolhidas por zangaratoa foram inoculadas assepticamente em Malte Extrato Agar (MEA, HIMEDIA – extrato de malte 20 g/L, glucose 20 g/L, peptona 1 g/L e ágar 20 g/L). As placas foram seladas com parafilme e incubadas a 28°C durante 7 a 14 dias para crescimento dos fungos. Para detetar crescimento microbiano lento, as placas de Petri inoculadas permaneceram em incubação por mais tempo, até 30 dias e monitorizadas periodicamente. As estirpes puras foram obtidas após subculturas sucessivas das colónias que cresceram nesse período. A identificação dos isolados fúngicos foi baseada em características macroscópicas e microscópicas, como textura e cor das colónias, morfologia das hifas e estruturas reprodutivas. Estes foram identificados com base na sequenciação da região ITS. Estirpes de fungos isoladas das

pinturas foram catalogadas e armazenadas na coleção de culturas do Laboratório Colégio Luís António Verney-Biotech-HÉRCULES, Universidade de Évora, e foram mantidas em meio glicerol-MEA a 4°C.

2.2.1.3.2. Extração do DNA fúngico isolado

De modo a promover a lise celular ressuspenderam-se as células fúngicas em 700 µL de solução tampão de lise (Tris-HCl – 50 mM, NaCl – 250 mM, EDTA – 50 mM, SDS – 0,3%, pH 8) com a adição de microesferas (425 – 600 nm de diâmetro). Após agitação (em ciclos de 30 s gelo/vórtex) a suspensão foi colocada a incubar a 65°C durante 60 min. O sobrenadante da suspensão foi obtido por centrifugação a 14 000 rpm durante 10 min a 4°C. Após se recolher o máximo de sobrenadante para outro microtubo de 2 mL, a este foi adicionado 700 µL de solução padrão de TE (tampão de extração) com RNase (ribonuclease) (50 µg/mL), e colocado a incubar a 37°C, durante 60 min, de modo a solubilizar os ácidos nucleicos. Após este período de incubação foi adicionado à mistura 500 µL de uma solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), promovendo a mistura de fases por inversão e efetuou-se uma centrifugação a 10 000 rpm durante 10 min. Adicionou-se tampão acetato de sódio 3 M (pH 5,2) frio, na proporção de 1:10 do volume de sobrenadante, misturando-se novamente por inversão do tubo. De seguida, de forma a promover a precipitação do DNA, adicionou-se 2,5 volumes de etanol absoluto frio (-20°C). O sedimento de DNA foi obtido por centrifugação a 13 000 rpm durante 15 min e foi, posteriormente, lavado com 1 mL de etanol a 70% (v/v), tendo sido adicionado lentamente junto à parede do microtubo de forma a não danificar a amostra de DNA.

Centrifugou-se a 10000 rpm durante 10 min, retirando-se o máximo de sobrenadante. Os tubos foram abertos na câmara de fluxo laminar durante 5 a 10 min, para a evaporação de vestígios de etanol. Posteriormente, procedeu-se à solubilização dos ácidos nucleicos com 100 µL de solução tampão TE e armazenamento das amostras a 4°C.

2.2.1.3.3. Quantificação do DNA

As amostras de DNA obtidas foram quantificadas por espectrofotometria UV-Vis utilizando um espectrofotómetro Multiskan® GO (Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia) e uma placa Thermo Scientific µDrop Plate MultiScan Go, acoplado a um *software* SkanTY RE for MultiScan 3.2. A concentração de DNA e o grau de pureza foram determinados pela quantificação da densidade ótica (OD – *optical density*) a 260 nm e pelo cálculo da razão de OD 260 nm/280 nm, respetivamente.

2.2.1.3.4. Amplificação e Sequenciação Sanger do DNA dos fungos

O DNA genómico foi amplificado na região ITS utilizando os primers universais ITS1 5'-(TCC GTA GGT GAA CCT GCG G)-3' e ITS4 5'-(TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC)-3', para organismos eucariotas.

As reações de PCR foram realizadas num volume de reação de 25 µL contendo 1 µL de DNA genómico e 24 µL de uma mistura reacional composta por 2,5 µL de tampão de reação 10 x NZYBuffer U (NZYTech, Lisboa, Portugal), 1,25 µL de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µL de mistura de dNTPs (2 mM), 0,1 µL de cada primer (0,5 µM) e 0,2 µL de NZYTaq II DNA polymerase (NZYTech, Lisboa, Portugal). A amplificação de eucariotas incluiu uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 min seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C a cada 60s; *annealing* a 50°C por 60s e extensão a 72°C por 2 min. A reação foi concluída com uma extensão de 6 min a 72°C.

Os produtos Amplicon PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% (p/v) e os fragmentos amplificados foram posteriormente purificados e sequenciados pelo serviço de *outsourcing* STAB VIDA (Lisboa, Portugal). As sequências de nucleótidos foram alinhadas com aquelas recuperadas dos bancos de dados GenBank (NCBI: *National Center for Biotechnology Information*) para a análise de homologia usando o programa *Basic Local Alignment Search Tool* Nucleotide-BLASTN 2.17.0 ([//blast.ncbi.nlm.nih.gov](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov)). A identificação taxonómica dos isolados foi realizada com base na maior similaridade obtida, considerando-se valores de identidade iguais ou superiores a 97% para atribuição ao nível do género. As sequências foram depositadas no banco de dados NCBI através do repositório GenBank com o Bioproject SUB15689019 (Biosamples PX449040-PX449041).

2.2.1.4. Análise metagenómica por NGS

2.2.1.4.1. Extração e Sequenciação de DNA

Para o estudo de comunidades microbianas complexas sem isolamento prévio de microrganismos, o DNA metagenómico foi extraído utilizando o Kit NZY Soil gDNA Isolation (NZYTech, Lisboa, Portugal; Catálogo MB21802). As amostras foram colocadas a incubar em agitação, durante 48 h, com 700 µL de soro fisiológico. Após esse período, agitaram-se os tubos levemente no vórtex e retiraram-se 500 µL da solução de amostra para o tubo que já contém as esferas (NZYSpin Soil Bead Tube), adicionando-se 700 µL do tampão de lise NSL1 e, de seguida, 150 µL do reagente NS Enhancer. Os tubos foram fechados e colocados horizontalmente num vórtex (Bead Ruptor Bead Mill Homogenizer, OMNI Internacional), agitando-se na velocidade máxima

durante 5 min à temperatura ambiente para promover a lise mecânica das células microbianas.

Após a lise, centrifugou-se os tubos a 11 000 g por 2 min para compactar os detritos e as esferas. Adicionou-se 150 µL do Tampão NSL3 ao sobrenadante, agitou-se por 5 s no vórtex, incubou-se a 0 - 4°C por 5 min para precipitar proteínas e inibidores, e centrifugou-se novamente a 11 000 g por 1 min. Transferiu-se cuidadosamente até 700 µL do sobrenadante para uma coluna NZYSpin Soil Inhibitor Removal (anel vermelho) colocada num tubo coletor, centrifugando-se a 11 000 g por 1 min; a coluna de remoção de inibidores foi descartada, restando o eluído filtrado.

Para preparar a ligação do DNA à membrana de sílica, adicionou-se 250 µL de Tampão NSB ao eluído filtrado e agitou-se no vórtex por 5 s. Colocou-se de seguida 550 µL desta mistura numa coluna NZYSpin Soil (anel verde) inserida num tubo coletor e centrifugou-se a 11 000 g por 1 min, descartando-se o eluído. Este passo foi repetido até que todo o volume remanescente fosse centrifugado.

Procedeu-se à lavagem da membrana: adicionou-se 500 µL de Tampão NSB, centrifugou-se por 30 s a 11 000 g e descartou-se o eluído; de seguida, adicionou-se 550 µL de Tampão NSW1, centrifugou-se por 30 s a 11 000 g e descartou-se o eluído. Adicionou-se então 700 µL de Tampão NSW2 (previamente preparado com 100 mL de etanol puro), agitou-se a coluna fechada no vórtex por 2 s e centrifugou-se por 30 s a 11 000 g, descartando-se o eluído; este passo de lavagem com NSW2 foi repetido para garantir a remoção eficiente de sais e inibidores. Para secar completamente a membrana de sílica, centrifugou-se a coluna vazia por mais 2 min a 11 000 g. Finalmente, colocou-se a coluna NZYSpin Soil num microtubo de 1,5 mL limpo e adicionou-se 30 µL de Tampão NSE diretamente sobre a membrana. Incubou-se por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugou-se a 11 000 g por 30 s para eluir o DNA genómico purificado. O DNA eluído foi armazenado a - 20°C para análises posteriores.

A análise metagenómica foi realizada pela técnica de NGS, como descrito no ponto 2.1.1.3.

2.2.1.5. Determinação da atividade antimicrobiana *in-vitro*

Para avaliar possíveis estratégias de controlo microbiano, foi testada a sensibilidade dos isolados e de uma cultura mista, a três agentes biocidas distintos. Foram selecionados dois produtos comerciais, PREVENTOL® Ri50 (Lanxess, Alemanha) e BIOTIN-T® (C.T.S., Espanha), ambos aplicados a uma concentração de

3%, bem como o biocida Syra-Óleovictis® (ResMonuH, Portugal), formulado à base de OEs (geraniol e limoneno), para explorar uma alternativa de base natural.

A cultura mista foi feita a partir de todas as zaragatoas recolhidas das pinturas com contaminação visível, incubando todas elas em meio de extrato de malte líquido, com agitação a 120 rpm, a 28°C, por 7 dias, para crescimento dos microrganismos. Para testar a eficácia de cada antimicrobiano, foi utilizado o método de difusão em disco de ágar. Os testes de bioatividade foram realizados incorporando 1×10^7 células de cada isolado e da cultura mista em placas de Petri (9 cm) com meio MEA e os biocidas a serem testados foram colocados em discos de papel estéreis de 20 mm (Macherey-Nagel 827 ATD), impregnados com 20 µL da substância antimicrobiana. As placas de petri foram incubadas a 28°C e o crescimento foi monitorizado diariamente. Os halos de inibição do crescimento microbiano ao redor dos discos foram medidos e considerados medida de sensibilidade.

2.2.2. Resultados e Discussão

2.2.2.1. Interação microrganismos-substrato

A análise por FEG-SEM (Figura 2.8) permitiu uma melhor compreensão da presença das comunidades microbianas presentes nos microfragmentos recolhidos da pintura 1252, e da sua interação com o suporte. Esta técnica fornece uma imagem de grande ampliação e resolução, permitindo inferir sobre a macroestrutura da pintura e a existência de contaminação biológica.

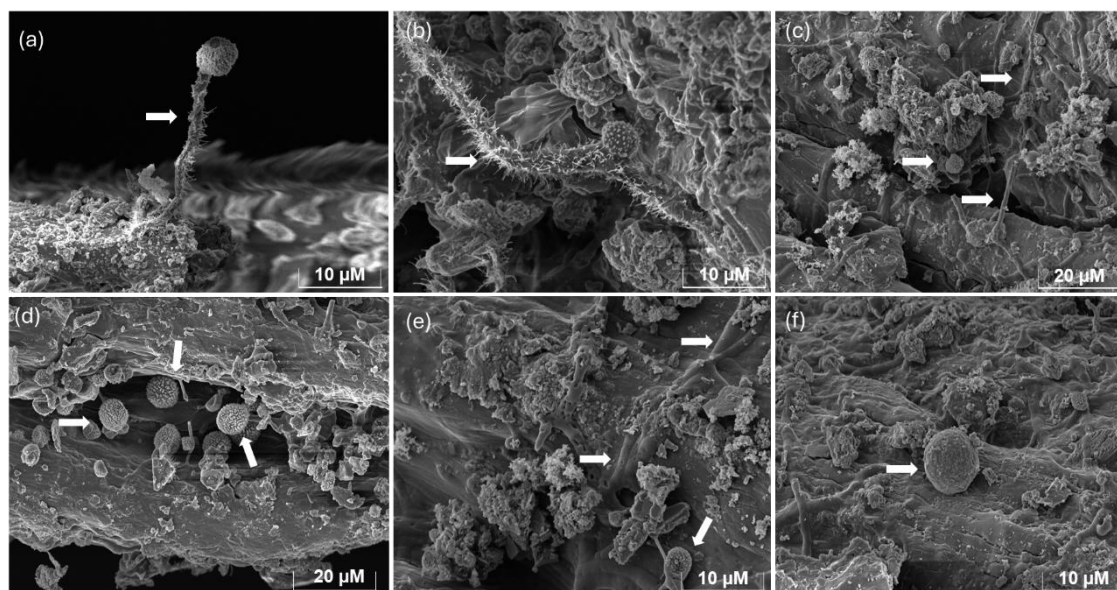


Figura 2.8: Micrografias de FEG-SEM da colonização fúngica no microfragmento analisado do suporte da pintura 1252: (a) corpo de frutificação fúngico; (b) pormenor de uma hifa; (c, e) agregados de células microbianas; (d) colonização massiva por cabeças reprodutiva

A análise por FEG-SEM confirmou a presença de uma contaminação biológica generalizada nos microfragmentos retirados da pintura.

Em todas as imagens analisadas, observaram-se de forma consistente estruturas típicas de fungos filamentosos. Estas incluem redes de filamentos (hifas) que se espalham pela superfície e esporos esféricos (Figura 2.8 (f)), que são as estruturas de reprodução do fungo. Curiosamente, com a presença de corpos de frutificação completos, como ilustrado na Figura 2.8 (a) e com a observação de várias cabeças do corpo de frutificação, que por sua vez estão cobertas por centenas de esporos (Figura 2.8 (d)), demonstra-se claramente que o fungo não só estava presente, como se encontrava a multiplicar ativamente, representando um enorme potencial de contaminação para as áreas circundantes. A morfologia destas estruturas, principalmente a do corpo de frutificação, é fortemente sugestiva de fungos do género *Aspergillus*, frequentemente identificado em pinturas deterioradas.



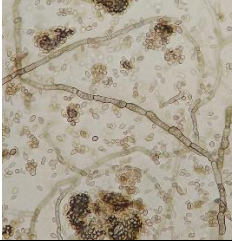

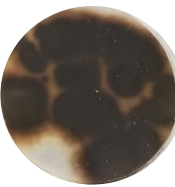

É importante também perceber a forma como estes microrganismos parecem estar “enraizados” no substrato, pois formam uma comunidade densa que cobre e se agarra ao suporte, usando-o como fonte de alimento (Figura 2.8 (c),(e)).

Deste modo, as observações por SEM demonstram que a deterioração do suporte desta pintura não se deve apenas a uma contaminação superficial ou pontual, mas sim a uma colonização fúngica ativa e bem estabelecida.

2.2.2.2. Identificação e caracterização dos isolados fúngicos

A caracterização e identificação dos fungos isolados do MNAA foi feita através de sequenciação da região ITS, cujas sequências de nucleótidos foram alinhadas com espécies de fungos relacionados obtidos na base de dados *GenBank* (NCBI) para a análise de homologia. Os resultados incluindo as características macroscópicas e microscópicas de cada isolado e a identificação mais provável, encontram-se resumidos na Tabela 2.4.

Tabela 2.4: Identificação dos fungos isolados no MNAA através de sequenciação da região ITS complementada com características macro e microscópicas de cada um

Amostra	Características macroscópicas		Características microscópicas	Identificação mais provável	Estirpe/ Nr. Acesso Gen Bank
	Frente	Verso			
1727_A1 (a)				<i>Cladosporium</i> sp.	MNAA1727A 1a/PX449040
1727_A1 (b)				<i>Pararousoella</i> sp.	MNAA1727A 1b/PX449041

Relativamente à amostra 1727_A1 (a), embora na tabela a identificação tenha sido atribuída apenas ao nível do género (*Cladosporium* sp.) - dado o elevado número de entradas próximas dentro do mesmo grupo - houve uma correspondência de 100% de identidade com várias sequências de *Cladosporium cladosporioides*, com 99% de cobertura e E-value de 0.0, pelo que se sugere ser a identificação mais provável ao nível da espécie.

Carvalho *et al.* (2018), demonstrou que *C. cladosporioides* foi identificado como uma das espécies fúngicas presentes nas amostras recolhidas do ar e em superfícies de obras de arte, incluindo pinturas e esculturas de madeira [183]. Essa espécie é frequentemente associada à contaminação em ambientes interiores de museus e galerias, devido à sua habilidade de resistir a condições adversas e à sua capacidade de se disseminar pelo ar, contribuindo para a biodeterioração dos materiais culturais [184]. No que respeita às pinturas, *C. cladosporioides* tem sido identificado como uma espécie potencialmente deteriógena neste tipo de substrato pela capacidade de hidrolisar ácidos gordos de cadeia curta, para além de exercer atividades amilolíticas e, ocasionalmente, proteolíticas e glicolíticas [185].

Por outro lado, na amostra 1727_A1 (b), a análise por sequenciação Sanger revelou maior proximidade com o género *Pararousoella*, apresentando valores de identidade entre 96–99% com diferentes espécies previamente descritas (*P. mukdahanensis*, *P. juglandicola*, *P. quercina* e *P. rosarum*). Estes resultados confirmam a atribuição do isolado a este género, embora a proximidade a múltiplas espécies

indiquem que não é possível a identificação inequívoca a esse nível. *Pararousoella* é um género de fungos ascomicetes, pertencentes à família Roussoellaceae, só recentemente caracterizado e classificado, pelo que ainda se desconhecem muitas das suas particularidades. Ainda assim, parece ser um género fortemente associado a ambientes terrestres, normalmente em associação com outros fungos.

2.2.2.3. Caracterização da microbiota por métodos independentes de cultura

A implementação de técnicas de metagenómica na avaliação da biodeterioração do MNAA permitiu explorar, comparar e caracterizar as comunidades microbianas das várias pinturas em estudo, ultrapassando os constrangimentos das abordagens convencionais de cultura, que se limitam a identificar a fração cultivável.

Os resultados de caracterização das comunidades eucariotas e procariotas encontram-se nas Figuras 2.9-2.10 e 2.11-2.12, respetivamente.

2.2.2.3.1. Comunidades eucariotas

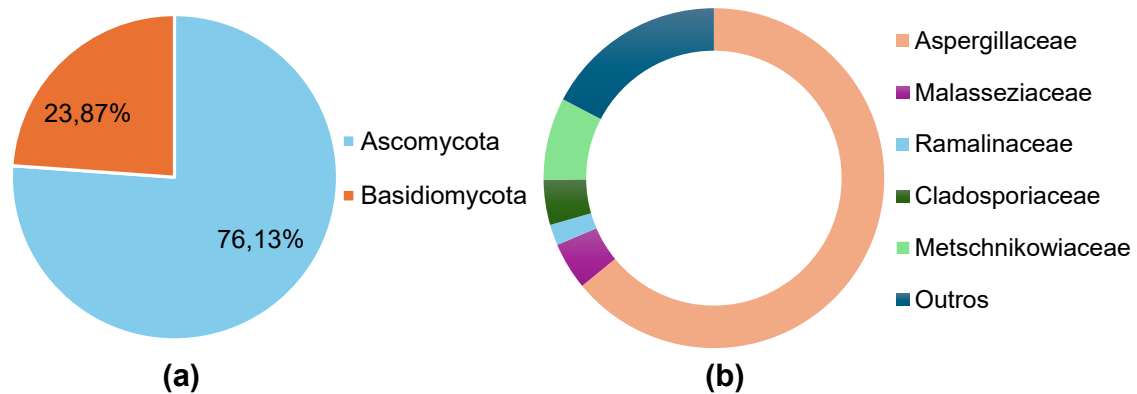


Figura 2.9: Filos (a) e Famílias (b) eucariotas predominantes nas pinturas selecionadas do MNAA

Os filos predominantes (Figura 2.9 (a)) nas pinturas selecionadas do MNAA foram Ascomycota (76,13%) e Basidiomycota (23,87%). Por outro lado, as famílias maioritárias identificadas (Figura 2.9 (b)) no conjunto das amostras foram Aspergillaceae (64,08%), Metschnikowiaceae (7,83%), Malasseziaceae (4,50%), Cladosporiaceae (4,28%) e Ramalinaceae (1,99%). As famílias minoritárias representaram 17,32%.

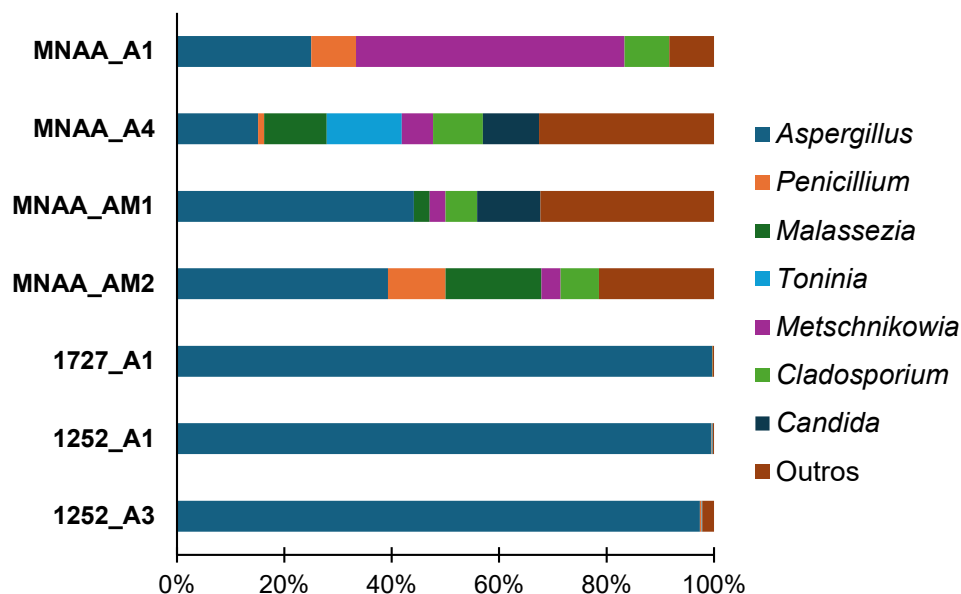


Figura 2.10: Gêneros eucariotas maioritários nas pinturas selecionadas do MNAА

O género eucariota predominantemente identificado nas pinturas em estudo foi *Aspergillus* (59,99%) (Figura 2.10), seguido dos géneros *Metschnikowia* (8,90%), *Malassezia* (4,64%), *Cladosporium* (4,38%), *Candida* (3,18%), *Penicillium* (2,97%) e *Toninia* (2,03%), sendo que 13,91% foram considerados como “outros” géneros de menor representatividade.

De uma observação geral, ao nível dos géneros eucariotas observa-se que as pinturas com os números de inventário 1727 e 1252 possuem uma composição consideravelmente mais homogénea do que as pinturas MNAА A1/A4 e MNAА AM1/AM2, que contêm uma maior diversidade microbiana.

As amostras 1727 e 1252, correspondentes aos quadros “Nossa Senhora com o Menino” e “Santa Isabel Da Hungria Curando Tinhosos”, respetivamente, apresentam um microbioma eucariota muito semelhante, o que seria expectável, pois a contaminação observada a olho nu também parecia ser muito idêntica no momento da recolha. O género predominante nestas amostras foi *Aspergillus* constituindo 99,6% da amostra 1727, 99,42% da parte da frente do quadro 1252 (A1) e 97,40% da parte inversa do mesmo quadro (A3). Este resultado de NGS é concordante com os resultados de SEM mostrados anteriormente para a amostra 1252, cuja estrutura reprodutiva do fungo observado se assemelhava bastante a membros deste género eucariota.

Como demonstrado anteriormente noutros casos de estudo deste capítulo, o género *Aspergillus* apresenta-se como um género fúngico colonizador de pinturas, com potencial deteiriógeno, podendo causar o aparecimento de manchas brancas como as

observadas nestes dois quadros das reservas [186]. Estando amplamente distribuído no ambiente, está frequentemente presente no ar atmosférico e é reconhecido como um contaminante recorrente de interiores, incluindo espaços museológicos e áreas de reserva. Para além disso, e considerando o suporte de madeira que a pintura 1252 tem, é de destacar que as espécies de *Aspergillus* são também produtoras de muitas enzimas extracelulares que têm como alvo diferentes substratos, incluindo ligninases termofílicas que hidrolisam a lignina (deterioração da madeira) [187], entre muitas outras.

Na pintura “A Descida da Cruz”, de Domingos Sequeira verificam-se algumas diferenças, ao nível dos géneros eucariotas, presentes na parte da frente (MNAA A1) e no verso da pintura (MNAA A4). Enquanto na parte exposta há uma predominância maior do género *Metschnikowia*, que representa 50,00% da microbiota desta amostra, na parte inversa da pintura predominam *Malassezia* (11,63%) e *Toninia* (13,95%), ambos conhecidos produtores de pigmentos. O género *Aspergillus* tem também nesta pintura uma grande representatividade, correspondendo a 25,00 e 15,12% da amostra retirada da parte exposta da pintura e do verso da mesma, respetivamente.

Metschnikowia é um género de levedura que se desenvolve tanto em ecossistemas terrestres quanto aquáticos, e cujas células produzem metabolitos secundários para se protegerem de agentes patogénicos ou para se adaptarem a condições ambientais desfavoráveis, como temperaturas elevadas/baixas e salinidade elevada. Os metabolitos produzidos por esta levedura já se provou noutros estudos terem potencial aplicação nas indústrias agrícola, de bioconversão, cosmética e farmacêutica [188]. De facto, este é um género mais conhecido em contextos ambientais, industriais e biotecnológicos do que em estudos de biodeterioração, mas ainda assim, considerando a capacidade conhecida destas leveduras para produzir metabolitos secundários em resposta a fatores de *stress* ambiental, é plausível que *Metschnikowia* tenha colonizado a superfície pintada como resposta a variações de humidade ou temperatura no interior das reservas do museu. Não sendo conhecidas por produzir pigmentos de cor escura, é pouco provável que a coloração que se observa nas manchas da pintura esteja diretamente associada à pigmentação desta levedura, mas sim devido à associação com outros microrganismos presentes.

Relativamente à pintura “Adoração aos Reis Magos”, de Domingos Sequeira, parecem pouco notórias as diferenças observadas na microbiota eucariota da parte exposta da pintura. Foram retiradas na amostragem duas amostras diferentes, MNAA AM1 e AM2, pois as manchas observadas pareciam ter colorações ligeiramente

distintas. Como em todas as amostras, também nestas predomina o género *Aspergillus*. No entanto, *Malassezia* (17,86%) e *Penicillium* (10,71%) têm maior representatividade na amostra AM2, enquanto o género *Candida* (11,76%) se apresenta predominante na amostra AM1.

Embora a composição geral da microbiota seja semelhante, a presença de géneros eucariotas com abundâncias distintas entre as amostras, ou mesmo dentro da mesma pintura, evidencia pequenas variações locais, que podem ter implicações na compreensão da colonização microbiana e na conservação das obras.

A análise seguinte recai sobre as comunidades procariotas, permitindo explorar a composição bacteriana destas pinturas, também a partir dos resultados de metagenómica.

2.2.2.3.2. Comunidades procariotas

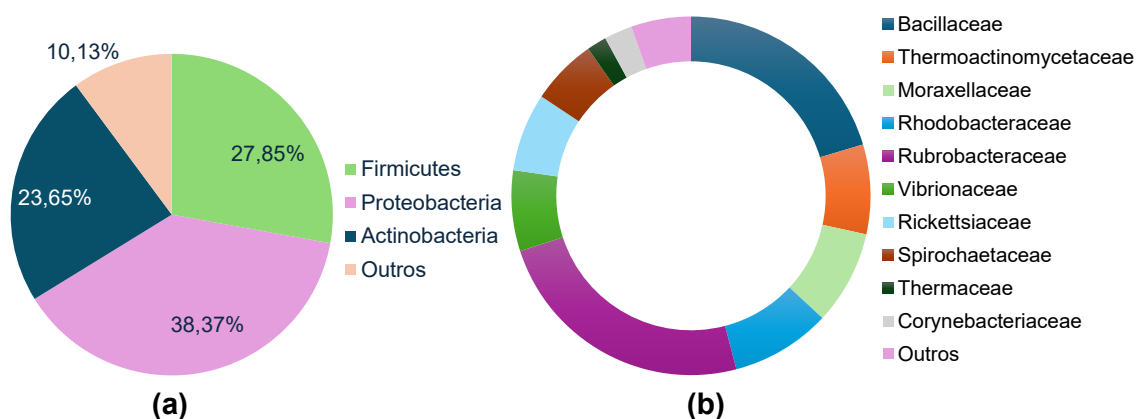


Figura 2.11: Filos (a) e Famílias (b) procariotas predominantes nas pinturas selecionadas do MNA

Os filios procariotas dominantes (Figura 2.11 (a)) nas pinturas em estudo incluíram Proteobacteria (38,37%), Firmicutes (27,85%) e Actinobacteria (23,65%), sendo que 10,13% foram considerados como “outros” filios com menor representatividade.

Na Figura 2.11 (b) encontram-se representadas as famílias maioritárias identificadas no conjunto de todas as amostras, que corresponderam a Rubrobacteraceae (24,08%), Bacillaceae (20,38%), Rhodobacteraceae (8,99%), Moraxellaceae (8,48%), Thermoactinomycetaceae (8,08%), Vibrionaceae (7,28%), Rickettsiaceae (7,05%), Spirochaetaceae (5,96%), Corynebacteriaceae (2,53%) e Thermaceae (1,79%). As famílias minoritárias representaram 5,39%.

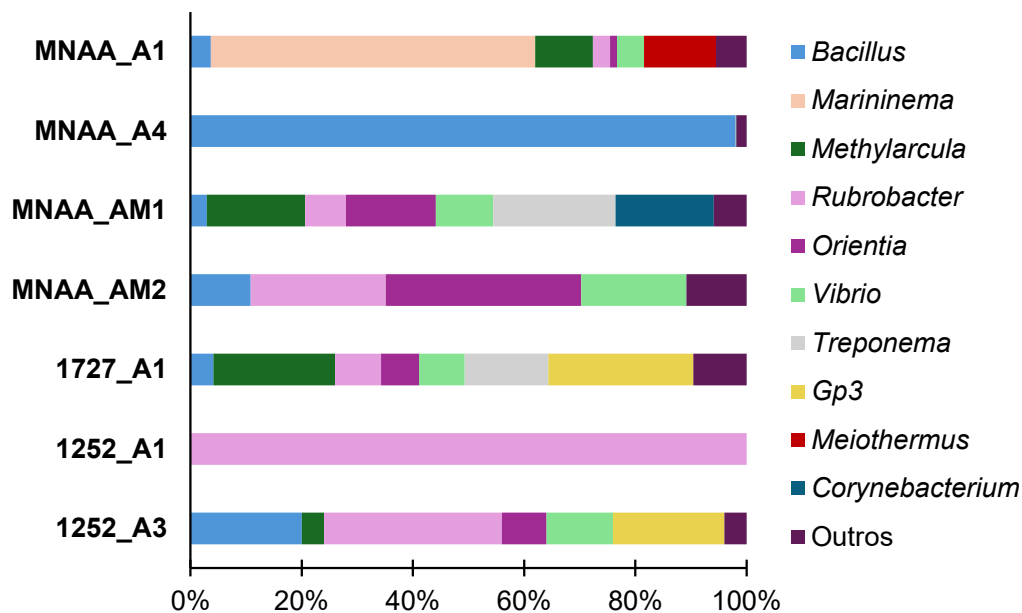


Figura 2.12: Gêneros procariotas majoritários nas pinturas selecionadas do MNAА

O gênero procariota predominantemente identificado nas pinturas em estudo foi *Rubrobacter* (25,00%) seguido de *Bacillus* (19,94%), *Orientia* (9,63%), *Marininema* (8,33%), *Vibrio* (7,77%), *MethyIarcuIa* (7,71%), *Gp3* (6,58%), *Treponema* (5,30%), *Corynebacterium* (2,53%) e *Meiothermus* (1,84%). Os gêneros considerados como “outros” representaram 5,37%.

A Figura 2.12 sugere que existe uma grande variabilidade na composição bacteriana entre as diferentes pinturas, e mesmo entre amostras da mesma pintura, observando-se notoriamente nas amostras MNAА_A1/A4 e 1252_A1/A3; isto sugere que os microambientes na superfície e no verso das pinturas são heterogêneos e que pequenas diferenças na humidade, temperatura, disponibilidade de nutrientes, ou contaminação inicial podem levar ao desenvolvimento de comunidades bacterianas distintas.

É igualmente curioso observar que a amostra MNAА_A4 é praticamente dominada por *Bacillus* (98,05%), enquanto em MNAА_A1, *Marininema* (58,28%) é o gênero dominante; por outro lado, a amostra 1252_A1 constituída por *Rubrobacter* na sua totalidade. As restantes amostras mostram uma diversidade maior, sem se distinguir um gênero claramente dominante, mas com vários gêneros em proporções significativas.

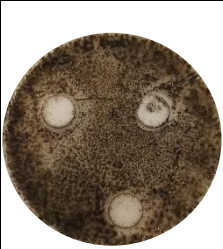









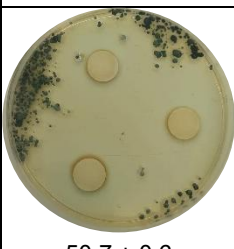
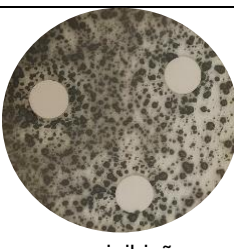
Embora a contaminação visual principal pareça ser fúngica, as bactérias fazem parte dos biofilmes complexos que se observam nas amostras. A presença de todos

estes géneros procariotas, alguns com conhecidas capacidades degradativas e produção de pigmentos, sugere um potencial papel na colonização e metabolização das superfícies das pinturas. É possível que possam atuar em sinergia com os fungos, utilizando subprodutos dos mesmos, modificar o pH ou a disponibilidade de oxigénio, influenciando o seu crescimento.

2.2.2.4. Avaliação da eficácia antimicrobiana

A avaliação da eficácia dos três antimicrobianos indicou variações na sensibilidade dos microrganismos testados, tanto nos isolados individuais como na cultura mista. A atividade antifúngica foi refletida na formação de halos de inibição ao redor dos discos, cujo diâmetro (em mm) serviu como indicador da resposta dos microrganismos (Tabela 2.5). Os resultados ilustrados de seguida permitem identificar quais tratamentos têm maior potencial para utilizar numa eventual intervenção nas pinturas em estudo.

Tabela 2.5: Efeito dos antimicrobianos contra as comunidades fúngicas das pinturas do MNA

Amostra	Halos de inibição (mm)			
	Controlo	Preventol®	Biotin-T®	Syra-Óleovictis®
Isolado 1727 A1(a)		 35,0 ± 1,0	 46,3 ± 1,2	 sem inibição
Isolado 1727 A1(b)		 33,0 ± 1,7	 49,0 ± 4,4	 sem inibição
Cultura mista		 29,0 ± 2,6	 50,7 ± 0,6	 sem inibição

Analisando os resultados obtidos e visualizados na tabela acima, verificam-se diferenças claras na eficácia dos diferentes tratamentos testados, quer no que diz respeito à cultura mista, quer contra os isolados fúngicos. Em primeiro lugar, os controlos funcionaram como expectável, observando-se um crescimento fúngico denso e sem qualquer zona de inibição em todas as amostras.

Relativamente ao comportamento dos antimicrobianos, o Preventol® demonstrou uma eficácia consistente nas várias amostras testadas, sendo a maior eficácia registada contra o isolado da amostra 1727 A1(a) com um halo de inibição médio de $35,0 \pm 1,0$ mm. O valor contra o isolado 1727 A1(b) foi ligeiramente inferior ($33,0 \pm 1,7$ mm), e registou-se a menor inibição contra os microrganismos da cultura mista.

O tratamento com o Biotin-T® revelou igualmente formação de halos de inibição em todas as amostras testadas, sendo aquele que produziu os melhores resultados. A eficácia mais notável foi contra a cultura mista, onde este antimicrobiano gerou um halo de inibição de $50,7 \pm 0,6$ mm, quase o dobro do observado com o Preventol para a mesma amostra, contribuindo para uma inibição quase total.

Por outro lado, o biocida à base de OEs não apresentou qualquer atividade inibitória visível. O crescimento fúngico nestas placas foi total, semelhante ao observado no controlo negativo, indicando que, nas condições realizadas, este biocida natural foi ineficaz para inibir o desenvolvimento dos fungos em questão. Além disso, segundo Sala-Luis *et al.* (2024) a difusão limitada dos compostos hidrofóbicos em meio sólido e o modo de aplicação podem ter condicionado a eficácia do tratamento. Os estudos prévios destes autores demonstraram que os OEs apresentam maior atividade antifúngica quando aplicados em grandes concentrações, sobretudo devido à volatilidade e rápida degradação dos seus componentes ativos [189].

O Biotin-T® correspondeu assim ao antimicrobiano mais eficaz, com resultados uniformes entre todas as amostras, e por isso, promissores para utilização no contexto estudado.

Pelo seu imenso valor histórico e cultural, torna-se imperativo este tipo de estudo para o controlo das obras de arte do MNAA, no que respeita à sua conservação. O estudo destas pinturas mostrou que, mesmo em condições controladas de reserva, as obras permanecem vulneráveis à colonização microbiana. A predominância de fungos *Aspergillus*, ainda que seja comum encontrá-los no ar atmosférico, evidencia o risco de alterações visíveis (como as manchas observadas nas pinturas), enquanto a deteção

Biodeterioração em Pintura Antiga

de comunidades bacterianas reforça a complexidade destes ecossistemas. Estes resultados sublinham a necessidade de acompanhamento contínuo das coleções, uma vez que a estabilidade aparente do ambiente museológico não permite eliminar na totalidade os processos de biodeterioração.

2.3. Estudo de comunidades microbianas de duas pinturas da Galeria de Arte da Universidade Silpakorn na Tailândia

A Galeria de Arte da Universidade Silpakorn, localizada no emblemático campus de Tha Phra em Bangucoque, funciona como um centro para a arte na Tailândia. Estando associada à principal universidade de artes do país – a Universidade Silpakorn – a galeria tem um papel ativo na promoção da criação artística nacional. O seu programa expositivo é diversificado, incluindo obras de docentes e alunos da reconhecida Faculdade de Pintura, Escultura e Artes Gráficas, mas também acolhe frequentemente exposições de artistas tailandeses. Estrategicamente situada na zona histórica de Bangucoque, perto de locais de interesse cultural, entende-se como um espaço de encontro relevante tanto para a comunidade artística como para o público geral.

Para este estudo foram analisadas duas pinturas da galeria referida, que apresentavam alguns sinais visíveis de biodeterioração. As condições ambientais (temperatura, humidade) juntamente com a biorreceptividade dos diferentes materiais parecem contribuir para a biocolonização. Na Tailândia, onde o clima tropical quente e húmido proporciona condições favoráveis ao crescimento microbiano, os objetos de arte são ainda mais vulneráveis à deterioração. A elevada humidade relativa e as flutuações de temperatura que se fazem sentir nesta região pode favorecer a formação de biofilmes, a produção de pigmentos e a desintegração dos materiais orgânicos, bem como conduzir a tensões mecânicas nos suportes das pinturas, acelerando a deterioração.

De modo a avaliar e identificar a microbiota presente, foi utilizada uma abordagem metagenómica filogenética.

2.3.1. Metodologia

2.3.1.1. Amostragem

O processo de amostragem (Figura 2.13) foi realizado na Universidade de Silpakorn, na Tailândia. As microamostras das duas pinturas selecionadas para o estudo, designadas Faith (F) e Titanic (T) foram recolhidas utilizando métodos não invasivos, em condições semi-estéreis, recorrendo a zaragatoas estéreis nas zonas com evidências de deterioração microbiana (sobretudo biofilmes e presença de manchas e pigmentos) para posterior avaliação da contaminação microbiana por análise metagenómica filogenética. O processo de amostragem foi feito de acordo com a ética

da conservação, recolhendo a quantidade mínima necessária para os ensaios. As microamostras foram conservadas a 4°C durante o transporte até ao laboratório e até à sua utilização.

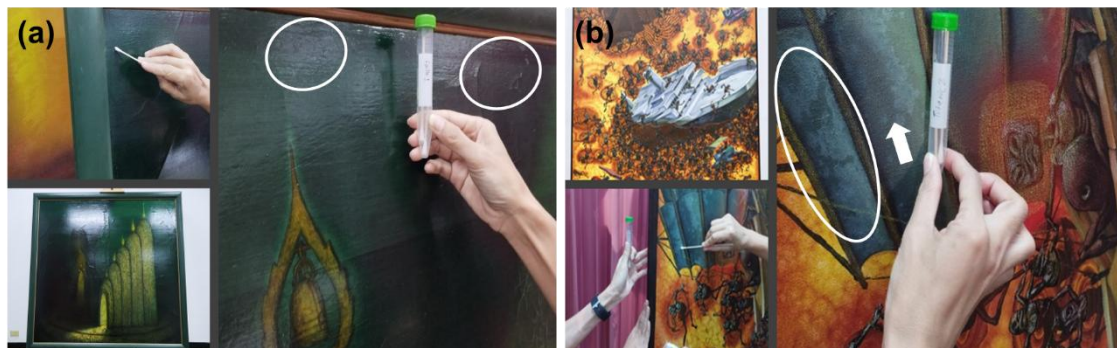


Figura 2.13: Pinturas (a) F - Faith analisadas e (b) T - Titanic e processo de amostragem

As observações visuais realizadas antes da recolha das amostras permitiram identificar indícios de biodeterioração em ambas as pinturas analisadas. Na **pintura Faith**, foram observadas alterações superficiais, como zonas escurecidas, brilho irregular e áreas com uma elevação subtil da camada pictórica. Na **pintura Titanic**, registaram-se sinais de degradação mais evidentes, nomeadamente zonas esbranquiçadas (possivelmente associadas à formação de biofilmes superficiais) e perda de brilho, além de pequenas irregularidades na superfície pictórica.

A seleção das áreas de amostragem teve por base essas observações e permitiu estabelecer uma base comparativa entre as duas obras. A caracterização da microbiota presente procurou confirmar e aprofundar a compreensão das causas associadas às alterações visuais identificadas.

2.3.1.2. Extração e Sequenciação de DNA

A extração de DNA das amostras de pintura foi realizada utilizando o Kit OMNI Soil DNA Purification Kit, como descrito no ponto 2.1.1.2. e a metodologia referente à sequenciação por NGS foi realizada como descrito no ponto 2.1.1.3.

2.3.2. Resultados e Discussão

2.3.2.1. Identificação e caracterização dos microrganismos colonizadores das pinturas

2.3.2.1.1. Comunidades procariotas

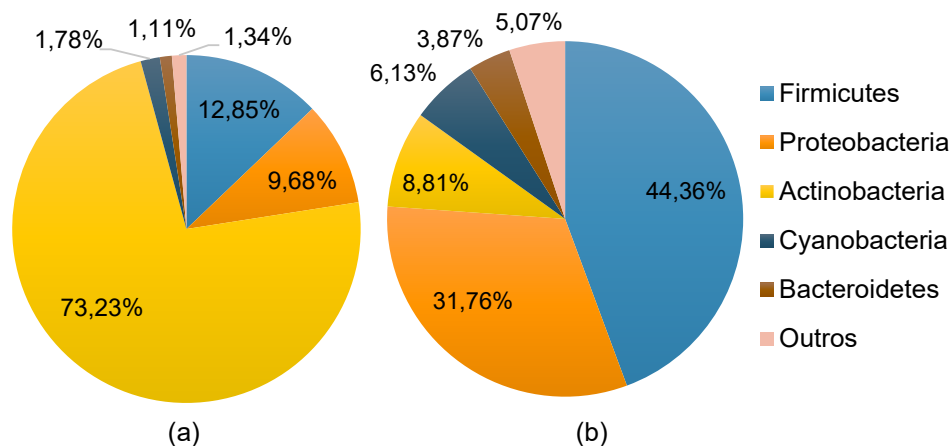


Figura 2.14: Filos procariotas predominantes na pintura (a) F - Faith e (b) T - Titanic

Pela observação dos resultados apresentados na Figura 2.14, verifica-se que a composição microbiana das duas pinturas é significativamente distinta. Enquanto a pintura F é colonizada predominantemente por bactérias do filo Actinobacteria (73,23%), na pintura T destaca-se o filo Firmicutes, constituindo 44,36% da microbiota. O filo Proteobacteria também difere claramente entre as duas pinturas, constituindo 9,68% e 31,76% da pintura F e T, respetivamente.

Na pintura F foram ainda identificados os filios Cyanobacteria (1,78%) e Bacteroidetes (1,11%), sendo que 1,34% dos filios foram considerados como “outros” (designação genérica que considera os microrganismos com menor representatividade). Na pintura T, Cyanobacteria (6,13%) e Bacteroidetes (3,87%) foram identificados, sendo 5,07% pertencentes a filios minoritários.

Os filios Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria têm sido dos filios bacterianos mais documentados em pinturas deterioradas do Património Cultural [166,190,191].

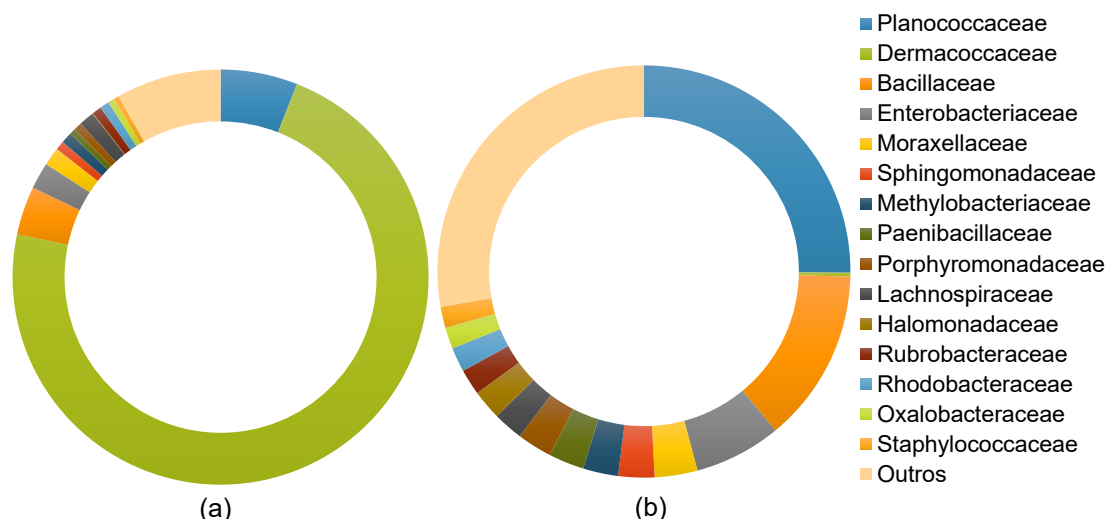


Figura 2.15: Famílias procariotas predominantes na pintura (a) F - Faith e (b) T - Titanic

Na pintura F foram identificadas como predominantes as famílias (Figura 2.15 (a)): Dermacoccaceae (72,32%), Planococcaceae (6,00%), Bacillaceae (3,77%) Enterobacteriaceae (2,08%), Moraxellaceae (1,42%), Lachnospiraceae (1,19%), Methylobacteriaceae (0,86%), Rubrobacteraceae (0,72%), Rhodobacteraceae (0,72%), Sphingomonadaceae (0,70%), Porphyromonadaceae (0,64%), Oxalobacteraceae (0,49%), Paenibacillaceae (0,48%), Staphylococcaceae (0,42%), Halomonadaceae (0,05%) e 8,16% das famílias foram consideradas como “outros”.

A família Planococcaceae (25,09%) foi a que constituiu uma abundância mais significativa na pintura T (Figura 2.15 (b)), seguida de Bacillaceae (13,63%), Enterobacteriaceae (6,81%), Moraxellaceae (3,35%), Sphingomonadaceae (2,83%), Paenibacillaceae (2,79%), Methylobacteriaceae (2,75%), Porphyromonadaceae (2,72%), Halomonadaceae (2,33%), Lachnospiraceae (2,37%), Rubrobacteraceae (2,04%), Rhodobacteraceae (1,92%), Oxalobacteraceae (1,67%), Staphylococcaceae (1,67%) e Dermacoccaceae (0,30%). 27,74% corresponderam a “outras” famílias minoritárias.

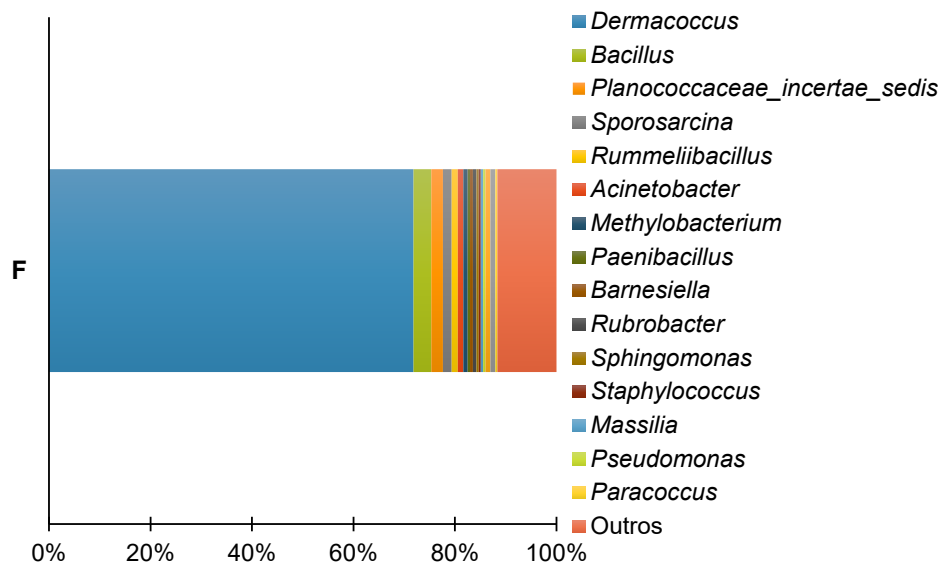


Figura 2.16: Gêneros procariotas maioritários identificados na pintura F

A Figura 2.16 identifica os principais gêneros procariotas identificados na pintura F. *Dermacoccus* (73,25%) foi o gênero com maior predominância, seguido de *Bacillus* (3,57%), *Planococcaceae_incertae_sedis* (2,36%), *Sporosarcina* (1,74%), *Rummeliibacillus* (1,23%), *Acinetobacter* (1,14%), *Methylobacterium* (0,84%), *Rubrobacter* (0,73%), *Barnesiella* (0,56%), *Paenibacillus* (0,48%), *Pseudomonas* (0,47%), *Massilia* (0,46%), *Sphingomonas* (0,45%), *Paracoccus* (0,43%), *Staphylococcus* (0,42%). 11,85% dos gêneros foram considerados como “outros” gêneros com uma abundância menos significativa.

Nesta pintura, a presença do gênero bacteriano *Dermacoccus* é bastante elevada. *Dermacoccus nishinomiyaensis*, a espécie identificada neste estudo, é uma espécie de cocos gram-positivos aeróbios da família *Dermacoccaceae* [192]. É um conhecido microrganismo inócuo e comensal da pele humana, o que pode refletir elevados níveis de manipulação humana na pintura. Esta manipulação ocorre frequentemente durante a criação, restauro ou transporte e exibição das obras.

Por outro lado, esta espécie foi também anteriormente identificada numa pintura em tela biodeteriorada [193] e em pinturas murais, conjuntamente com outras espécies, em que se detetou a sua presença não só na própria pintura como no ar circundante, pelo que os autores concluíram que as espécies detetadas no ar podem ter potencial biodeteriogeno quando se depositam na pintura através de poeira, e se desenvolvem nas paredes [194].

A presença de géneros procariotas como *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Rubrobacter*, *Methylobacterium* e *Rummeliibacillus* sugere a coexistência de microrganismos capazes de formar esporos e resistir a condições extremas. Embora a sua abundância individual seja menor, as suas atividades metabólicas cumulativas podem ter um impacto significativo, pois estes microrganismos estão associados a processos metabólicos que envolvem compostos orgânicos presentes nos vernizes e pigmentos da pintura, podendo contribuir para a degradação de materiais à base de celulose e polímeros sintéticos, favorecendo a biodeterioração do material pictórico [195].

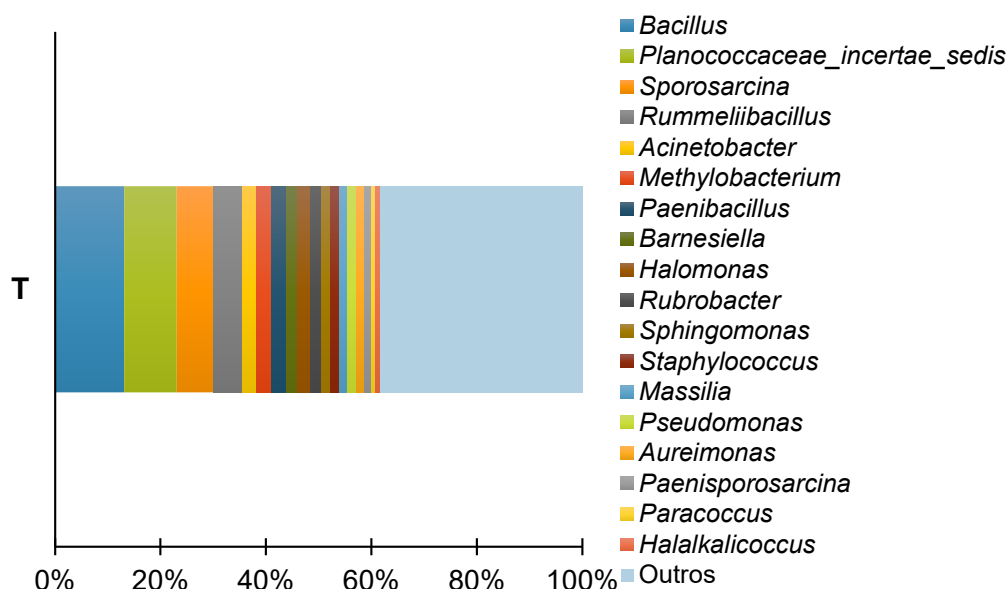


Figura 2.17: Géneros procariotas majoritários identificados na pintura T

Para a composição, ao nível do género, da microbiota colonizadora do quadro T (Figura 2.17), predominam os géneros *Bacillus* (13,10%), *Planococcaceae_incertainae_sedis* (9,95%), *Sporosarcina* (7,03%), *Rummeliibacillus* (5,43%), *Paenibacillus* (2,83%), *Acinetobacter* (2,75%), *Methylobacterium* (2,76%), *Halomonas* (2,32%), *Barnesiella* (2,24%), *Rubrobacter* (2,09%), *Sphingomonas* (1,74%), *Massilia* (1,59%), *Staphylococcus* (1,65%), *Aureimonas* (1,61%), *Pseudomonas* (1,58%), *Paenisporosarcina* (1,40%), *Halalkalicoccus* (0,79%) e *Paracoccus* (0,74%). “Outros” géneros minoritários representaram 38,41% da população.

A presença do género *Bacillus* em pinturas deterioradas tem sido documentada em vários estudos [77,190,196–201]. Esses microrganismos são frequentemente encontrados em ambientes como museus, galerias e em objetos de arte devido à sua

capacidade de sobreviver em condições adversas, degradar componentes orgânicos e utilizar uma ampla gama de substratos. As pinturas em tela são significativamente danificadas por bactérias com atividade celulolítica e este género procariota já foi anteriormente relatado quanto à produção da enzima celulase [179]. A sua capacidade de degradação de compostos orgânicos também é um fator preponderante, uma vez que grande parte do Património Cultural em pinturas consiste na utilização de materiais orgânicos, e cuja degradação é facilmente realizada por microrganismos heterotróficos que os utilizam como fontes de carbono.

Por exemplo, Noohi N. & Papizadeh M. (2022) conduziram um estudo sobre a biodeterioração de pinturas em tela no Museu Golestan Palace, no Irã, onde a maioria das bactérias isoladas pertence ao género *Bacillus*, demonstrando-se o seu potencial biodeteriogeno e atividade celulolítica significativa, contribuindo para a degradação do material da pintura [179].

Resultados semelhantes foram obtidos por Gorbushina *et al.* (2004) no seu estudo sobre pinturas a óleo na Igreja Martin em Greene-Kreiensen, Alemanha, no qual a maioria das bactérias isoladas pertencia aos géneros *Bacillus* e *Paenibacillus* [197]. Esses resultados sugerem que a maioria dos estudos são capazes de isolar bactérias produtoras de esporos. A capacidade de sobreviver por um longo período de tempo como esporos pode explicar a dominância de espécies de *Bacillus* neste tipo de amostras de pinturas, pois isso permite-lhes suportar condições ambientais desfavoráveis e serem rapidamente disseminados.

Outro exemplo inclui o estudo de Mar López-Miras *et al.* (2013) que caracterizou comunidades microbianas numa pintura a óleo sobre tela, "Virgen de Guadalupe", e identificou que diferentes tipos de microrganismos, incluindo *Bacillus*, estavam envolvidos nos processos de degradação da obra. As enzimas produzidas por essas bactérias, como lipases e proteases, contribuem significativamente para a deterioração do material pictórico [190]. Também Caselli *et al.* (2012) investigou a degradação biológica numa pintura sobre tela do século XVII, "Incoronazione della Vergine" onde, entre os microrganismos identificados, o género *Bacillus* foi um dos responsáveis pela biodeterioração, demonstrando a sua capacidade de colonizar e degradar tanto materiais orgânicos quanto inorgânicos presentes nas camadas da pintura [199].

O género *Sporosarcina* foi igualmente identificado com uma abundância relativa considerável nesta pintura. Este é um género anaeróbio facultativo e formador de esporos que, tal como o género *Bacillus*, lhe permite sobreviver em condições adversas e aderir com facilidade à superfície das pinturas [202]. No estudo de López-Miras *et al.*

(2013), *Sporosarcina* foi um dos géneros identificados na fração cultivável da comunidade bacteriana que colonizava a frente e o verso da pintura em estudo [166]. O seu potencial biodeteriorativo pode estar associado à sua atividade endocelulolítica [185,200].

2.3.2.1.2. Comunidades eucariotas

Em complemento à análise das comunidades procariotas, foi igualmente realizada a caracterização metagenómica filogenética das comunidades eucariotas. A compreensão deste grupo é particularmente relevante neste contexto, uma vez que os fungos são frequentemente os principais agentes de biodeterioração em ambientes tropicais, onde a temperatura e a humidade elevada favorecem a sua atividade metabólica. Estes organismos destacam-se pela capacidade de produzir enzimas hidrolíticas, pigmentos e outros metabolitos secundários que contribuem para a degradação das camadas pictóricas e para alterações cromáticas nas superfícies das obras de arte.

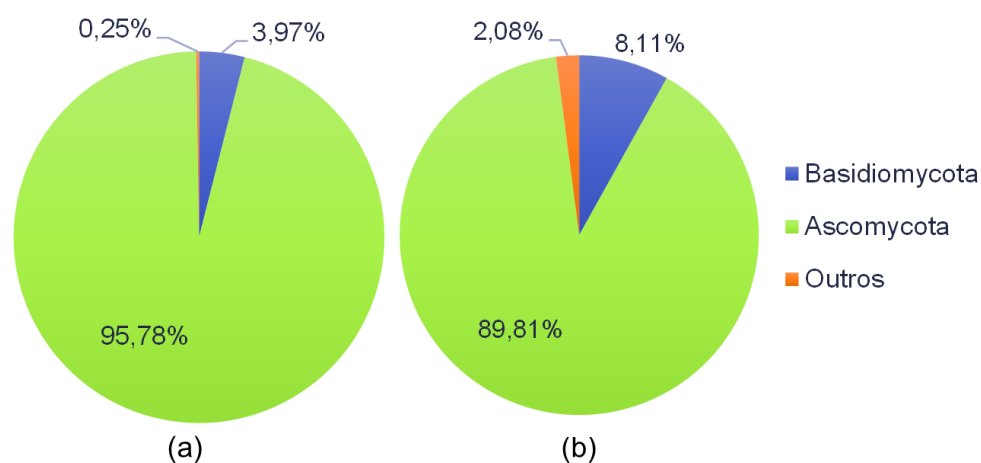


Figura 2.18: Filos eucariotas predominantes na pintura (a) F – Faith e (b) T - Titanic

Ao nível do filo (Figura 2.18), em ambas as pinturas se verifica uma maior predominância do filo *Ascomycota*, constituindo 89,81% e 95,78% dos quadros T e F, respetivamente. A abundância do filo *Basidiomycota* teve maior representatividade no quadro T (8,11%) do que no quadro F (3,97%).

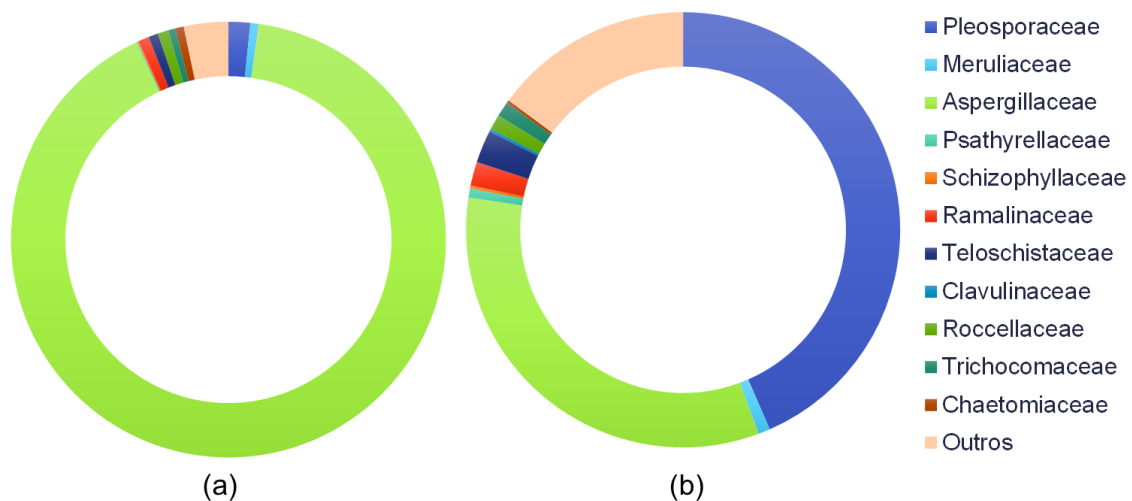


Figura 2.19: Famílias eucariotas predominantes na pintura (a) F – Faith e (b) T - Titanic

Na pintura F foram identificadas como predominantes as famílias (Figura 2.19 (a)): Aspergillaceae (90,80%), Pleosporaceae (1,61%), Ramalinaceae (0,80%), Roccellaceae (0,80%), Teloschistaceae (0,71%), Chaetomiaceae (0,63%), Meruliaceae (0,63%), Trichocomaceae (0,54%), Psathyrellaceae (0,09%) e Schizophyllaceae (0,09%), sendo que 3,30% das famílias foram consideradas como “outros”.

A família Pleosporaceae (43,46%) foi a que constituiu uma abundância mais significativa na pintura T (Figura 2.19 (b)), seguida de Aspergillaceae (33,04%), Teloschistaceae (2,44%), Ramalinaceae (1,77%), Roccellaceae (1,11%), Trichocomaceae (1,11%), Meruliaceae (0,89%), Psathyrellaceae (0,67%), Schizophyllaceae (0,22%), Clavulinaceae (0,22%), Chaetomiaceae (0,22%) e 14,86% corresponderam a “outras” famílias minoritárias.

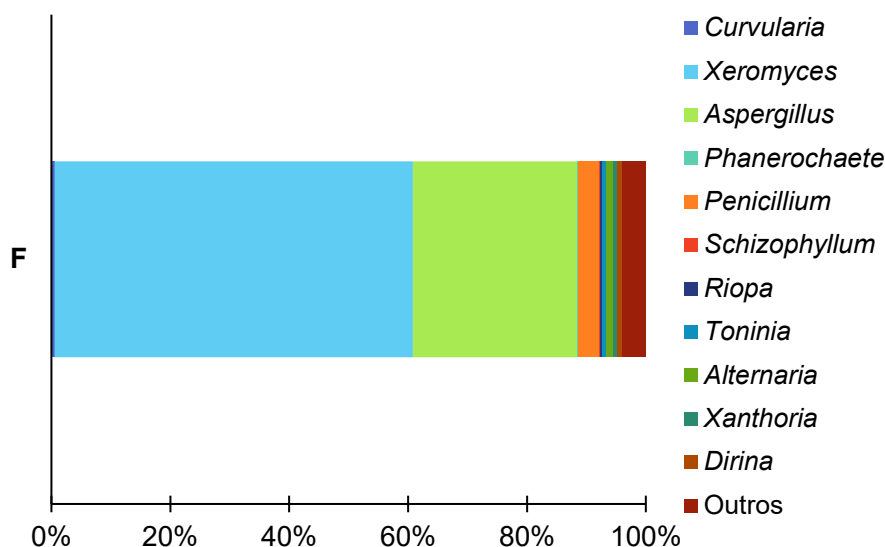


Figura 2.20: Gêneros eucariotas maioritários identificados na pintura F

Os gêneros maioritários identificados na pintura F (Figura 2.20) incluíram *Xeromyces* (60,27%), *Aspergillus* (27,60%), *Penicillium* (3,62%), *Alternaria* (1,09%), *Dirina* (0,81%), *Toninia* (0,81%), *Xanthoria* (0,63%), *Curvularia* (0,54%), *Riopa* (0,27%), *Phanerochaete* (0,18%), *Schizophyllum* (0,09%), e 4,07% foram considerados como “outros”.

A contaminação de pinturas por algumas espécies de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Alternaria* estão documentados como causa de danos mecânicos devido à penetração profunda do micélio, alterações cromáticas decorrentes da produção de biopigmentos e outros metabólitos, e ainda degradação enzimática da matriz da pintura. [179]. O gênero *Alternaria*, por exemplo, é considerado um dos principais agentes de biodeterioração, devido à sua capacidade de produzir celulase que permite a degradação de pinturas em tela [203]. Para além disso, o gênero *Aspergillus* e *Penicillium* produzem uma variedade de micotoxinas, pelo que a sua presença, sobretudo como contaminantes aéreos, pode representar uma ameaça aos visitantes e restauradores-conservadores [78].

Foi ainda possível identificar algumas espécies relevantes neste quadro, nomeadamente *Xeromyces bisporus* e *Aspergillus halophilicus*.

O gênero *Xeromyces* é monotípico, representado por uma única espécie, *Xeromyces bisporus*. O ascomicete filamentoso *X. bisporus* é, presumivelmente, o organismo xerofílico que resiste a condições mais extremas (“dry-loving”) conhecido até ao momento. Tem capacidade de crescer em atividades de água abaixo de 0,70 e forma

colônias visíveis mesmo em 0,61 e 0,62 a_w , com crescimento ótimo em 0,85 a_w tendo preferência por substratos com elevado nível de açúcar [204]. Este fungo, para além de ser extremamente resistente ao calor, adota várias estratégias que lhes permitem tolerar fatores de *stress* e ter vantagem competitiva de crescimento contra outros fungos xerofílicos, apesar de ser um microrganismo de crescimento lento [205,206].

A presença de fungos xerofílicos, como o género *Xeromyces* identificado, pode estar associada a fenómenos de destacamento da camada pictórica, fenómeno que se assemelha às observações na pintura Faith. De acordo com Zalar *et al.* (2023) e Kujović *et al.* (2024), áreas com destacamentos de tinta constituem microambientes ideais para o crescimento deste tipo de fungos e reforçam que estes, ao libertarem enzimas hidrolíticas e ácidos orgânicos, provocam a degradação de componentes orgânicos da pintura, o que fragiliza a adesão entre as camadas e conduz a fenómenos de fissuração e destacamento [75,78]. Assim, sugere-se que a atividade metabólica destes fungos xerofílicos pode contribuir para a deterioração estrutural das camadas pictóricas, podendo ter influência nas irregularidades subtis que se observam na pintura em estudo.

Aspergillus halophilicus é também exemplo de fungo xerofílico e extremófilo, com capacidade de crescer e de se reproduzir em condições de baixa disponibilidade de água, tendo uma grande tolerância ao *stress* hídrico. Tem sido identificado em micro-nichos muito particulares dentro de museus, bibliotecas ou arquivos, onde coloniza materiais orgânicos higroscópicos, como colas animais, proteínas, celulose e aglutinantes naturais. A sua presença é particularmente complexa, pois além da degradação enzimática de ligantes e substratos, a produção de ácidos orgânicos e pigmentos secundários pode contribuir para alterações de pH, perda de adesão e mudanças cromáticas nas superfícies [207].

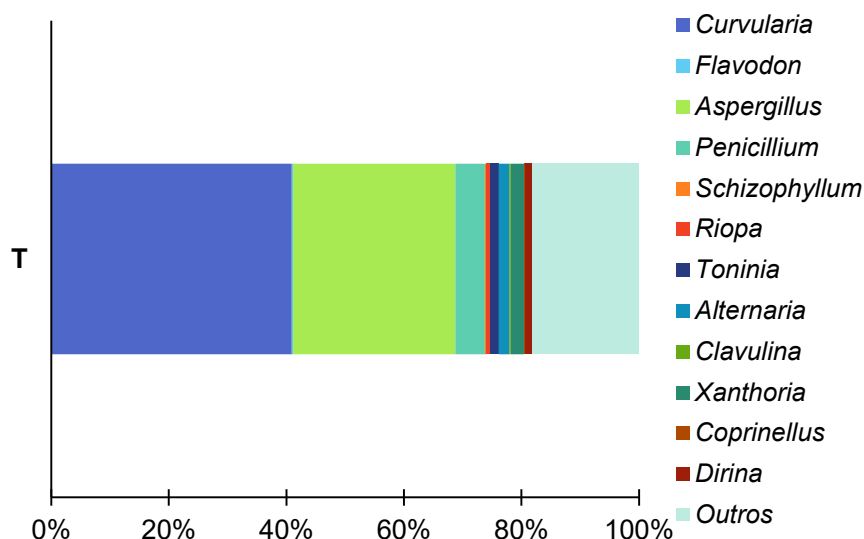


Figura 2.21: Gêneros eucariotas maioritários identificados na pintura T

Os microrganismos do gênero *Curvularia* (40,92%) foram detetados com maior predominância na amostra T (Figura 2.21). Seguiram-se os gêneros *Aspergillus* (27,59%), *Flavodon* (0,23%), *Penicillium* (5,06%), *Dirina* (1,15%), *Xanthoria* (2,30%), *Alternaria* (1,84%), *Toninia* (1,38%), *Riopa* (0,69%), *Schizophyllum* (0,23%), *Clavulina* (0,23%), *Coprinellus* (0,23%), e 18,16% foram considerados como “outros”.

Curvularia lunata foi a espécie mais relevante identificada do gênero *Curvularia*. Este é um fungo filamentoso fitopatogénico, de coloração preta [208], descrito na literatura como produtor de pigmentos de coloração laranja, vermelha e de cor bronze [209]. Foi demonstrado em estudos anteriores que *C. lunata* coloniza e deteriora substratos como arenito, mármore e monumentos de andesito nas regiões tropicais da Indonésia, Índia e Camboja [210]. *C. lunata* foi igualmente identificada como colonizadora de pinturas murais nos templos Chang Yai e Yai Thepnimit, na Tailândia [211].

Os fungos do gênero *Aspergillus*, como já falado anteriormente, para além de poderem provocar manchas esbranquiçadas, na forma de biofilme, como o que se observa na pintura Titanic, podem induzir também descamação da camada pictórica, ao colonizarem a superfície da pintura, promovendo a degradação dos aglutinantes e pigmentos através da sua atividade enzimática e da produção de ácidos orgânicos. Estes processos enfraquecem a coesão dos materiais, originando uma textura fragilizada ou com aspeto escamoso.

Resumidamente, as pinturas estudadas na Universidade de Silpakorn revelaram comunidades microbianas distintas, refletindo a influência combinada de fatores ambientais e do contexto expositivo. Na obra Faith, a predominância da família Dermacoccaceae sugere uma possível ligação à manipulação humana, um aspeto particularmente relevante em pinturas expostas, onde o contacto e a proximidade do público podem contribuir para a introdução de novos microrganismos. Por outro lado, a pintura Titanic apresentou uma comunidade procariota mais rica em Firmicutes, incluindo géneros resistentes e pigmentados, além da presença de géneros eucariotas como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Alternaria*, frequentemente associados a biodeterioração. Estes resultados reforçam que a degradação pictórica resulta da capacidade adaptativa dos microrganismos e da interação entre condições ambientais, práticas humanas e a diversidade de comunidades que colonizam as superfícies.

2.4. Reflexões finais sobre os casos de estudo

A análise integrada dos três casos de estudo – a Galeria dos Vice-Reis da Índia, as pinturas das reservas do MNAA e as pinturas da Universidade de Silpakorn – permite identificar padrões comuns, diferenças significativas e implicações relevantes para a compreensão da biodeterioração em pinturas.

Em todos os contextos, confirmou-se o papel central dos fungos, sobretudo do filo Ascomycota (com géneros como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria* e *Penicillium*), como principais agentes de colonização e degradação das superfícies pictóricas. Estes organismos, amplamente reconhecidos pelo seu potencial deteriorativo, foram associados tanto à degradação estrutural de suportes como madeira e tela, como a alterações cromáticas e à formação de manchas visíveis, frequentemente pela síntese de pigmentos e metabolitos secundários. A sua atividade bioquímica inclui ainda a excreção de enzimas que degradam componentes orgânicos presentes nas camadas pictóricas e de ácidos orgânicos que alteram a superfície. Também em todos os casos foi evidente a coexistência de comunidades bacterianas (Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria), cuja presença pode estar relacionada com fatores ambientais específicos, propriedades químicas dos materiais e mesmo interações sinérgicas com fungos.

Apesar destes elementos comuns, observaram-se diferenças relevantes entre os três casos.

Nas pinturas de Goa, a presença de microrganismos halotolerantes sugeriu uma influência direta das condições ambientais e da localização geográfica da galeria. A presença de microrganismos adaptados a estas condições pode ser igualmente consequência da falta de monitorização adequada no interior da galeria, especialmente notória pelos níveis de humidade elevados nas reservas, e da deterioração natural que ocorre com o tempo nas pinturas, que pode possibilitar a entrada de bactérias nas camadas de tinta ou no material que as envolve (madeira e tela). Além da caracterização taxonómica, a comparação entre as pinturas mostrou que tanto o local onde se encontram as pinturas como o tipo de suporte influenciam fortemente a estrutura das comunidades microbianas. As obras expostas, de forma geral, com menores valores de humidade, apresentaram comunidades mais simples e frequentemente dominadas por poucos grupos, enquanto as peças em reserva, especialmente aquelas que estão associadas a níveis de humidade mais elevados, mostraram composições mais heterogéneas. O tipo de suporte também mostrou ser importante, pois as pinturas sobre madeira mostraram comunidades mais estáveis e menos diversas, enquanto os retratos sobre tela apresentaram maior variabilidade, o que pode refletir a maior porosidade e retenção de água desse suporte. Esses padrões sugerem que a interação entre as características físicas do suporte e as condições ambientais específicas de cada local têm um importante papel na seleção e dinâmica das comunidades microbianas nas pinturas.

Por outro lado, nas pinturas do MNAA, destaca-se a colonização massiva por *Aspergillus* em todas as pinturas e, mesmo todas elas sendo das reservas, houve duas que apresentaram uma composição consideravelmente mais homogénea (1252 e 1727) do que as restantes, sobretudo relativamente às comunidades eucariotas, o que realça o facto de, mesmo no mesmo ambiente de reserva, poder haver variações na dinâmica microbiana. Por sua vez, no caso dos microrganismos procariotas, houve variações que ocorreram dentro da mesma pintura, entre a frente e o verso, evidenciando também a presença de microambientes distintos. A realização de testes com antimicrobianos, como os realizados nas pinturas deste museu (onde se destacou o biocida Biotin-T®), são de extrema importância para arranjar estratégias eficazes que assegurem a preservação a longo prazo destas obras de arte.

Na Tailândia, as variações entre as pinturas Faith e Titanic evidenciaram como fatores ambientais tropicais e a própria dinâmica de exposição em galeria influenciam a colonização microbiana. As diferenças observadas entre as duas obras mostraram que tanto as condições do espaço como a interação humana podem ter um papel determinante nos padrões de biodeterioração.

A análise comparativa dos três estudos de caso – Goa, MNAA e Silpakorn – revela, para além de elementos comuns, uma complexidade notável nas interações entre microrganismos, suportes materiais e ambientes. Estes dados não apenas reforçam o papel central dos fungos, em especial os do filo Ascomycota, como principais agentes de biodeterioração, como também expõem a diversidade de respostas ecológicas microbianas perante variações ambientais e materiais.

Apesar da ubiquidade de géneros como *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium*, os padrões de colonização e as dinâmicas microbianas variaram de forma significativa entre os contextos. Em Goa, a presença de microrganismos halotolerantes aponta diretamente para uma influência da localização geográfica e do clima, sobretudo no que respeita à humidade relativa, e destaca a vulnerabilidade de acervos localizados em regiões costeiras sem controlo ambiental rigoroso. Esta vulnerabilidade é ainda exacerbada por falhas na manutenção e pela ausência de monitorização constante, abrindo caminho à instalação de comunidades microbianas mais resilientes e adaptadas a condições extremas.

No MNAA, mesmo dentro de um contexto de reserva controlada, a heterogeneidade entre pinturas aponta para a existência de microclimas locais e para o papel de fatores aparentemente subtis – como a orientação da pintura ou a natureza química específica das camadas pictóricas – na modelação das comunidades. A diferenciação entre frente e verso de uma mesma obra sublinha a importância da análise localizada e não apenas global de cada peça. A testagem com biocidas, como o Biotin-T[®], é um dado particularmente relevante, pois acrescenta uma dimensão prática à investigação: não basta caracterizar, é essencial intervir com métodos validados e adaptáveis a diferentes contextos.

Já na Universidade de Silpakorn, a comparação entre duas pinturas expostas em galeria evidencia a influência direta do clima tropical e da exposição ao público. Fatores como temperatura elevada, oscilações de humidade e até a proximidade humana contribuem para a modulação das comunidades microbianas, sugerindo que galerias abertas ou com tráfego intenso podem ser zonas de risco acentuado para a biodeterioração, mesmo que não armazenem obras em reserva.

Assim, as considerações finais extraídas deste estudo apontam para três eixos centrais:

1. **A importância do ambiente específico** – não apenas entre museus e países, mas dentro de um mesmo espaço museológico, as variações ambientais podem moldar significativamente a colonização microbiana. A ausência de

monitorização contínua e controlos de temperatura/humidade adequados emerge como um dos fatores de risco mais críticos.

2. **A influência do suporte material** – a natureza do substrato (madeira vs. tela, por exemplo) afeta diretamente a diversidade e estabilidade das comunidades microbianas. Substratos mais porosos, como a tela, retêm mais humidade e favorecem comunidades mais dinâmicas, enquanto suportes menos porosos, como a madeira, tendem a apresentar microbiotas mais estáveis.
3. **A necessidade de estratégias preventivas e reativas** – a deteção precoce, a análise localizada (frente e verso, por exemplo), a caracterização taxonómica e funcional das comunidades, e o uso controlado de biocidas são pilares essenciais para a preservação. Mais do que aplicar protocolos genéricos, torna-se evidente que cada obra exige uma abordagem individualizada, baseada no seu histórico, materialidade e ambiente.

Em suma, o estudo integrado destes três contextos mostra que a biodeterioração em pintura não é um fenómeno uniforme, mas um processo ecológico multifatorial, que depende da interação entre o microrganismo, o suporte e o meio. Compreender esta complexidade é o primeiro passo para desenvolver políticas de conservação realmente eficazes e ajustadas às realidades de cada acervo.

Capítulo 3

A Casa de Fresco do Palácio Condes de Basto em Évora: Caracterização da Comunidade Microbiana e Testes Antimicrobianos para Conservação



Capítulo 3 – A Casa de Fresco do Palácio Condes de Basto em Évora: Caracterização da Comunidade Microbiana e Testes Antimicrobianos para Conservação

A biodeterioração em materiais pétreos é um processo complexo no qual organismos vivos colonizam a superfície da pedra, promovendo a sua degradação física e química, podendo acelerar a perda de coesão do material, alterar a sua cor ou mesmo favorecer a formação de fissuras, comprometendo a integridade do monumento ao longo do tempo.

Neste caso de estudo em particular, a presença de agentes biológicos colonizadores de materiais ornamentados revela-se um fator crítico na deterioração observada. Assim, este capítulo pretende responder às questões-chave dos processos de alteração dos materiais constituintes da Casa de Fresco em Évora, utilizando metodologias complementares baseadas em técnicas dependentes de cultura, análises metagenómicas filogenéticas e avaliação da atividade antimicrobiana, para auxiliar os conservadores-restauradores na intervenção realizada entre Abril e Setembro de 2022 no âmbito do Programa de Valorização e Conservação da Casa de Fresco e Ermida de São Miguel.

Os resultados deste capítulo encontram-se publicados na forma de artigo científico e capítulo de livro:

Silva, I.; Salvador, C.; Arantes, S.; Miller, A.Z.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. The Decorated Garden Grotto of Condes de Basto Palace in Évora, Portugal: Microbial Community Characterization and Biocide Tests for Conservation. *Micro* **2024**, 4, 117–131, doi:10.3390/micro4010008.

Caldeira, A.T.; Silva, I.; Salvador, S.; Arantes, S. Estudo das Comunidades Microbianas presentes na Casa de Fresco pp 76-90 / Study of Microbial Communities Present in Casa de Fresco, pp 166-170 (English version) **2023**, In A Casa de Fresco do Paço de São Miguel: A Ciência ao Serviço da Arte, Fundação Eugénio de Almeida (eds), Évora, Portugal, ISBN: 978-989-53620-2-8

3.1. Introdução ao caso de estudo: A Casa de Fresco do Palácio Condes de Basto

A Fundação Eugénio de Almeida (FEA) teve em curso a intervenção de conservação da Casa de Fresco do Palácio dos Condes de Basto, Património que para além do seu inestimável valor histórico-artístico, é detentor de um enorme potencial de partilha e fruição que importa promover através da sua dinamização, com vista a garantir no futuro a sustentabilidade da sua preservação.

Na segunda metade do século XVI, D. Diogo de Castro introduziu neste jardim um notável conjunto de elementos visualmente cativantes, com particular destaque para a Casa de Fresco. Essa estrutura foi adornada com decoração ornamentada (*“rocaille”*), apresentando um intrincado conjunto de enfeites como conchas, fragmentos de vidro, porcelanas, mosaicos, azulejos, cristais, fósseis, entre outros, usados para ornamentar as suas paredes. O termo *rocaille* é um termo enraizado na história da arte e do design e representa um estilo que deixou uma marca indelével no mundo da arquitetura, do design de interiores e das artes decorativas.

A Casa de Fresco, espaço de pequenas dimensões foi, antigamente, um local de conversa e lazer, pois nas épocas mais quentes do ano a sua frescura permitia o conforto com momentos de contemplação e reflexão, em contacto direto com a natureza [212]. Estando exposto à luz solar pela entrada através de um arco na fachada central, e tendo nas proximidades uma fonte de água, cria um ambiente com temperatura e humidade propício ao crescimento microbiano. Além disso, por estar localizado num jardim ao ar livre, é um local que também está exposto a outros fatores deteriorantes, como a erosão pelo vento ou pela chuva. Portanto, os fatores ambientais externos estão inevitavelmente ligados ao crescimento microbiano neste local.

Infelizmente, os icónicos materiais decorativos contidos neste espaço sofreram inúmeras alterações estéticas, físicas e químicas devido ao crescimento e ação, principalmente de fungos, bactérias e líquenes.

Neste trabalho foi investigada a biodeterioração da Casa de Fresco localizada no Palácio Condes de Basto da FEA (Évora, Portugal) no âmbito de um Projeto de Conservação e Restauro contribuindo para o “Estudo de Caracterização e Diagnóstico do Estado de Conservação”. O estudo foi realizado com os principais objetivos de: (i) deteção de contaminação microbiana; (ii) avaliação e caracterização da comunidade microbiana por NGS e (iii) estudo da efetividade de biocidas comerciais, de forma a promover a salvaguarda deste bem do Património Cultural. Assim, a ação em curso visou a conservação da Casa de Fresco, que teve lugar entre Abril e Setembro de 2022,

enquanto elemento arquitetónico, decorativo e funcional essencial à harmonização de todo o conjunto formado pelo jardim. Este trabalho constituiu uma oportunidade para aprofundar o conhecimento sobre a dimensão histórica, simbólica e material deste Património [213].

3.2. Metodologia











3.2.1. Amostragem

O processo de amostragem (Figura 3.1, Tabela 3.1) foi realizado em áreas representativas da Casa de Fresco com sinais significativos de contaminação e alteração, sob a coordenação de conservadores-restauradores, obedecendo aos requisitos de conservação e minimização do impacto estrutural e estético da obra de arte, recolhendo-se a quantidade mínima necessária para os ensaios. Foram usados métodos não invasivos, que incluem as amostras recolhidas com zaragatoas (Z1 a Z10); e métodos semi-invasivos, em condições semi-assépticas (amostragem realizada com material esterilizado em ambiente exterior). A recolha dos microfragmentos de pedra, retirados com bisturis esterilizados (líquenes identificados como B2, B3, B4, B6 e B8), foi feita próxima a falhas ou fissuras na pedra para evitar danos adicionais.








Figura 3.1: Casa de Fresco localizada no Palácio Condes de Basto (Évora, Portugal) com pormenores do processo de amostragem. Os círculos vermelhos representam o local exato de recolha

Tabela 3.1: Registo fotográfico de cada zona de amostragem na Casa de Fresco

Biofilmes	Zona amostragem	Zaragatoas	Zona amostragem
B2		Z1	
B3		Z3	
B4		Z4	
B6		Z7	
B8		Z8	

(continua)

Tabela 3.1 (continuação)

Zaragatoas	Zona amostragem	Zaragatoas	Zona amostragem
Z9		Z10	
Z2		Z5	
Z6			

3.2.2. Microscopia de fluorescência

Os microfragmentos recolhidos de locais biodeteriorados, foram observados no microscópio ótico (Motic BA410E) sob iluminação de fluorescência – com os filtros de fluorescência FITC (isotiocianato de fluoresceína) e TRITC (isotiocianato de tetrametilrodamina) - e as imagens adquiridas com câmara fotográfica MoticamPro 282B. Foram também visualizadas as evidências de contaminação através da lupa LEICA M205C.

3.2.3. Métodos dependentes de cultura e identificação de isolados fúngicos

O isolamento dos microrganismos eucariotas e todo o procedimento referente à Sequenciação Sanger para identificação desses mesmos isolados encontra-se descrito na secção 2.2.1.3. do Capítulo 2. Os dados de sequência apresentados neste estudo foram carregados no NCBI através do repositório GenBank no Bioproject SUB15689006 (Biosamples PX448815-PX448818).

3.2.4. Avaliação da atividade antifúngica

Foram realizados testes laboratoriais para determinar o efeito de dois biocidas comerciais a serem utilizados pela equipa de restauro na inibição do crescimento

microbiano, nomeadamente, PREVENTOL® Ri 50 (Lanxess, Köln, Alemanha) e BIOTIN-T® (C.T.S., Madrid, Espanha) a 3% de concentração. Culturas mistas, feitas a partir de zaragoas recolhidas de locais com contaminação visível (Z1, Z3, Z4 e Z7) foram realizadas incubando cada zaragatoa separadamente em meio MEA líquido, com agitação a 120 rpm, a 28°C, por 7 dias, para crescimento dos microrganismos. Para testar a eficácia de cada antimicrobiano, foi utilizado o método de difusão em disco de ágar. Os testes de bioatividade foram realizados incorporando 1×10^8 células de cada cultura líquida mista em placas de Petri (9 cm) com meio MEA e os biocidas a serem testados foram colocados em discos de papel estéreis de 20mm (Macherey-Nagel 827 ATD), impregnados com 20 µL da substância antimicrobiana. As placas de petri foram incubadas a 28°C e o crescimento foi monitorizado diariamente. Os halos de inibição do crescimento microbiano ao redor dos discos foram medidos e considerados medida de sensibilidade.

3.2.5. Identificação das comunidades microbianas por NGS

3.2.5.1. Extração do DNA

O DNA metagenómico foi extraído utilizando o Kit E.Z.N.A.® Stool DNA Kit (Omega Bio-tek, Norcross, GA, EUA). As microamostras de biofilmes fúngicos, recolhidas com bisturis estéreis, bem como as zaragoas recolhidas dos diferentes locais de amostragem, foram colocadas a incubar em agitação (100 rpm), durante 48 h, com 200 mg de esferas de vidro X e 540 µL de tampão SLX-Mlus. Após esse período, foi utilizado o vórtex (Bead Ruptor Bead Mill Homogenizer, OMNI Internacional) durante 10 min, até a amostra estar completamente homogeneizada; adicionou-se 60 µL de tampão DS e 20 µL de solução de Proteinase K e voltou a utilizar-se o vórtex para misturar bem. Incubou-se a 70°C por 30 min, colocando a amostra três vezes no vórtex durante este processo. Adicionaram-se 200 µL de tampão SP2 e utilizou-se o vórtex em velocidade máxima durante 30 s e, posteriormente, deixou-se a descansar no gelo por 5 min. Centrifugou-se na velocidade máxima ($\geq 13\,000\ g$) por 5 min e aspirou-se cuidadosamente o máximo de sobrenadante possível para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Adicionou-se 200 µL de reagente cHTR e a amostra foi colocada no vortex na velocidade máxima por 10 s para, posteriormente, deixar descansar à temperatura ambiente por 2 min. Centrifugou-se na velocidade máxima por 2 min e transferiu-se 500 µL do sobrenadante para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Adicionou-se 500 µL de tampão BL e 500 µL de etanol 100% e agitou-se novamente no vórtex na velocidade máxima por 10 s. Inseriu-se uma Mini coluna HiBind® DNA num tubo coletor de 2 mL e transferiu-se para lá toda a amostra anterior.

Centrifugou-se na velocidade máxima por 1 min e foi descartado o filtrado e o tubo coletor. Transferiu-se a Mini coluna HiBind® DNA para um novo tubo coletor e adicionou-se 500 µL de tampão VHB. De seguida, centrifugou-se na velocidade máxima por 30 s e descartou-se novamente o filtrado, reutilizando-se desta vez o tubo coletor. Adicionaram-se 700 µL de tampão de lavagem do DNA e centrifugou-se na velocidade máxima por 1 min, descartando depois o filtrado e reutilizando o tubo. Repetiu-se este processo, para uma segunda etapa de lavagem. Centrifugou-se a Mini coluna HiBind® DNA vazia na velocidade máxima por 2 min à temperatura ambiente e transferiu-se a coluna para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. Adicionaram-se 60 µL de tampão de eluição previamente aquecido a 65°C, diretamente no centro da matriz HiBind®, e deixou-se repousar à temperatura ambiente por 2 min. Por fim, centrifugou-se à velocidade máxima por 1 min e o DNA foi armazenado a - 20°C.

3.2.5.2. Sequenciação do DNA

A metodologia referente à sequenciação do DNA por NGS foi realizada como descrito no ponto 2.1.1.3. do Capítulo 2.

3.3. Resultados e Discussão

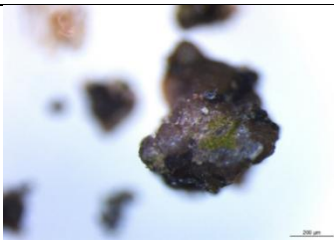
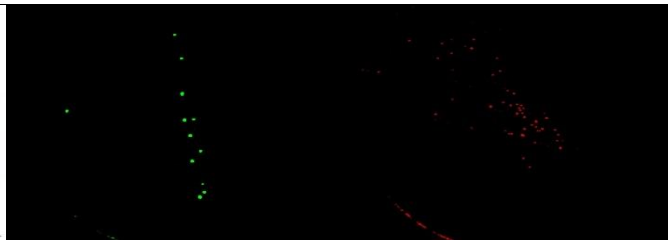
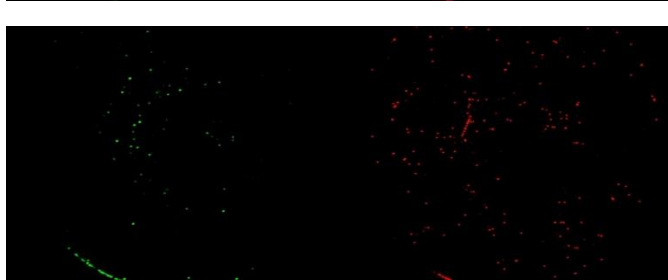
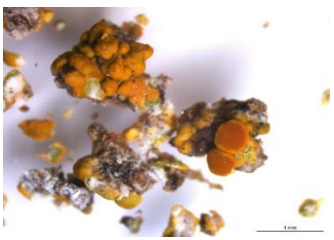
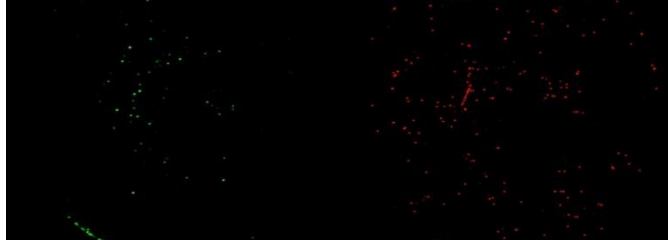
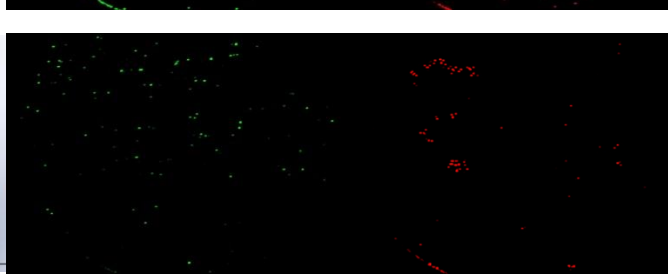

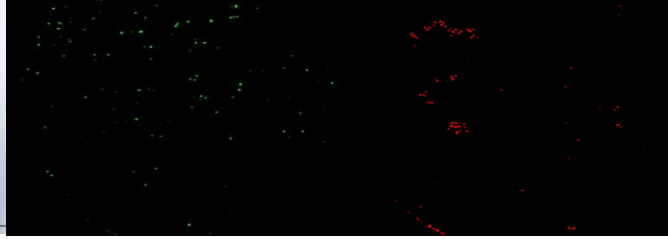
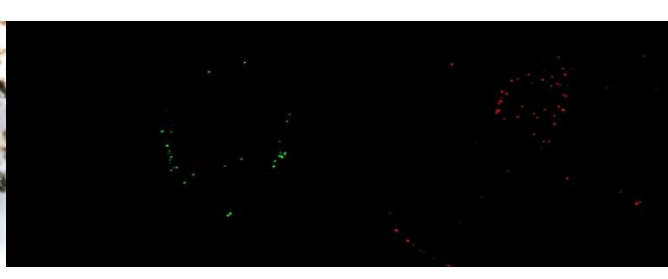

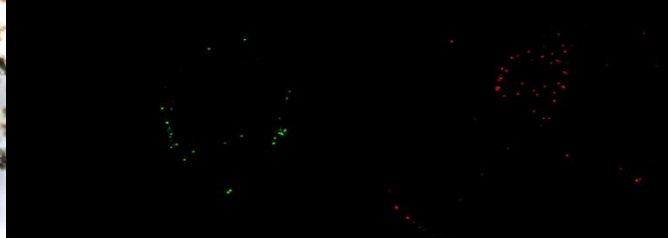
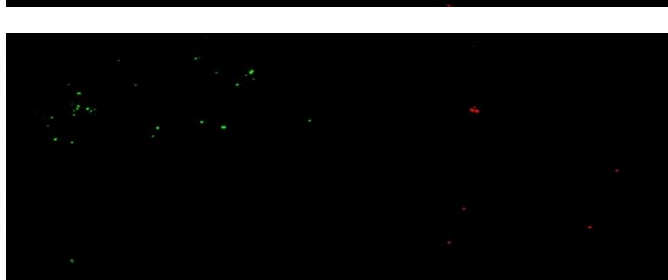

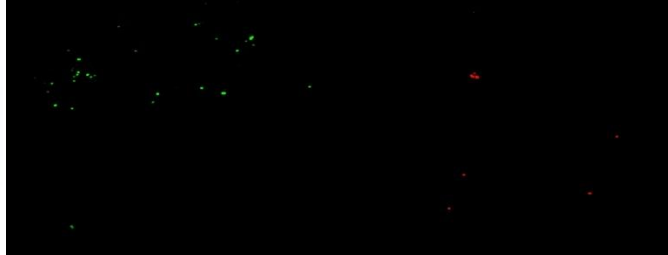
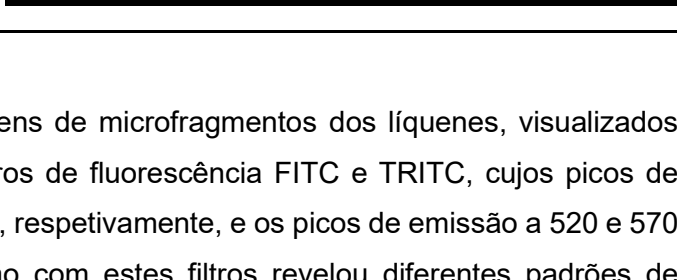
3.3.1. Detecção de contaminação microbiológica

Nos microfragmentos recolhidos dos locais biodeteriorados da FEA, foram observadas evidências de contaminação microbiológica. Algumas estruturas exibiram fluorescência quando excitadas por uma luz apropriada, permitindo a visualização de microrganismos presentes nas amostras.

Os líquenes apresentam propriedades fluorescentes principalmente devido à produção de metabolitos secundários e pigmentos únicos, que desempenham papéis essenciais na proteção contra radiação UV e nos mecanismos de dissipação de energia. Estes compostos, de que são exemplo as antraquinonas, depsidonas e melaninas, absorvem a radiação UV e reemitem parte dessa energia em comprimentos de onda visíveis, criando o efeito fluorescente captado ao microscópio. Este mecanismo de proteção é essencial para a sobrevivência destes microrganismos em ambientes expostos a elevados níveis de radiação, como superfícies rochosas e monumentos históricos [214–216].

Na Tabela 3.2 encontram-se os resultados desta visualização.

Tabela 3.2: Observação dos microfragmentos de pedra por microscopia de fluorescência

Amostra	LEICA M205C	Filtros de fluorescência	
		FITC	TRITC
B2			
B3			
B4			
B6			
B8			



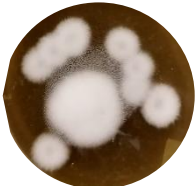
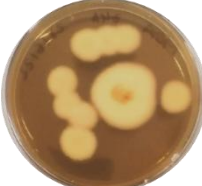
A tabela acima mostra imagens de microfragmentos dos líquenes, visualizados sob microscopia ótica, com os filtros de fluorescência FITC e TRITC, cujos picos de excitação rondam os 490 e 544 nm, respetivamente, e os picos de emissão a 520 e 570 nm, respetivamente. A visualização com estes filtros revelou diferentes padrões de emissão de luz, indicando a possível presença de compostos fluorescentes específicos

nas amostras. A emissão de luz observada sob o filtro FITC pode ser atribuída à presença de compostos como o ácido úsnico, ácido vulpínico e outros depsídeos, enquanto a emissão sob o filtro TRITC pode ser causada por antraquinonas como a parietina. No entanto, para confirmação, a identificação precisa destes compostos requer análises espectrais adicionais.

3.3.2. Caracterização e identificação da população cultivável




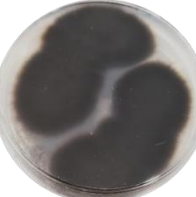
Uma vez detetada a contaminação microbiana, foi caracterizada a população de isolados. O conhecimento detalhado dos fungos que proliferam nos materiais pétreos é essencial não só para neutralizar/reduzir danos estruturais e estéticos, mas também para proteger a saúde dos trabalhadores e visitantes da Casa de Fresco. Conhecer a diversidade de isolados fúngicos é um passo importante para definir medidas preventivas de conservação, já que possibilita a monitorização de espécies-chave e a avaliação de riscos futuros. Assim, a obtenção de isolados puros é fundamental para estudos laboratoriais controlados, como ensaios de sensibilidade a compostos antimicrobianos, que permitem avaliar a eficácia de diferentes agentes de inibição e identificar soluções potencialmente aplicáveis em contexto patrimonial. Esta caracterização (Tabela 3.3) foi baseada nas características de cada isolado microbiano, sendo a identificação das estirpes fúngicas complementada com a sequenciação da região ITS.

Tabela 3.3: Características macroscópicas dos isolados fúngicos da Casa de Fresco com respetiva identificação por Sequenciação Sanger

Amostra	Características macroscópicas		Estirpe	Identificação mais provável	Nr. Acesso <i>Gen Bank</i>
	Frente	Verso			
Z1B			CFEAZ1B	<i>Alternaria</i> sp.	PX448815
Z4A			CFEAZ4A	<i>Psathyrella</i> sp.	PX448816

(continua)

Tabela 3.3 (continuação)

Amostra	Características macroscópicas		Estirpe	Identificação mais provável	Nr. Acesso Gen Bank
	Frente	Verso			
Z4D			CFEAZ4D	<i>Engyodontium</i> sp.	PX448817
Z4E			CFEAZ4E	<i>Cladosporium</i> sp.	PX448818

As estirpes isoladas foram identificadas como *Alternaria* sp. (CFEAZ1B), *Psathyrella* sp. (CFEAZ4A), *Engyodontium* sp. (CFEAZ4D) e *Cladosporium* sp. (CFEAZ4E).

O género *Alternaria*, identificado na amostra Z1B, é considerado um dos principais agentes de biodeterioração, com capacidade de colonização em vários materiais. Šimonovičová *et al.* (2004) identificou *A. alternata* (a espécie identificada com maior percentagem de identidade na amostra Z1B) como uma das espécies dominantes em amostras de pedra deterioradas, produzindo vários ácidos gordos e ésteres de ácidos gordos, bem como coloração castanho-escuro [217]. Para além disso, Diakumaku *et al.* (1995) consideraram as espécies de *Alternaria* como as principais causadoras de manchas castanhas e pretas em mármore, calcários e arenitos de diversos monumentos na Europa e na África, devido principalmente às suas características de pigmentação e crescimento. *A. alternata* também já foi isolada de revestimentos de aragonite em algumas caves subterrâneas [217–219].

Engyodontium album, a espécie com maior percentagem de identidade identificada do género *Engyodontium* na amostra Z4D, é uma espécie fúngica saprófita ambiental e um microrganismo patogénico oportunista [220]. Tem sido frequentemente descrito em edifícios históricos, museus, bibliotecas e locais turísticos. A sua deteção em todo o mundo demonstra que é uma espécie de fungo ubíqua, tendo sido já isolado em toda a Europa, de Portugal à Rússia, com observações da sua presença na Inglaterra, Espanha, França, Alemanha, Itália e Polónia [221].

Os sítios mais comuns em que este eucariota já foi descrito dizem respeito a monumentos de pedra religiosos, como igrejas, catedrais ou mosteiros. Por exemplo, Mang *et al.* (2020) demonstraram a contaminação por este fungo em duas igrejas rupestres de Matera (sul da Itália) [222]. No estudo de Ponizovskaya *et al.* (2019), *E. album* foi identificado como uma das espécies mais abundantes em artefactos feitos de calcário e gesso, no espaço interior de monumentos do património cultural, tendo um papel bastante significativo na deterioração de materiais em monumentos culturais e museus. A frequência da sua ocorrência foi a maior entre todas as espécies isoladas, sendo realçado o desenvolvimento fúngico abundante nos locais com eflorescências salinas, o que lhe confere claramente uma vantagem de proliferação [223]. Este facto pode ser explicado, em parte, pelo facto deste fungo produzir proteases, α -amilase, esterase, fosfatase lipase e quitinase, que são enzimas cujos estudos já demonstraram a sua eficácia em condições de elevada salinidade [221].

Trovão *et al.* (2020) realizaram análises *in-vitro* para compreensão da interação de *E. album* com o calcário dolomítico e concluíram que o fungo promoveu modificações estéticas visíveis pela significativa proliferação do seu micélio branco. Os resultados obtidos apontam para uma grande versatilidade metabólica que lhe permite colonizar vastamente o calcário, tanto em ambientes pobres como ricos em nutrientes [224]. A mesma equipa de investigadores tinha já, anteriormente, estudado duas capelas em Coimbra, considerada Património Mundial da UNESCO, em que identificaram um biofilme complexo escuro e verde na presença de eflorescências salinas em paredes húmidas na capela de São Miguel e na de Santa Maria, cuja espécie predominante foi *E. album* [225].

Na amostra Z4E foi identificado o género *Cladosporium*, e a espécie *Cladosporium sphaerospermum*, já anteriormente reportada na literatura como um dos principais agentes fúngicos envolvidos na deterioração de estruturas de argamassa e cimento [226]. No estudo de Shirakawa *et al.* (2003) demonstrou-se que *C. sphaerospermum* tem capacidade de dissolução do cálcio pela segregação de ácidos orgânicos seguida de precipitação de cálcio criando cristais na superfície do material. Este eucariota tem capacidade de causar alterações químicas nos substratos da argamassa, bem como danos físicos devido ao crescimento de estruturas filamentosas [227].

Foi igualmente identificado como um dos fungos predominantes no ar interior de arquivos, bibliotecas e museus [228]. Segundo Segers *et al.* (2015), *C. sphaerospermum* é um organismo xerófilo, e isso confere-lhe grande vantagem na colonização do interior

de edifícios, sendo proposto como uma das principais causas de danos estéticos e estruturais cuja exposição prolongada pode representar um risco à saúde [229].

3.3.3. Caracterização da microbiota nos materiais pétreos da Casa de Fresco por NGS

3.3.3.1. Comunidades eucariotas

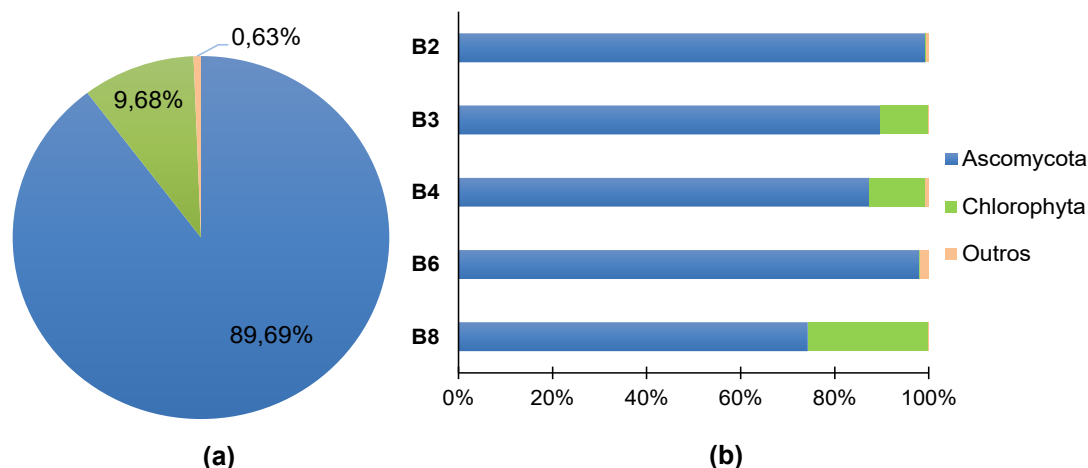


Figura 3.2: Filos gerais predominantes (a) e filios específicos de cada amostra (b) da população eucariota presente na Casa de Fresco

Os resultados presentes na Figura 3.2 mostram que a população eucariota presente nos biofilmes, considerando o conjunto de todas as amostras, pertencem maioritariamente ao filo Ascomycota (89,69%) seguido de Chlorophyta (9,68%) e 0,63% para a população considerada como “outros” (designação genérica que considera os microrganismos menos representativos).

Os Ascomycota constituem um dos maiores e mais diversos filios de fungos, abrangendo cerca de 64 000 espécies conhecidas, destacando-se sobretudo pela sua ampla variedade ecológica e ubiquidade. Encontram-se em quase todos os ecossistemas terrestres e aquáticos, desempenhando papéis cruciais na decomposição de matéria orgânica e como organismos mutualistas, parasitas ou patogénicos. Aproximadamente 40% das espécies são liquenizadas e têm capacidade de colonizar ambientes extremos, desde zonas com gelo a sedimentos marinhos profundos [230].

Segundo evidências científicas, a maioria das espécies de fungos envolvidas na deterioração do património pertence ao filo Ascomycota. Os membros deste filo já foram

identificados como biodeteriogenos, presentes em: (i) paredes de caves pré-históricas registadas como Património Cultural mundial [231]; (ii) relíquias culturais de madeira, incluindo substratos em igrejas históricas, alterando as propriedades químicas e físicas do material [232,233]; (iii) artefactos de museus, com a formação de biofilmes [139]; (iv) monumentos de pedra, tendo capacidade de solubilizar uma variedade de silicatos sintéticos e naturais, produzindo vários ácidos orgânicos e contribuindo, desse modo, para a biodeterioração do substrato [21]; (v) em pinturas em tela, como resultado da sua atividade metabólica fúngica e capacidade de hidrolisar ácidos gordos de cadeia curta, além de atividades amilolíticas, e ocasionalmente proteolíticas e glicolíticas [73].

Chlorophyta é um táxon de algas verdes eucarióticas que estabelece frequentemente relações simbióticas com fungos para formar líquenes. Como produtor primário, esta alga parceira alimenta os fungos com hidratos de carbono derivados da fotossíntese para manter a relação com o líquen [234].

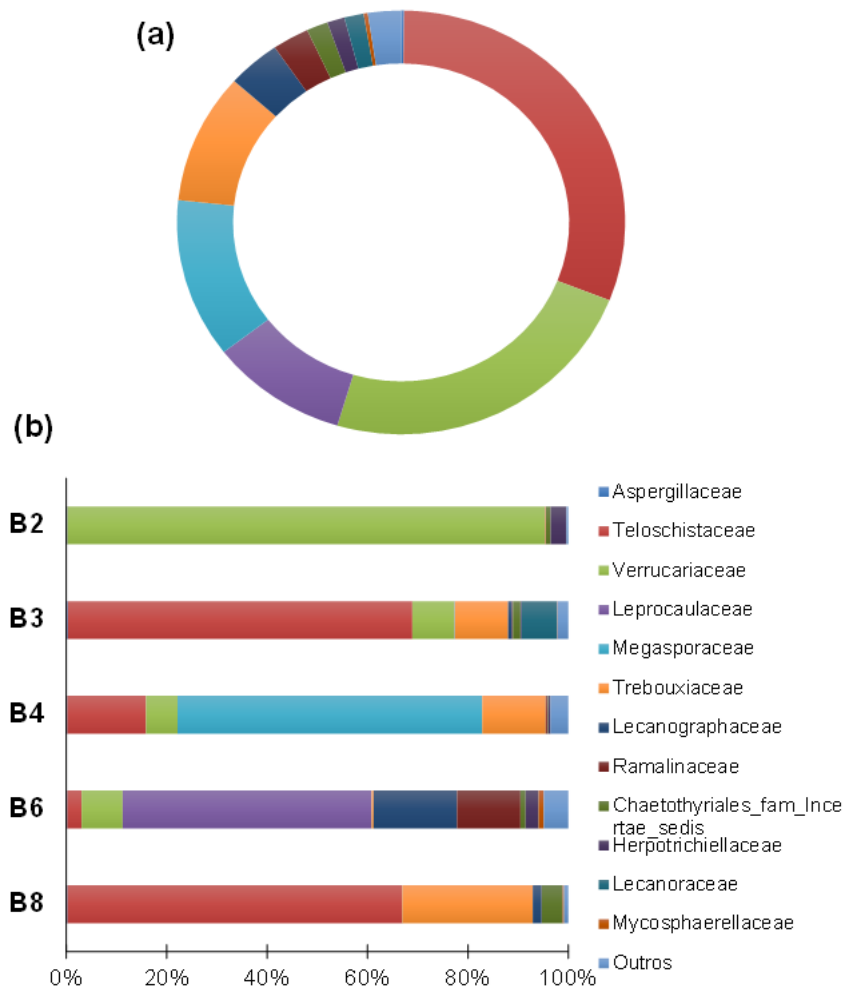


Figura 3.3: Famílias gerais predominantes (a) e famílias específicas de cada amostra (b) da população eucariota presentes na Casa de Fresco

As comunidades eucariotas mais representativas pertencem às famílias (Figura 3.3) Teloschistaceae (30,77%), Verrucariaceae (23,61%), Megasporaceae (12,16%), Trebouxiaceae (9,95%), Leprocaulaceae (9,93%), Lecanographaceae (3,83%), Ramalinaceae (2,65%), Chaetothyriales_fam_Incertae_sedis (1,54%), Lecanoraceae (1,40%), Herpotrichiellaceae (1,26%), Mycosphaerellaceae (0,30%) e Aspergillaceae (0,22%), sendo que 2,38% das famílias foram incluídas em “outros”.

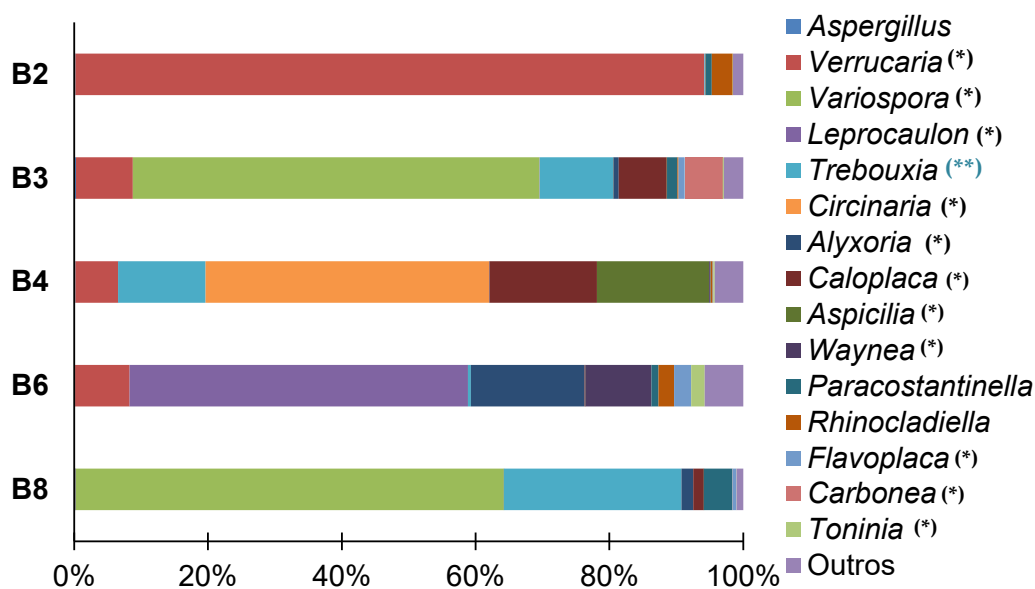


Figura 3.4: Gêneros eucariotas predominantes; (*) representam os gêneros de fungos liquenizados; (**) destaca o fotobionte associado aos líquenes identificados no estudo

Os gêneros maioritários presentes nas amostras (Figura 3.4), incluem *Variospora* (24,95%), *Verrucaria* (23,42%), *Trebouxia* (10,22%), *Leprocaulon* (10,14%), *Circinaria* (8,48%), *Caloplaca* (4,99%), *Alyxoria* (3,92%), *Aspicilia* (3,38%), *Waynea* (1,99%), *Paracostantinella* (1,58%), *Rhinocladiella* (1,19%), *Carbonea* (1,14%), *Flavoplaca* (0,82%), *Toninia* (0,51%), *Aspergillus* (0,18%) e 3,09% correspondentes a “outros” gêneros minoritários.

A família Teloschistaceae é uma das maiores famílias de fungos liquenizados, e a primeira com maior predominância nas amostras em estudo, com mais de 1000 espécies conhecidas em todo o mundo. Com a sua cor laranja brilhante e talos conspícuos, muitas espécies desta família estão entre os líquenes mais atraentes esteticamente e nos mais diversificados [235]. Particularmente, as espécies de *Variospora* são notavelmente tolerantes a forte aridez, irradiação solar direta, eutrofização elevada e poluição do ar. Este género de líquen representa 60,8% do biofilme B3.

Deste género identificou-se a espécie *Variospora thallincola*, caracterizada por um talo crostoso e amarelo-dourado brilhante, cuja presença notória parece ser a justificação para a coloração alaranjada que a pedra apresenta neste local de amostragem [236]. Curiosamente, a observação por microscopia de fluorescência (Tabela 3.2) revelou que a amostra B3, dominada pelo líquen *V. thallincola*, exibiu uma emissão de luz característica sob os filtros FITC e TRITC. Assim, é interessante perceber que os membros da família Teloschistaceae, incluindo *V. thallincola*, produzem antraquinonas, tanto na estrutura vegetativa (talo) como no corpo de frutificação, cuja acumulação lhes confere a pigmentação característica laranja e amarela. As antraquinonas como metabolitos secundários são particularmente importantes neste líquenes, em ambientes rochosos, protegendo-os contra radiação UV, permitindo-lhes colonizar áreas muito expostas à luz solar, como é o caso de monumentos em pedra, desencadeando uma aceleração na sua diversificação [237,238].

Além disso, outros géneros eucariotas relevantes, associados a este líquen, foram identificados como *Verrucaria*, *Caloplaca*, *Paracostantinella* e *Carbonea*.

Relativamente à amostra B2, a presença notória do género *Verrucaria* (94,0%) sugere-se como a principal causa da evidência estética de biodeterioração observada nesta amostra. Este é um género de líquen da família *Verrucariaceae*, altamente diversificado e tipicamente visto como uma crosta preta que cobre as superfícies de pedra [239]. *Verrucaria nigrescens* é frequentemente identificada em rochas calcárias, mármore e argamassas, descrita como uma espécie colonizadora de edifícios, monumentos patrimoniais e calcários em toda a Europa, podendo ser encontrada esporadicamente em substratos ricos em sílica, como arenitos e pedras quartzíticas [240]. Esta espécie é considerada um agente de biodeterioração altamente agressivo por causar danos estéticos (principalmente escurecimento do substrato) e desintegração do material pétreo [241].

Segundo Carter *et al.* (2004), a cor preta do talo de *V. nigrescens* desempenha um papel significativo na determinação da resposta térmica da superfície da rocha e que pode aumentar a suscetibilidade da rocha à quebra. De facto, foi anteriormente sugerido que a presença de líquenes pode aumentar a temperatura da superfície das rochas. As superfícies enegrecidas, colonizadas por líquenes, podem ser até 8°C mais quentes do que as áreas não colonizadas, o que sugere que tais microrganismos podem afetar o regime de temperatura em monumentos de pedra. Um possível mecanismo para este acontecimento é a absorção de radiação no talo do líquen, a condução para a superfície da rocha e a prevenção do arrefecimento da superfície da rocha por um efeito de

cobertura [242]. Foi também identificada como a espécie epilítica mais abundante, associada a algas verdes, num estudo de Fröoberg (2011) onde se procurou estudar a abundância e diversidade de líquenes ao longo de fendas de pavimentos calcários [243].

Para além do género predominante *Verrucaria*, foram também identificados os principais géneros *Rhinocladiella*, *Paracostantinella* e *Aspergillus*.

As manchas brancas do líquen da amostra B4 foram associadas à notável presença dos géneros liquenizados *Circinaria* (42,4%) e *Caloplaca* (16,0%). Em relação a esses géneros de líquenes, identificaram-se as espécies *Circinaria calcarea* e *Caloplaca teicholyta* que, de acordo com a literatura, são geralmente identificados em materiais pétreos de locais históricos em todo o mundo, como mosteiros, esculturas, catedrais e templos [244–250]. Para além das observações estéticas resultantes da colonização por líquenes, o talo epilítico crostoso do género *Caloplaca* parece tornar-se totalmente integrado no substrato, o que significa que, quando ocorrem alterações no volume do talo devido à expansão e contração, isso pode contribuir para os processos de biodeterioração através das alterações geradas pela sua penetração interna e capacidade de alteração mecânica [251].

Outros géneros significativos, associados a estes géneros liquenizados nesta amostra, foram *Aspicilia* e *Verrucaria*.

O aspeto esverdeado do líquen da amostra B6 sugere-se ser explicado pela composição maioritária do fungo liquenizado *Leprocaulon* (50,6%) nesta amostra. As espécies de *Leprocaulon* geralmente crescem no solo ou em detritos, frequentemente entre ou sobre musgos, em rochas ou na casca das árvores e geralmente crescem misturados com outros líquenes em quase todos os tipos de substrato, formando crostas no solo ou na face da rocha [252]. *Verrucaria*, *Alyxoria*, *Waynea*, *Rhinocladiella*, *Flavoplaca* e *Toninia* são géneros que também foram identificados como relevantes nesta amostra.

Por fim, o género maioritário da amostra B8 foi identificado como *Variospora* (64,0%) e outros géneros importantes associados a esta amostra foram identificados como *Alyxoria*, *Caloplaca* e *Paracostantinella*.

Por outro lado, *Trebouxia* foi o género de algas verdes unicelulares identificado maioritariamente como fotobionte associado aos líquenes presentes no estudo. É um organismo fotossintético e ubíquo, sendo que mais de metade de todas as espécies de líquenes existentes, têm esta como seu fotobionte, o que a torna a alga mais comum e amplamente distribuída no mundo [253–255]. É conhecida por colonizar

essencialmente monumentos de pedra [256,257], em áreas protegidas pela sombra e caracterizadas por baixa humidade do substrato ou ainda propensas à dessecação [258].

3.3.3.2. Comunidades procariotas

No que diz respeito à comunidade microbiana de procariotas, neste estudo a análise metagenómica filogenética da região V3-V4 do gene 16S foi feita: (i) em biofilmes recolhidos na forma de microfragmentos, na parte exterior da Casa de Fresco (B3, B6 e B8) e (ii) através da recolha de zaragatoas (Z1 a Z10), em vários locais do interior do monumento.

Esta abordagem é particularmente importante pela associação conhecida que existe entre uma ampla gama de bactérias associadas a líquenes, como revelado por Grube *et al.* (2015) [259]. Esta evidência foi anteriormente fornecida por uma série de estudos baseados em evidências morfológicas usando isolados cultiváveis de bactérias em líquenes [260]. Bates *et al.* (2011) corroboram a ideia de que as comunidades bacterianas associadas aos líquenes são altamente organizadas, possivelmente como resultado do papel funcional que desempenham na simbiose dos líquenes, e também revelam que alguns táxons bacterianos são predominantes em várias espécies de líquenes [261]. No talo do líquen, as bactérias formam frequentemente comunidades semelhantes a biofilmes e estão intimamente ligadas às estruturas fúngicas, especialmente às superfícies hidrofílicas dos líquenes. Além disso, as bactérias são ocasionalmente vistas dentro das hifas dos hospedeiros fúngicos e podem penetrar na matriz intercelular do córtex superior em diferentes profundidades [262].

O DNA extraído dos diferentes locais foi recuperado e utilizado para os estudos de sequenciação, cuja caracterização bacteriana com os principais níveis taxonómicos são discutidos a seguir.

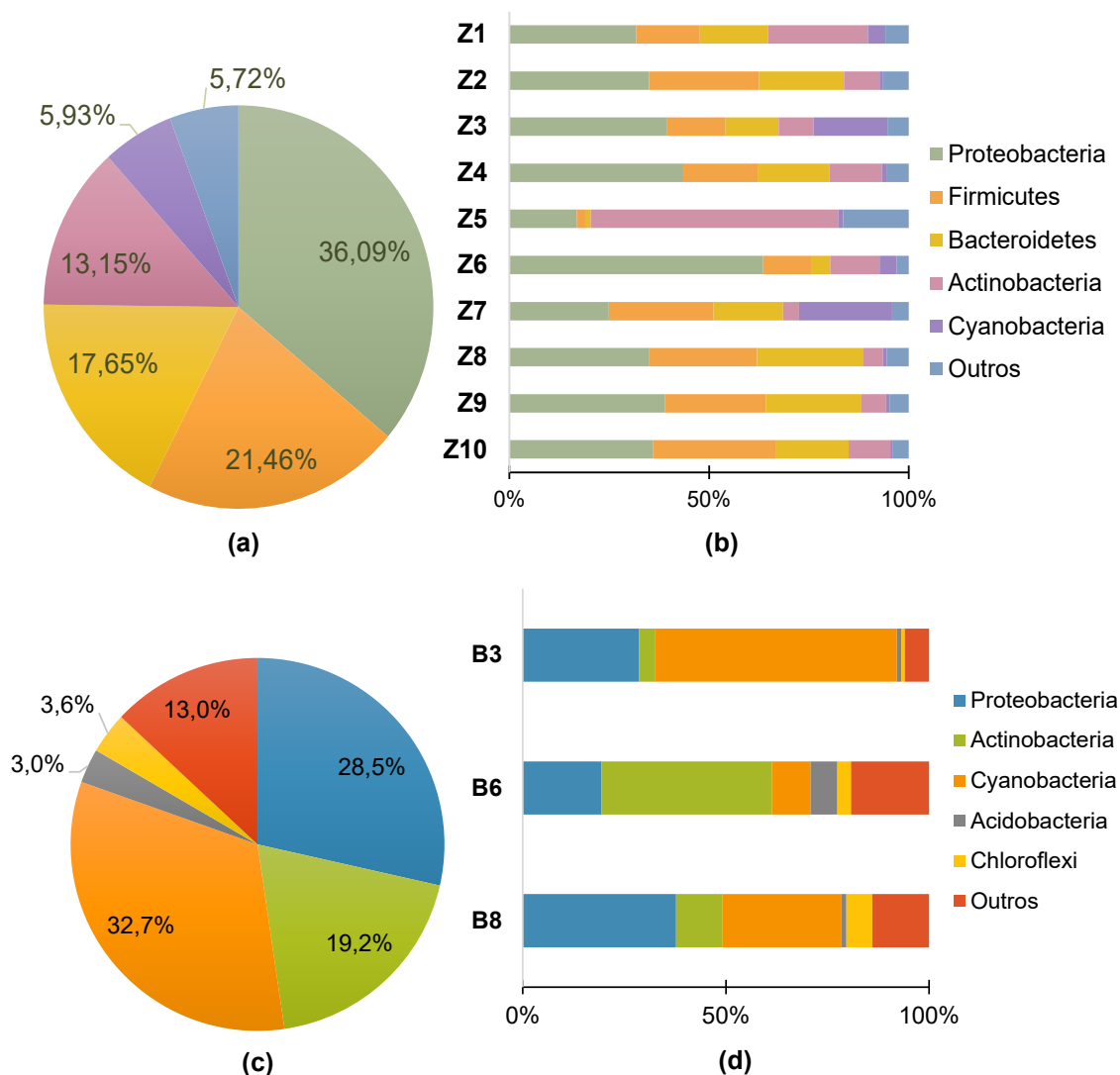


Figura 3.5: Filos gerais predominantes e filios específicos de cada amostra da comunidade procariota nas amostras do interior (a,b) e do exterior (c,d) da Casa de Fresco

Da comunidade microbiana presente nas zonas cuja amostragem foi feita através de zaragatoas (no interior), destacam-se os filios (Figura 3.5 (a) e (b)): Proteobacteria (36,09%), Firmicutes (21,46%), Bacteroidetes (17,65%), Actinobacteria (13,15%), Cyanobacteria (5,93%) e 5,72% para os procariotas considerados como “outros”. Nas amostras de biofilmes do exterior (Figura 3.5 (c) e (d)) o Filio Cyanobacteria (32,7%) foi predominante, seguido de Proteobacteria (28,5%), Actinobacteria (19,2%), Acidobacteria (3,0%) e Chloroflexi (3,6%), sendo 13,0% dos filios considerados como “outros.”

As Proteobacteria são atualmente o maior filio dentro do domínio das bactérias e representam a grande maioria das bactérias Gram-negativas conhecidas. Este grupo de microrganismos é omnipresente, podendo colonizar quase todos os tipos de materiais

e tem ainda a capacidade de formar biofilmes ou agregados de microrganismos que aderem uns aos outros para facilitar a sobrevivência da comunidade em superfícies rochosas, reter água e nutrientes. No estudo de Skipper *et al.* (2022), em que se realizou uma análise metagenômica do microbioma bacteriano do calcário, e o papel dos biofilmes associados na biodeterioração de superfícies de pedra patrimoniais, o filo Proteobacteria estava entre os que foram significativamente detetados em superfícies danificadas [263].

No que respeita ao filo Actinobacteria, são igualmente conhecidas por representar um risco potencial para o Património natural e cultural, considerado um filo predominante do microbioma pétreo. Os filamentos de Actinobacteria podem crescer e estender-se na pedra, facilitando não apenas a fixação do microbioma à pedra, mas também o acesso aos minerais dentro da pedra [61]. Estes microrganismos têm uma enorme capacidade de adesão e, por isso, têm sido identificados biofilmes na superfície de antigos monumentos de pedra, em paredes de caves com desenhos pré-históricos, em antigas pinturas murais e frescos, em catacumbas históricas e nas paredes de castelos históricos e artísticos [264]. Assim, os membros deste filo habitam a pedra de forma mais eficaz do que a maioria das bactérias unicelulares, o que é provavelmente atribuído ao seu crescimento filamentoso e à sua utilização efetiva de várias fontes de nitrogénio e carbono [52].

Em estudos recentes, através de técnicas moleculares, foi revelado que uma grande diversidade de bactérias do filo Proteobacteria, Cianobactéria, Bacteroidetes, Actinobacteria e Firmicutes estão presentes em **relações simbióticas com líquenes**, desempenhando diversas funções nesta associação como: fornecimento de nutrientes, mobilização de ferro e fosfato; fixação de nitrogénio para crescimento simbiótico de líquenes; fornecimento de resistência a fatores abióticos e bióticos, desintoxicação de metabólitos, fonte de vitamina B12 para a fotossíntese, libertação de hormonas que promovem o desenvolvimento de fungos e algas e degradação de seções mais antigas do talo do líquen [261,265].

Por exemplo, de acordo com Rikkinen (2013), nos talos dos líquenes, as cianobactérias contribuem para a simbiose fornecendo açúcar e/ou azoto atmosférico fixo e, em troca, o fungo hospedeiro fornece às cianobactérias um ambiente relativamente estável, água e dióxido de carbono, conferindo-lhe proteção contra fatores ambientais externos [266].

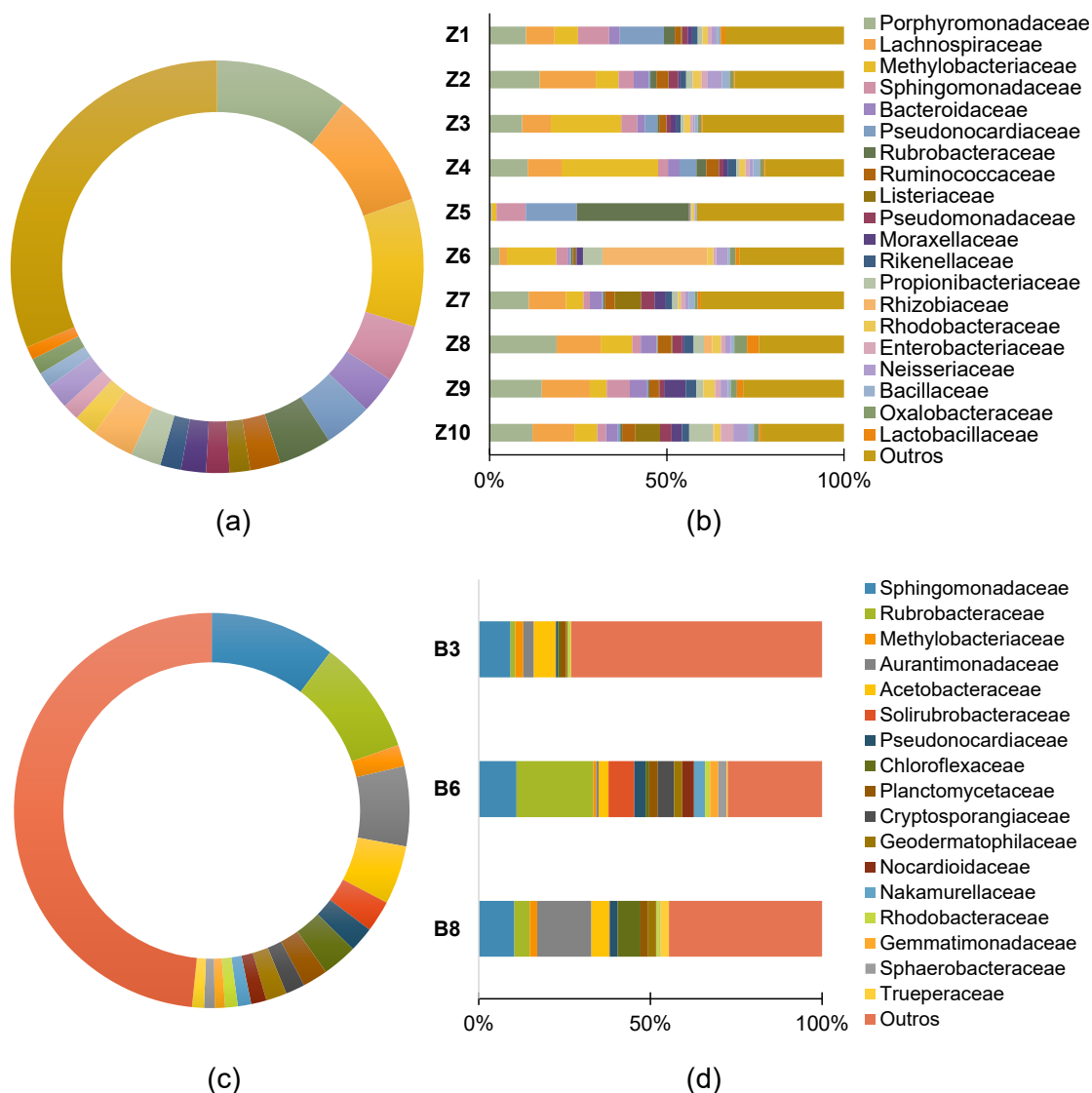


Figura 3.6: Famílias gerais predominantes e famílias específicas de cada amostra da comunidade procariota nas amostras do interior (a,b) e do exterior (c,d) da Casa de Fresco

As famílias com maior abundância relativa nas amostras interiores (Figura 3.6 (a) e (b)) foram identificadas como Porphyrimonadaceae (10,47%), Methylobacteriaceae (10,04%), Lachnospiraceae (9,20%), Sphingomonadaceae (4,50%), Rubrobacteraceae (4,13%), Pseudonocardiaceae (3,76%), Rhizobiaceae (3,30%), Bacteroidaceae (2,95%), Ruminococcaceae (2,37%), Propionibacteriaceae (2,37%), Moraxellaceae (1,95%), Neisseriaceae (1,95%), Pseudomonadaceae (1,82%), Rhodobacteraceae (1,80%), Rikenellaceae (1,64%), Listeriaceae (1,62%), Enterobacteriaceae (1,30%), Oxalobacteraceae (1,26%), Bacillaceae (1,18%) e Lactobacillaceae (1,02%). 31,38% das famílias foram consideradas como “outros”.

Relativamente às amostras de biofilmes do exterior (Figura 3.6 (c) e (d)) predominaram Sphingomonadaceae (10,22%), Rubrobacteraceae (9,41%),

Aurantimonadaceae (6,53%), Acetobacteraceae (4,80%), Chloroflexaceae (2,85%), Solirubrobacteraceae (2,58%), Planctomycetaceae (2,06%), Pseudonocardiaceae (2,05%) Methylobacteriaceae (1,76%), Geodermatophilaceae (1,70%), Cryptosporangiaceae (1,58%), Nocardioideaceae (1,25%), Nakamurellaceae (1,09%), Rhodobacteraceae (1,03%), Trueperaceae (0,97%), Sphaerobacteraceae (0,87%), Gemmatimonadaceae (0,83%) e 48,40% das famílias foram consideradas minoritárias.

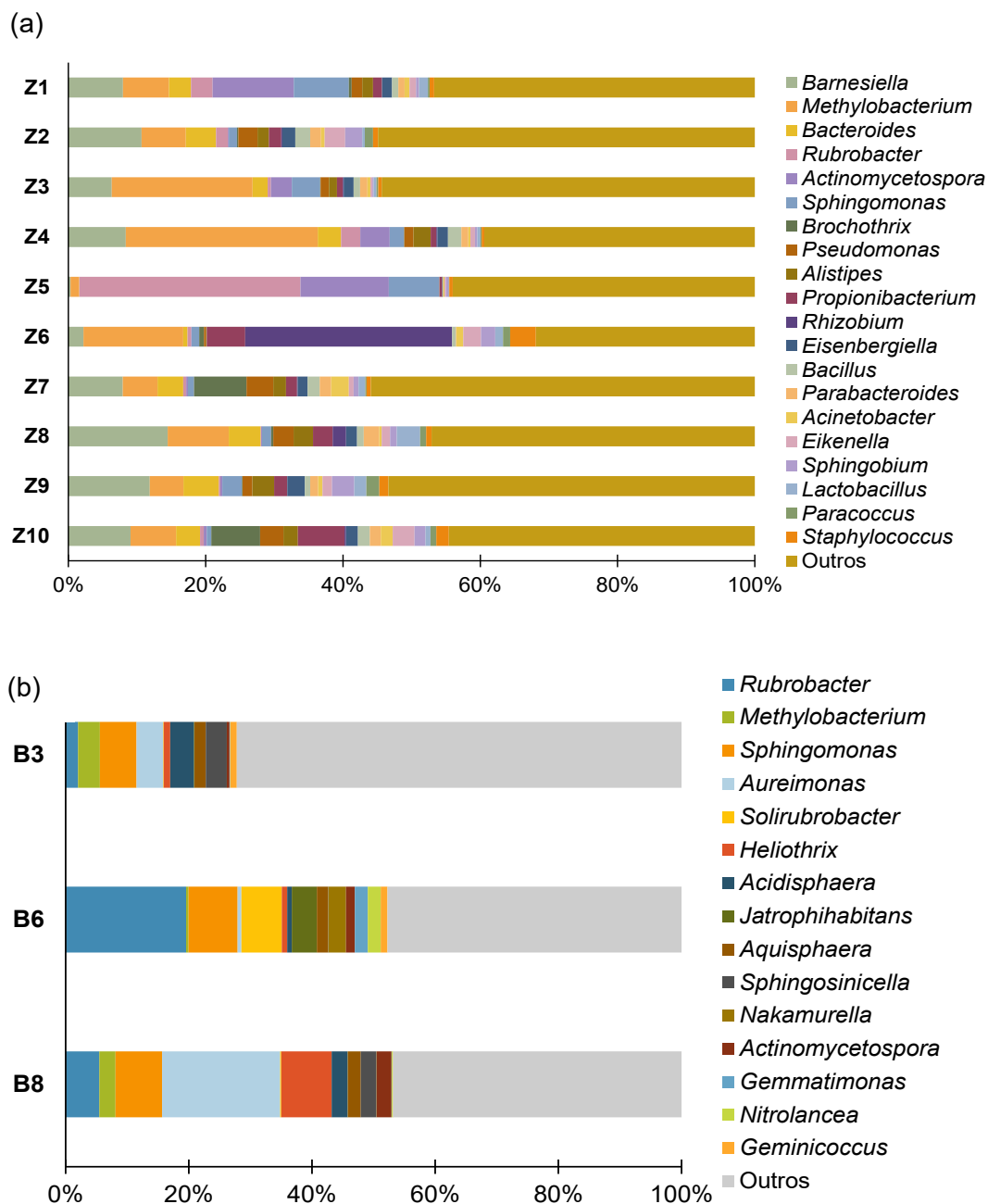


Figura 3.7: Gêneros procariotas dominantes nas amostras do interior (a) e do exterior (b) da Casa de Fresco

As bactérias do género *Methylobacterium* (10,30%) foram os microrganismos identificados em maior abundância nas amostras recolhidas com zaragatoa no interior da Casa de Fresco (Figura 3.7 (a)), seguido por *Barnesiella* (7,90%), *Rubrobacter* (4,22%), *Rhizobium* (3,29%), *Actinomycespora* (3,33%), *Bacteroides* (3,09%), *Sphingomonas* (2,96%), *Propionibacterium* (2,38%), *Pseudomonas* (1,89%), *Alistipes* (1,71%), *Brochothrix* (1,66%), *Eikenella* (1,41%), *Eisenbergiella* (1,37%), *Sphingobium* (1,25%), *Bacillus* (1,20%), *Parabacteroides* (1,14%), *Staphylococcus* (1,11%), *Lactobacillus* (1,05%), *Acinetobacter* (0,84%) e *Paracoccus* (0,68%). 47,23% correspondem a géneros considerados como “outros”.

Por outro lado, nas amostras de biofilmes do exterior (Figura 3.7 (b)) identificaram-se os géneros *Rubrobacter* (9,01%), *Aureimonas* (8,03%), *Sphingomonas* (7,17%), *Heliothrix* (3,38%), *Acidisphaera* (2,40%), *Solirubrobacter* (2,27%), *Methylobacterium* (2,19%), *Sphingosinicella* (2,00%), *Aquisphaera* (1,94%), *Actinomycespora* (1,43%), *Jatrophihabitans* (1,38%), *Nakamurella* (0,97%), *Nitrolancea* (0,77%), *Gemmatimonas* (0,74%), *Geminococcus* (0,72%) e 55,61% corresponderam a géneros considerados como “outros”.

Methylobacterium foi o género bacteriano com maior representatividade nas amostras em estudo. A maioria são metilotróficos facultativos e de pigmentação rosa, colonizadores de substratos pétreos. Como mencionado anteriormente, é um género com elevada capacidade de formação de biofilmes e resiste a inúmeros fatores de stress. Para além disso, e particularmente interessante neste contexto, devido à sua capacidade metabólica única, pensa-se que possa ter um papel benéfico na simbiose com líquenes [267].

A presença dos géneros *Rubrobacter*, *Sphingomonas*, *Aureimonas* e *Pseudomonas* também se revelou particularmente relevante nas amostras analisadas, sendo reconhecidos na literatura como componentes frequentes das comunidades microbianas associadas a líquenes [268,269].

3.3.4. Determinação da eficácia antimicrobiana

Com o objetivo de selecionar o agente antimicrobiano mais adequado à intervenção de conservação e restauro da Casa de Fresco, foram avaliados os produtos Preventol® e Biotin-T® quanto à sua eficácia frente a culturas microbianas mistas provenientes de áreas com evidente presença de biofilmes. Os resultados demonstraram que ambos os compostos apresentaram atividade antifúngica mensurável, expressa pela formação de halos de inibição (Tabela 3.4), embora com diferenças na amplitude dos efeitos observados. Estes dados permitiram comparar a eficiência relativa dos biocidas e apoiar a escolha do produto mais adequado para aplicação no contexto patrimonial em estudo.

Tabela 3.4: Efeito dos compostos comerciais contra as comunidades microbianas da Casa de Fresco


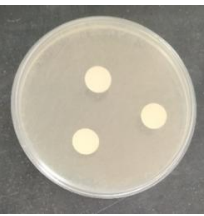
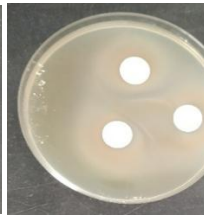
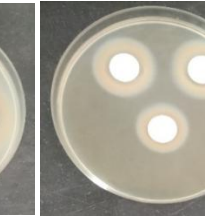
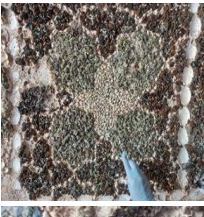

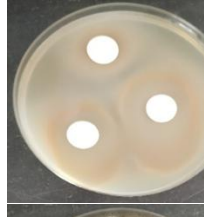
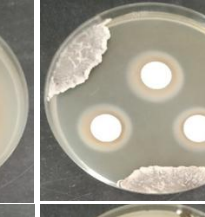

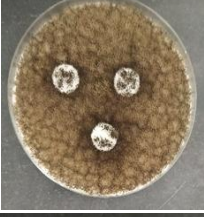
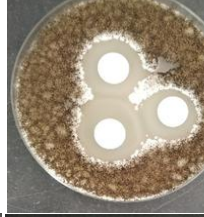
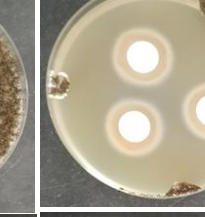



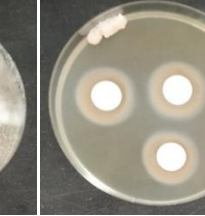


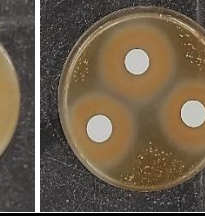
Amostra	Amostragem	Controlo	PREVENTOL®	BIOTIN-T®
Z1				
Z3				
Z4				
Z7				
Cultura mista das várias zonas				

Tabela 3.5: Medição dos halos de inibição (mm) para cada zona de amostragem

Zona de amostragem	Halos de inibição (mm)	
	PREVENTOL®	BIOTIN-T®
Z1	32,0 ± 5,0	it ¹
Z3	12,0 ± 1,0	47,0 ± 3,0
Z4	26,0 ± 4,0	35,0 ± 1,0
Z7	4,0 ± 2,0	27,0 ± 1,0
Cultura mista	45,0 ± 0,3	44,0 ± 1,0

Pela observação da Tabela 3.5, entre os dois compostos comerciais testados, o composto Biotin-T® foi o agente mais eficiente para inibir o desenvolvimento dos fungos das várias zonas de amostragem, nomeadamente Z1, Z3, Z4 e Z7. Os fungos presentes na amostra Z1 foram os mais suscetíveis ao antimicrobiano, uma vez que se verificou inibição total, seguido dos fungos na amostra Z3, evidenciado pela formação de um halo de inibição de 47,0 ± 3,0 mm. Na cultura mista, o composto Preventol® foi o que produziu melhores resultados, verificando-se um halo de inibição de 45,0 ± 0,3 mm. Este último composto possui grupos químicos hidrofílicos e hidrofóbicos, capazes de romper a estrutura da membrana celular do microrganismo, causando disseminação de materiais intracelulares e, conseqüentemente, a sua morte [7]. Relativamente à resistência destes microrganismos aos antimicrobianos, aqueles presentes na zona de amostragem Z7 foram os que mais resistiram à ação do antimicrobiano Preventol®, pois o halo de inibição produzido foi mais reduzido (4,0 ± 2,0 mm). O ensaio controlo não mostra halos de inibição ao redor dos discos, conforme esperado.

Em resumo, a eficácia da inibição do crescimento microbiano varia entre diferentes zonas de amostragem. Entre os dois compostos comerciais testados, Biotin-T® demonstrou a maior eficiência na inibição do crescimento microbiano em todas as zonas de amostragem, pelo que foi selecionado e aplicado no processo de conservação da Casa de Fresco, pela equipa de restauro. Este antimicrobiano parece ter efeito curativo e preventivo, resultando na eliminação da contaminação biológica e protegendo os materiais de novas contaminações.

3.4. Considerações finais

A Casa de Fresco da Fundação Eugénio de Almeida é um grande exemplo de uma importante construção em pedra que sofreu significativas alterações aparentemente

causadas pela biocolonização, constituindo um habitat ecológico para a sobrevivência de microrganismos como bactérias, fungos e líquenes.

Os avanços na análise e sequenciação de elevado rendimento têm fornecido novas ferramentas para a identificação de microrganismos presentes em sistemas complexos, que auxiliam indubitavelmente nos estudos do Património Cultural a fim de definir estratégias para proteger os bens da biocolonização e desenvolver abordagens para salvaguardar os monumentos, sendo crucial a implementação da tecnologia NGS no fluxo de trabalho para caracterizar totalmente a microbiota.

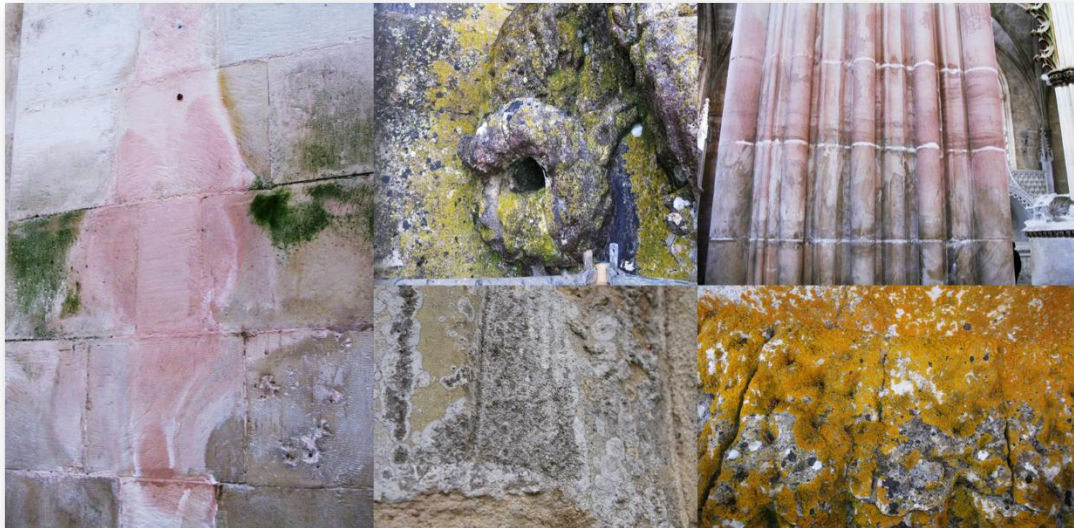
Neste caso de estudo, a utilização de HTS mostrou-se extremamente eficiente na deteção e identificação de espécies bacterianas e fúngicas conhecidas, proporcionando um maior conhecimento das comunidades microbianas, e constituindo desse modo uma importante visão para a implementação de um plano de conservação e intervenção eficaz e preciso (incluindo tratamentos de mitigação). Foram identificados fungos liquenizados do filo predominante Ascomycota, com potencial papel biodeteriogénico, como *Variospora*, *Verrucaria*, *Circinaria*, *Caloplaca* e *Leprocaulon*, que podem ser a explicação para o tipo de coloração que se observa no monumento. Além disso, foram identificadas algumas bactérias associadas aos líquenes, principalmente dos filios Proteobacteria e Cyanobacteria, no qual os géneros *Methylobacterium* e *Rubrobacter* foram dominantes. Também foram identificadas bactérias dos filios Bacteroidetes, Acidobacteria, Chloroflexi, Actinobacteria e Firmicutes.

Na tentativa de mitigar ou reduzir a contaminação fúngica, foram testados antimicrobianos comerciais em quatro zonas de amostragem, nas quais a Biotin-T[®] foi o antimicrobiano mais eficiente na inibição do crescimento microbiano, produzindo um halo de inibição de 47, 35 e 27 mm para a zona de amostragem Z3, Z4 e Z7, respectivamente, e causaram inibição total na amostra Z1. Assim, sendo a colonização biológica a patologia mais extensa presente nos elementos decorativos, o biocida orgânico Biotin-T[®] foi o produto escolhido e a metodologia de tratamento aplicada eficazmente às diferentes áreas de amostragem.

Acreditamos que este estudo foi uma mais-valia para a implementação de um plano eficaz e preciso de conservação e restauro da Casa de Fresco do Palácio Condes de Basto em Évora que decorreu entre Abril e Setembro de 2022, promovendo a sua preservação.

Capítulo 4

Processos de Biodeterioração em Monumentos de Pedra do Património Mundial da UNESCO: Convento de Cristo, Mosteiro da Batalha e de Alcobaça



Capítulo 4 – Processos de Biodeterioração em Monumentos de Pedra do Património Mundial da UNESCO: Convento de Cristo, Mosteiro da Batalha e de Alcobaça

A biodeterioração é uma preocupação significativa para monumentos Património Mundial da UNESCO, especialmente aqueles feitos de pedra. Embora esteja bem estabelecido que os microrganismos podem causar graves danos neste tipo de monumentos, o conhecimento dos mecanismos precisos de deterioração é ainda fragmentado e não está totalmente compreendido. A utilização de técnicas avançadas e de elevado rendimento possibilita-nos a identificação e a compreensão mais ampla da diversidade de organismos presentes em monumentos expostos ao ar livre e pode expandir o nosso conhecimento sobre novos tipos de metabolismo microbiano que ocorrem nestes habitats. Complementando esta abordagem com técnicas de microscopia e de espectroscopia, e outras que permitam a caracterização dos materiais, é possível elucidar as complexas interações bioquímicas que ocorrem na interface microrganismo-pedra e que conduzem à sua degradação.

Neste contexto, o presente capítulo centra-se em três monumentos classificados como Património Mundial da UNESCO em Portugal: o Convento de Cristo, em Tomar, o Mosteiro da Batalha e o Mosteiro de Alcobaça. Para além da sua inestimável relevância histórica, cultural e arquitetónica, estes edifícios apresentam características construtivas e materiais distintos que os tornam bons exemplos para estudar a biodeterioração em monumentos de pedra calcária, cujas propriedades e biorreceptividade já foram anteriormente caracterizadas por diferentes autores [270–272]. O facto de estarem localizados em diferentes contextos ambientais e terem diferentes particularidades de construção (do estilo gótico ao manuelino), é também uma mais-valia para perceber de que forma fatores materiais, ambientais e biológicos interagem e influenciam os processos de degradação. Assim, o estudo integrado destes três monumentos possibilita estudar os microrganismos envolvidos, os processos de colonização e as alterações estéticas visíveis em cada um deles.

4.1. Convento de Cristo

O Convento de Cristo (Património Mundial da UNESCO, Tomar-Portugal) é um complexo monumental histórico, cuja construção foi iniciada em 1160, com a edificação do Castelo Templário e da Charola [273], sendo hoje um dos testemunhos mais expressivos da arquitetura portuguesa, cuja enorme estrutura inclui sete claustros, diferentes construções monásticas e a emblemática Janela do Capítulo (ou como é comumente conhecida, Janela Manuelina). Esta encontra-se localizada no lado poente da igreja, cuja decoração destaca os elementos régios e náuticos do estilo manuelino: a Cruz da Ordem de Cristo, esfera armilar e um emaranhado de talha representando algas marinhas e cordas. Vários estilos arquitetónicos como o românico, gótico, manuelino, renascentista, maneirista e barroco podem ser encontrados neste espaço cultural, turístico e devocional [274,275].

Infelizmente, ao longo dos anos, os materiais pétreos constituintes deste monumento têm vindo a sofrer danos estruturais e estéticos, que modificaram a aparência das superfícies e a sua integridade e conservação, como formação de biofilmes, aparecimento de manchas coloridas, fragmentação em camadas e desprendimento de alguns fragmentos da pedra [276].

Assim, este emblemático Convento tem vindo a ser estudado pelo laboratório Hércules desde 2015 devido à evidência visível de alteração nos materiais pétreos [95], estudando-se os materiais utilizados e o fenómeno de alteração que induz a degradação das pedras cujos resultados sugerem o papel ativo dos microrganismos na deterioração desses materiais, e cuja preservação pode estar ameaçada. Este monumento encontra-se no topo de uma colina em Tomar, uma cidade com verões quentes e secos, mas também invernos frios, com precipitação e céu parcialmente nublado. As temperaturas atingem habitualmente os 38°C no Verão e os -1°C no Inverno, por isso, não é surpreendente que o ambiente envolvente (temperatura, humidade, sol e vento) juntamente com a biorreceptividade dos materiais pétreos possam contribuir para a sua bio colonização [95,274].

Este estudo foi feito no âmbito da intervenção de conservação e restauro que decorreu nas superfícies exteriores da Igreja Manuelina e Charola do Convento de Cristo (39°36'15"N 8°25'22"O), inserida numa empreitada designada por "Convento de Cristo - Conservação, restauro e recuperação de fachadas e coberturas da Igreja", com o objetivo da estabilização físico-química dos materiais constituintes e a preservação do aspeto e história original do monumento.

A aplicação de uma abordagem metagenómica filogenética aos materiais pétreos do monumento teve como objetivo compreender as razões das alterações evidentes e os processos de deterioração ativos. Assim, foi aplicada uma técnica de HTS nas múltiplas zonas do Convento, mostrando diferentes processos de alteração de forma a ser possível caracterizar os microrganismos que colonizam as superfícies pétreas e avaliar os padrões de distribuição dessa microbiota, para auxiliar os conservadores-restauradores na adoção do melhor procedimento de limpeza a ser aplicado nos materiais de pedra.

Os resultados deste caso de estudo encontram-se publicados na forma de artigo científico: Silva, I.; Salvador, C.; Miller, A.Z.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. Addressing Biodeterioration at UNESCO Stone Monuments: Tomar Convent and Batalha Monastery. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2025**, 205, 106188, doi:10.1016/j.ibiod.2025.106188.

4.1.1. Metodologia

4.1.1.1. Amostragem

O processo de amostragem foi realizado em duas áreas exteriores principais do monumento (Figura 4.1): na fachada norte e nos próprios elementos figurativos da icónica Janela Manuelina. Em ambos os locais, foram utilizados métodos semi-invasivos (recolha de microfragmentos com recurso a bisturis estéreis) em condições semi-assépticas (recolha realizada com material estéril, mas em ambiente externo). A recolha dos microfragmentos de pedra foi feita próxima a pedra fragmentada ou fissuras para evitar danos adicionais. As amostras foram recolhidas sob a coordenação de conservadores-restauradores, cumprindo os requisitos de conservação e minimização do impacto estrutural e estético do monumento, recolhendo a quantidade mínima necessária para os ensaios.

Para a análise exterior em torno da janela, na fachada norte do monumento, foram recolhidos alguns dos líquenes mais abundantes observados na superfície pétrea, nomeadamente as amostras C4 (líquen esbranquiçado), C5-1 (líquen amarelo-alaranjado volumoso), C5-2 (líquen branco-acinzentado) e C6 (líquen acinzentado).

Na Janela Manuelina, foram recolhidas um total de 6 amostras (CC1 – líquenes alaranjados com volume; CC2 - líquenes brancos sem volume; CC4 - colonização difusa (negro-acinzentado); CC6 - líquenes pretos de aspeto volumoso; CC7 - líquenes pretos sem volume e CC8 - líquenes branco-acinzentado de aspeto volumoso) de microrganismos vivos visualmente diferentes, com recurso a raspagem com bisturi

estéril. As amostras foram armazenadas em embalagens esterilizadas para análise devidamente identificadas.

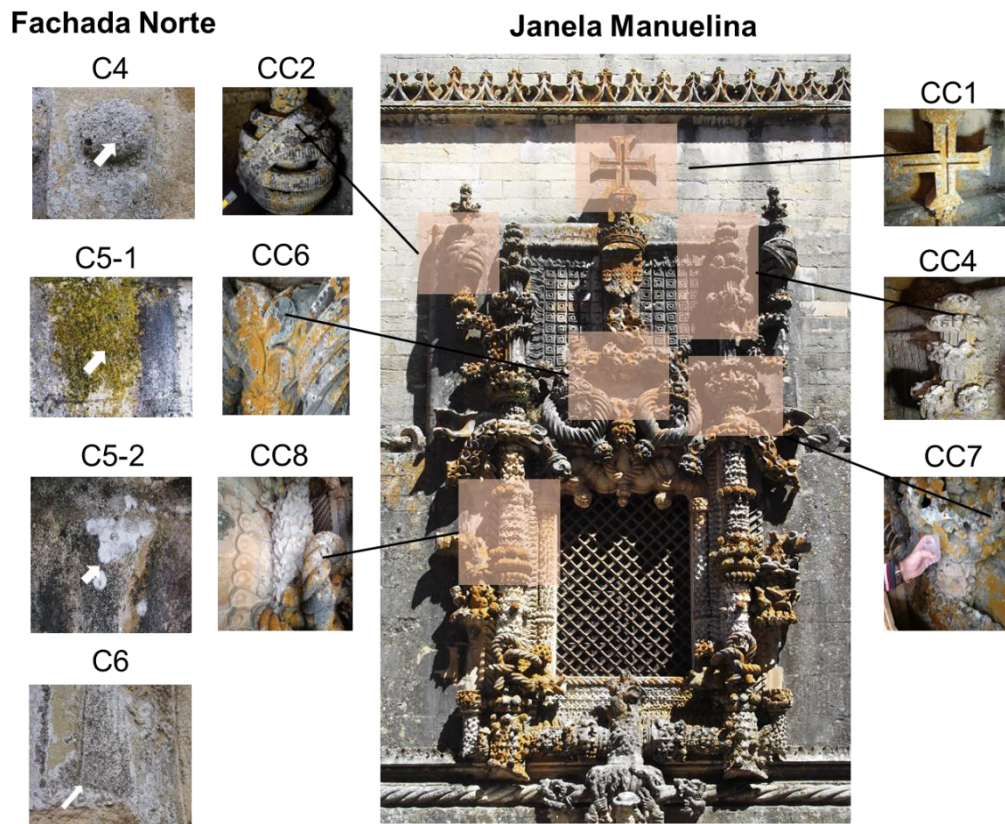


Figura 4.1: Processo de amostragem no Convento de Cristo (Tomar)

4.1.1.2. Identificação e caracterização da microbiota colonizadora

4.1.1.2.1. Extração e Sequenciação do DNA

A extração de DNA das amostras de pedra do Convento de Cristo foi realizada utilizando o Kit OMNI Soil DNA Purification Kit, como descrito no ponto 2.1.1.2. e a metodologia referente à sequenciação por NGS foi realizada como descrito no ponto 2.1.1.3 do Capítulo 2.

4.1.2. Resultados e Discussão: comunidades microbianas – efeitos do seu metabolismo na biodeterioração

A caracterização das comunidades microbianas nas superfícies pétreas do monumento permitiu identificar a diversidade de microrganismos eucariotas e procariotas presentes, bem como compreender o impacto visual e estrutural provocada por estes organismos. A análise iniciou-se na Fachada Norte, onde a maior extensão da

contaminação por líquenes era visível, antes de se proceder à avaliação dos elementos arquitetónicos da Janela Manuelina. A composição microbiana foi descrita separadamente para eucariotas e procariotas, permitindo correlacionar a presença de organismos específicos com alterações cromáticas, pigmentação e sinais de deterioração estrutural nas diferentes superfícies.

4.1.2.1. Na Fachada Norte do monumento

4.1.2.1.1. Microrganismos eucariotas

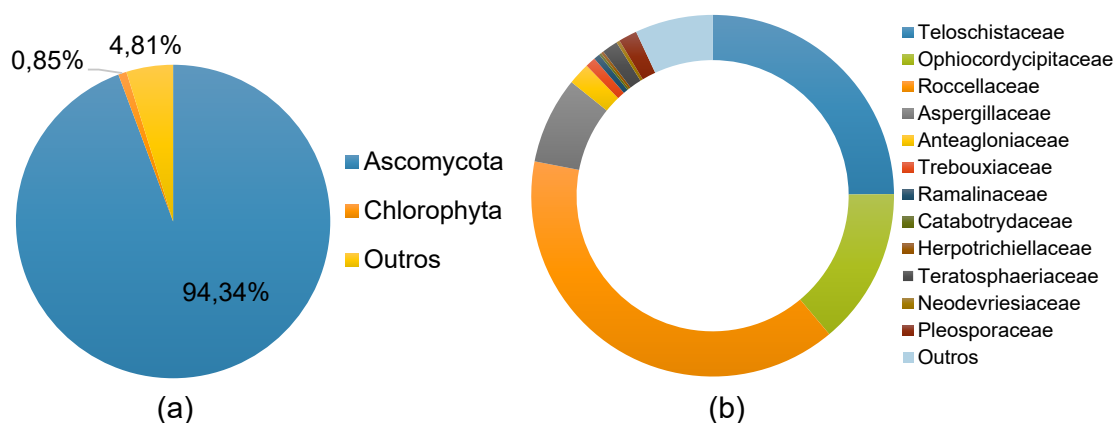


Figura 4.2: Filos (a) e Famílias (b) eucariotas predominantes no conjunto das amostras da fachada norte

O principal filo (Figura 4.2 (a)) identificado nas amostras exteriores da fachada norte foi Ascomycota (94,34%) seguido de Chlorophyta (0,85%), sendo que 4,81% corresponderam à população eucariota definida como “outros” (designação genérica que considera os microrganismos com menor representatividade).

Ascomycota é o filo que inclui mais de 98% das espécies de fungos liquenizados conhecidas caracterizado pela sua ubiquidade e diversidade, produção de ascósporos dentro das células em forma de saco (ascos), e capacidade de colonizar uma enorme variedade de ambientes [277]. Frequentemente, como resultado da sua atividade metabólica, contribuem para a deterioração do Património Cultural podendo provocar a desintegração de materiais através da produção de ácidos orgânicos e da penetração de hifas nas fendas e poros do substrato [21,213].

Os resultados mostram que a população eucariota presente no Convento de Cristo pertence às famílias (Figura 4.2 (b)): Roccellaceae (39,17%), Teloschistaceae (24,86%), Ophiocordycipitaceae (14,02%), Aspergillaceae (7,76%), Anteagloniaceae (1,97%),

Pleosporaceae (1,65%), Teratosphaeriaceae (1,41%), Trebouiaceae (0,92%), Ramalinaceae (0,56%), Neodevriesiaceae (0,31%), Herpotrichiellaceae (0,24%), Catabotrydaceae (0,20%) e 6,93% inserem-se na categoria “outros”.

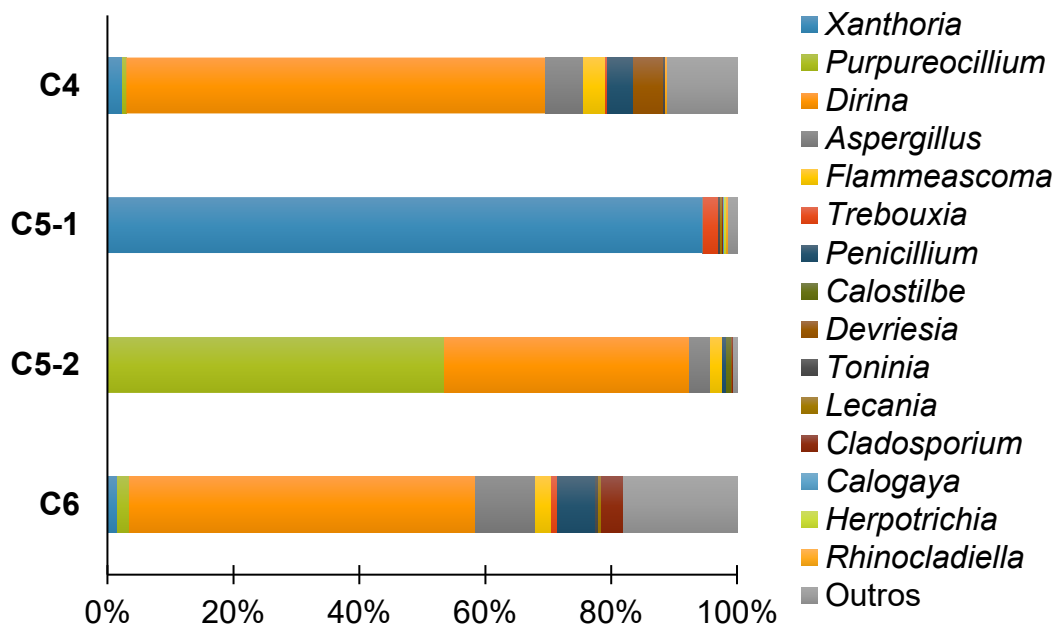


Figura 4.3: Gêneros eucariotas predominantes em cada uma das amostras da fachada norte

Os eucariotas do género *Dirina* (40,15%) foram os principais microrganismos identificados (Figura 4.3), seguido dos géneros *Xanthoria* (24,58%), *Purpureocillium* (14,01%), *Aspergillus* (4,71%), *Penicillium* (2,68%), *Flammeascooma* (2,01%), *Devriesia* (1,24%), *Trebouxia* (0,93%), *Cladosporium* (0,88%), *Toninia* (0,30%), *Lecania* (0,23%), *Calostilbe* (0,20%), *Rhinocladiella* (0,13%), *Calogaya* (0,07%) e *Herpotrichia* (0,07%). 7,79% dos géneros foram considerados como “outros”.

Pela observação dos resultados obtidos, *Dirina* parece ser o principal género responsável pela deterioração observada. Este facto é concordante com o estudo de Rosado *et al.* (2020), cuja amostragem foi igualmente feita neste monumento [95].

Nas amostras em estudo, este género está presente na sua maioria em C4 (66,57%), C5-2 (38,96%) e C6 (55,00%), o que está de acordo com as manchas de coloração esbranquiçada que se observam em todas elas, pois este líquen é de coloração cinza a branco calcário de talo crostoso. Os membros do género *Dirina* encontram-se difundidos em muitas áreas da Europa, provavelmente devido à sua estratégia reprodutiva, à sua capacidade de explorar substratos artificiais (materiais

feitos pelo homem) e à ausência de outras espécies concorrentes resultantes da crescente poluição do ar [95]. É um eucariota considerado biodeteriígeno em inúmeros substratos patrimoniais, tendo a capacidade de produzir incrustações de várias espessuras, e tendo sido já relatado em vários monumentos italianos, espanhóis e portugueses durante as duas últimas décadas [52], bem como em materiais como gesso/calcite, tijolo romano, pedra (incluindo frequentemente paredes de várias igrejas), interfaces chumbo/vidro de janelas e argamassas [278].

Especificamente em monumentos em pedra, *Dirina* foi anteriormente identificado como biodeteriígeno: (i) em pedras exteriores de igrejas inglesas, por exemplo uma igreja do século XIV em Fiskerton em Lincolnshire (Inglaterra) [278]; (ii) em quatro igrejas costeiras da Galiza com evidências de biodeterioração, cobrindo as superfícies pétreas exteriores destes monumentos [279]; (iii) em fragmentos de pedra retirados do Mosteiro da Batalha (Portugal) [265].

Por outro lado, *Xanthoria* foi o líquen biodeteriígeno prevalente na amostra **C5-1** (94,44%). Este é um género de fungo liquenizado da família Teloschistaceae. *X. ectaneoides*, a espécie deste género identificada na amostra, é um conspícuo líquen com um talo folhoso grande e laranja brilhante. Curiosamente, *X. ectaneoides* já foi identificado por Carballal *et al.* (2001) na igreja de São Miguel de Bréamo, uma das igrejas costeiras da Galiza com evidências de biodeterioração [279], e igualmente em Chellah - um sítio arqueológico nos subúrbios de Rabat (Marrocos) – como um líquen que alterou ligeiramente a superfície dos materiais pétreos [280].

Os membros desta família de líquenes, Teloschistaceae, são geralmente de cor laranja brilhante e esta cor pigmentar confere-lhes proteção contra radiação prejudicial, como a radiação UV. Segundo Llewellyn *et al.* (2023), estes pigmentos que produzem são insolúveis em água, e logo que o líquen os produz, começam a cristalizar e formam uma camada no topo do líquen. Isto permite que a espessa camada de cristais possa refletir a radiação prejudicial, ao mesmo tempo que permite a passagem de parte da radiação solar para a fotossíntese [281,282].

De facto, observando o líquen da amostra C5-1 (Figura 4.1), a cor que se observa do biofilme, corresponde à descrição deste líquen na literatura bibliográfica.

No local de amostragem **C5-2**, *Purpureocillium* (53,44%) foi o principal género identificado, conhecido por ser responsável por fenómenos de biodeterioração em superfícies de pedra [283]. De entre as espécies pertencentes a este género, identificou-se *P. lilacinum* e *P. lavendulum*.

P. lilacinum é uma espécie de fungo filamentoso e cosmopolita que pode desenvolver-se ativamente em materiais que penetram profundamente nos substratos durante anos e causam a sua deterioração em condições de teor de humidade consideravelmente elevado. Foi relatada a sua capacidade de decompor material vegetal e vários componentes celulares devido às atividades de esterase, fosfatase e quitinase. Devido a estas elevadas atividades enzimáticas, pode decompor um amplo espectro de matéria orgânica incluindo plantas, bactérias, outros fungos, artrópodes, etc., podendo ser muito versátil ao nível de necessidades nutricionais. Isso dá-lhe a oportunidade de sobreviver e prosperar em condições oligotróficas, como os substratos de pedra. Assim, para além de já ter sido descrito antes como contaminante do ar interior, *P. lilacinum* pode desempenhar um papel importante na deterioração de materiais pétreos em interiores de monumentos culturais e museus [223]. Para além destas evidências, segundo a literatura bibliográfica, *P. lilacinum* já demonstrou ter papel biodeteriogeno, tendo sido identificado na microbiota associada a cinco documentos históricos importantes da Costa Rica [284] e em vários materiais como pedra, betão, tijolo e argamassa [285]. *P. lavendulum* é uma nova espécie de fungo descoberta recentemente e relativamente próximo do fungo *P. lilacinum*.

4.1.2.1.2. Microrganismos procariotas

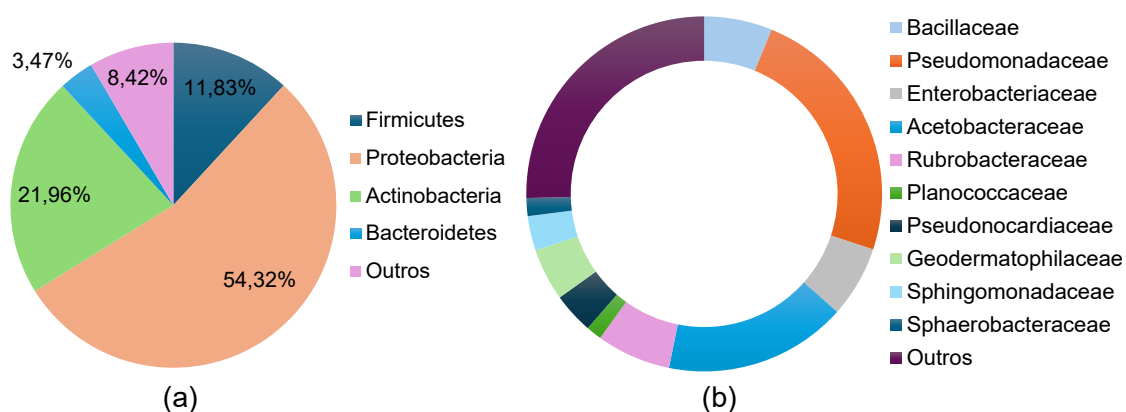


Figura 4.4: Filos (a) e Famílias (b) procariotas predominantes no conjunto das amostras da fachada norte

Os filios procariotas maioritários identificados nas amostras da fachada norte (Figura 4.4 (a)) foram Proteobacteria (54,32%), Actinobacteria (21,96%), Firmicutes (11,83%) e Bacteroidetes (3,47%). Os géneros com menor representatividade representaram 8,42%.

A família procariota Pseudomonadaceae (23,88%) foram os principais microrganismos identificados (Figura 4.4 (b)), seguidos de Acetobacteraceae (16,61%), Rubrobacteraceae (6,77%), Enterobacteriaceae (6,50%), Bacillaceae (6,19%), Geodermatophilaceae (4,75%), Pseudonocardiaceae (3,74%), Sphingomonadaceae (3,16%), Sphaerobacteraceae (1,63%) e Planococcaceae (1,41%). 25,37% das famílias foram consideradas como “outros”.

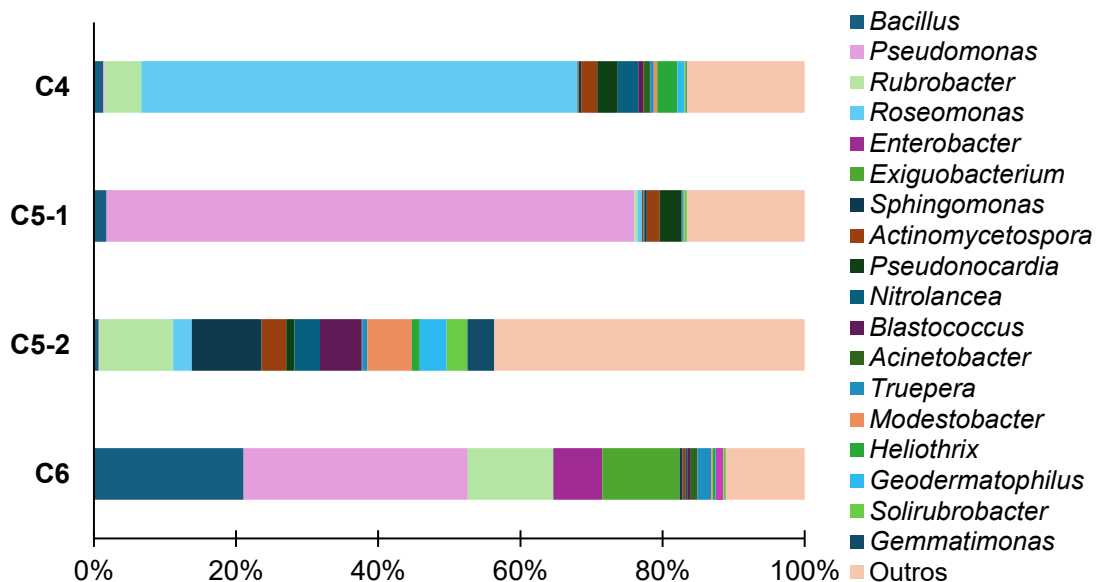


Figura 4.5: Gêneros procariotas predominantes nas amostras da fachada norte

O principal gênero identificado foi *Pseudomonas* (Figura 4.5) constituindo 26,61% das amostras recolhidas na fachada norte do Convento de Cristo. Os gêneros *Roseomonas* (16,14%), *Rubrobacter* (7,02%), *Bacillus* (6,25%), *Exiguobacterium* (2,82%), *Sphingomonas* (2,75%), *Actinomycespora* (1,97%), *Enterobacter* (1,80%), *Pseudonocardia* (1,80%), *Blastococcus* (1,77%), *Modestobacter* (1,75%), *Nitrolancea* (1,68%), *Geodermatophilus* (1,27%), *Heliobacter* (1,07%), *Solirubrobacter* (0,97%), *Gemmatimonas* (0,97%), *Truepera* (0,80%) e *Acinetobacter* (0,53%) foram igualmente identificados. 22,02% dos gêneros foram considerados como “outros”.

De um modo geral, observa-se que as amostras C5-1 e C4 têm uma menor diversidade de gêneros, comparativamente às restantes, cada uma dominada por um gênero específico (*Pseudomonas* e *Roseomonas*, respetivamente), enquanto as amostras C5-2 e C6 encontram-se mais equilibradas e diversificadas. Existe ainda a presença consistente de outros gêneros com menor representatividade mas que ainda assim contribuem para a complexidade do microbioma.

A presença do género *Pseudomonas*, predominantemente detetado nas amostras C5-1 (74,26%) e C6 (31,82%), já foi previamente reportada em talos de líquenes, indicando o seu potencial papel no microbioma do líquen e nas interações ecológicas dentro destes sistemas simbióticos [286,287]. De acordo com Nahar *et al.* (2019), *Pseudomonas* é um género de bactérias frequentemente associada a líquenes que, tendo capacidade de degradar toxinas nocivas e de produzir poliésteres naturais como compostos de armazenamento de carbono e energia, podem auxiliar na sobrevivência do líquen em condições extremas [288]. Este género pode igualmente contribuir para a fixação de azoto, aumentando as necessidades nutricionais dos líquenes [261].

Para além disso, os géneros *Roseomonas* e *Rubrobacter* têm sido associados a deterioração de monumentos em pedra, principalmente ao nível de alterações estéticas, com a formação de biofilmes e produção de pigmentos, que causam consequentemente, a alteração de coloração na pedra [95].

4.1.2.2. Nos Elementos Figurativos da Janela Manuelina

A composição figurativa da Janela Manuelina integra diversos elementos decorativos, entre os quais se evidenciam a cruz da Ordem de Cristo (amostra CC1), símbolo do poder espiritual e militar da Ordem, que foi um dos principais impulsionadores das explorações durante a Era dos Descobrimentos; e a esfera armilar (amostra CC2), que representa o conhecimento náutico e astronómico essencial para a navegação, simbolizando a capacidade dos navegadores portugueses de explorar e conquistar novos territórios.

Os restantes elementos refletem o estilo exuberante e simbólico do Manuelino, caracterizado pela fusão de motivos naturalistas e marítimos, como folhas, conchas, flores estilizadas, cordas e padrões em espiral. O estilo manuelino celebra os Descobrimentos Portugueses, e esses detalhes esculpidos são uma expressão dessa era, simbolizando a ligação entre o homem e a natureza, assim como o poder marítimo de Portugal.

A Janela Manuelina é esculpida em calcário, uma pedra comum na construção de monumentos portugueses durante o período manuelino [289]. Este tipo de calcário, com uma textura fina e resistente, é altamente vulnerável a processos de degradação, como o crescimento de líquenes, fungos e a erosão causada pela humidade e poluição.

Nas Figuras 4.6-4.7 e 4.8-4.9 encontram-se os resultados da análise metagenômica feita nos elementos da Janela, para os microrganismos eucariotas e procariotas, respetivamente.

4.1.2.2.1. Microrganismos eucariotas

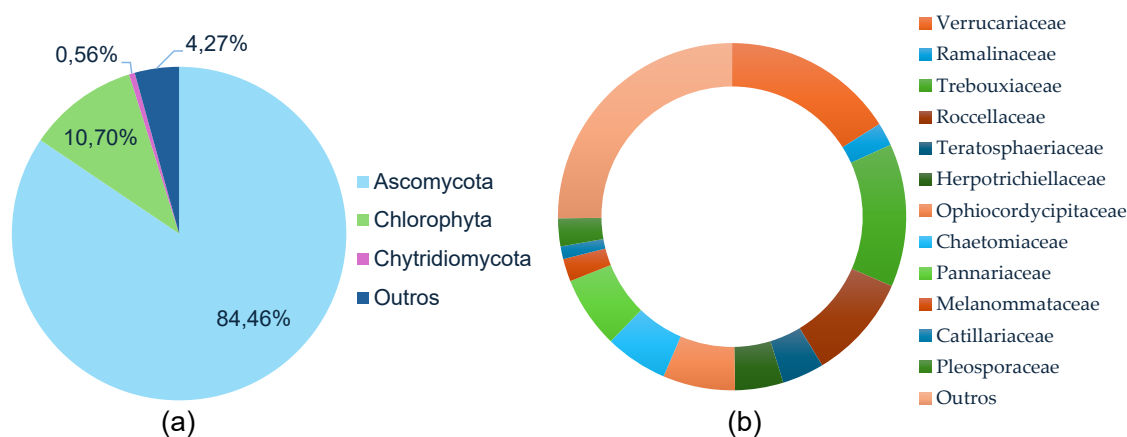


Figura 4.6: Filos (a) e Famílias (b) eucariotas predominantes nos elementos da Janela

Considerando o conjunto de toda a amostragem dos elementos figurativos presentes na Janela Manuelina, o filo eucariota identificado com maior predominância (Figura 4.6 (a)) foi Ascomycota (84,46%), seguindo-se de Chlorophyta (10,70%) e Chytridiomycota (0,56%). 4,27% dos filos eucariotas foram considerados como “outros” (designação genérica que considera os microrganismos com menor representatividade).

Relativamente às famílias predominantes (Figura 4.6 (b)), foram identificadas Verrucariaceae (16,04%), Trebouxiaaceae (13,33%), Roccellaceae (9,80%), Ophiocordycipitaceae (6,70%), Pannariaceae (6,69%), Chaetomiaceae (5,83%), Herpotrichiellaceae (4,48%), Teratosphaeriaceae (3,91%), Pleosporaceae (2,60%), Ramalinaceae (2,17%), Melanommataceae (2,12%), Catillariaceae (1,19%), sendo que 25,14% foram consideradas como “outros”.

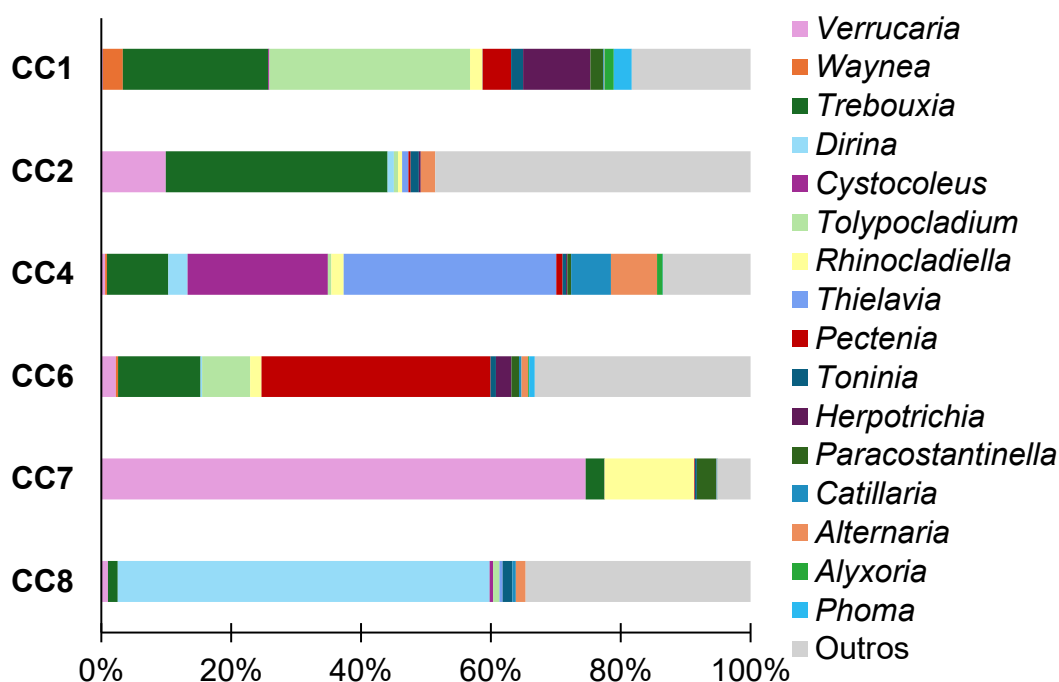


Figura 4.7: Gêneros eucariotas predominantes nos elementos figurativos da Janela

Ao nível do gênero, *Verrucaria* (14,75%) foram os microrganismos identificados com maior abundância relativa (Figura 4.7), seguidos de *Trebouxia* (13,85%), *Dirina* (10,25%), *Pectenina* (6,84%), *Tolypocladium* (6,75%), *Thielavia* (5,70%), *Cystocoleus* (3,71%), *Rhinoclatiella* (3,34%), *Herpotrichia* (2,21%), *Alternaria* (1,99%), *Catillaria* (1,22%), *Paracostantinella* (1,11%), *Toninia* (1,05%), *Waynea* (0,61%), *Phoma* (0,61%), *Alyxoria* (0,42%) e 25,57% dos gêneros foram considerados como “outros”.

A amostra 1 (CC1) corresponde à cruz da Ordem de Cristo, que apresentava líquenes alaranjados com volume, indicativos de biodeterioração. Os gêneros que mais se destacaram nesta amostra, pela abundância relativa mais elevada, foram *Tolypocladium* (30,88%), *Trebouxia* (22,36%) e *Herpotrichia* (10,37%).

Trebouxia é um gênero de alga verde unicelular conhecida por colonizar essencialmente monumentos de pedra, sobretudo em áreas protegidas por sombra e caracterizadas por baixa humidade do substrato, ou ainda propensas à dessecação [258]. Mais de metade das cerca de 15 000 espécies de líquenes existentes, têm a alga *Trebouxia* como seu fotobionte, o que a torna a alga mais comum e amplamente distribuída no mundo [253–255].

Os gêneros fúngicos *Tolypocladium* e *Herpotrichia* identificados nesta amostra, embora sejam frequentemente estudados pelas suas capacidades enzimáticas e metabólicas,

ainda existem poucas referências específicas sobre estes géneros em contexto patrimonial.

A explicação para o tom alaranjado observado na amostra não parece estar diretamente relacionada a estes géneros principais, pois não há evidências significativas que associem esses organismos à produção de pigmentos alaranjados. Embora *Trebouxia* seja uma alga verde que participa na simbiose líquénica, a produção de pigmentos, como os carotenoides ou compostos fenólicos, é geralmente atribuída ao componente fúngico da simbiose. Os líquenes são conhecidos pela produção de uma vasta gama de pigmentos, como a parietina e carotenóides, que são responsáveis por colorações intensas, como o laranja e o amarelo [290,291]. Esses pigmentos são frequentemente produzidos pelo componente fúngico da simbiose líquénica e têm um papel importante, por exemplo, na proteção contra radiação UV [281]. Entre os géneros minoritários identificados, alguns são conhecidos por produzir metabolitos secundários. Por exemplo, *Verrucaria* pode produzir compostos fenólicos que contribuem para diferentes tonalidades, e *Alternaria* é conhecida pela produção de melaninas [292,293]. Além disso, líquenes do género *Toninia* podem formar associações com pigmentos variados. Esses géneros, mesmo com uma abundância mais reduzida, podem ter um impacto significativo na tonalidade observada, especialmente quando interagem com outros componentes da simbiose líquénica.

A **amostra 2** (CC2) corresponde à esfera armilar como elemento figurativo da Janela Manuelina, de onde foram recolhidos líquenes brancos sem volume.

Os géneros mais abundantes nesta amostra foram identificados como *Trebouxia* (34,19%) e *Verrucaria* (9,90%). *Trebouxia* é uma alga verde que forma parte dos líquenes e, embora não tenha cor branca por si só, pode estar associada a diferentes tipos de líquenes em combinações simbióticas. A cor branca que se observa no elemento pode vir de outros fatores, como a presença de sais minerais, poeiras, ou a estrutura calcária do substrato. *Verrucaria*, por outro lado, é frequentemente encontrado em superfícies rochosas e calcárias, podendo também assumir cores esbranquiçadas dependendo do ambiente, especialmente se há deposição de sais ou cristais na superfície onde cresce [242].

As manchas brancas observadas podem, portanto, não estar apenas diretamente ligadas à biologia dos géneros identificados, mas a fatores abióticos (como a deposição de partículas calcárias ou sais) ou a microrganismos não dominantes.

A **amostra 4** (CC4) corresponde à colonização difusa (negro-acinzentado) observada na pedra e é composta maioritariamente pelos géneros *Thielavia* (32,74%), *Cystocoleus* (21,57%), *Trebouxia* (9,46%), *Alternaria* (7,10%) e *Catillaria* (6,13%).

Thielavia é um género de fungos filamentosos que forma colónias cinza e preto, que parece corresponder à coloração observada na amostragem. *Th. subthermophila* foi a espécie deste género identificado na amostra, com propriedades termófilas e um micélio densamente pigmentado de castanho escuro [294]. No que diz respeito a processos de biodeterioração em materiais do Património, especialmente pedras ou estruturas arquitetónicas, a informação sobre este género é limitada. Por outro lado, *Thielavia* faz parte de um grupo de fungos do solo, tipicamente associados à degradação da matéria orgânica, e tem sido documentado em contextos de biodeterioração devido à sua presença em ambientes onde o crescimento de fungos pode ter impacto em materiais como a celulose ou outros substratos orgânicos, pelo que pode contribuir para a biodeterioração ao produzir enzimas que decompõem esse tipo de materiais [295,296].

Cystocoleus, o segundo género maioritário nesta amostra, é um género de fungo liquenizado, comumente chamado de líquen de veludo, cuja cor é geralmente castanho escuro a preto. Deste género identificou-se a espécie *C. ebeneus*.

Este é um líquen geograficamente difundido, castanho muito escuro a preto fuliginoso, e um colonizador frequente de pedra e rochas. Apresenta um crescimento microfilamentoso característico, em que os fotobiontes filamentosos associados estão firmemente envolvidos por hifas fúngicas melanizadas, que atuam como um eixo central. Geralmente, encontra-se em rochas que estejam húmidas, sombreadas e que não estejam expostas à chuva diretamente [297]. Relativamente ao seu papel na biodeterioração, segundo a literatura, já foi identificado igualmente, por exemplo, na Igreja de San Roque em Campeche (México), onde foi predominante em amostras de biofilmes escuros e um dos líquenes responsáveis pela formação de crostas biológicas dessa mesma cor, que revestiam as paredes da igreja [298].

Catillaria é um género de líquenes, que quando coloniza um substrato, a cor do biofilme pode variar entre acinzentado, esbranquiçado até castanho escuro. Deste género identificou-se a espécie *Catil. lenticularis*, comumente encontrado em rochas calcárias e materiais de construção com um talo fino, esbranquiçado, bege ou castanho claro [299].

Assim, dado que a amostra 4 é caracterizada por uma colonização difusa de cor negro-acinzentado, e como todos estes géneros referidos anteriormente produzem

colorações semelhantes à descrição da amostragem, leva a crer que a colonização difusa que se observa neste elemento da janela é uma junção de um biofilme extenso de cor escura, formado pelo conjunto destes géneros.

Na **amostra 6** (CC6) foram recolhidos líquenes pretos de aspeto volumoso. Os géneros de maior destaque pela maior abundância relativa foram identificados como *Pectenia* (35,28%), *Trebouxia* (12,70%) e *Tolypocladium* (7,39%).

Pectenia plumbea, espécie identificada do género *Pectenia*, é um líquen cinza-azulado ou castanho-amarelado.

Na **amostra 7** (CC7), foram recolhidos líquenes pretos sem volume, a mesma coloração apresentada pelo género maioritário nesta amostra. O líquen predominantemente identificado foi o género *Verrucaria*, que representou 74,59% da amostra. Os biofilmes formados por estes líquenes constituem uma camada preta com aspeto viscoso, nas superfícies pétreas, assemelhando-se a manchas de alcatrão. Ao nível das espécies deste género, foi identificada *Verrucaria nigrescens*, um líquen crostoso de coloração preta/castanho muito escuro e que é muito comum em rochas calcárias, mármore e argamassa, relatada como uma espécie generalizada em edifícios e monumentos patrimoniais [240]. Esta espécie é considerada um agente de biodeterioração altamente agressivo por causar danos estéticos (principalmente escurecimento do substrato) e desintegração do material pétreo, aumentando a suscetibilidade da rocha à quebra [241,242].

Para a **amostra 8** (CC8) foram recolhidos líquenes branco-acinzentado de aspeto volumoso. O género *Dirina* (57,29%) foram os microrganismos identificados com maior abundância relativa. Mais precisamente, foi identificada a espécie *Dirina massiliensis*. Este é um eucariota de coloração cinza a branco calcário de talo crostoso, encontrando-se entre os líquenes com maior potencial biodeteriogeno, particularmente agressiva pela deterioração de materiais em pedra e frescos [52]. *D. massiliensis* é reconhecida como um notável agente de processos biogeoquímicos na interface talo-substrato devido à segregação de ácido oxálico, produz incrustações de várias espessuras e tem sido identificadas em inúmeras paredes de igrejas e superfícies pétreas em vários locais do mundo como Itália [278,300,301], Inglaterra [278], Espanha [279] e Portugal [265]. Dada a abundância deste líquen, e uma vez que a sua coloração corresponde à descrição da amostra 8, sugere-se que a contaminação presente neste elemento da Janela é causada maioritariamente por este eucariota.

4.1.2.2.2. Microorganismos procariotas

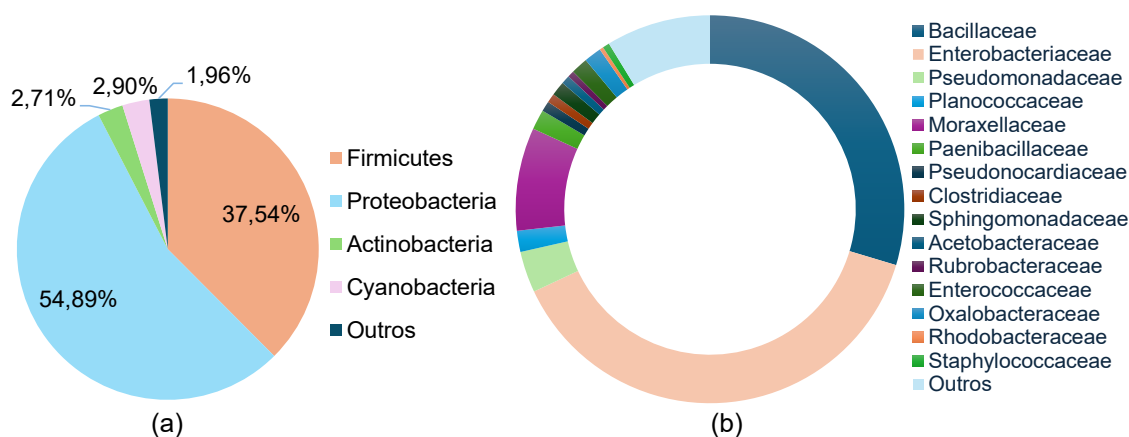


Figura 4.8: Filos procariotas predominantes nos elementos figurativos da Janela

Os dois filos procariotas predominantes na amostragem dos elementos figurativos da Janela (Figura 4.8 (a)) foram Proteobacteria (54,89%) e Firmicutes (37,54%). Os filos Cyanobacteria (2,90%) e Actinobacteria (2,71%) também foram identificados e 1,96% dos filos foi considerado como “outros” (designação genérica que considera os microrganismos com menor representatividade).

Relativamente às famílias procariotas (Figura 4.8 (b)), 38,38% foi identificado como Enterobacteriaceae. As restantes famílias maioritárias identificadas foram Bacillaceae (29,65%), Moraxellaceae (8,59%), Pseudomonadaceae (3,43%), Planococcaceae (1,76%), Paenibacillaceae (1,66%), Oxalobacteraceae (1,45%), Enterococcaceae (1,40%), Sphingomonadaceae (1,19%), Pseudonocardiaceae (0,85%), Clostridiaceae (0,76%), Acetobacteraceae (0,73%), Staphylococcaceae (0,57%), Rubrobacteraceae (0,55%), Rhodobacteraceae (0,31%) e 8,70% foi considerado como “outras famílias”, pela sua abundância minoritária.

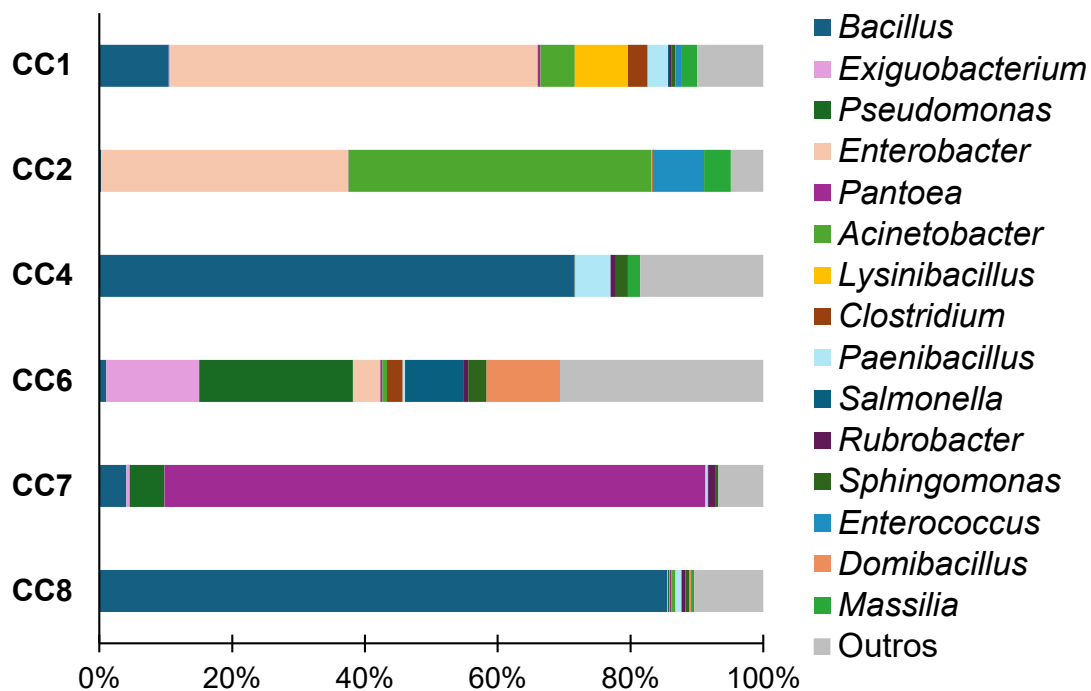


Figura 4.9: Gêneros procariotas predominantes nos elementos figurativos da Janela

Relativamente ao género bacteriano (Figura 4.9), *Bacillus* foi o que mais se destacou, pela abundância mais elevada de 28,84%. Os géneros *Enterobacter* (16,13%), *Pantoea* (13,74%), *Acinetobacter* (8,69%), *Pseudomonas* (4,76%), *Exiguobacterium* (2,46%), *Domibacillus* (1,89%), *Paenibacillus* (1,67%), *Salmonella* (1,51%), *Massilia* (1,46%), *Enterococcus* (1,41%), *Lysinibacillus* (1,37%), *Sphingomonas* (1,02%), *Clostridium* (0,91%) e *Rubrobacter* (0,60%) foram igualmente identificados. 13,53% dos géneros foram identificados como “outros”.

As comunidades microbianas identificadas nos elementos figurativos da Janela Manuelina revelam uma composição bastante heterogénea entre os diferentes locais de amostragem analisados. Observa-se a predominância de alguns géneros específicos em determinadas áreas, enquanto noutros locais existem perfis de maior diversidade.

Em CC4 e CC8, *Bacillus* representa a fração dominante (71,60 e 85,57% respetivamente), refletindo a sua reconhecida capacidade de esporulação e resistência a condições ambientais adversas. Já CC7 é caracterizado por uma baixa diversidade, com predomínio quase exclusivo de *Pantoea* (81,42%), género frequentemente associado a ambientes húmidos e à presença de matéria orgânica.

Por outro lado, CC1 e CC2 apresentam perfis distintos, nos quais *Enterobacter* surge como grupo predominante, sendo que em CC2 este convive com uma proporção significativa de *Acinetobacter* (45,63%).

A amostra CC6 destaca-se pela maior heterogeneidade, integrando múltiplos géneros em proporções relativamente equilibradas, entre os quais se destacam *Pseudomonas* (23,18%), *Exiguobacterium* (13,67%) e *Domibacillus* (11,06%).

Em síntese, o estudo do Convento de Cristo evidenciou o papel dominante dos líquenes na biodeterioração da pedra, sobretudo em áreas emblemáticas do monumento. Os géneros de fungos liquenizados *Dirina*, *Xanthoria* e *Purpureocillium* foram identificados como os líquenes em maior abundância nas amostras recolhidas da fachada norte do monumento, enquanto os géneros *Verrucaria*, *Dirina*, *Pectenia*, *Thielavia*, *Cystocoleus* e *Catillaria* se destacaram nos elementos icónicos da Janela. Identificaram-se igualmente comunidades procariotas que se associam frequentemente a líquenes, como os géneros *Pseudomonas* e *Bacillus*, e que desempenham um papel fundamental na sobrevivência e função ecológica destes organismos. A caracterização destas comunidades permitiu compreender melhor os mecanismos bioquímicos associados à degradação e reforçou a relevância deste tipo de análise para a valorização e preservação do Património.

4.2. Mosteiro da Batalha

O Mosteiro da Batalha está classificado como Património Mundial da UNESCO e situa-se no centro de Portugal [265]. Conhecido no país como 'Mosteiro de Santa Maria da Vitória', foi mandado construir por D. João I, mestre da Ordem Militar de Aviz, em agradecimento à Virgem Maria pela vitória na Batalha de Aljubarrota. É considerada uma obra-prima arquitetónica, demonstrando uma mistura perfeita dos estilos gótico e manuelino. O edifício alcançou o estatuto de panteão real ao receber na Capela do Fundador os monumentos funerários de D. João I, sua mulher D. Filipa de Lencastre, bem como dos seus filhos e netos, até D. Manuel I [302]. Em 1840, depois do quase abandono do mosteiro devido à extinção das ordens religiosas em 1834, iniciou-se um primeiro programa de restauro e mais de um século se passou desde que o último restauro em grande escala foi concluído [303,304].

O Mosteiro da Batalha apresentava um elevado grau de biodeterioração da pedra (Figura 4.10), tanto no interior da igreja como na Capela do Fundador, nas fachadas, colunas e paredes, apresentando principalmente uma extensa coloração rosa, que se sugere ser devido à presença de bactérias produtoras de carotenos e formadoras de biofilmes dessa mesma cor [305].

Determinados microrganismos podem produzir este tipo de substâncias coloridas e causar alterações cromáticas e manchas permanentes. Os carotenóides são produzidos principalmente por bactérias, mas também por fungos filamentosos, leveduras, algas e líquenes. Os carotenóides apresentam cores amarelas, laranja e vermelhas e são a classe de pigmentos mais abundante encontrada na natureza. Este tipo de pigmento desempenha um papel fundamental na extração de energia luminosa, funcionando como fotossensibilizadores para proteger os organismos de danos oxidativos, interagindo com o oxigénio e eliminando radicais peróxidos para evitar a formação de ROS e estabilizando complexos específicos de pigmento-proteína [32–35].

Assim, para identificar os fenómenos que promovem o aparecimento destes biofilmes, e de modo a auxiliar os conservadores-restauradores na seleção do correto procedimento de limpeza a utilizar, adotou-se uma abordagem multidisciplinar que integrou métodos dependentes e independentes de cultura. Esta estratégia permitiu complementar os resultados obtidos por sequenciação de primeira geração com dados de segunda e terceira geração, possibilitando uma caracterização mais precisa dos microrganismos colonizadores das superfícies pétreas, bem como a análise dos padrões de distribuição da microbiota entre as diferentes zonas de amostragem.

Os resultados deste caso de estudo encontram-se publicados na forma de artigo científico: Silva, I.; Salvador, C.; Miller, A.Z.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. The Role of Bacteria in Pink Stone Discoloration: Insights from Batalha Monastery. *Micro* **2024**, 4 (4), 778-797, doi: 10.3390/micro4040048.

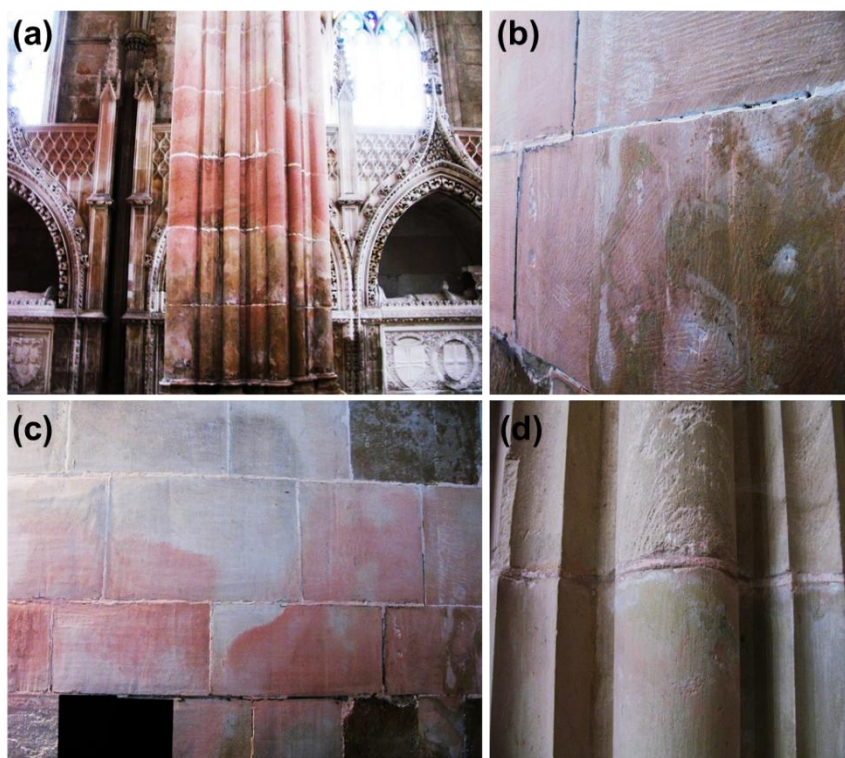


Figura 4.10: Alterações superficiais dos elementos arquitetónicos em pedra no interior (a,d) da Capela do Fundador e (b,c) na igreja do Mosteiro da Batalha

4.2.1. Metodologia

4.2.1.1. Amostragem

O Mosteiro da Batalha, que constitui um conjunto arquitetónico cultural, turístico e devocional, encontra-se localizado na vila portuguesa de Batalha, no distrito de Leiria, na região central de Portugal (39°39' 32"N 8°49'33" O). Património Mundial da UNESCO, este monumento é, indiscutivelmente, uma das mais belas obras da arquitetura portuguesa e europeia, onde se podem observar vários estilos arquitetónicos, como o gótico, renascentista e o manuelino.

O processo de amostragem (Figura 4.11) foi realizado em duas áreas representativas do mosteiro com sinais significativos de contaminação e alteração correspondente a (1) paredes e colunas da Igreja (amostras A1 e B1); (2) paredes e colunas da Capela do Fundador (amostras A2, A3, B2, B3, B4, B5 e B6), ambos os locais

cobertos por biofilmes cor-de-rosa, com exceção da amostra B6, cuja amostragem foi feita num local em que a evidência dessa coloração não era tão acentuada. As amostras foram recolhidas sob a coordenação de conservadores-restauradores, cumprindo os requisitos de conservação e minimização do impacto estrutural e estético do monumento, recolhendo a quantidade mínima necessária para os ensaios.

Para a amostragem, foram utilizados métodos não invasivos (zaragatoas identificadas com a letra B) e métodos semi-invasivos (recolha de microfragmentos com recurso a bisturis estéreis, identificados com a letra A), em condições semi-assépticas (recolha realizada com material estéril, mas em ambiente externo). A recolha dos microfragmentos de pedra foi feita próxima a pedra fragmentada ou fendas para evitar danos adicionais.

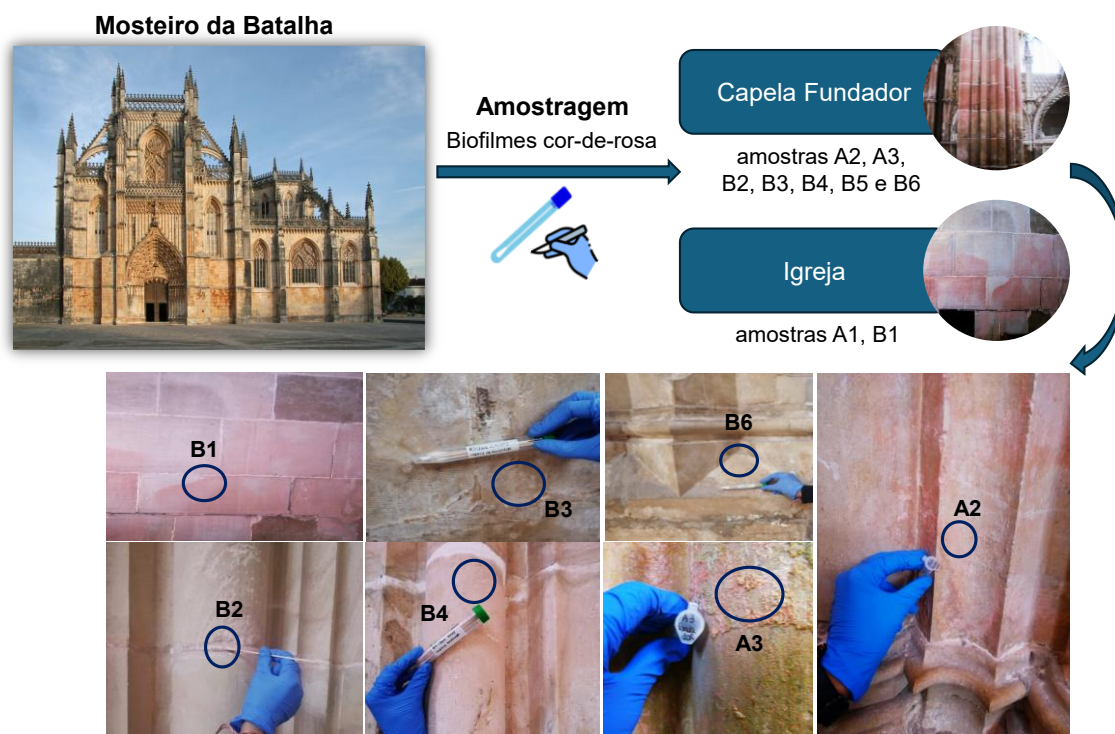


Figura 4.11: Processo de amostragem no Mosteiro da Batalha

4.2.1.2. Métodos dependentes de cultura

4.2.1.2.1. Isolamento bacteriano

As suspensões microbianas foram cultivadas assepticamente em Ágar Nutriente (NA, HIMEDIA - hidrolisado péptico de tecido animal 5 g/L, extrato de carne bovina 1,5 g/L, extrato de levedura 1,5 g/L, cloreto de sódio 5 g/L e ágar 15 g/L). As placas foram seladas com parafilme e incubadas a 30°C na estufa durante 24 a 48 h para crescimento

de bactérias. Para detetar crescimento microbiano lento, as placas de Petri inoculadas permaneceram em incubação por mais tempo, até 30 dias e foram monitorizadas periodicamente. Foram obtidas estirpes bacterianas puras após subculturas sucessivas das colónias que cresceram nesse período.

As estirpes bacterianas isoladas das microamostras foram catalogadas e armazenadas na coleção de culturas do Laboratório Colégio Luís António Verney-Biotech-HÉRCULES, Universidade de Évora, e foram mantidas em meio glicerol-NA a 4°C.

4.2.1.2.2. Extração de DNA dos isolados bacterianos

O DNA procariótico foi extraído de acordo com o método descrito por Rinta-Kanto *et al.*, 2005 [306]. Ressuspenderam-se as células em 200 µL de tampão TE (Tris – 10 mM, EDTA – 1 mM, pH 8) e adicionaram-se 30 µL de lisozima (2 mg/mL) em tampão TE 1x à suspensão celular, para promover a desintegração celular, incubando-se posteriormente a 37°C durante 60 min. Adicionaram-se 30 µL de α-quimiotripsina em 10% SDS (4 mg/mL), deixando a incubar a 50°C por 90 min. Após este período de incubação, adicionaram-se 100 µL de uma solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), em igual volume que a fase aquosa, agitando suavemente, promovendo a mistura de fases por inversão. Efetuou-se uma centrifugação a 10 000 *g* durante 1 min e transferiu-se a fase aquosa (sobrenadante) para um novo microtubo. Adicionou-se 1 volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), agitou-se suavemente e procedeu-se à mesma centrifugação anterior. De seguida, transferiu-se a fase aquosa e adicionaram-se 2 volumes de etanol absoluto frio e 0,3 volumes de acetato de sódio (3 M). De forma a promover a precipitação do DNA, colocou-se a incubar overnight a -20°C. Efetuou-se uma centrifugação a 11900 *g* durante 25 min, desprezou-se o sobrenadante por inversão, e deixou-se o *pellet* secar na câmara de fluxo laminar durante 30 min. Posteriormente, procedeu-se à solubilização dos ácidos nucleicos com solução tampão TE e armazenamento das amostras a 4°C.

4.2.1.2.3. Identificação dos isolados por Sequenciação Sanger

Toda a metodologia referente à Sequenciação Sanger como método de identificação dos isolados está descrita na secção 2.2.1.3.4. do Capítulo 2, sendo aqui aplicada com a modificação dos primers para a região 16S, nomeadamente 518F 5'-(CCA GCA GCC GCG GTAATA CG)-3' e 785R 5'-(CTACCAGGGTATCTAATCC)-3', e as condições de amplificação para organismos procariotas que incluiu uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 3 min seguida de 36 ciclos de desnaturação a 94°C a cada 50

s; *annealing* a 56°C por 50 s e extensão a 72°C por 1 min. Por fim, uma etapa de extensão durante 10 min a 72°C.

Os produtos Amplicon PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% (p/v) e os fragmentos amplificados foram posteriormente purificados e sequenciados pelo serviço de outsourcing STAB VIDA (Lisboa, Portugal). As sequências de nucleótidos foram alinhadas com aquelas recuperadas dos bancos de dados GenBank para a análise de homologia usando o programa Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide-BLASTN 2.17.0. A identificação taxonómica dos isolados foi realizada com base na maior similaridade obtida, considerando-se valores de identidade iguais ou superiores a 97% para atribuição ao nível do género. Os dados de sequência apresentados neste estudo foram carregados no NCBI através do repositório GenBank no Bioproject PRJNA1140600 (Biosamples SRR30203440-SRR30203447 e SRR30203430) e Bioproject SUB15688990 (Biosamples PX448813-PX448814).

4.2.1.3. Métodos independentes de cultura

4.2.1.3.1. NGS

A extração de DNA das amostras foi realizada utilizando o Kit OMNI Soil DNA Purification Kit, como descrito no ponto 2.1.1.2. e a metodologia referente à sequenciação por NGS foi realizada como descrito no ponto 2.1.1.3. do Capítulo 2.

4.2.1.3.2. Sequenciação de Terceira Geração

Para complementar a caracterização das comunidades bacterianas, foi utilizada a tecnologia de sequenciação de terceira geração utilizando a plataforma MinION da ONT. A biblioteca de sequenciação foi preparada de acordo com as instruções fornecidas no kit Rapid PCR Barcoding Kit 24 V14 (SQK-RPB114.24), seguindo as instruções do fabricante. O software MinKNOW™ foi usado para verificar o número de poros ativos e utilizado com as configurações padrão.

Para a indexação das amostras, foram misturados 20 µL de água RNase Free, 4 µL de DNA tagmentado, 1 µL do barcode correspondente a cada amostra e 25 µL de MyTaq™ HS Mix 2X (Bioline, Taunton, MA, EUA), perfazendo um total de 50 µL. O programa de PCR consistiu em 3 min de desnaturação a 95°C, seguido por 14 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 s, polimerização a 56°C por 15 s e extensão a 65°C por 6 min, e uma extensão final a 65°C por 6 min. Os *amplicons* foram quantificados por fluorimetria e purificados posteriormente utilizando o kit High Prep™ PCR Clean-up System Kit (MagBio Genomics, Gaithersburg, MD, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras, indexadas com o barcode correspondente, foram misturadas num *pool* em proporções equimolares para se ajustar a uma concentração

adequada ($\approx 400\text{--}800$ ng). A mistura foi posteriormente inserida numa célula de fluxo *MinION R10.4.1 flow cells (FLO-MIN114)*.

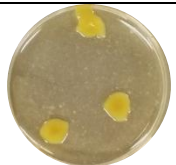
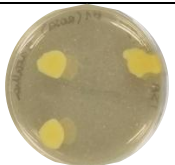
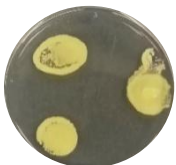
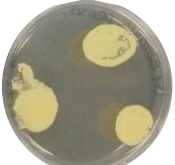

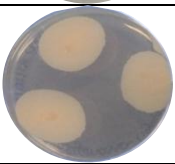
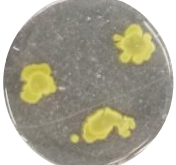

A célula de fluxo foi colocada na plataforma de sequenciação MinION e controlada pelo *software* MinKNOW 4.3.12 da ONT. A sequenciação decorreu *overnight*, usando a célula de fluxo R10 conectada ao computador apropriado de acordo com os critérios recomendados. Os dados em bruto, no formato FASTQ, foram posteriormente processados utilizando o fluxo de trabalho 16S acessível no software de análise de dados EPI2ME Desktop Agent “Fastq 16S Analysis”.

4.2.2. Resultados e Discussão: comunidades microbianas – efeitos do seu metabolismo na biodeterioração

4.2.2.1. Identificação dos isolados procariotas


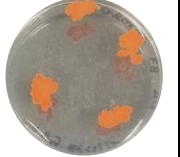
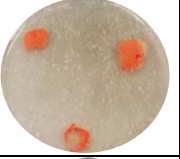
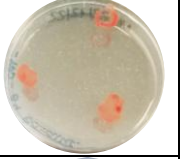
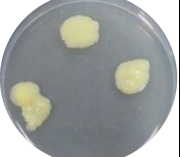
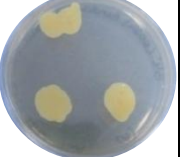
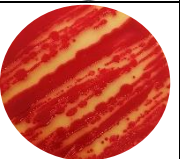
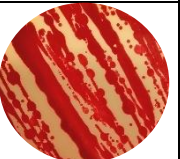


Os métodos dependentes de cultura permitiram caracterizar a população isolada cultivável (Tabela 4.1), composta por microrganismos procariotas, produtores de pigmentos interessantes e que nos possibilita ter uma primeira visão das bactérias que podem estar associadas ao problema estético visível no monumento.

Tabela 4.1: Características macroscópicas e identificação dos isolados do Mosteiro da Batalha

Amostra	Características macroscópicas		Estirpe	Identificação mais provável	Nr. Acesso Gen Bank
	Frente	Verso			
B1			CCLBMBat1	<i>Pseudomonas</i> sp.	PQ095922
			CCLBMBatB1-2	<i>Kocuria</i> sp.	PQ144780
B2			CCLBMBatB2	<i>Bacillus</i> sp.	PQ144790
			CCLBMBatB2-2	<i>Citricoccus</i> sp.	PQ144849

(continua)

Tabela 4.1 (continuação)

Amostra	Características macroscópicas		Estirpe	Identificação mais provável	Nr. Acesso Gen Bank
	Frente	Verso			
B3			CCLBMBatB 3	<i>Gordonia</i> sp.	PQ144851
B4			CCLBMBatB 4	<i>Methylobacterium</i> sp.	PX448814
			CCLBMBatB 4-1_2	<i>Micrococcus</i> sp.	PQ144861
			---	<i>Serratia</i> sp.	SAMN428374 01
B6			CCLBMBatB 6	<i>Micromonospora</i> sp.	PX448813

As estirpes isoladas foram identificadas como *Pseudomonas* sp. (CCLBMBat1), *Kocuria* sp. (CCLBMBatB1-2), *Bacillus* sp. (CCLBMBatB2), *Citricoccus* sp. (CCLBMBatB2-2), *Gordonia* sp. (CCLBMBatB3), *Micrococcus* sp. (CCLBMBatB4-1_2), *Serratia* sp. (SAMN42837401), *Methylobacterium* sp. (CCLBMBatB4) e *Micromonospora* sp. (CCLBMBatB6).

A amostra B2 apresentou uma percentagem de identidade elevada com *Bacillus* sp., e particularmente com a espécie *Bacillus megaterium*. *B. megaterium* é uma bactéria Gram-positiva, aeróbica, neutrofilica e saprófita, formadora de esporos encontrada em diversos habitats, mas comumente considerada como uma bactéria do solo [307]. Os esporos de *B. megaterium* contêm um pigmento avermelhado único (identificado como sendo consistente com uma estrutura carotenóide) nas suas membranas que não é encontrado noutras espécies. Este pigmento pode desempenhar um papel na estabilidade das membranas dos esporos deste microrganismo e, portanto, pode ser importante nas propriedades de resistência dos esporos [308–310]. A sua

capacidade de utilizar diferentes fontes de carbono, crescer numa ampla gama de temperaturas (3°C a 45°C) e ter capacidade de produção de carotenoides tem atraído interesse por esta espécie no setor industrial [311].

Methylobacterium extorquens, a espécie com maior percentagem de identidade identificada do género *Methylobacterium*, é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia obrigatória, que pode ser facilmente isolada de vários habitats, incluindo ar, águas residuais e solo, onde está presente em grande número. É um microrganismo de coloração rosa, classificada como metilotrófico facultativo de pigmentação rosa e conhecido por gerar um carotenóide rosa forte [312,313]. A produção de pigmentos carotenoides parece conferir a esta bactéria uma notável resistência à radiação UV, o que poderá explicar a sua capacidade de formar biofilmes persistentes e de rápida recorrência nas superfícies [314,315].

Em contexto patrimonial, por exemplo, Tescari *et al.* (2018) identificaram esta espécie como produtora de carotenóides rosa, na Casa do Bicentenário (Herculaneum, Itália), através da combinação de técnicas metagenómicas e técnicas convencionais de cultura [316].

O género *Gordonia*, identificado na amostra B3, é conhecido por ser amplamente distribuído em ecossistemas naturais como solo, água, areia de estuários e rizosfera, entre outros. Algumas das espécies pertencentes a este género degradam parcial ou completamente vários compostos xenobióticos e macromoléculas naturais [317]. Os membros deste género, para além de terem capacidade de se adaptar a variadas condições ambientais, incluindo elevadas concentrações de sal, também possuem muitas vias metabólicas diferentes, o que significa que possuem grande potencial para a formação de metabólitos secundários.

Gordonia sp. é um actinomicete gram-positivo e aeróbio [318], da ordem Mycobacteriales, de coloração rosa alaranjado com capacidade de usar alcanos como fonte de carbono. É descrita como produtora de forte pigmentação, associada a carotenóides avermelhados, sobretudo quando exposta sob luz intensa [319,320]. Dos diferentes carotenóides produzidos, três já foram identificados como cantaxantina (pigmento avermelhado), astaxantina (pigmento carotenóide rosa salmão) e luteína (pigmento amarelo-alaranjado) [33].

As amplas capacidades metabólicas, devido à notável plasticidade dos genomas deste género, tornam as estirpes de *Gordonia* promissoras para aplicação no campo da biotecnologia. A respeito desta aplicação, esta bactéria é de grande importância, por exemplo, na remoção de enxofre de combustíveis fósseis e tem sido amplamente

estudada para o desenvolvimento de tecnologias de reciclagem de petróleo; e ainda tem capacidade de produzir L-lisina, vários polissacáridos, biossurfactantes, carotenóides e compostos antimicrobianos [321].

Na amostra B6 foi identificado o género *Micromonospora* (Actinobacteria), produtor de pigmentos alaranjados [322]. Já na amostra B4 identificou-se o género *Serratia* (Enterobacteriaceae) [323], reconhecido pela produção do pigmento rosa-avermelhado prodigiosina [324].

4.2.2.2. Identificação das comunidades procariotas por NGS

Devido às conhecidas limitações dos métodos dependentes de cultura para o propósito deste estudo, foi utilizada a tecnologia de NGS que permite uma melhor compreensão das funções, atividades e dinâmica das comunidades microbianas.

Os resultados de metagenómica obtidos para as comunidades procariotas e eucariotas são descritos de seguida nas Figuras 4.12-4.13 e 4.14-4.15, respetivamente.

4.2.2.2.1. Comunidades procariotas

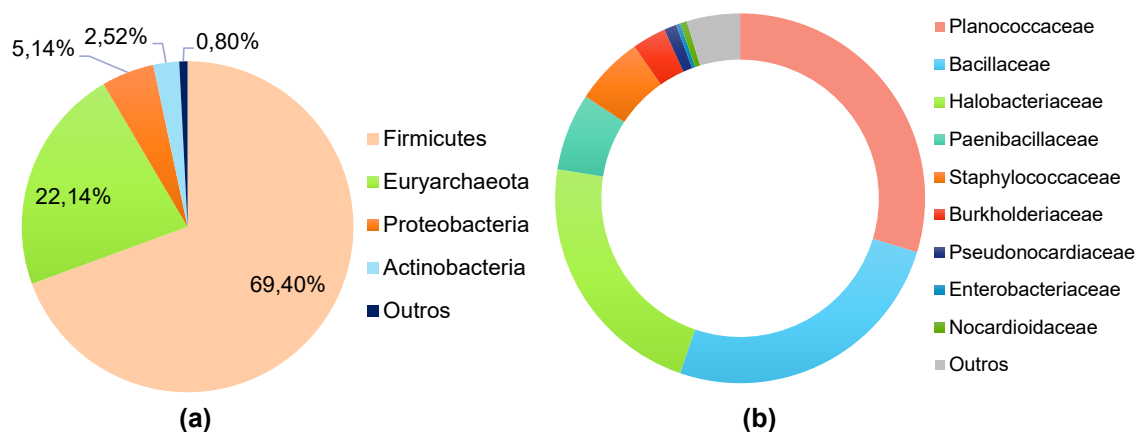


Figura 4.12: Filos (a) e Famílias (b) procariotas predominantes nos biofilmes do Mosteiro da Batalha

Considerando o conjunto de todas as amostras, o filo Firmicutes (69,40%) foi o filo dominante (Figura 4.12 (a)), seguido de Euryarchaeota (22,14%), Proteobacteria (5,14%), Actinobacteria (2,52%) e 0,80% para a população procariota definida como “outros” (designação genérica que considera os microrganismos com menor representatividade).

O filo Firmicutes tem sido frequentemente identificado como colonizador de materiais de pedra, contribuindo significativamente para a biodeterioração de monumentos históricos. É um filo que inclui uma variedade de géneros importantes, como *Bacillus*, *Clostridium* ou *Staphylococcus*, cuja principal característica é a capacidade de formar endósporos, estruturas altamente resistentes que lhes permitem sobreviver em condições extremas de temperatura, humidade e radiação. Esta adaptabilidade torna os Firmicutes particularmente aptos a colonizar superfícies expostas, como monumentos de pedra. Para além disso, podem segregar ácidos orgânicos e outras substâncias químicas que reagem com os minerais da pedra, acelerando processos de corrosão e enfraquecimento estrutural [21,95,265,325].

Os resultados mostram que a população procariota presente no Mosteiro da Batalha pertence às famílias (Figura 4.12 (b)) Planococcaceae (29,72%), Bacillaceae (25,55%), Halobacteriaceae (22,25%), Paenibacillaceae (6,76%), Staphylococcaceae (6,05%), Burkholderiaceae (2,97%), Pseudonocardiaceae (1,09%), Nocardioideae (0,60%) e Enterobacteriaceae (0,37%). 4,65% das famílias foram consideradas como “outros”.

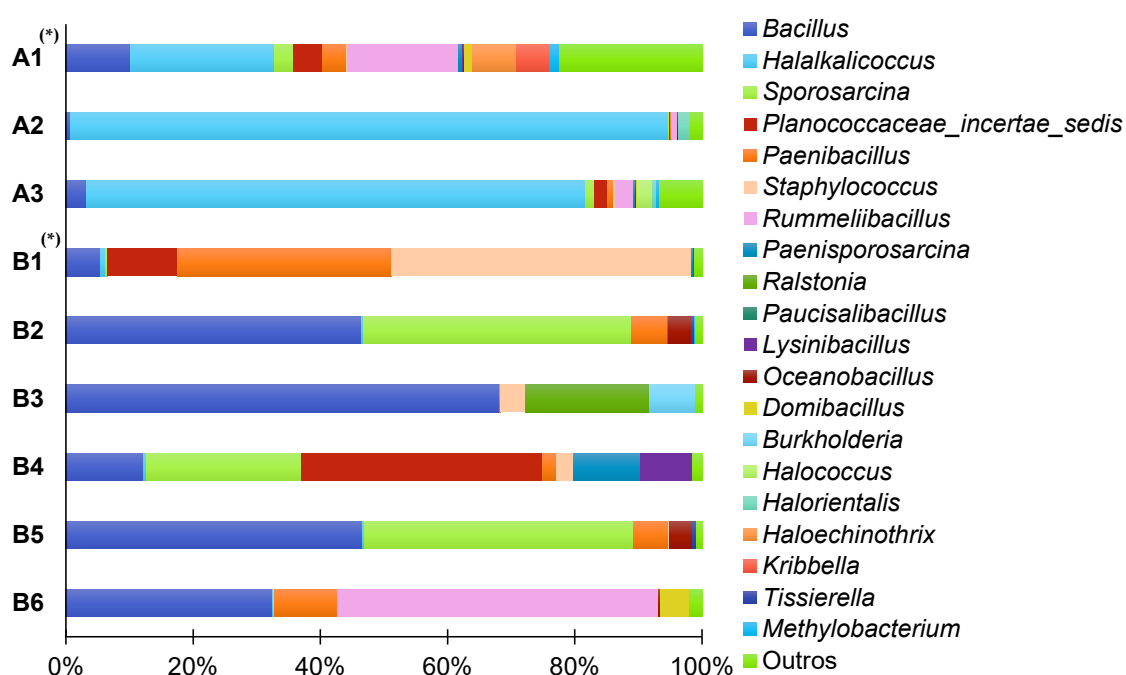


Figura 4.13: Géneros procariotas predominantes nos biofilmes cor-de-rosa. O símbolo (*) representa as amostras recolhidas na igreja do mosteiro

Relativamente à população bacteriana presente, as bactérias do género *Bacillus* (25,06%) foram os principais microrganismos identificados (Figura 4.13). Também foram identificados os géneros *Halalkalicoccus* (21,91%), *Sporosarcina* (12,63%),

Rummeliibacillus (7,98%), *Paenibacillus* (6,82%), *Planococcaceae_incertae_sedis* (6,23%), *Staphylococcus* (6,07%), *Ralstonia* (2,17%), *Paenisporosarcina* (1,32%), *Lysinibacillus* (0,95%), *Oceanobacillus* (0,86%), *Burkholderia* (0,80%), *Haloechinothrix* (0,77%), *Domibacillus* (0,69%), *Kribbella* (0,58%), *Halorientalis* (0,27%), *Halococcus* (0,26%), *Methylobacterium* (0,24%) *Tissierella* (0,12%) e *Paucisalibacillus* (0,01%). 4,27% dos géneros foram classificados como “outros”.

Em ambas as zonas de amostragem com evidências de contaminação foram identificados géneros procariotas produtores de pigmentos rosa.

O género *Bacillus* foi identificado em todas as amostras deste estudo, notavelmente nas amostras B2 (46,48%), B3 (68,14%), B5 (46,65%) e B6 (32,52%). *Bacillus* spp. são bactérias aeróbicas, gram-positivas, esporuladas e em forma de bastonete, que apresentam uma grande versatilidade metabólica [326], desenvolvendo-se em quase todos os ambientes naturais (solos, água, rochas etc.) pois a elevada relação área/volume destes microrganismos permite uma rápida transferência de nutrientes entre o ambiente externo e o interior das células. Os endósporos de *Bacillus* são altamente resistentes a uma variedade de fatores de *stress* ambientais, como agentes químicos tóxicos, dessecação, desidratação, variações de pressão, temperaturas extremas e elevadas doses de radiação ionizante ou UV, o que lhes confere uma vantagem seletiva na sua sobrevivência [123,310]. Assim, a prevalência do género *Bacillus*, e a rápida disseminação pelos locais que frequentemente apresenta (estando associado a um grande número de obras de arte, como pinturas murais, frescos, objetos de arte em madeira, pinturas e monumentos de pedra) parece estar intimamente relacionada à capacidade de formação de esporos [196].

Bactérias quimioheterotróficas do filo Firmicutes são frequentemente identificadas na superfície e no interior dos artefactos de pedra. Particularmente, *Bacillus* spp., com a sua estratégia de sobrevivência e ampla gama de nutrientes utilizados, são algumas das bactérias frequentemente identificadas em substratos pétreos [327]. Kiel & Gaylarde (2006) descobriram que alguns dos seus isolados de *Bacillus* produziam ácidos e surfactantes, indicando que tinham a capacidade de acelerar a degradação da pedra [328].

No género *Bacillus* existe um amplo espectro de espécies produtoras de pigmentos carotenóides (como *B. firmus*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. aquimaris*, *B. atrophaeus*, *B. indicus*, entre outros) predominando as cores amarelo, laranja e cor-de-rosa, sendo a intensidade da cor variável consoante a espécie e a estirpe correspondente. Este tipo de pigmentos em *Bacillus* exercem função maioritariamente

de proteção contra radiação UV, pois como antioxidantes, e localizados nas membranas, os carotenóides são capazes de eliminar ROS geradas pela radiação [309,310].

Por outro lado, o género *Halalkalicoccus* foi identificado principalmente nas amostras A1 (22,71%), A2 (93,97%) e A3 (78,60%). Este género de halófilos estritos é classificado na família Halobacteriaceae e as colónias são pigmentadas de rosa, laranja ou vermelho.

Através da sequenciação da região V3-V4 do gene 16S rRNA, é importante destacar algumas espécies identificadas neste estudo, que são relevantes para a produção de carotenóides e pigmentos cor-de-rosa, e que nesse sentido, podem contribuir na forma de biofilme, para a alteração cromática observada no monumento, nomeadamente *Rummeliibacillus stabekisii*, *Bacillus firmus*, *Bacillus aryabhatai* e *Bacillus cereus*.

B. cereus produz um pigmento rosa-avermelhado semelhante à pulcherrimina e foi identificado em superfícies de pedra biodeterioradas, onde contribui para a formação de biofilmes que podem causar fenómenos de *pitting* [263], e alterações na superfície da pedra. Este microrganismo foi também reportado como significativamente abundante e associado a biodeterioração de calcário, por exemplo, no Minarete de Prince Muhammad, em Akhmim (Egito), devido à sua capacidade de dissolver carbonato de cálcio [329].

B. firmus parece ter evidências científicas correlacionadas ao Património Cultural, pois tem capacidade de produzir pigmentos cor-de-rosa, carotenóides, tendo um deles sido identificado como astaxantina [309,330–332]. Por outro lado, *B. aryabhatai* é uma rizobactéria gram-positiva, resistente à radiação UV e halotolerante [181] com capacidade de formar biofilmes em condições de elevada salinidade [182].

Rummeliibacillus stabekisii é halotolerante, produz pigmentos brancos, amarelos e rosa [333], e mostra atividade de biomineralização, um dos mecanismos microbianos de deterioração de objetos e substratos patrimoniais [334]. Mudgil *et al.* (2018) demonstrou esta capacidade de precipitação de calcite, isolada de espeleotemas em caves indianas [335].

4.2.2.2. Comunidades eucariotas

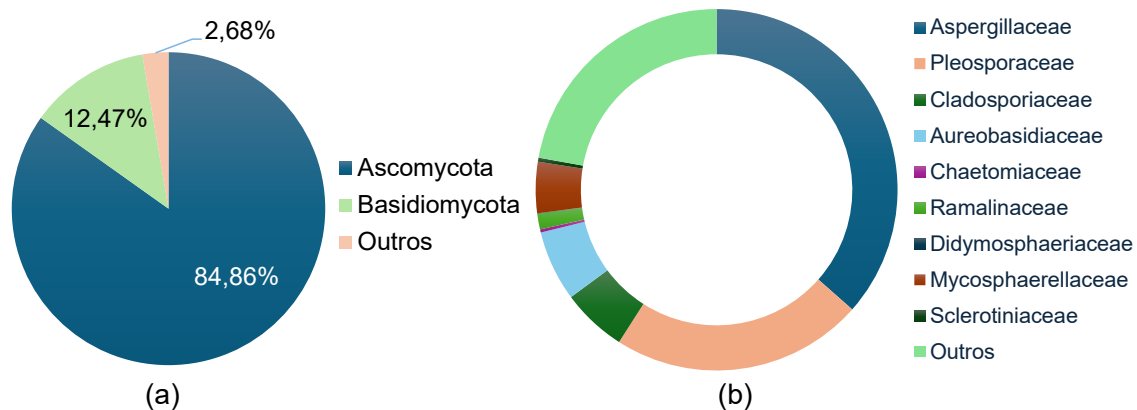


Figura 4.14: Filos (a) e Famílias (b) eucariotas predominantes nos biofilmes do Mosteiro da Batalha

Os dois filos com maior representatividade (Figura 4.14 (a)) nas amostras em estudo foram Ascomycota (84,86%) e Basidiomycota (12,47%), tendo sido considerado 2,68% para a população eucariota definida como “outros” (designação genérica que considera os microrganismos com menor representatividade).

As principais famílias (Figura 4.14 (b)) identificadas da comunidade eucariota foram Aspergillaceae (36,51%), Pleosporaceae (22,54%), Aureobasidiaceae (6,32%), Cladosporiaceae (5,83%), Mycosphaerellaceae (4,58%), Ramalinaceae (1,40%), Sclerotiniaceae (0,36%), Chaetomiaceae (0,28%), Didymosphaeriaceae (0,04%), e 22,15% foram considerados como “outras” famílias.

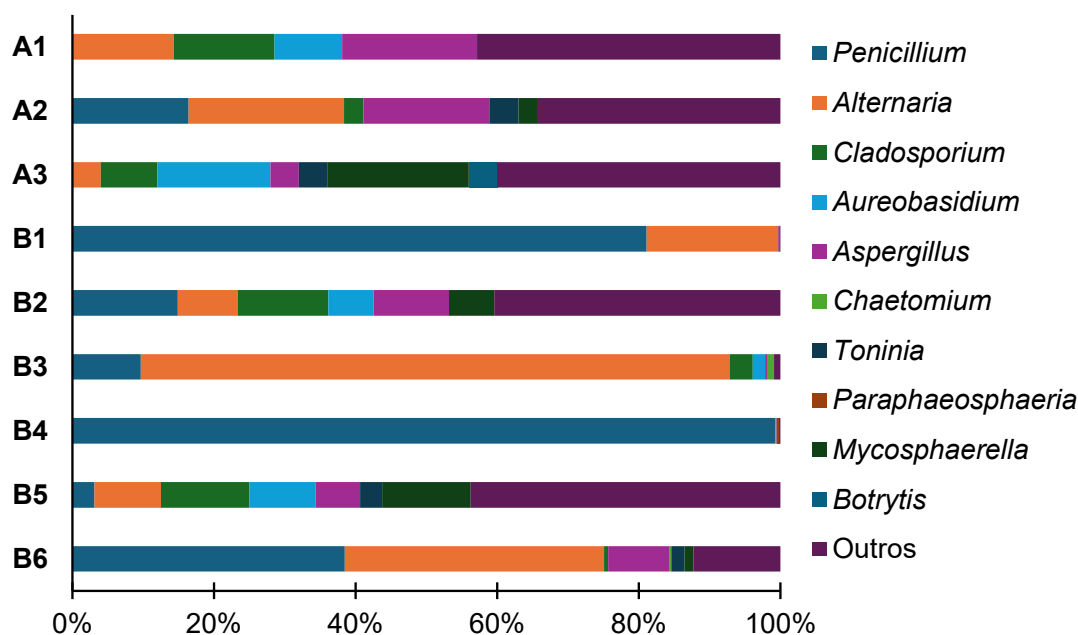


Figura 4.15: Gêneros eucariotas predominantes nos biofilmes do Mosteiro da Batalha

O género *Penicillium* (29,22%) foi aquele com maior representatividade nas amostras recolhidas no Mosteiro da Batalha (Figura 4.15). Seguiram-se os géneros *Alternaria* (21,84%), *Aspergillus* (7,42%), *Cladosporium* (6,02%), *Aureobasidium* (4,78%), *Mycosphaerella* (4,76%), *Toninia* (1,48%), *Botrytis* (0,44%), *Chaetomium* (0,14%) e *Paraphaeosphaeria* (0,04%). 23,86% dos géneros foram classificados como “outros”.

Para além das bactérias, também os fungos são conhecidos por produzir uma grande variedade de pigmentos que incluem metabólitos de diversas classes, como melaninas, antraquinonas, quinonas, azafilonas, carotenóides, entre outros [336]. Recentemente, têm atraído especial atenção para a produção de pigmentos naturais pelo facto de conterem compostos com elevada estabilidade luminosa e química, espectro de cores, elevado rendimento e fornecimento sustentável [209].

Os géneros *Alternaria*, *Penicillium* e *Aspergillus* são alguns dos géneros descritos na literatura como produtores deste tipo de pigmentos [336]. As espécies do género *Alternaria* produzem sobretudo pigmentos de coloração rosa, laranja e amarelo [293]; as espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* podem produzir desde pigmentos de cor rosa, roxo-avermelhado, verde, amarelo até pigmentos mais escuros, como o castanho [209]. O género *Cladosporium* também pode contribuir para alteração da cor da pedra, pois algumas espécies apresentam pigmentação vermelha devido à excreção de grande

quantidade de perilenoquinona [337]; e *Aureobasidium*, pois existem espécies que podem adquirir pigmentação vermelha [338,339].

4.2.2.3. Identificação dos microrganismos por Sequenciação de Terceira Geração

Para complementar a identificação dos microrganismos procariotas foi utilizada sequenciação de terceira geração utilizando o sequenciador MinION™, que compõe uma tecnologia que possibilita utilizar um nanoporo como biossensor para a sequenciação do DNA e nos possibilita obter maiores comprimentos de leitura, pelo que se sugere ser mais preciso quando pretendemos analisar a microbiota ao nível da espécie. Foram selecionadas algumas amostras para a identificação das espécies bacterianas com este sequenciador, cujos resultados se apresentam na Figura 4.16.

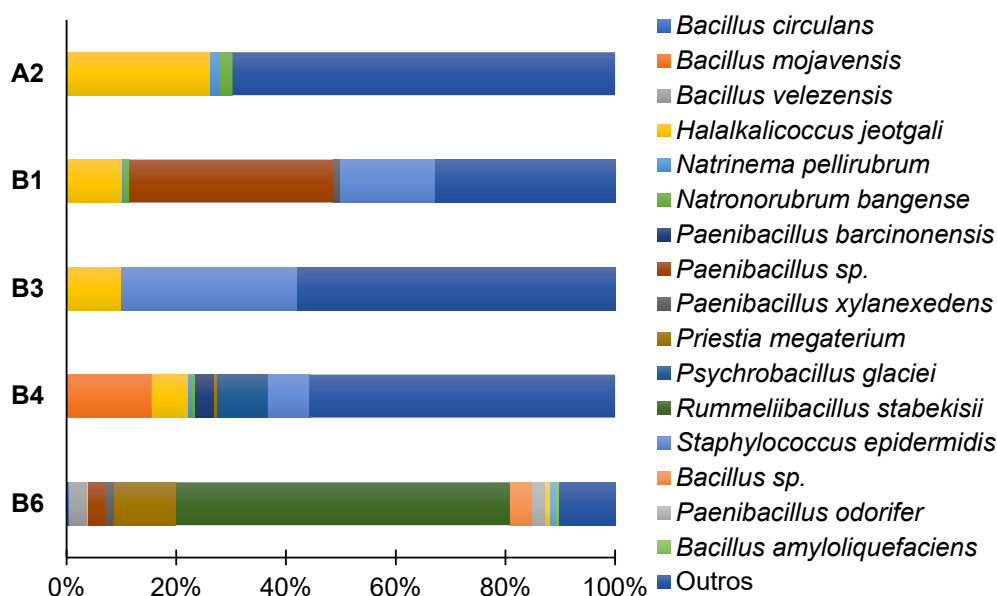


Figura 4.16: Identificação das espécies procariotas predominantes pela tecnologia da ONT

Utilizando a sequenciação de terceira geração (MinION) de forma complementar às abordagens Sanger e NGS, não só foi possível identificar a presença de géneros como *Bacillus*, *Halalkalicoccus*, *Rummeliibacillus*, *Paenibacillus* e *Staphylococcus* que já tinham sido identificados anteriormente, como também se identificaram os géneros *Psychrobacillus* e dois géneros de arqueas extremamente halofílicas, *Natrinema* e *Natronorubrum*, ausentes nos resultados anteriores. Isto sublinha o valor da tecnologia MinION, cujas leituras longas são vantajosas para detetar diversidade

adicional e aperfeiçoar a identificação taxonómica, potencialmente até ao nível da espécie.

Considerando todos os resultados, o estudo do Mosteiro da Batalha sugere que a pigmentação rosa visível nas superfícies de pedra está diretamente ligada à presença de biofilmes bacterianos. A caracterização detalhada destas comunidades evidenciou ainda a importância de recorrer a metodologias de sequenciação complementares, permitindo uma visão mais completa de toda a diversidade microbiana associada ao fenómeno de biodeterioração.

4.3. Mosteiro de Alcobaça

Classificado pela UNESCO como Património Mundial em 1989, o imponente Mosteiro de Alcobaça, situado na cidade de Alcobaça (Portugal), é um dos melhores e mais impressionantes exemplares da arquitetura cisterciense na Europa [340].

Atualmente, este monumento apresentava um elevado grau de alteração superficial dos elementos arquitetónicos pétreos do interior da igreja, observando-se principalmente o aparecimento de biofilmes rosados nas paredes e colunas (Figura 4.17 (b)), associados à presença de eflorescências salinas (Figura 4.17 (c)).

Anteriormente, as descolorações rosadas e os biofilmes desta cor não eram frequentemente associados a uma origem biológica, pois no passado a sua génese era predominantemente atribuída a processos químicos. A origem biológica destes biofilmes nas paredes de edifícios antigos foi proposta pela primeira vez há cerca de um século, embora sem uma etologia precisa. Mais recentemente, vários estudos já demonstraram que monumentos de pedra ou obras de arte representam um habitat comum para bactérias halotolerantes e, conseqüentemente, a pigmentação rosa é um fenómeno intrigante em diferentes edifícios históricos localizados em várias partes do mundo [38]. Acredita-se que essa mudança de cor, frequentemente associada a condições de elevada humidade, elevada salinidade e iluminação moderada, seja devida à produção de carotenóides como mecanismo de proteção celular. Estes compostos podem modificar as cores levando a problemas estéticos, mas também problemas em termos de estabilidade da superfície do substrato [316]. Assim, acredita-se que o elo comum entre os diferentes monumentos colonizados por biofilmes cor-de-rosa (devido à pigmentação) seja a cristalização de sais auxiliada pela infiltração de água, o que cria condições ideais para o crescimento dos microrganismos halofílicos [341].

Além disso, foi identificado um fenómeno distinto no Mosteiro de Alcobaça (Figura 4.17 (a)): a pigmentação rosa parece estar presente sempre a uma altura muito semelhante na maioria das colunas e paredes, começando a 40 cm do chão e associada à presença de sais nas paredes. Geralmente, o aparecimento de eflorescências salinas favorece a proliferação de microrganismos halotolerantes/halofílicos, o que pode levar à alteração cromática causada por pigmentos libertados ou contidos nos microrganismos, dos quais a cor rosa é um exemplo.

Para compreender os processos de deterioração que afetam a pedra deste monumento, foi realizada a combinação de técnicas de microscopia eletrónica de varrimento com análise de espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (SEM-EDS), difração de raios-x (XRD) e HTS para estudar amostras de zonas específicas da igreja

do Mosteiro de Alcobaça, mostrando diferentes processos de alteração para (i) confirmar a contaminação microbiana das amostras; (ii) caracterizar o tipo de eflorescência salina observada; (iii) identificar e caracterizar os microrganismos que colonizam as superfícies pétreas nas diferentes zonas de amostragem.

Os resultados deste caso de estudo encontram-se publicados na forma de artigo científico: Silva, L.; Dias, L.; Salvador, C.; Miller, A.Z.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. Microbial Induced Stone Discoloration in Alcobaça Monastery: A Comprehensive Study. *J. Cult. Herit.* **2024**, 67, 248–257, doi:10.1016/j.culher.2024.03.011.

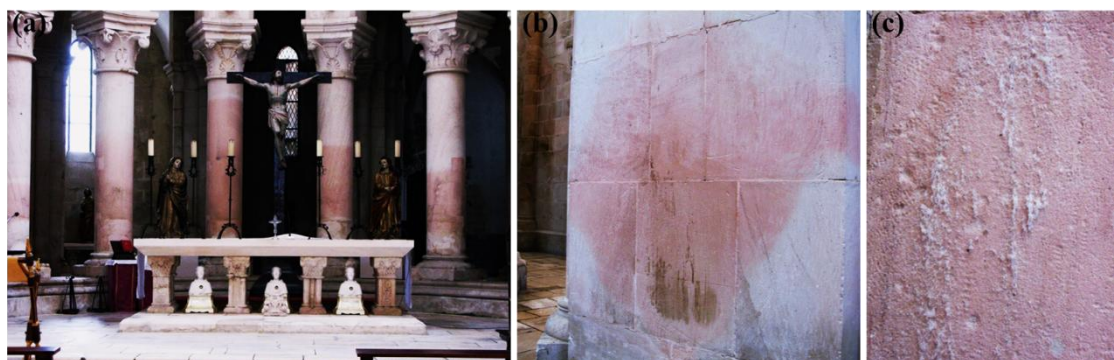


Figura 4.17: Evidências de biodeterioração no Mosteiro de Alcobaça: (a) fenómeno distinto observado no altar da igreja; (b) biofilmes cor-de-rosa nas paredes; (c) presença de eflorescências salinas

4.3.1. Metodologia

4.3.1.1. Amostragem

O processo de amostragem (Figura 4.18) foi realizado no Mosteiro de Alcobaça (39°32'54"N 8°58'48"W), especificamente nas paredes e colunas da igreja do monumento, construídas em calcário de Ançã, em três áreas representativas com sinais significativos de contaminação e alteração, nomeadamente (1) colunas e paredes cobertas por biofilmes cor-de-rosa (amostras A4-A7); (2) paredes com presença de eflorescências salinas e simultaneamente biofilmes rosados (amostras A8-A9) e na zona (3) as amostras foram recolhidas de colunas com coloração rosa próximas ao altar da igreja (amostras B7, B8). A amostragem foi feita sob a coordenação de conservadores-restauradores, cumprindo os requisitos de conservação e minimização do impacto estrutural e estético na pedra, recolhendo a quantidade mínima necessária para os ensaios. Métodos não invasivos (amostras B7 e B8) e métodos semi-invasivos (amostras A4-A9) foram utilizados para a recolha das amostras, em condições semi-assépticas (recolha realizada com material estéril, mas em ambiente externo). A recolha

dos microfragmentos de pedra foi feita próxima a perdas ou fissuras para evitar danos adicionais.

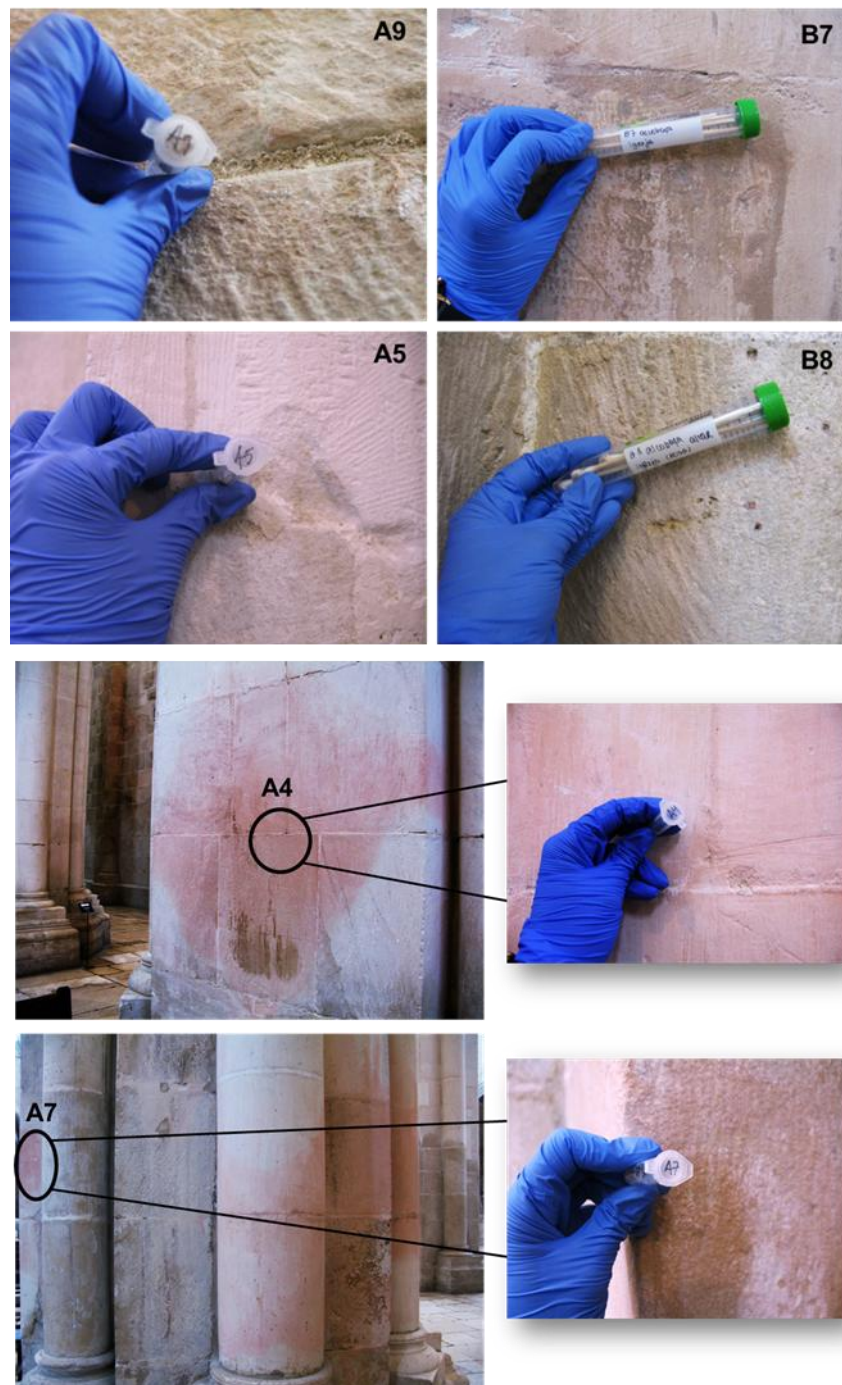


Figura 4.18: Processo de amostragem no Mosteiro de Alcobaça

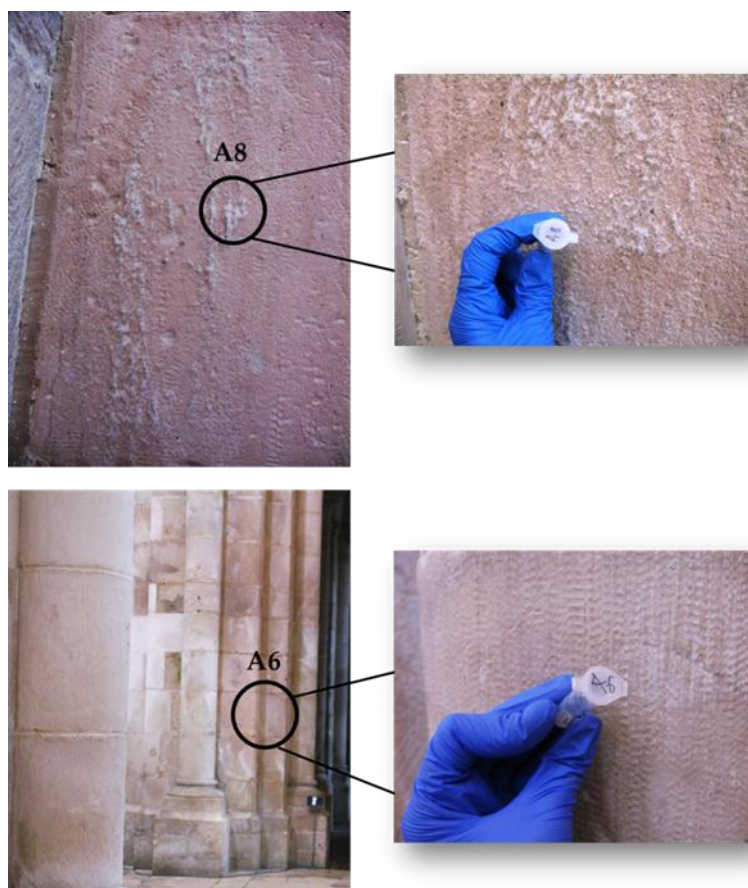


Figura 4.18 (continuação)

4.3.1.2. XRD

Para caracterizar as eflorescências salinas visíveis nas paredes do Mosteiro de Alcobaça, foi utilizada a técnica XRD. As amostras recolhidas foram colocadas num porta-amostras de baixo fundo de silício e os dados foram obtidos em geometria Bragg-Brentano (θ - 2θ) através de um micro-difratómetro BRUKER AXS D8 Discover em micro modo. As condições de operação foram: radiação $\text{CuK}\alpha$, tensão de aceleração de 40 kV e corrente de 40 mA; faixa angular de 3–75° 2θ , varrimento escalonado de 0,05° $2\theta/2s$. As fases mineralógicas foram identificadas utilizando o *software* EVA Bruker-AXS e a base de dados PDF-2 ICDD.

4.3.1.3. SEM-EDS

Os microfragmentos de pedra recolhidos foram analisados por SEM e as amostras foram secas ao ar, revestidas com Au/Pd durante 30 s. As micrografias foram obtidas utilizando um microscópio eletrónico de varrimento de emissão de campo (TESCAN

Clara, Tcheça), operando sob alto vácuo a uma tensão de aceleração de 10 kV, corrente de 30 pA e distância de 10-11 mm. O detetor utilizado foi o detetor de elétrons secundários Everhart-Thornley.

A análise de EDS foi realizada com um espectrômetro de raios-X Bruker XFlash 6130 SDD, detetor com resolução espectral de 126 eV no FWHM/Mn K α acoplado ao instrumento anterior. As análises de mapas e pontos foram adquiridas com tensão de aceleração de 15 kV, corrente de 300 pA e distância de 10 mm. Os dados foram recolhidos e processados utilizando o *software* Esprit 2.5.

4.3.1.4. Análise metagenômica

A extração de DNA das amostras de pedra do Mosteiro da Batalha foi realizada utilizando o Kit OMNI Soil DNA Purification Kit, como descrito no ponto 2.1.1.2. e a metodologia referente à sequenciação por NGS foi realizada como descrito no ponto 2.1.1.3. do Capítulo 2.

4.3.2. Resultados e Discussão: comunidades microbianas – efeitos do seu metabolismo na biodeterioração

4.3.2.1. Caracterização das eflorescências salinas

A análise química é crucial para determinar a composição das eflorescências, a fim de prevenir o seu desenvolvimento e evitar a degradação dos materiais de pedra [342]. A XRD foi utilizada neste estudo para caracterizar as eflorescências salinas evidenciadas na amostra A8, uma vez que é uma metodologia prática e útil para a identificação de compostos cristalinos, para examinar a composição mineralógica de substratos rochosos, sais e produtos de alteração, que tem sido aplicada na preservação do património [274].

O difratograma de XRD das eflorescências (Figura 4.19) revelou o padrão de difração típico do **nitrato de potássio** (KNO₃), identificado pela correspondência dos principais picos com os dados de referência. Estes resultados indicam que as eflorescências que afetam os materiais pétreos do Mosteiro de Alcobaça são maioritariamente constituídas por este sal, cuja cristalização é um fenómeno comum e amplamente documentado em edifícios históricos [342–346].

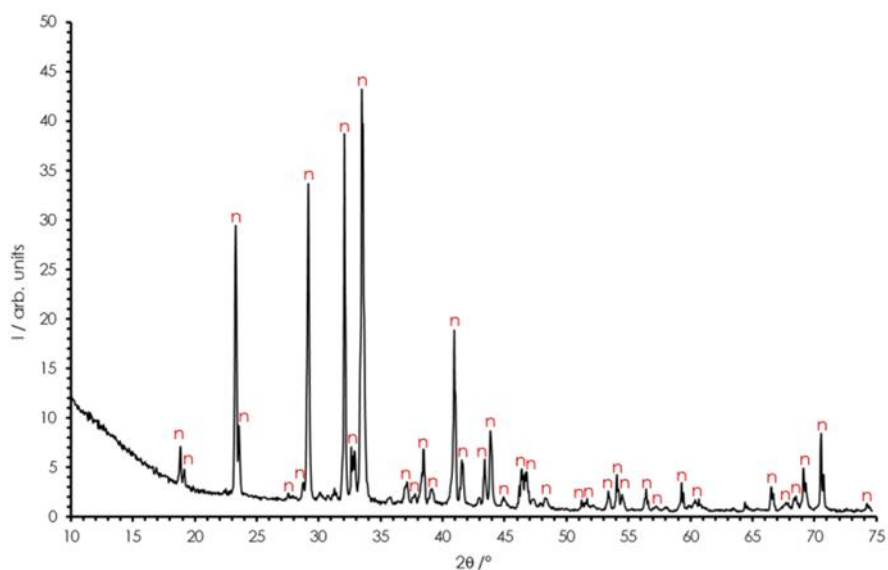


Figura 4.19: Difratograma de XRD das eflorescências salinas dos microfragmentos pétreos com identificação dos principais sinais de nitrato de potássio (n).

Este sal pode causar graves danos em pedras porosas, como o calcário de Ançã, devido à elevada pressão de cristalização da solução de água supersaturada no interior dos poros. No Mosteiro de Alcobaça, construído sobre dois leitos de rios, a água ascende por capilaridade, penetrando na estrutura de pedra. A evaporação desta água na superfície e na subsuperfície das paredes provoca a supersaturação dos sais nos poros, favorecendo o crescimento cristalino. Para além disso, as eflorescências salinas resultantes criam condições propícias ao desenvolvimento de microrganismos e, simultaneamente, contribuem para a degradação da pedra, promovendo particularmente a desintegração granular. Devido à sua elevada solubilidade, o nitrato de potássio tende a precipitar em elevadas concentrações na superfície ou na rede de poros, como consequência de processos evaporativos ou variações de temperatura que induzem a supersaturação da solução [347–350].

4.3.2.2. Detecção de contaminação microbiana

Para avaliar o grau de deterioração do material e a presença de colonização, os microfragmentos de pedra foram analisados por SEM-EDS.

A técnica SEM na análise de materiais patrimoniais tem crescido exponencialmente e é uma das poucas técnicas adequadas para detetar microrganismos no seu habitat natural [57,351]. Tem sido utilizado para caracterizar a estrutura superficial dos biomateriais e para medir a adesão celular e alterações na morfologia bacteriana [352], principalmente porque apresenta diversas vantagens

associadas à sua utilização, nomeadamente: uma grande profundidade de campo; elevada resolução em nano escala; facilidade de preparação de amostras; a variação da região examinada e um grande espaço de câmara amostral [353,354]. A combinação com EDS permite determinar os elementos presentes no analito alvo, fornecendo informações sobre a microestrutura superficial e a composição química das regiões afetadas pela deterioração [354,355].

A análise SEM-EDS confirmou a presença de contaminação microbiana nas amostras e permitiu a deteção de material orgânico na superfície da pedra (Figura 4.20 (a)). Identificaram-se os elementos carbono (C), enxofre (S), nitrogénio (N) e oxigénio (O) como os principais constituintes dos materiais pétreos, mas também a presença concomitante de potássio (K) e sódio (Na) (Figura 4.20 (b)). A presença de C, N, O e S na superfície da pedra pode ser indicativa da presença de material biológico, sendo posteriormente confirmada pela análise de SEM. Por outro lado, a presença de Na e K está relacionada à presença de eflorescências salinas, que como referido anteriormente, fornecem condições ideais de crescimento para microrganismos halotolerantes [356–359].

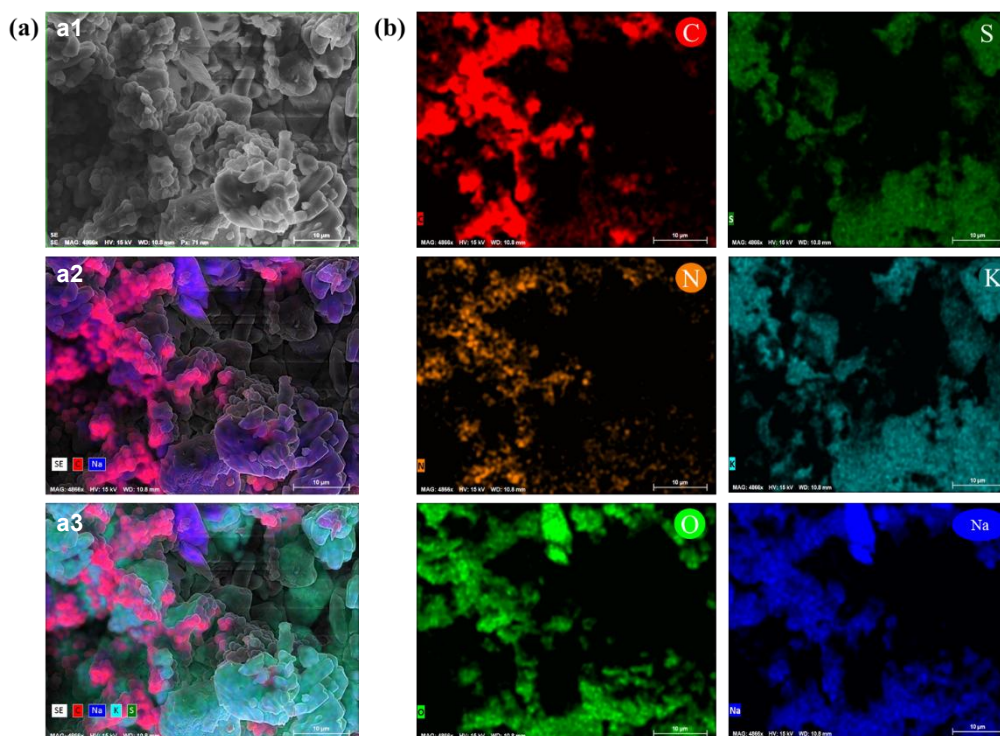


Figura 4.20: Análise de microfragmentos de pedra do Mosteiro de Alcobaça por observação SEM em modo eletrónico secundário (a1) e mapas elementares EDS 2D (a2-a3) com distribuição de elementos individuais (b) de carbono (C), azoto (N), oxigénio (O), enxofre (S), potássio (K) e sódio (Na)

As micrografias SEM evidenciam a presença de biofilmes bacterianos organizados sobre a superfície da pedra (Figura 4.21), observando-se células com forma arredondada e agrupadas em colónias. As setas assinalam zonas onde as bactérias se encontram imersas numa matriz extracelular, com filamentos e estruturas de adesão interligando as células e a superfície do substrato. Este tipo de organização sugere uma forte capacidade de fixação e colonização, compatível com a formação de manchas e pigmentação rosa observadas macroscopicamente nas amostras.

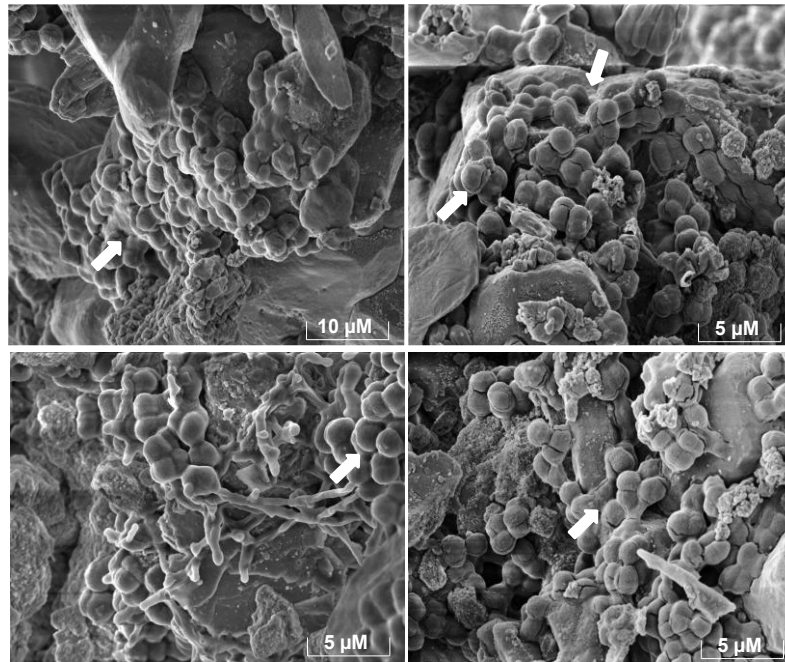


Figura 4.21: Micrografias SEM da população microbiana que prospera em áreas alteradas da pedra do mosteiro

4.3.2.3. Caracterização da microbiota por NGS

4.3.2.3.1. Comunidades procariotas

Para identificar e caracterizar as comunidades procariotas causadoras da biodeterioração observada no monumento, foi realizada uma análise metagenómica filogenética detalhada ao nível do Filo, Família e Género, apresentada abaixo, nas Figuras 4.22 e 4.23.

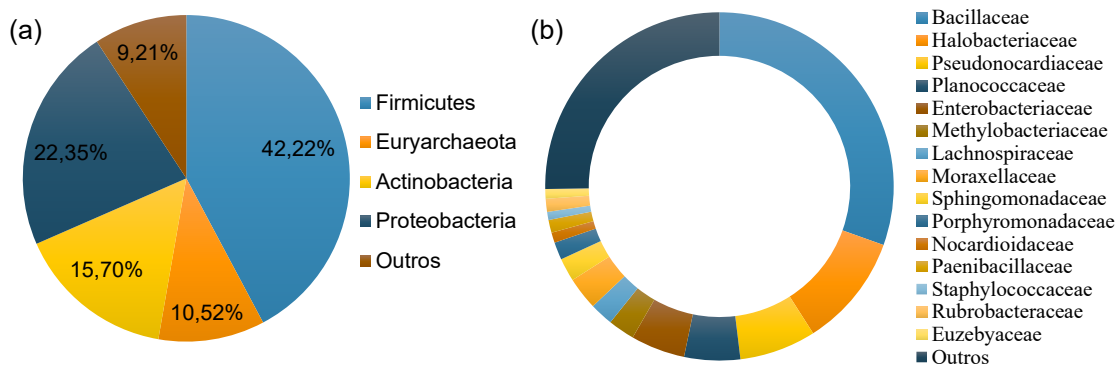


Figura 4.22: Filos (a) e famílias (b) procariotas predominantes no Mosteiro de Alcobaça

O filo dominante nas amostras do Mosteiro de Alcobaça (Figura 4.22 (a)) foi o filo Firmicutes (42,22%), seguido de Proteobacteria (22,35%), Actinobacteria (15,70%), Euryarchaeota (10,52%) e 9,21% para “outros” filos (designação genérica que considera os microrganismos com menor representatividade).

Estes são filos bacterianos que têm sido previamente identificados em monumentos construídos por diversos materiais pétreos. No filo Proteobacteria existem importantes bactérias quimiolitotróficas, que contribuem para o ciclo do nitrogénio e do enxofre, várias das quais têm sido identificadas em materiais de pedra [327]. Devido ao seu importante papel deteriorante, reforça-se a necessidade de estudos mais aprofundados neste sentido, incluindo em monumentos portugueses construídos em calcário.

O filo Actinobacteria também tem sido associado a calcário com evidências de biodeterioração, pois alguns dos microrganismos incluídos neste filo promovem diminuição do pH e podem, portanto, atuar como indicadores de deterioração ativa [360]. Os membros deste filo são descritos como colonizadores de pedra de forma mais eficaz do que a maioria das bactérias unicelulares provavelmente devido ao seu crescimento filamentoso e à utilização eficaz de diversas fontes de nitrogénio e carbono. O mesmo pode ser esperado para bactérias formadoras de esporos devido à sua maior resistência. É o caso do género *Bacillus* (pertencente ao filo Firmicutes) que é um colonizador comum de construções patrimoniais feitas de pedra [69].

Os resultados mostram que a população procariota presente no Mosteiro de Alcobaça, considerando o conjunto de todas as amostras, pertence às seguintes famílias (Figura 4.22 (b)): Bacillaceae (30,46%), Halobacteriaceae (10,50%), Pseudonocardiaceae (7,11%), Planococcaceae (5,19%), Enterobacteriaceae (5,03%), Moraxellaceae (3,03%), Methylobacteriaceae (2,47%), Lachnospiraceae (2,17%),

Sphingomonadaceae (2,17%), Porphyromonadaceae (1,63%) Rubrobacteraceae (1,21%), Paenibacillaceae (1,19%), Euzebyaceae (0,90%), Nocardioideae (0,95%), Staphylococcaceae (0,75%) e 25,24% das famílias foram consideradas como “outros”.

Adicionalmente, os resultados da sequenciação revelaram variações significativas na composição dos géneros bacterianos entre as três zonas distintas do mosteiro, ilustrados na Figura 4.23.

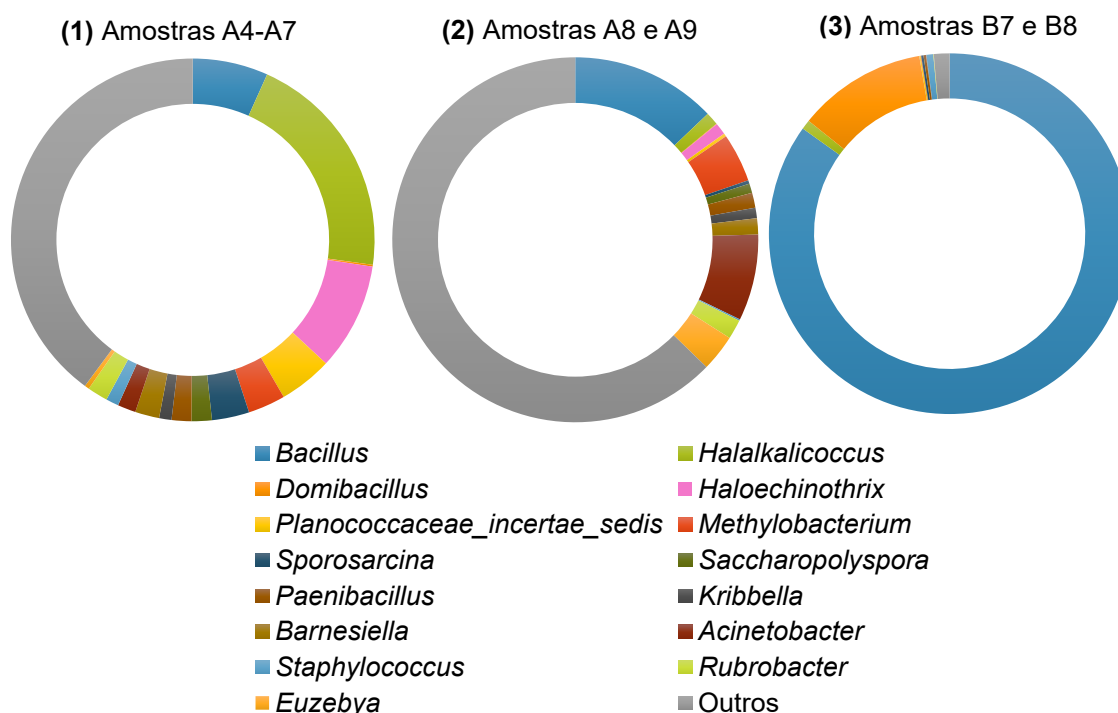


Figura 4.23: Géneros predominantes discriminados por zona de amostragem no Mosteiro de Alcobaça

Apesar da relativa proximidade com que as amostras foram retiradas, cada zona apresentou um perfil bacteriano único, refletindo as características microambientais específicas de cada local. Estas diferenças na composição bacteriana sublinham a influência de fatores como a exposição à luz solar ou artificial, humidade, presença de salinidade, a formação de biofilmes e a localização específica dentro do edifício na estruturação das comunidades microbianas. Estes resultados evidenciam a complexidade e diversidade microbiológica em áreas tão próximas, mas com condições microambientais aparentemente distintas.

As diferenças entre cada amostra em particular, para melhor visualizar o perfil taxonómico, são apresentadas nas Figuras abaixo.

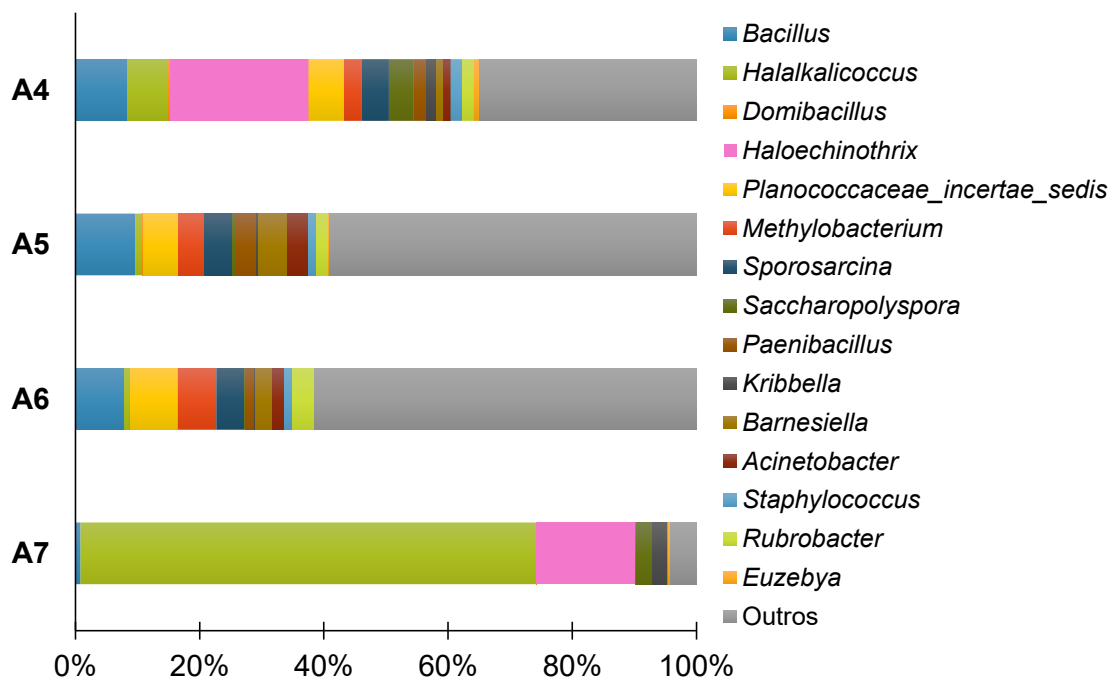


Figura 4.24: Gêneros procariotas predominantes na zona de amostragem (1)

Em relação ao nível do gênero (Figura 4.24) a zona de amostragem (1) é constituída principalmente por *Halalkalicoccus* (20,48%), *Haloechothrix* (9,56%) e *Bacillus* (6,71%). Os gêneros minoritários *Planococcaceae_incertae_sedis* (4,74%), *Methylobacterium* (3,33%), *Sporosarcina* (3,32%), *Barnesiella* (2,15%), *Rubrobacter* (1,82%), *Saccharopolyspora* (1,80%), *Paenibacillus* (1,75%), *Acinetobacter* (1,62%), *Staphylococcus* (1,14%), *Kribbella* (1,10%), *Euzebya* (0,41%) e *Domibacillus* (0,16%) também foram identificados. 39,89% dos gêneros foram incluídos em “outros”.

Esta zona de amostragem contém o maior número de biofilmes rosa recolhidos, pelo que não é surpreendente que os gêneros maioritários sejam *Bacillus* e *Halalkalicoccus*, uma vez que incluem várias espécies que produzem carotenóides rosa. O último gênero, presente de forma significativamente notória na amostra A7, é pigmentado de vermelho-rosa e requer elevadas concentrações de sal para se desenvolver [361], tendo vindo a ser bem documentado como estando presente em inúmeros monumentos históricos, com ênfase naqueles em que se observa contaminação derivada de pigmentação cor-de-rosa e produção de eflorações salinas [38,69,359,362–364]. Atualmente, o gênero inclui três espécies: *Hac. tibetensis* (espécie-tipo do gênero), *Hac. jeotgali* e *Hac. Paucihalophilus* [365]. *Hac. tibetensis*, uma das espécies deste gênero que se identificou neste estudo, é uma bactéria

haloalcalifílica, o que significa que cresce preferencialmente em condições de elevado pH e elevada salinidade, e produz pigmentos alaranjados [366].

As amostras A5 e A6 são bastante semelhantes, o que seria expectável, uma vez que a amostragem foi realizada em zonas bastante próximas e onde foi possível detetar a presença da espécie *Rubrobacter radiotolerans*. Esta é uma bactéria extremamente resistente à radiação gama e UV [367], e foi documentada na literatura como uma importante causa de biodeterioração essencialmente (i) pela produção de carotenóides rosa (bacterioruberina e monoanidrobacterioruberina) [368] e formação de manchas coloridas da mesma cor, em vários substratos [360]; (ii) pelo papel ativo que desempenha nos fenómenos de eflorescência e precipitação mineral [38] e (iii) por ter o benefício de crescer em superfícies rochosas mesmo sob luz solar direta devido à sua halotolerância e resistência à radiação UV [369].

A amostra A4 apresenta uma microbiota ligeiramente distinta, incluindo *Haloechothrix alba*, previamente identificada em solos altamente salinos, evidenciando a especialização desta espécie para sobreviver em condições hipersalinas [362].

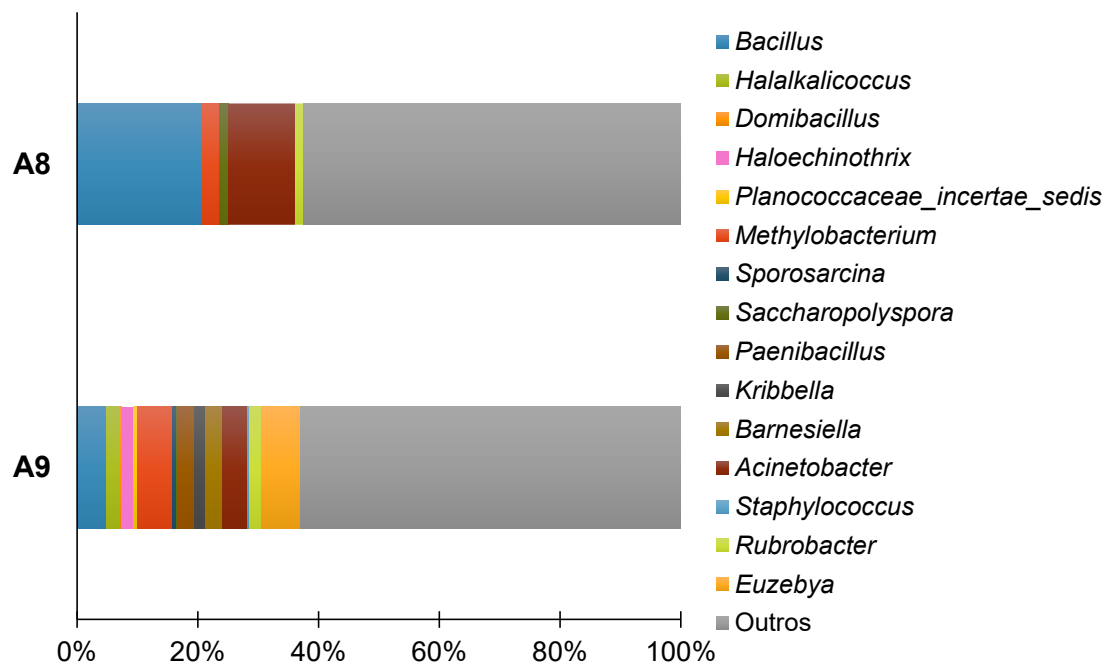


Figura 4.25: Gêneros procariotas predominantes na zona de amostragem (2)

Na zona (2), os gêneros maioritariamente identificados (Figura 4.25) foram *Bacillus* (12,88%), *Acinetobacter* (7,65%) e *Methylobacterium* (4,32%). Os gêneros com abundância relativa minoritária foram *Rubroacter* (1,72%), *Barnesiella* (1,43%), *Paenibacillus* (1,33%), *Halalkalicoccus* (1,15%), *Haloechothrix* (1,04%), *Kribbella* (0,93%), *Saccharopolyspora* (0,83%), *Sporosarcina* (0,30%), *Planococcaceae_incertae_sedis* (0,28%), *Staphylococcus* (0,13%), *Domibacillus* (0,05%) e 62,72% foram classificados como “outros”.

Para além da maioria dos gêneros acima mencionados terem capacidade de prosperar em ambiente salino (como *Halalkalicoccus* ou *Haloechothrix*, por exemplo) foi possível ainda identificar-se duas espécies interessantes: *Acinetobacter lwoffii* e *Egibacter rhizosphaerae*.

A. lwoffii tem a capacidade de produzir pigmentos rosa-avermelhados, utilizando metanol como fonte de energia. De acordo com Ghosh *et al.* (2007), o pigmento foi caracterizado como uma molécula carotenóide, provavelmente com estrutura semelhante à bacterioruberina. É interessante notar que o pigmento rosa produzido por *A. lwoffii* parece exercer duas funções diferentes para o microrganismo. Primeiro, defende-o do stress oxidativo, combatendo os radicais livres produzidos (função antioxidante); segundo, mantém a integridade estrutural da membrana ao ser capaz de se conectar com a bicamada de ácidos gordos [370].

E. rhizosphaerae é uma espécie aeróbia e halofílica obrigatória que forma colónias amarelo-rosa pálido [371].

Como nesta zona as amostras foram recolhidas diretamente de um ambiente salino, espera-se que a diversidade microbiana seja menor nessa área em comparação com as outras zonas de amostragem. Ambientes com elevadas concentrações de sal criam condições extremas, limitando o crescimento apenas a determinados microrganismos, conhecidos como halotolerantes, capazes de sobreviver e prosperar em tais condições adversas, ou halofílicos, que necessitam dessas mesmas condições para sobreviver. Assim, não é inesperado que os microrganismos procariotas encontrados nestas amostras sejam predominantemente halotolerantes/halofílicos, refletindo a influência seletiva do ambiente salino sobre a comunidade presente.

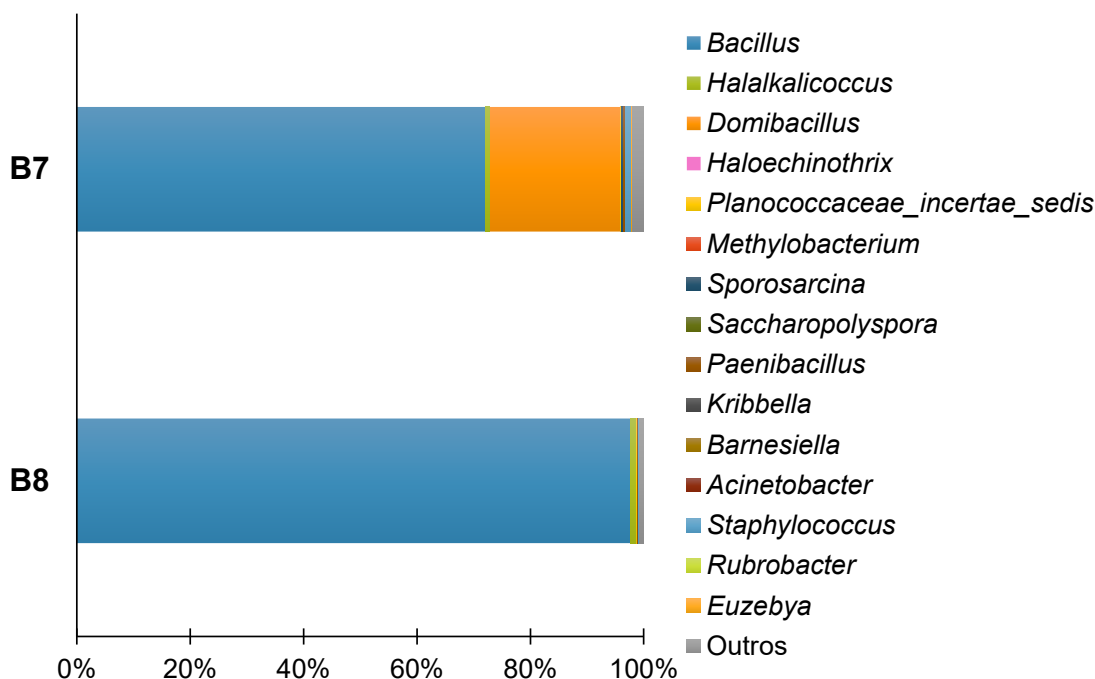


Figura 4.26: Gêneros bacterianos predominantes na zona de amostragem (3)

Observando os resultados ao nível taxonómico do género da zona (3) (Figura 4.26), nas colunas de coloração rosa próximas ao altar da igreja, o principal género identificado foi *Bacillus* (84,91%), que se destaca significativamente das demais zonas, seguido de *Domibacillus* (11,54%), que também inclui espécies com pigmentação rosa [372]. *Halalkalicoccus* (0,85%), *Haloechinothrix* (0,01%), *Planococcaceae_incertae_sedis* (0,12%), *Methylobacterium* (0,05%), *Sporosarcina* (0,20%), *Saccharopolyspora* (0,01%), *Paenibacillus* (0,21%), *Barnesiella* (0,02%), *Acinetobacter* (0,03%), *Staphylococcus* (0,61%), *Rubrobacter* (0,04%) e *Euzebya* (0,01%) também foram identificados. A categoria “outros” compreendeu 1,40% dos géneros.

Do género *Bacillus*, que constituiu 72,1% da amostra B7 e 97,8% da amostra B8, identificaram-se duas espécies interessantes: *B. aryabhatai* e *B. licheniformis*.

B. aryabhatai, a principal espécie identificada na amostra B8, é uma espécie resistente à radiação UV e halotolerante, com capacidade de formar biofilmes em condições de elevada salinidade [181]. Para além disso, sabe-se que é uma espécie produtora de carotenóides rosa [373].

Em relação às principais espécies detetadas na amostra B7, *B. licheniformis* é uma bactéria saprófita amplamente distribuída na natureza e halotolerante que produz um pigmento carotenóide rosa-avermelhado denominado pulcherrimina [374,375], para

além de possuir uma enorme capacidade de formar biofilmes, estando também envolvida na formação de eflorescências salinas [376]. O que acontece é que bactérias nitrificantes, como *B. licheniformis*, oxidam o amônio em iões nitrito e nitrato, que levam à formação de ácido nítrico. Este processo faz com que a pedra se dissolva e se formem sais de nitrato solúveis, aparecendo na forma de eflorescência [12]. *B. licheniformis* foi anteriormente isolado das superfícies de vários objetos históricos [377]. Por exemplo, de acordo com Skipper *et al.* (2022), esta bactéria está significativamente associada a superfícies de pedra deterioradas. Com base nos resultados desse estudo, esta espécie foi considerada um dos principais contribuintes para a biocorrosão, pois estava presente em 100% dos locais de amostragem com evidência de biodeterioração [263].

Por outro lado, *D. robiginosus*, a espécie identificada do género *Domibacillus* neste estudo, é uma nova estirpe bacteriana de pigmentação avermelhada, o que também pode reforçar a sua contribuição para a coloração observada nas amostras [372].

4.3.2.3.2. Comunidades eucariotas

Para complementar a caracterização das comunidades, foi também analisada a fração eucariota presente nas amostras. A sua identificação é particularmente relevante neste contexto, uma vez que podem contribuir para a formação de biofilmes em interação com os procariotas. Os resultados da distribuição taxonómica encontra-se resumida nas Figuras 4.27 e 4.28.

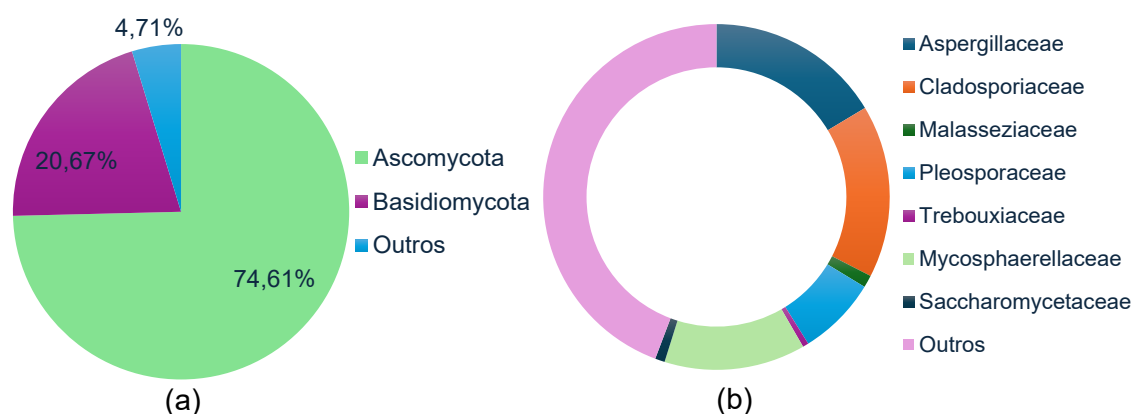


Figura 4.27: Filos (a) e famílias (b) eucariotas predominantes no Mosteiro de Alcobaça

Os dois filos com maior representatividade nas amostras em estudo (Figura 4.27 (a)) foram Ascomycota (74,61%), Basidiomycota (20,67%), tendo sido considerado

4,71% para a população eucariota definida como “outros” (designação genérica que considera os microrganismos com menor representatividade).

As principais famílias identificadas da comunidade eucariota (Figura 4.27 (b)) foram Aspergillaceae (16,39%), Cladosporiaceae (16,16%), Mycosphaerellaceae (13,18%), Pleosporaceae (7,42%), Malasseziaceae (1,15%), Saccharomycetaceae (0,90%), Trebouxiaceae (0,55%) e 44,25% das famílias foram classificadas como “outros”.

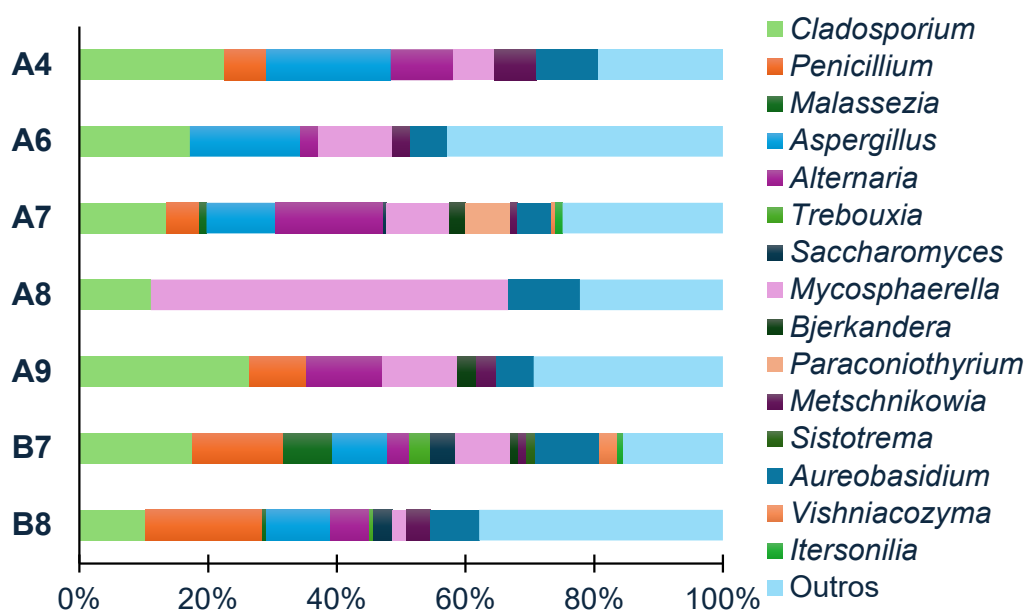


Figura 4.28: Gêneros eucariotas predominantes no Mosteiro de Alcobaça

O género *Cladosporium* (16,95%) foi aquele com maior representatividade nas amostras recolhidas no Mosteiro de Alcobaça (Figura 4.28). Seguiram-se os géneros *Mycosphaerella* (15,11%), *Aspergillus* (9,38%), *Aureobasidium* (7,90%), *Penicillium* (7,55%), *Alternaria* (7,22%), *Malassezia* (1,32%), *Saccharomyces* (1,03%), *Trebouxia* (0,56%), *Bjerkandera* (0,95%), *Paraconiothyrium* (1,02%), *Metschnikowia* (2,59%), *Sistotrema* (0,21%), *Vishniacozyma* (0,47%) e *Itersonilia* (0,28%). 27,46% dos géneros foram considerados como “outros”.

Os membros do género *Cladosporium* apresentam ampla distribuição geográfica e são comuns em diversos ambientes, sendo frequentemente isolados de solos, tintas, têxteis e outros materiais orgânicos. Devido à sua ubiquidade, muitas espécies atuam como agentes de decomposição e deterioração de substratos, além de poderem causar reações alérgicas, tendo, por isso, um impacto ambiental significativo [378].

C. halotolerans, uma das espécies deste género identificadas neste estudo, é um fungo encontrado em ambientes hipersalinos, o que condiz com a presença de eflorescências encontradas no mosteiro, conseguindo resistir em condições com pouca disponibilidade de água [379]. *C. halotolerans* destaca-se como uma das espécies mais representativas do género *Cladosporium* em ambientes interiores, com distribuição mundial e identificado numa ampla gama de diferentes substratos [380,381].

Como já referido em casos de estudo anteriores, os géneros fúngicos *Alternaria*, *Penicillium* e *Aspergillus*, também maioritários nestas amostras, representam microrganismos produtores de pigmentos e potencialmente deteriógenos de materiais pétreos. Para o género *Aspergillus*, identificou-se a espécie *A. penicillioides*, que curiosamente, está entre os fungos mais xerofílicos deste género, ou seja, é um organismo extremófilo que pode crescer e reproduzir-se também em condições de baixa disponibilidade de água; neste caso, pode crescer com a_w de cerca de 0,58, o que é inibitório para a maioria dos fungos. Para além disso é igualmente um verdadeiro halófilo, presente em diversos ambientes hipersalinos [78].

Resumidamente, os resultados deste estudo revelaram uma íntima ligação entre colonização bacteriana, formação de biofilmes pigmentados e presença de eflorescências salinas. Esta associação mostrou como processos biológicos e físico-químicos podem atuar em conjunto, contribuindo de forma significativa para a deterioração das superfícies pétreas. Deste modo, para evitar a deterioração deste imponente edifício em pedra, e incentivar a sua preservação, acreditamos que este estudo foi um passo na direção certa para a implementação de um plano preciso e eficaz de conservação e intervenção de um Monumento Património Mundial da UNESCO.

4.4. Reflexões finais sobre os casos de estudo

O estudo conjunto dos três casos de estudo - Convento de Cristo, Mosteiro da Batalha e Mosteiro de Alcobaça - permite identificar padrões comuns e diferenças significativas nos processos de biodeterioração em monumentos de pedra classificados como Património Mundial da UNESCO.

Em todos os casos, a colonização microbiana revelou-se um fator determinante na deterioração, envolvendo tanto comunidades bacterianas como fúngicas, com destaque para géneros amplamente associados a pigmentação, formação de biofilmes e alterações cromáticas. Estes organismos demonstraram elevada capacidade adaptativa às condições ambientais de cada local, explorando a disponibilidade de nutrientes e a composição mineral das superfícies para estabelecer uma colonização persistente. Do ponto de vista bioquímico, os mecanismos observados incluem a produção de pigmentos (como carotenóides) responsáveis por manchas visíveis, a síntese de enzimas capazes de degradar componentes da pedra, e a associação a sais solúveis que originam eflorescências e potenciam processos de degradação físico-química.

Embora existam aspetos comuns, cada monumento apresentou particularidades relevantes.

No Convento de Cristo, os líquenes foram os principais agentes de colonização, incluindo em zonas icónicas como a Janela do Capítulo. Estes organismos, resultantes da simbiose entre fungos e bactérias, revelaram-se particularmente agressivos devido à sua capacidade de penetrar na pedra, promover processos de bioquímica extracelular, como a libertação de ácidos orgânicos, a produção de pigmentos e a secreção de metabolitos que intensificam a degradação estrutural. Por sua vez, no Mosteiro da Batalha, o fenómeno mais marcante foi a pigmentação rosa provocada por biofilmes bacterianos, cujos principais agentes foram identificados com recurso a abordagens complementares, revelando a importância da conjugação de técnicas de sequenciação, para se obter uma visão completa da diversidade taxonómica. Em Alcobaça, observou-se uma forte associação entre colonização bacteriana, pigmentação rosa e a ocorrência de eflorescências salinas. Sugere-se que as bactérias halofílicas e halotolerantes tenham capacidade de utilizar os sais presentes na pedra, produzindo pigmentos carotenóides que conferem coloração intensa, ao mesmo tempo que a cristalização dos sais provoca tensões mecânicas e acelera a deterioração. Este caso evidencia de forma clara a interação entre processos microbianos e físico-químicos na biodeterioração.

Com efeito, a análise integrada dos três casos de estudo - Convento de Cristo, Mosteiro da Batalha e Mosteiro de Alcobaça - revela um quadro complexo e multifatorial da biodeterioração. Embora existam elementos comuns, os resultados evidenciam também dinâmicas específicas que refletem as particularidades ambientais, arquitetônicas e materiais de cada local.

Pontos em comum que emergem de forma clara: a colonização microbiana é uma ameaça transversal, com comunidades compostas por bactérias e fungos altamente adaptáveis, capazes de explorar características físico-químicas da pedra para se instalar e proliferar. Em todos os monumentos, foram identificados microrganismos produtores de pigmentos (nomeadamente carotenóides), formadores de biofilmes e sintetizadores de enzimas e ácidos orgânicos que contribuem diretamente para a alteração cromática e a degradação estrutural das superfícies.

Contudo, as particularidades de cada caso revelam-se cruciais para a compreensão mais fina do fenómeno:

- No Convento de Cristo, a presença predominante de líquenes, inclusive em elementos emblemáticos como a Janela do Capítulo, realça a agressividade deste tipo de colonização. A capacidade dos líquenes de penetrar mecanicamente a pedra e de produzir compostos bioativos torna-os uma ameaça singular, exigindo abordagens de conservação diferenciadas.
- No Mosteiro da Batalha, o fenómeno de pigmentação rosada provocado por biofilmes bacterianos sublinha a importância de abordagens multianalíticas. A utilização conjugada de técnicas de sequenciação permitiu uma identificação mais precisa dos agentes envolvidos e revelou como uma mesma manifestação visual (cor) pode ter origens microbianas diversas.
- No Mosteiro de Alcobaça, destaca-se a interação direta entre colonização bacteriana e processos físico-químicos de degradação, como a formação de eflorescências salinas. A presença de bactérias halofílicas e halotolerantes, capazes de metabolizar sais minerais e produzir pigmentos, demonstra como a biodeterioração resulta da interligação entre fatores bióticos e abióticos. O processo de cristalização dos sais, potenciado pela atividade microbiana, acelera tensões internas na pedra, intensificando a deterioração. Estes três exemplos deixam claro que a biodeterioração em monumentos pétreos não pode ser encarada como um fenómeno uniforme. Pelo contrário, trata-se de um processo complexo, onde a diversidade microbiana, as propriedades específicas do substrato, as condições ambientais e o histórico de exposição ou intervenção

interagem continuamente. O reconhecimento desta complexidade exige uma resposta igualmente articulada e multidisciplinar, tanto na fase de diagnóstico como na definição de estratégias de conservação.

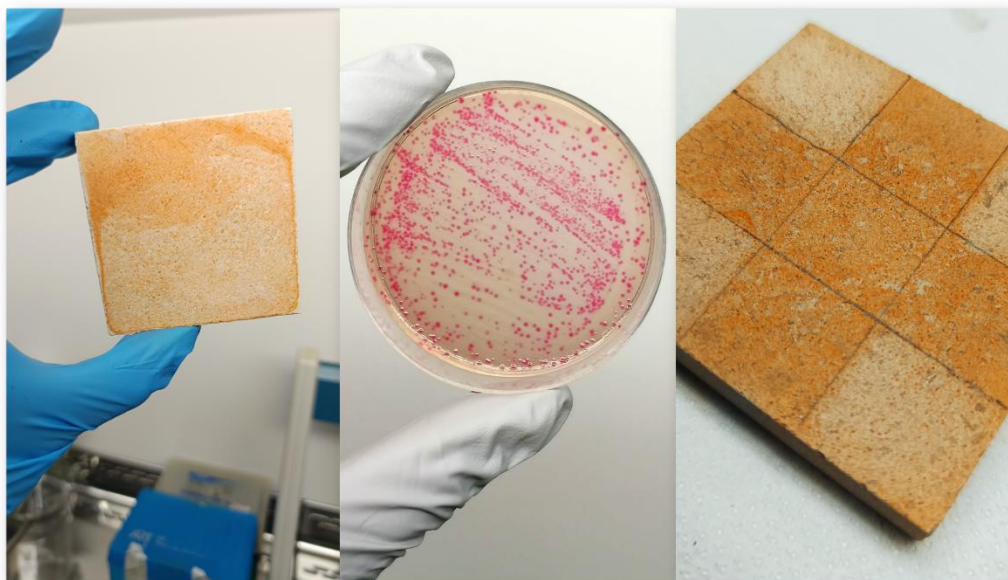
Algumas implicações práticas e futuras emergem deste estudo, nomeadamente:

- A monitorização contínua das condições ambientais (temperatura, humidade, deposição de sais) é essencial para prever e prevenir riscos;
- A aplicação de tecnologias moleculares e bioquímicas avançadas permite uma caracterização mais fina dos agentes envolvidos e das suas vias de ação;
- Devem ser desenvolvidas e testadas estratégias de conservação adaptadas ao tipo de colonização e às particularidades de cada monumento, evitando soluções genéricas;
- A integração entre investigação científica e práticas de conservação é crucial para intervenções mais sustentáveis, eficazes e reversíveis;

Este estudo conjunto reforça que a proteção do património edificado, especialmente aquele classificado como Património Mundial da UNESCO, exige um entendimento aprofundado das ameaças biológicas. Só com base nesse conhecimento será possível desenvolver estratégias de conservação verdadeiramente eficazes, respeitando a integridade histórica, artística e material dos monumentos.

Capítulo 5

Formação de biofilmes avermelhados de origem bacteriana em monumentos de pedra: Ensaio de simulação e estratégias de mitigação



Capítulo 5 – Formação de biofilmes avermelhados de origem bacteriana em monumentos de pedra: Ensaios de simulação e estratégias de mitigação

A observação de biofilmes avermelhados em diferentes monumentos de pedra, nomeadamente no Convento de Cristo, no Mosteiro da Batalha e no Mosteiro de Alcobaça, constituiu um dos fenómenos mais marcantes identificados nos casos de estudo anteriormente descritos. Estas formações, frequentemente associadas à presença de bactérias pigmentadas, representam uma alteração estética indesejável e um risco acrescido para a integridade da pedra, podendo potenciar processos de deterioração físico-química.

A pertinência e frequente ocorrência deste tipo de colonização no Património motivaram a realização de ensaios de simulação controlados, elaborados para simular as condições naturais e, assim, aprofundar o conhecimento sobre a dinâmica de formação destes biofilmes. Os testes de biocolonização foram conduzidos com o objetivo de monitorizar de forma detalhada o processo de colonização microbiana e compreender o fenómeno de pigmentação em materiais pétreos. Ao mimetizar fatores ambientais, como a temperatura e a exposição à luz solar, tornou-se possível analisar de que forma os microrganismos interagem com a superfície da pedra ao longo do tempo e avaliar o impacto dessas comunidades na sua aparência e conservação.

Este capítulo tem como objetivo, além da produção e caracterização de pigmentos bacterianos *in-situ*, a avaliação de diferentes tratamentos com dois focos principais: a remoção superficial dos pigmentos visíveis e a prevenção do crescimento microbiano ao longo do tempo. Pretende-se: (i) o desenvolvimento microbiano em laboratório; (ii) caracterizar os pigmentos microbianos produzidos; (iii) mimetizar o processo de pigmentação que ocorre nos monumentos através de simulação em pedra calcária, em condições controladas e incubação prolongada; (iv) a avaliação da alteração do substrato e (v) a aplicação de antimicrobianos e avaliação da eficácia dos tratamentos.

Os resultados apresentados neste capítulo foram publicados em dois artigos científicos:

Silva, I.; Salvador, C.; Miller, A.Z.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. The Role of Bacteria in Pink Stone Discoloration: Insights from Batalha Monastery. *Micro* **2024**, 4 (4), 778-797, doi: 10.3390/micro4040048.

Silva, I.; Salvador, C.; Miller, A.Z.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. Addressing Biodeterioration at UNESCO Stone Monuments: Tomar Convent and Batalha Monastery. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2025**, 205, 106188, doi:10.1016/j.ibiod.2025.106188.

5.1. Metodologia: Testes de biocolonização

5.1.1. Seleção dos microrganismos com potencial de formação de biofilmes

A capacidade de formação de biofilmes bacterianos foi determinada com o método cristal-violeta, que é um método clássico para testar esta capacidade a partir de isolados bacterianos. Os isolados foram incubados a 30°C durante 7 dias em meio líquido HS (45 g/L NaCl, 20 g/L MgSO₄·7H₂O, 3 g/L citrato trissódico·2H₂O, 2 g/L KCl e 10 g/L Peptona bacteriológica, pH 6,5-7,4).

Após crescimento das culturas líquidas, 90 µL de meio HS juntamente com 10 µL dos isolados foram adicionados a uma placa de poliestireno de 96 poços, deixando-se a incubar a 37°C durante 72 h. Depois desse período de tempo, o meio foi descartado da placa onde a cultura foi incubada. Os poços foram corados com 125 µL de corante cristal-violeta a 0,1% deixando atuar durante 15 min. O excesso de corante foi descartado e foram adicionados 200 µL de ácido acético (30% v/v) para solubilizar, deixando atuar por 15 min. A absorvância (abs) foi lida a 595 nm [382].

5.1.2. Inoculação dos modelos de pedra

Para os ensaios de biocolonização, dois modelos de pedra calcária (6 cm²) foram lavados, secos e posteriormente esterilizados durante 20 min (120°C; 1,5 bar). O isolado bacteriano CCLBMBatB3 (*Gordonia* sp.) foi cultivado em meio líquido HS, sob incubação a 30°C e agitação de 100 rpm por 7 dias. De seguida, os modelos de pedra foram inoculados com uma suspensão bacteriana contendo aproximadamente 1×10¹⁰ UFC/mL (Figura 5.1), distribuída uniformemente sobre toda a superfície pétreo. Um dos modelos foi mantido sob exposição solar e o outro mantido na escuridão, ambos incubados a 30°C.

Durante o decorrer do ensaio, foi adicionado meio HS a cada dois dias para manutenção das condições de crescimento. O desenvolvimento dos biofilmes sobre as pedras foi monitorizado diariamente. Incluiu-se ainda uma amostra controlo negativo, uma pedra não inoculada, para comparação dos resultados.



Figura 5.1: Crescimento bacteriano do isolado CCLBMBatB3 em meio líquido HS

5.1.3. Colorimetria

Após a inoculação e crescimento da bactéria nos modelos de pedra, a alteração de cor de cada modelo foi medida por um colorímetro não invasivo KONICA MINOLTA CM-700d (Japão, Osaka). Antes das medições de referência, o colorímetro foi calibrado com padrões de calibração de branco e preto, garantindo que os valores Lab* obtidos para as amostras de referência se aproximassem de (100, 0, 0) e (0, 0, 0), respectivamente.

Os resultados correspondem à média de dez medições realizadas na superfície da pedra, expressas no espaço de cor CIE L*a*b* ΔE^* (definido pela *Commission Internationale de l'Éclairage*, CIE), em que L*, a* e b* representam, respectivamente, a luminosidade e as coordenadas cromáticas da cor. As coordenadas cromáticas medidas foram L*, que representa luminosidade (0-100); a*, que representa o espectro do verde (-) ao vermelho (+); e b*, que abrange o espectro do azul (-) ao amarelo (+). As alterações nesses parâmetros foram determinadas pelo cálculo do parâmetro ΔE (diferença total de cor), através da seguinte equação:

$$\Delta E = ((\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2)^{1/2}$$

$$\Delta L = (L_2 - L_1); \Delta a = (a_2 - a_1); \Delta b = (b_2 - b_1)$$

5.1.4. Espectroscopia RAMAN

Para complementar os ensaios, ambos os modelos de pedra (mantida sob exposição solar e mantida na escuridão) foram analisadas por espectroscopia Raman para confirmar a identificação dos pigmentos, utilizando um espectrômetro Raman Horiba Xplora acoplado a um microscópio Olympus. Os espectros Raman foram

adquiridos em modo alargado na gama 0-2500 cm^{-1} e foi aplicado um laser com comprimento de onda de 785 nm e filtro de 10%. Os espectros Raman foram obtidos acumulando 10 aquisições de 30 s com resolução espectral de 5 cm^{-1} . Não foi necessária qualquer preparação de amostra. Os espectros foram analisados com o *software* do equipamento (LabSPEC 5 da Horiba Jobin Yvon, França, Longjumeau).

5.1.5. Avaliação da capacidade de remoção de pigmentos

5.1.5.1. Ensaio de otimização

Primeiramente, para um ensaio de otimização da limpeza dos pigmentos (Figura 5.2), preparou-se uma solução com uma mistura de álcool isopropílico puro ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$, E.Merck) e água destilada em diferentes concentrações, a ser utilizada posteriormente nos modelos de pedra.

Foi preparada uma suspensão de β -caroteno comercial adicionando 20 mg de β -caroteno a 1 mL de água destilada e homogeneizando por pipetagem antes da aplicação numa pedra estéril. Utilizou-se também uma pedra-controlo, sem qualquer aplicação do pigmento. Aplicaram-se diferentes concentrações (100, 75, 50, 25 e 10%) da solução de limpeza na pedra-teste ($250 \mu\text{L}/\text{cm}^2$), para verificar a capacidade de remoção do caroteno e, na pedra-controlo, foram aplicadas as mesmas soluções, com o objetivo de avaliar possíveis alterações superficiais do material pétreo após a aplicação.

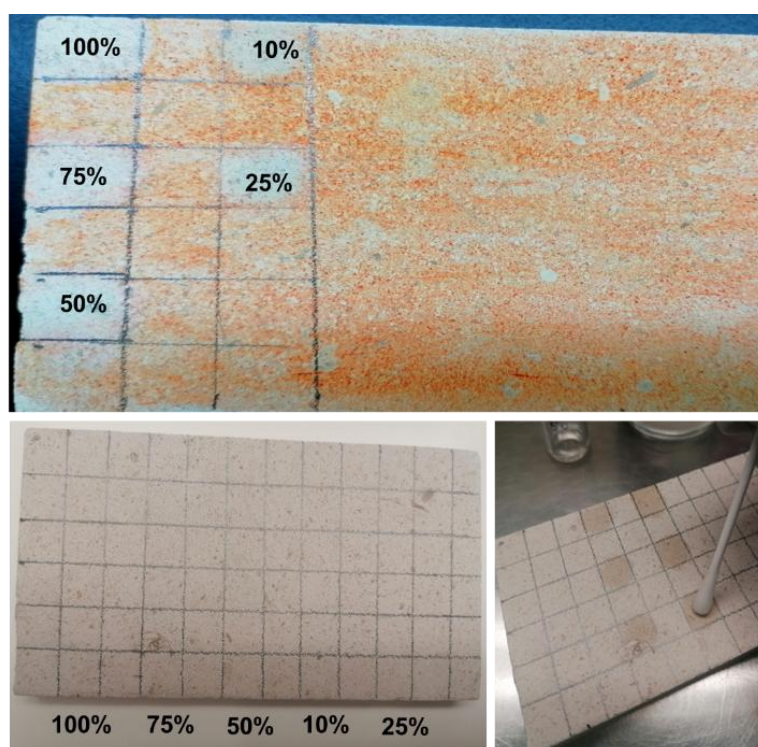


Figura 5.2: Esquematização do ensaio de otimização com beta caroteno

5.1.5.2. Ensaio de limpeza nos modelos de pedra

A mesma solução de limpeza utilizada no ensaio de otimização (em concentrações de 5, 10, 25 e 50%) foi aplicada nas pedras (500 $\mu\text{L}/2\text{ cm}^2$) onde se observam os biofilmes bacterianos pigmentados, para avaliar a capacidade de remoção dos carotenos produzidos pela bactéria.

A medição da eficácia da solução de limpeza na eliminação dos pigmentos foi realizada por colorimetria (como descrito na secção 5.1.3.) e pela medição da atividade de desidrogenases (como descrito na secção 5.1.7.2).

5.1.6. Avaliação da capacidade de inibição do crescimento bacteriano

5.1.6.1. *In-vitro*

Foram realizados testes laboratoriais para determinar o efeito de dois biocidas comerciais - Preventol® Ri 50 (Lanxess, Köln, Alemanha) e Biotin-T® (C.T.S., Madrid, Espanha) a 3% de concentração -, um biocida à base de óleos essenciais denominado Syra-Óleovictis® (ResMonuH, Portugal), composto por geraniol e limoneno, e a solução de limpeza a 25%, destinados a ser potencialmente utilizados para inibir o crescimento bacteriano do isolado CCLBMBatB3 (*Gordonia* sp.) utilizado nos testes de biocolonização.

Para testar a eficácia de cada antimicrobiano, utilizou-se o método de difusão em disco de ágar. Em primeiro lugar, a cultura líquida do isolado em meio HS foi incubada com agitação a 110 rpm, a 30°C, durante 7 dias, para o crescimento da bactéria. Os testes foram realizados incorporando 1×10^{10} UFC/mL, em placas de Petri (9 cm) contendo meio ágar Nutriente e os biocidas a serem testados foram aplicados em discos de papel estéreis de 20 mm (Macherey-Nagel 827 ATD), impregnados com 20 μL da substância antimicrobiana. As placas de Petri foram incubadas a 30°C e o crescimento foi monitorizado diariamente. A medição dos halos de inibição do crescimento microbiano, ao redor dos discos, foi considerada como medida de sensibilidade.

5.1.6.2. *In-situ*

O ensaio antimicrobiano *in-situ* foi realizado utilizando dois modelos replicados de pedra para cada composto a testar, ambos inoculados com o mesmo isolado bacteriano (CCLBMBatB3, *Gordonia* sp.), e tratados com os antimicrobianos descritos na secção anterior. Nos ensaios, foram também incluídos um controlo positivo e um controlo negativo.

Para cada composto, uma das pedras replicadas foi utilizada na quantificação de ATP (*adenosine triphosphate*) por bioluminescência, enquanto a outra foi utilizada na medição da atividade de desidrogenases, garantindo a avaliação independente de cada método. As pedras foram divididas em nove esquadrias, cada uma correspondendo a um tempo de amostragem específico, conforme ilustrado na Figura 5.3. Nas esquadrias destinadas ao teste dos biocidas (t1-t24), foram aplicados 100 µL do respetivo composto. A esquadria central foi mantida sem qualquer tratamento durante todo o tempo do ensaio, para monitorização da manutenção da cor dos pigmentos a longo prazo.

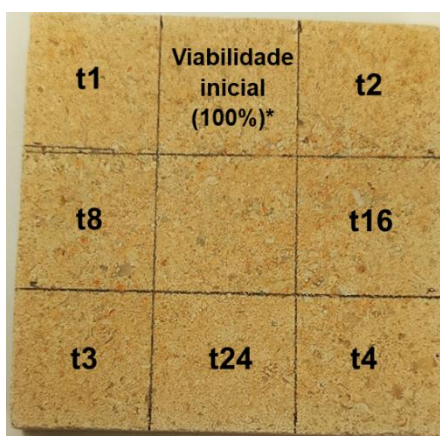


Figura 5.3: Esquematização dos testes de viabilidade celular e aplicação de antimicrobianos. (*) representa a primeira medição, correspondente a 100% de viabilidade, antes da aplicação dos compostos; t representa o tempo em semanas

A avaliação da eficácia dos compostos antimicrobianos e da solução de limpeza na inibição do crescimento bacteriano foi avaliada semanalmente, ao longo de 24 semanas (6 meses), através de ensaios de viabilidade celular – quantificação de ATP e atividade das enzimas desidrogenases, descritos de seguida. Esta avaliação foi complementada por técnicas colorimétricas, para avaliação da alteração de cor na pedra.

5.1.7. Ensaio de viabilidade celular

5.1.7.1. Quantificação de ATP

A avaliação da atividade metabólica por bioluminescência foi realizada através da utilização do LuciPac Pen, em conjunto com o luminómetro portátil Lumitester™ PD-30. Este sistema permite a deteção de ATP e AMP (*adenosine monophosphate*), moléculas indicadoras da presença e atividade microbiana.

Para a recolha das amostras, foram selecionadas as sete áreas em cada modelo de pedra e utilizaram-se as zaragatoas fornecidas no kit de deteção de ATP/AMP, garantindo uma amostragem padronizada. Cada zaragatoa foi aplicada e raspada sobre a superfície definida, de acordo com as instruções do fabricante, de forma a maximizar a recuperação de resíduos biológicos. Os resultados foram processados no dispositivo, e os valores de emissão luminosa foram registados como unidades relativas de luz, que se correlacionam diretamente com a quantidade de ATP/AMP presente. Foram feitas medições a cada 5 min até estabilização, perfazendo uma média de 10 medições em cada uma das pedras testadas.

5.1.7.2. Atividade de enzimas desidrogenases

O índice de viabilidade celular referente aos testes de biocolonização em pedra foi avaliado pelo brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio (MTT) adaptado para materiais de Património Cultural. O ensaio foi feito com recurso a zaragatoas, retirando o biofilme superficial das sete zonas coradas selecionadas e, posteriormente das zonas limpas pelo processo de limpeza, deixando incubar as zaragatoas durante 20 min em 250 µL de soro. Retiraram-se 90 µL de cada amostra, incubando com 300 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL) por 4 h, a 37°C no escuro. Terminado o período de incubação, as suspensões foram centrifugadas a 10 000 rpm por 15 min e os sobrenadantes foram removidos e descartados. De seguida foram adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO)/etanol (1:1) para promover a dissolução dos cristais de formazano formados. A absorvância foi determinada por espectrofotometria a 570 nm.

5.2. Resultados e Discussão

5.2.1. Determinação da capacidade de formação de biofilmes

A capacidade dos isolados para a formação de biofilmes foi determinada pelo método cristal-violeta, um corante catiónico de trianilina, permeável à membrana celular em células gram-positivas e negativas, que tem capacidade de se ligar às EPS e aos microrganismos que compõem a matriz do biofilme e corar todo o biofilme, tornando-o visível e quantificável. Atualmente, a coloração de biofilmes com este corante em poços de microplacas (Figura 5.4) é um dos métodos mais utilizados para quantificação do biofilme, avaliando os estágios iniciais da sua formação. No final, a intensidade da cor resultante é diretamente proporcional à biomassa do biofilme [383–385].



Figura 5.4: Formação de biofilmes em microplaca pelo isolado do género *Gordonia*

A capacidade de formação de biofilmes bacterianos pelos isolados foi determinada por espectrofotometria, pela leitura da absorvância a 595 nm. Os resultados desta medição apresentam-se na Figura 5.5.

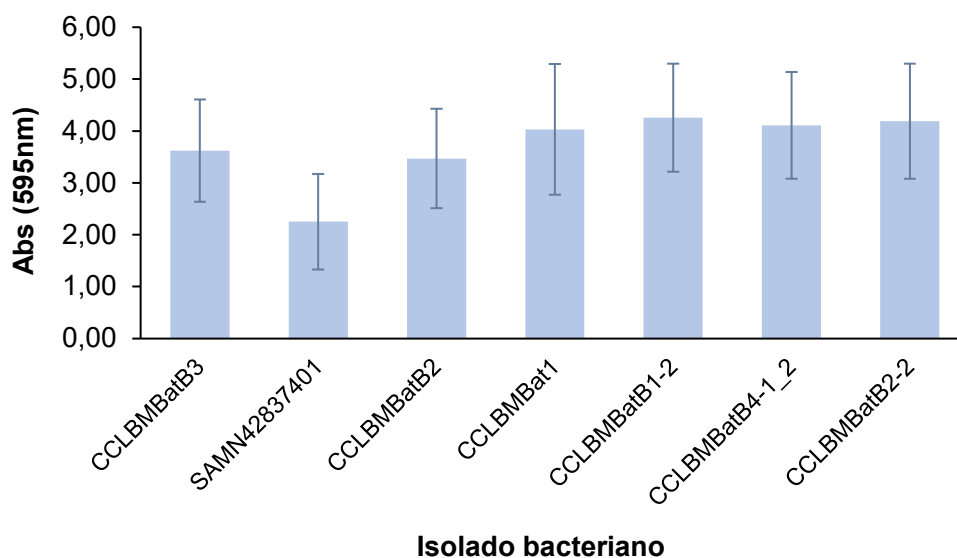


Figura 5.5: Determinação da capacidade de formação de biofilmes para cada isolado. Os valores apresentados são a média \pm desvio padrão de 16 réplicas

A análise das absorvâncias acima apresentadas, que refletem a capacidade de formação de biofilmes pelos diferentes isolados bacterianos, mostra que o isolado SAMN42837401 apresentou o valor mais baixo, indicando uma menor capacidade de formação de biofilmes em comparação com os restantes. Em contrapartida, os isolados CCLBMBat1, CCLBMBatB2, CCLBMBatB1-2, CCLBMBatB4-1_2, CCLBMBatB2-2 e CCLBMBatB3 exibiram valores de absorvância semelhantes, sugerindo desempenhos comparáveis na produção de biofilmes em condições laboratoriais estéreis e controladas.

Dado que o comportamento dos isolados foi idêntico, o isolado CCLBMBatB3, pertencente ao género *Gordonia*, foi selecionado para os ensaios seguintes. Esta escolha baseou-se na coloração rosa-alaranjada mais intensa apresentada por este isolado, característica que está frequentemente associada à produção de pigmentos carotenoides. Estes pigmentos estão muitas vezes relacionados com maior proteção celular e maior estabilidade metabólica, o que pode favorecer a formação e a estabilidade dos biofilmes, mesmo em ambiente controlado.

Importa ainda considerar que, embora os ensaios subsequentes tenham sido realizados sob condições laboratoriais estéreis, o uso de substratos naturais, como a pedra calcária, introduz fatores adicionais - como textura, porosidade e composição química - que podem influenciar a adesão bacteriana e o desenvolvimento dos biofilmes. Por esse motivo, a escolha do isolado CCLBMBatB3, que apresentava uma coloração mais intensa, estável e consistente, mostrou-se adequada para dar continuidade ao estudo.

5.2.2. Avaliação da produção de pigmentos bacterianos e a sua caracterização

Os ensaios de biocolonização foram realizados utilizando o isolado CCLBMBatB3, cujo género *Gordonia* sp. produz diferentes carotenóides. As pedras de calcário foram inoculadas e mantidas tanto no escuro quanto à luz solar, enquanto o controlo negativo permaneceu não inoculado. A formação dos biofilmes pigmentados, incluindo a ausência de pigmentação no controlo, é ilustrada na Figura 5.6 (a-c).

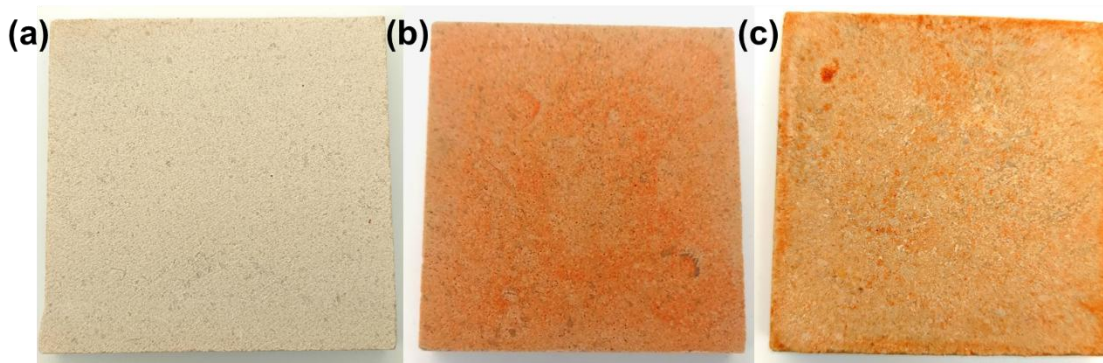


Figura 5.6: Produção de pigmentos no modelo de pedra: (a) controlo negativo não inoculado, (b) pedra inoculada mantida no escuro, e (c) pedra inoculada exposta à luz solar.

A formação de biofilmes pigmentados em ambas as pedras inoculadas com a bactéria em estudo foi claramente visível, apresentando variações na intensidade da coloração conforme as condições de iluminação. A pedra mantida à luz solar (Figura 5.6 (c)) parece exibir uma cor mais vibrante, luminosa e ligeiramente mais alaranjada, quando comparada aquela mantida no escuro (Figura 5.6 (b)), que apresenta pigmentação igualmente intensa, mas de tonalidade mais fechada. Pelo contrário, a pedra controle, não inoculada, manteve-se inalterada, sem qualquer pigmentação perceptível (Figura 5.6 (a)), evidenciando que a coloração observada nas pedras é resultado direto da atividade do biofilme.

Foram seguidas estas duas abordagens para melhor compreender, não só o fenómeno que ocorre no mosteiro, como também entender a influência que a luz solar pode ter no desenvolvimento dos biofilmes produzidos por este isolado. Está documentado em estudos anteriores que o crescimento de *Gordonia* sp. está associado à presença de luz e que, sob condições de iluminação, essa bactéria cresce de maneira mais eficaz e produz maior teor de carotenóides do que num ambiente menos iluminado [317].

Em bactérias não-fotossintéticas, como este género, os carotenóides não estão envolvidos na captação de luz para a fotossíntese, mas desempenham outras funções cruciais, tais como proteção contra o *stress* oxidativo, estabilização das membranas celulares e contribuição para a pigmentação das células, o que pode fornecer proteção contra danos causados pela radiação UV. Estes mecanismos explicam, em parte, a intensidade de pigmentação observada nos biofilmes e a sua capacidade de adaptação a diferentes ambientes [317,386].

5.2.2.1. Parâmetros colorimétricos dos biofilmes

Para avaliar as alterações de coloração entre as pedras com biofilmes coloridos e o controle, realizaram-se medições *in-situ* utilizando técnicas colorimétricas baseadas no sistema CIELAB. Este sistema, amplamente reconhecido por fornecer uma descrição quantitativa da cor, oferece um modelo tridimensional que reflete a percepção visual. Trata-se de um método particularmente útil para quantificar alterações de cor com precisão [387].

Para os dois modelos de pedra corados, foi feita a medição dos parâmetros colorimétricos, com a determinação de ΔE (Anexo A, Tabela A.1), e estes foram igualmente representados no espaço de cores CIELAB, na Figura 5.7.

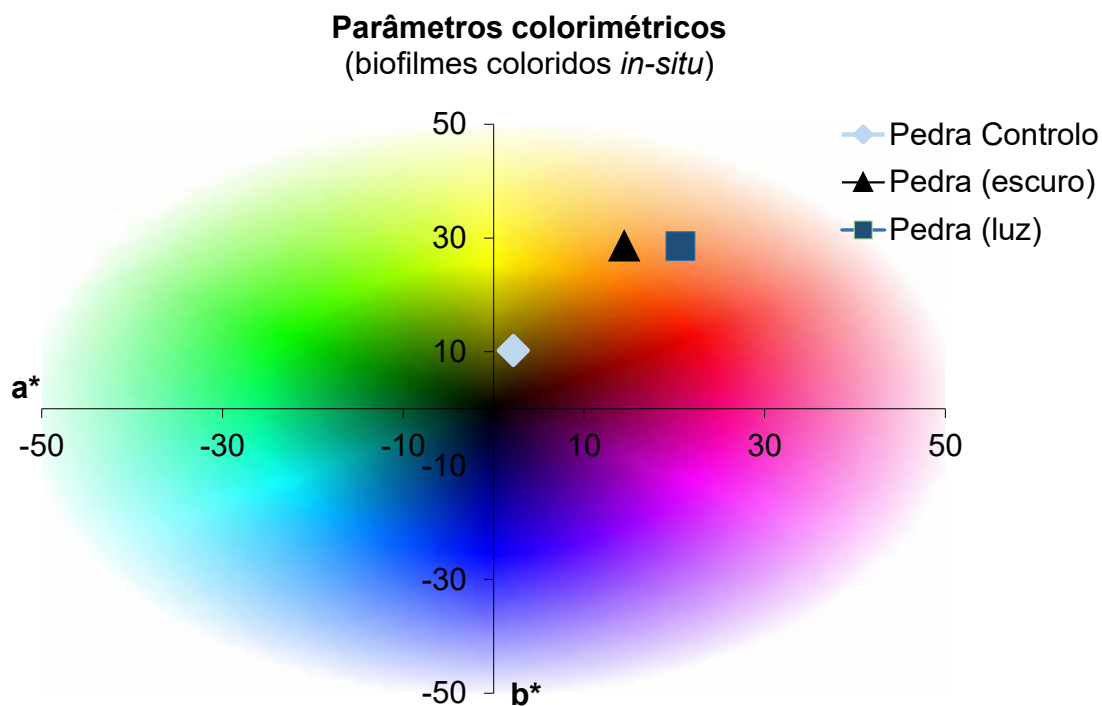


Figura 5.7: Espectro de cores CIELAB e representação dos parâmetros colorimétricos dos biofilmes corados

Os resultados mostrados na Figura 5.7 corroboram a alteração da cor original da pedra observada anteriormente, quer através da observação das coordenadas cartesianas, quer na medição de ΔE (Tabela A.1 do anexo A), calculado a partir da comparação entre os parâmetros CIELAB das duas pedras coradas comparativamente à pedra não inoculada.

Os elevados valores de ΔE (> 16 unidades) demonstram que a cor original das superfícies da pedra nas áreas pigmentadas, devido ao desenvolvimento de biofilmes, está bastante alterada [388]. Evidencia-se também uma diferença ligeira dos parâmetros colorimétricos e da coloração observada, entre a pedra exposta à luz solar e a pedra mantida no escuro durante o decorrer do ensaio. A primeira apresenta um ΔE superior (28,74) à segunda (23,95), razão pela qual se observa uma cor ligeiramente mais viva na pedra exposta à luz.

A cor ligeiramente mais intensa na pedra exposta à luz solar pode possivelmente ser justificada por estudos anteriores, que sugeriram que *Gordonia* sp. é produtora de carotenóides induzidos pela luz, baseado na produção seletiva de cor avermelhada que é mais intensa sob maior luminosidade e cujo crescimento aumenta nessas condições [317]. Fernandes *et al.* (2018) também destacou a importância do tempo de incubação

para o desenvolvimento dos pigmentos, demonstrando que culturas mais prolongadas, expostas à luz, alcançam maior concentração de carotenóides [389].

5.2.2.2. Detecção de pigmentos associados aos biofilmes bacterianos

Análises de espectroscopia Raman foram feitas para complementar os resultados anteriores. Por esta técnica é possível detetar carotenóides, compostos que podem ser produzidos através da atividade metabólica de alguns microrganismos. Como mencionado anteriormente, os carotenóides podem apresentar tonalidades amarelas a vermelhas, portanto a presença destes compostos provavelmente contribui para as manchas avermelhadas observadas na pedra.

A espectroscopia Raman foi aplicada *in-vitro*, para confirmar a produção de carotenóides pelo isolado CCLBMBatB3; e *in-situ*, de forma a caracterizar os pigmentos que foram produzidos nos biofilmes formados nas pedras.

Os resultados obtidos por esta técnica são ilustrados e descritos a seguir, nas Figura 5.8 para a análise *in-vitro* e nas Figuras 5.9 e 5.10 *in-situ*, para a pedra mantida no escuro e exposta à luz solar, respetivamente.



Figura 5.8: Espectro de Raman da cultura *in-vitro* do isolado *Gordonia*

Segundo a literatura, para carotenóides naturais, independente do grupo final, o espectro Raman é dominado por três bandas características em ≈ 1520 , ≈ 1160 e ≈ 1000 cm^{-1} [390].

O espectro de Raman do isolado *Gordonia* (Figura 5.8) permitiu a identificação das bandas 1009,8, 1157,2 e 1516,4 cm^{-1} , características de compostos carotenóides [391,392], pelo que a análise revelou que estes microrganismos possuem capacidade de promover alteração pigmentar em cultura.

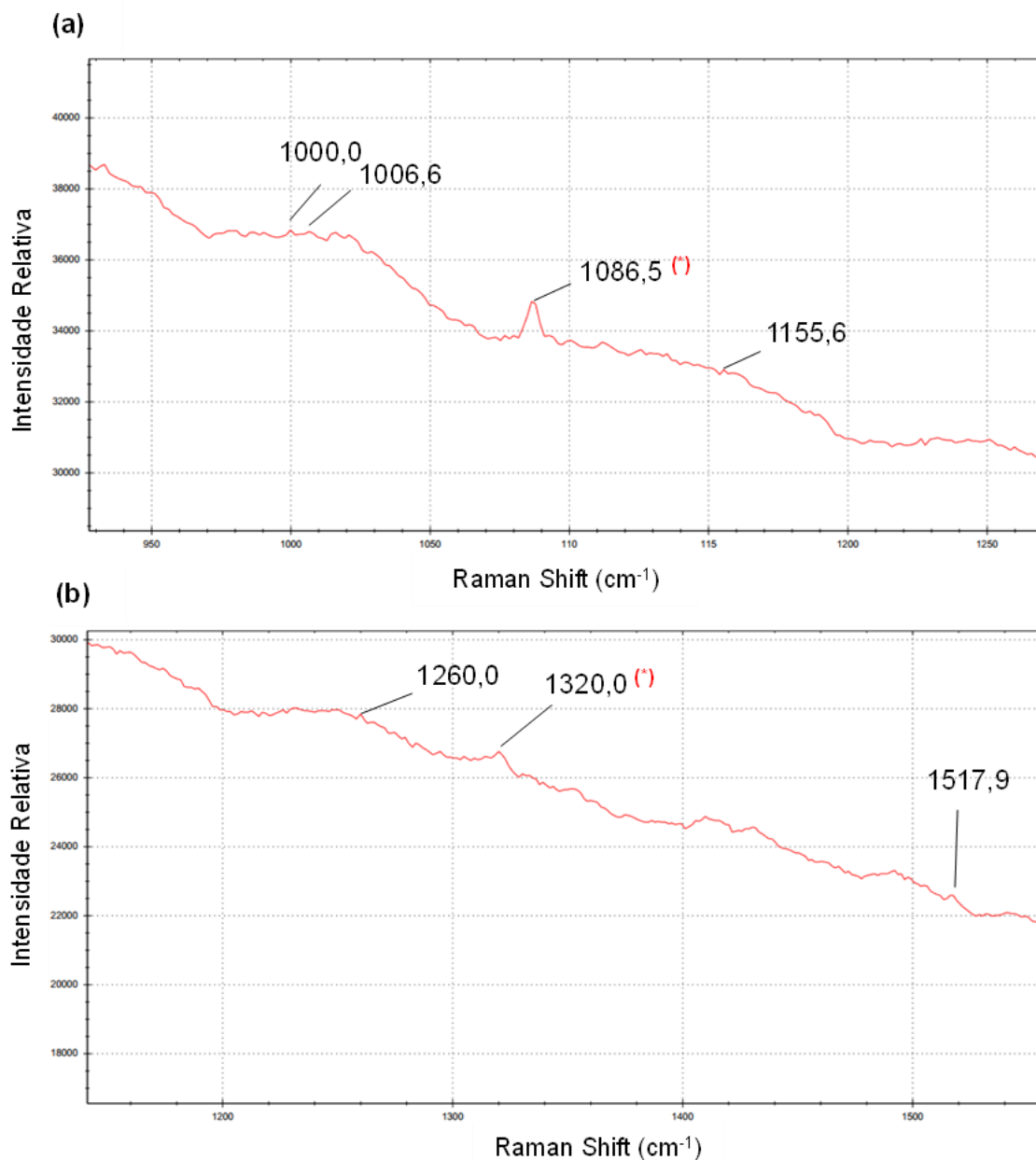


Figura 5.9: Espectros de Raman *in-situ* da pedra mantida no escuro, considerando as escalas (a) 930 – 1270 cm^{-1} e (b) 1160 – 1560 cm^{-1} . A conotação (*) representa picos atribuídos à calcite e consistentes com a presença deste mineral

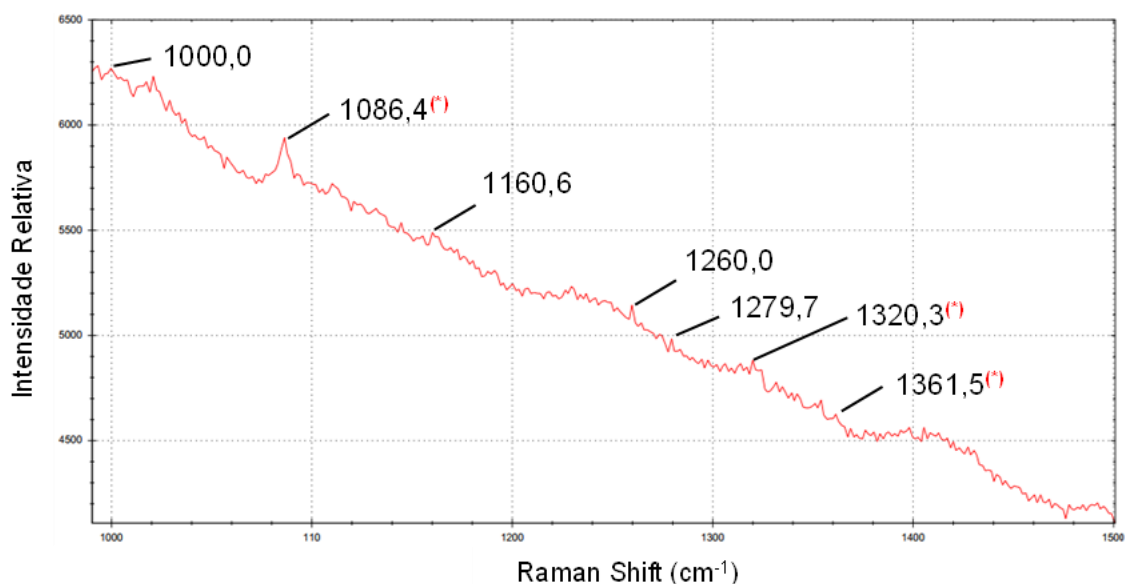


Figura 5.10: Espectro de Raman *in-situ* da pedra exposta à luz solar. A conotação (*) representa picos atribuídos à calcite e consistentes com a presença deste mineral

Na pedra de calcário mantida no escuro (Figura 5.9), pigmentada pelo isolado bacteriano, identificaram-se os picos 1000,0, 1006,6, 1155,6, 1260,0 e 1517,9 cm^{-1} igualmente característicos de compostos carotenóides. Por sua vez, na pedra exposta à luz solar (Figura 5.10) identificaram-se os picos 1000,0, 1160,6, 1260,0 e 1279,7 cm^{-1} também consistentes com a presença deste grupo de pigmentos.

De facto, *Gordonia* é um género descrito na literatura como produtor dos conhecidos pigmentos luteína, cantaxantina e astaxantina [33]. Os valores teóricos destes compostos foram identificados nos seguintes deslocamentos Raman: 966, 1009, 1159, 1195, 1277, 1448, 1520 cm^{-1} para astaxantina [393]; 1008, 1159 e 1525 cm^{-1} para luteína [394,395] e 1512, 1269, 1189, 1159 e 999 cm^{-1} para cantaxantina [396].

Estudos anteriores demonstraram que estes carotenóides apresentam espectros de Raman de ressonância semelhantes, tanto em termos de deslocamentos Raman quanto em intensidades relativas. Assim, a presença das bandas características deste grupo de compostos sugere a produção de pigmentos carotenóides por esta espécie bacteriana, tanto *in vitro* como *in situ*, o que poderá explicar a coloração observada nos modelos de pedra [394]. Adicionalmente, os picos em $\sim 1086,5$ e $1086,4 \text{ cm}^{-1}$ correspondem à vibração de estiramento do grupo carbonato (CO_3^{2-}), sendo característicos da calcite, o principal mineral constituinte do calcário [397–399]. As bandas observadas na região de $\sim 1361,5$ e $1320,0 \text{ cm}^{-1}$ podem também estar

associadas à presença deste mineral ou a contributos adicionais da matriz, devendo, no entanto, ser interpretadas com cautela por não constituírem bandas diagnósticas.

Deste modo, com base nos resultados anteriores, este isolado demonstrou capacidade de colonizar a pedra calcária, produzindo biofilmes e pigmentos visíveis. Relativamente ao ensaio de biocolonização, que é feito em condições de esterilidade, temperatura e fornecimento de nutrientes controlado, são a sua flexibilidade metabólica e a capacidade de produzir EPS, os fatores chave na colonização. Em condições controladas, fatores como a ausência de competição microbiana, a disponibilidade constante de nutrientes e as condições ótimas de temperatura podem favorecer o crescimento de *Gordonia* e a formação de biofilmes. A capacidade dos membros deste género de produção de EPS está bem documentada, e conseqüentemente, a facilidade em formar biofilmes e aderir às superfícies da pedra calcária, criando uma matriz protetora e estável [400]. Para além disso, a flexibilidade e características metabólicas únicas, que lhe permite a utilização de uma ampla gama de substratos como fontes de carbono e energia [401,402], e ainda a aptidão para a produção de pigmentos carotenóides [33,317], que possibilita uma maior proteção, estabilidade e integridade do biofilme.

Por outro lado, transpondo a situação do ensaio *in-situ*, para a colonização microbiana que acontece naturalmente no ambiente e no Património, no que diz respeito à formação de biofilmes por este género bacteriano, podem ser importantes os fatores de:

- adaptação a diferentes condições ambientais;
- capacidade notável de degradação de alcanos, hidrocarbonetos e seus derivados [401,402].

A capacidade de degradar alcanos permite que *Gordonia* utilize esses compostos como fontes de carbono e energia, promovendo o seu crescimento e metabolismo ativo. O calcário, composto principalmente por carbonato de cálcio (CaCO_3), não contém naturalmente alcanos na sua estrutura mineral. No entanto, em ambientes contaminados, pode absorver hidrocarbonetos, como alcanos, provenientes da poluição, disponibilizando-os como fonte de carbono para estas bactérias. Os membros do género *Gordonia* podem beneficiar de traços de matéria orgânica ou contaminantes presentes na superfície da pedra para se desenvolver, quando em contexto ambiental.

5.2.3. Otimização das condições de tratamento para remoção de pigmentos

Após caracterização do isolado bacteriano e dos pigmentos que produz *in-vitro* e *in-situ*, foi feito um ensaio de limpeza, na tentativa de remover os pigmentos produzidos pelo microrganismo. Para esse efeito, antes da aplicação da solução de limpeza nas pedras em estudo, realizou-se um ensaio de otimização com aplicação de caroteno comercial, para melhor prever a concentração ideal da solução de limpeza a aplicar no material pétreo, produzindo resultados para uma remoção eficiente.

O álcool isopropílico que a solução contém foi, em estudos anteriores, utilizado para a extração de carotenóides, podendo dissolvê-los de forma eficaz, embora essa eficácia possa variar em função dos carotenóides específicos e da presença de outros solventes na mistura [403,404]. O uso deste álcool diluído em água é justificado pela sua comprovada capacidade de solubilizar carotenóides, as substâncias lipofílicas associadas aos biofilmes e alterações de pedra que se verificam neste estudo. Essa propriedade, amplamente explorada em estudos de extração em alimentos e biotecnologia, pode possivelmente ser transferível ao contexto da limpeza patrimonial, desde que aplicada com o controlo e monitorização corretos.

A diferença de cores entre a pedra com caroteno corada e a pedra-controlo foi comparada visualmente através de uma escala de cores (KODAK), representado na Figura 5.11.

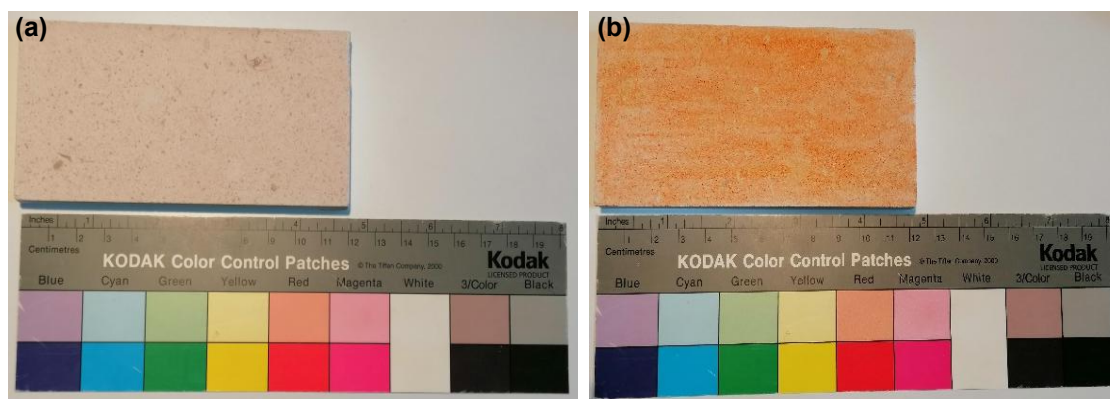


Figura 5.11: Medição em escala colorimétrica na (a) pedra-controlo e (b) pedra com caroteno a utilizar no ensaio

Foram feitos dois tipos de ensaio de otimização, cujos resultados se apresentam de seguida, de forma a avaliar tanto a eficácia na remoção dos carotenos, como a possibilidade de alteração superficial da pedra. Em ambos os ensaios se consideraram as concentrações de 100, 75, 50, 25 e 10% da solução de limpeza a aplicar.

- **Na pedra com caroteno**

Para testar se a solução de limpeza consegue eliminar o caroteno comercial nas zonas aplicadas, e para avaliar qual a concentração de solução mais eficiente para esse efeito, foram medidos os parâmetros colorimétricos através do sistema de cores CIELAB (Anexo A, Tabela A.2), bem como a Refletância (R) para as várias soluções de limpeza utilizadas no ensaio (Figura 5.12). A Refletância é medida em função do comprimento de onda da luz (λ).

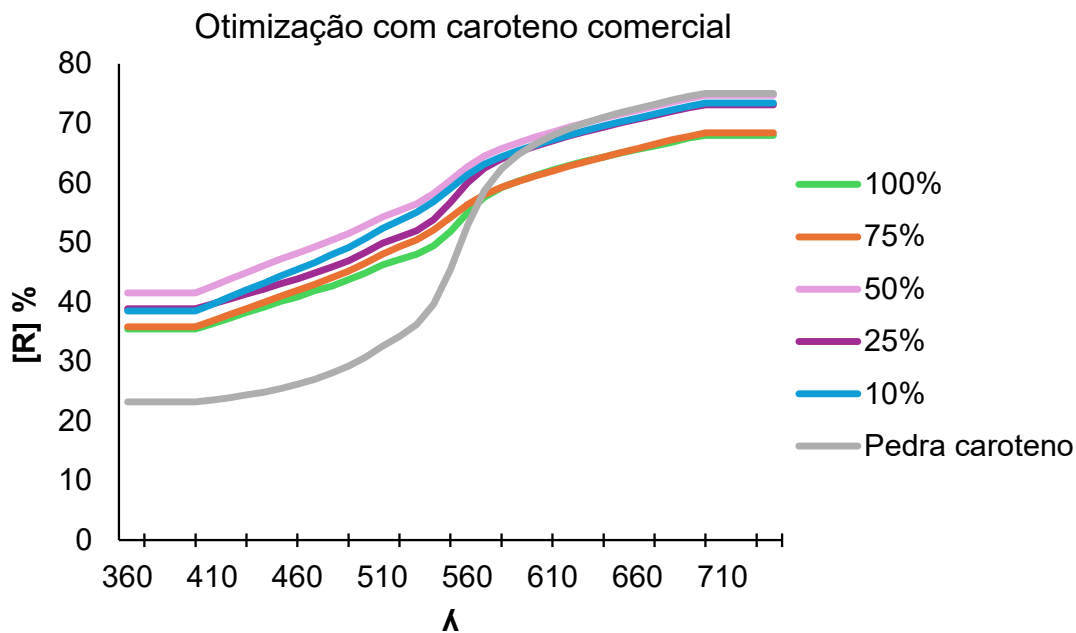


Figura 5.12: Medição da Refletância (%) para as várias concentrações de solução de limpeza no ensaio com beta caroteno

A Refletância da amostra (%R) corresponde ao *output* do colorímetro, sendo por definição a medida da capacidade de uma superfície de refletir a luz ou outras radiações eletromagnéticas. Especificamente, é a razão entre a intensidade da radiação refletida por uma superfície e a intensidade da radiação incidente sobre ela. A refletância é expressa como um valor entre 0 a 100% onde 0% significa que a superfície não reflete nada e 100% significa que a superfície reflete toda a radiação incidente.

A relação entre o aumento da refletância e a eficácia da remoção de biofilmes já foi documentada em estudos anteriores, demonstrando que as medições de refletância podem servir como um método eficaz para avaliar a limpeza de uma superfície após a remoção do biofilme microbiano, fornecendo uma avaliação quantitativa da eficácia desse processo. A medição deste parâmetro tem sido empregue para detetar mudanças de cor relacionadas ao biofilme e avaliar a extensão da colonização microbiana em diversos substratos [405–407]. As principais vantagens proporcionadas por esta técnica

são a natureza não destrutiva do procedimento, permitindo análises repetidas da mesma amostra, bem como a prontidão dos resultados [408].

Neste sentido, a pedra corada pelos pigmentos terá uma refletância característica, que será influenciada pela presença desses pigmentos. Geralmente, os biofilmes microbianos tendem a reduzir a refletância da superfície, tornando-a mais escura ou mais opaca. Se o processo de limpeza for eficaz, removerá os biofilmes, expondo a superfície original da pedra. A refletância da pedra limpa será então diferente (normalmente maior) porque a superfície original da pedra refletirá mais luz do que a superfície coberta pelos biofilmes. Assim, um aumento na refletância após a limpeza geralmente indica que a superfície da pedra foi eficazmente limpa, removendo a maior parte dos pigmentos.

Assim, a curva correspondente à “Pedra caroteno” (superfície corada com caroteno comercial) apresenta valores de refletância mais baixos nas regiões de menor comprimento de onda (360–520 nm), o que indica maior absorção da luz azul-verde, comportamento característico dos pigmentos carotenóides. A partir dos 560 nm, verifica-se um aumento gradual da refletância, que se aproxima dos valores observados nas amostras limpas. Este comportamento é consistente com o espectro típico do caroteno, que absorve predominantemente na zona azul-verde e reflete a luz na região do vermelho, originando a tonalidade alaranjada visível.

Por observação da Tabela A.2 do anexo A e da Figura 5.12, verifica-se que a solução com 50% de álcool isopropílico teve os parâmetros colorimétricos de ΔE e refletância mais elevados, por isso sugere-se que foi a concentração que gerou maiores diferenças e que foi mais eficiente na remoção dos carotenos. No entanto, as soluções de limpeza com concentrações de 25 e 10% foram igualmente eficazes, produzindo resultados muito semelhantes, pelo que deverão ser eficientes quando aplicadas em contexto patrimonial.

- **Na pedra não corada**

O objetivo primordial da aplicação do método de limpeza na pedra-controlo não corada foi verificar se a solução empregue poderia alterar a superfície do substrato. Embora não seja inerentemente prejudicial para os materiais patrimoniais, a aplicação de álcool isopropílico na mistura da limpeza requer uma consideração cuidadosa para evitar possíveis danos.

A utilização inadequada deste álcool, especialmente em concentrações elevadas ou em materiais sensíveis, pode causar danos, tais como alterações de cor, alterações na superfície ou enfraquecimento dos materiais.

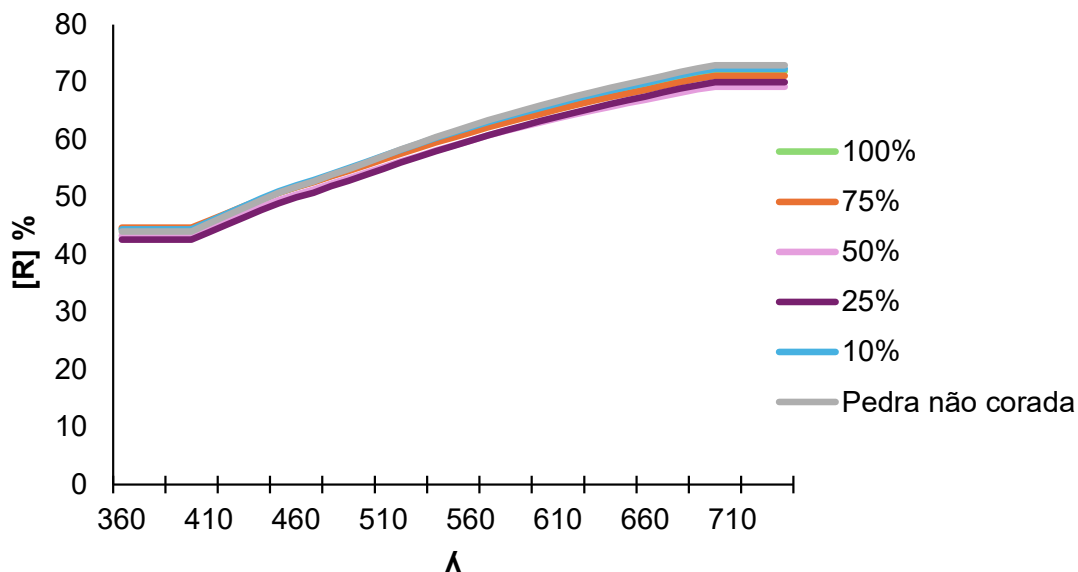


Figura 5.13: Medição de Refletância (%) para as várias concentrações de solução de limpeza no ensaio com a pedra não corada

A análise espectral da refletância (Figura 5.13) permite observar que as curvas correspondentes às diferentes concentrações da solução de limpeza (10–100%) praticamente se sobrepõem à da pedra não corada. Essa coincidência indica que não ocorreram alterações significativas no comportamento ótico da superfície após a aplicação das soluções, sugerindo que a interação entre o agente de limpeza e o substrato não provocou modificações mensuráveis na sua capacidade de refletir a luz ao longo do espectro visível.

Em complemento, os resultados colorimétricos (ΔE) apresentados no Anexo A, Tabela A.3 confirmam esta tendência, mostrando valores extremamente baixos para todas as concentrações testadas. Assim, tanto os dados de refletância como de colorimetria corroboram que as diferenças em relação à pedra original são mínimas e pouco significativas. Dessa forma, sugere-se que esta solução de limpeza é apropriada para ser utilizada neste tipo de material, uma vez que demonstra eficácia na remoção dos carotenos produzidos sem alterar as propriedades óticas ou a cor original da pedra.

5.2.4. Avaliação da eficácia da limpeza na remoção dos carotenos bacterianos produzidos

Para proceder à limpeza das duas pedras utilizadas (mantida no escuro e exposta à luz solar), utilizou-se a concentração de solução de limpeza ideal determinada anteriormente (50%), mas também concentrações de 25, 10 e 5%. A utilização destas concentrações foi ponderada por considerações práticas e de conservação em contextos patrimoniais. Em muitos casos, a aplicação de soluções de limpeza em elevadas concentrações pode ser restrita devido ao potencial risco de danificar materiais históricos mais sensíveis. Concentrações elevadas de agentes de limpeza podem, embora eficazes, alterar a estrutura química ou física dos materiais originais, comprometendo a sua integridade e valor histórico. Assim, é comum na área da conservação patrimonial procurar um equilíbrio entre a eficácia da limpeza e a preservação das propriedades originais do material em estudo, avaliando a mínima concentração necessária que ainda proporciona uma limpeza eficiente, garantindo que o material seja tratado com o maior cuidado possível.

Os resultados de alteração de cor observados na pedra encontram-se na Figura 5.14, e os parâmetros colorimétricos medidos na Tabela A.4 do Anexo A.

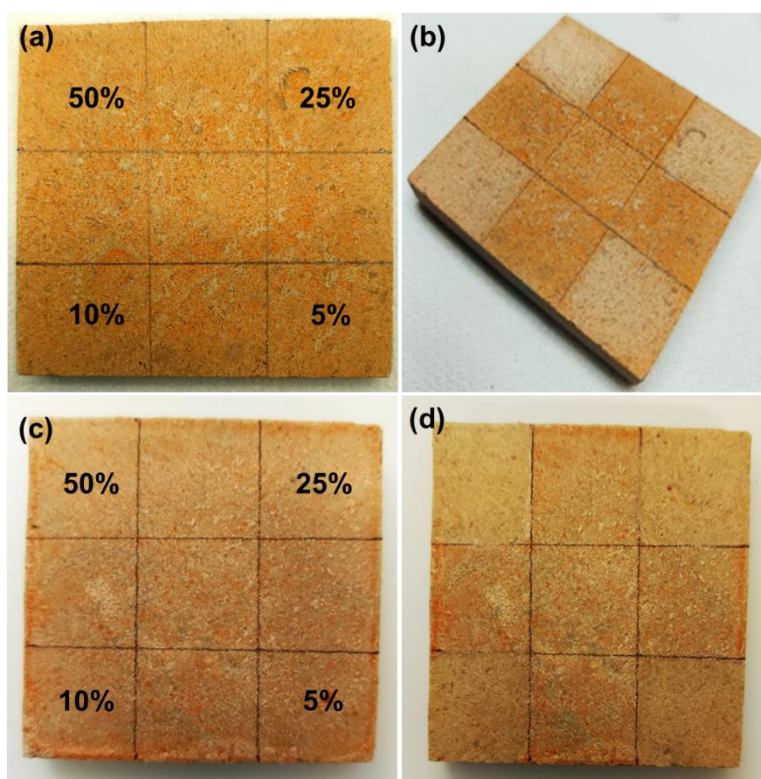


Figura 5.14: Efeito da limpeza nas pedras com os biofilmes pigmentados sujeitas a diferentes concentrações de tratamento: (a, b) pedra mantida no escuro, antes e depois da limpeza; (c, d) pedra exposta à luz solar, antes e depois da limpeza.

Para complementar a análise visual da Figura 5.14, foram quantificadas as alterações colorimétricas nas pedras após a limpeza (Anexo A, Tabela A.4), onde se confirma a eficácia dos tratamentos. Os valores de ΔE , que medem a diferença total de cor em relação à pedra original, são elevados para todas as concentrações e em ambas as condições (no escuro e sob exposição solar), indicando uma remoção significativa da coloração inicial.

Analisando os parâmetros individuais, observa-se consistentemente um aumento da luminosidade (L^*) e uma diminuição acentuada das coordenadas a^* e b^* . Isto traduz-se visualmente numa pedra mais clara e menos saturada, sendo uma forte evidência da remoção eficiente dos pigmentos associados à bactéria, como os carotenoides mencionados. Embora a concentração de 50% apresente os valores de ΔE ligeiramente mais altos ($16,37 \pm 0,44$ no escuro e $20,61 \pm 0,93$ ao sol), é notável a elevada eficácia das concentrações mais baixas. Particularmente sob exposição solar, as diferenças de ΔE entre 5%, 10%, 25% e 50% tornam-se mínimas (variando apenas entre 19,24 e 20,61). Este ponto é particularmente relevante para a aplicação prática em pedra nos monumentos, pois sugere que concentrações mais reduzidas (como 5% ou 10%) podem ser suficientes para alcançar uma limpeza visualmente muito semelhante à obtida com 50%, minimizando a quantidade de produto aplicado.

Nos espectros de refletância apresentados na Figura 5.15, observa-se o comportamento ótico das amostras de pedra tratadas com diferentes concentrações da solução de limpeza, em duas condições distintas: (a) pedra mantida no escuro e (b) pedra exposta à luz solar. Em ambos os casos, as curvas correspondentes às pedras com biofilme carotenóide apresentam valores de refletância mais baixos, o que é expectável, uma vez que a presença dos pigmentos reduz a quantidade de luz refletida pela superfície.

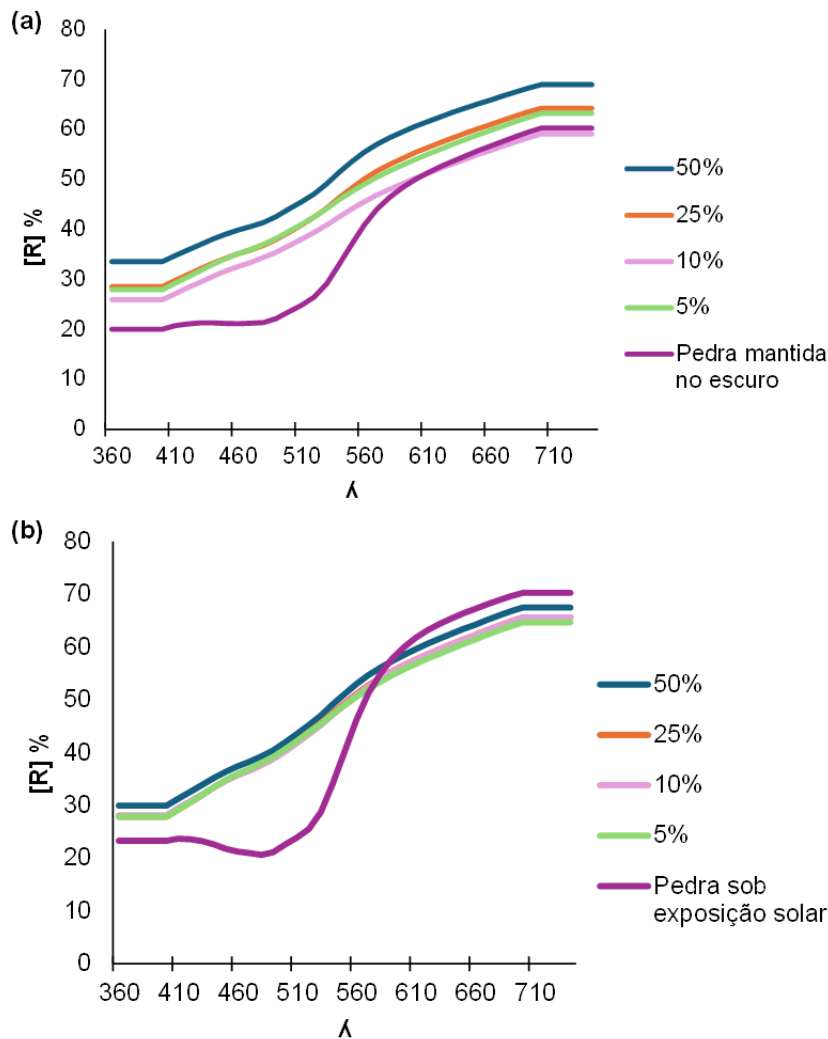


Figura 5.15: Medição da Refletância (%) na (a) pedra mantida no escuro e na (b) pedra mantida sob exposição solar, para as várias concentrações de solução de limpeza utilizadas

No primeiro caso (Figura 5.15 (a)) é possível observar que as curvas para cada concentração estão mais afastadas entre si, pelo que as diferenças entre elas estão bem evidenciadas. De forma geral, quanto maior a concentração da solução de limpeza, maior é a refletância da pedra em quase toda a gama de comprimentos de onda testada, indicando que as soluções mais concentradas promovem uma ligeira clarificação da superfície da pedra.

Por outro lado, na pedra exposta à luz solar (Figura 5.15 (b)), embora a tendência geral de aumento da refletância com o comprimento de onda se mantenha, as curvas correspondentes às diferentes concentrações estão muito mais próximas umas das outras, ou seja, as diferenças que eram bem visíveis anteriormente, foram reduzidas após a exposição ao sol. Este comportamento sugere que a exposição à luz tende a

reduzir as diferenças óticas, atuando como um fator de “uniformização” do aspecto superficial das amostras.

Comparando estes resultados com a análise dos parâmetros colorimétricos (Anexo A, Tabela A.4), os valores de ΔE são geralmente superiores na pedra exposta ao sol, e a diferença de eficácia entre as concentrações é visivelmente menor nesta condição, corroborando as observações feitas nos gráficos de refletância: os efeitos das distintas concentrações tornam-se mais semelhantes, tanto em termos de refletância como de variação colorimétrica.

5.2.4.1. Ensaio de viabilidade pós-limpeza dos pigmentos

Ao estudar comunidades microbianas presentes em materiais do Patrimônio Cultural, é essencial determinar se os microrganismos se encontram em estado viável e metabolicamente ativo. A simples presença de microrganismos não implica necessariamente atividade biológica; muitos podem estar em estado latente ou inativo, não representando, portanto, uma ameaça significativa para os substratos que colonizam.

A medição da atividade das enzimas desidrogenases, com o corante MTT, foi um método implementado em 1983 e é usado para medir a atividade metabólica celular como um indicador de viabilidade e proliferação. Este ensaio colorimétrico (Figura 5.16) é baseado na redução de um sal de tetrazólio amarelo pelo processo de respiração das células (através da atividade das desidrogenases) a cristais roxos de formazano, por células metabolicamente ativas [409].

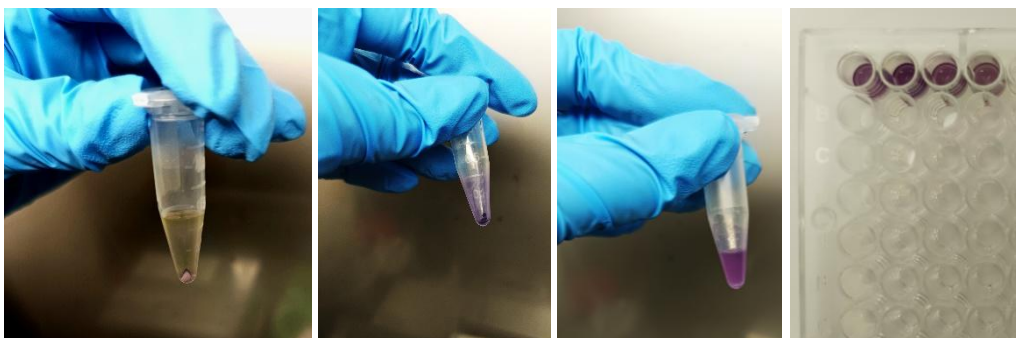


Figura 5.16: Ensaio de viabilidade celular: atividade de enzimas desidrogenases

Este ensaio teve como foco principal a monitorização das alterações estéticas e da produção de pigmentos bacterianos, sendo aplicado não para testar a eficácia inibitória da solução de limpeza, mas para acompanhar a viabilidade metabólica residual ao longo do tempo. O seu propósito é, portanto, caracterizar a dinâmica da população bacteriana sobrevivente e correlacionar essa atividade com as alterações de cor observadas. Estes resultados irão complementar os dados colorimétricos, permitindo compreender se as alterações de cor observadas correspondem a uma eliminação efetiva dos microrganismos ou apenas a uma redução temporária da sua atividade.

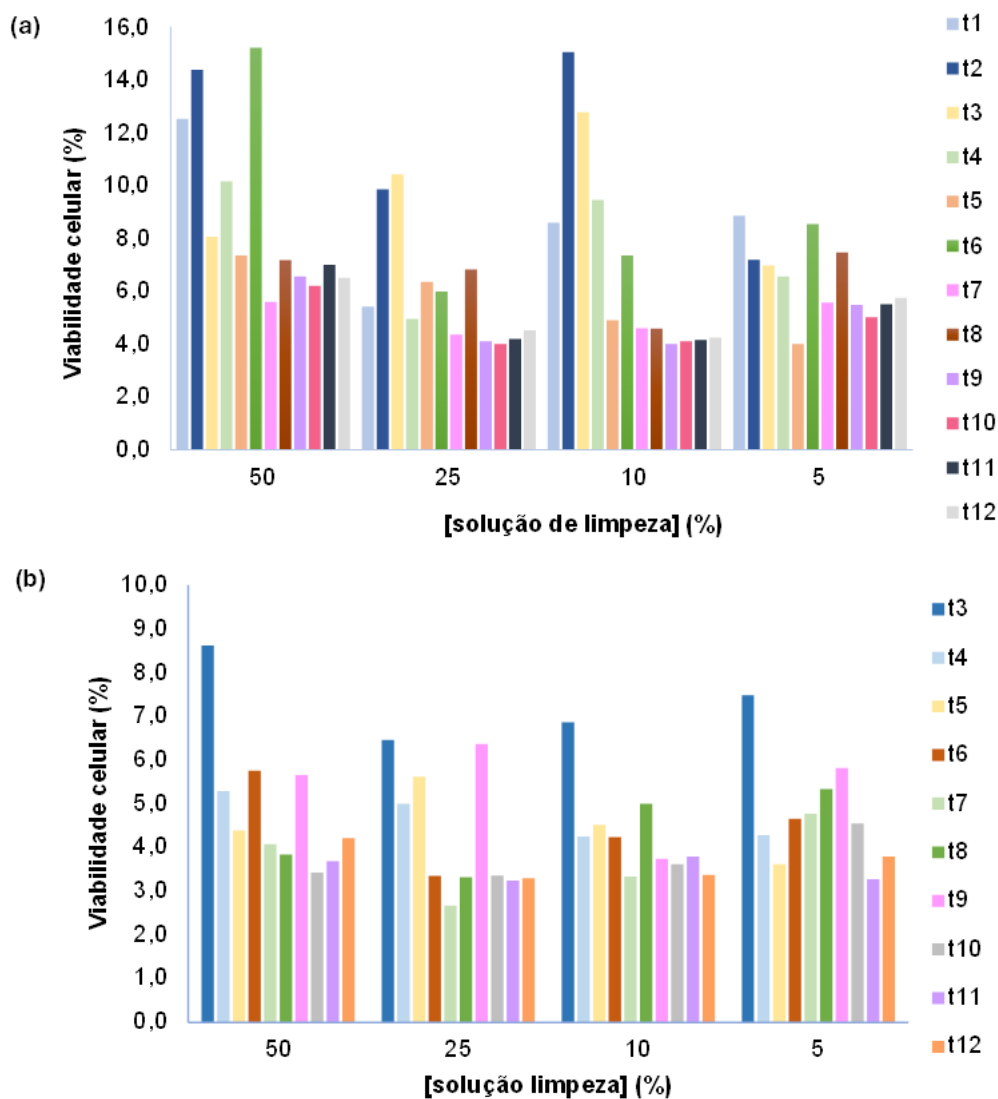


Figura 5.17: Viabilidade celular (%) da população bacteriana, monitorizado mensalmente durante 1 ano (t = meses), em função da concentração (%) da solução de limpeza aplicada na pedra sob exposição solar (a) e mantida no escuro (b).

Os resultados demonstram que, independentemente da concentração da solução utilizada, existe de facto uma população bacteriana metabolicamente ativa ao longo de todo o período de 12 meses. A resposta biológica é complexa e não linear, exibindo dinâmicas distintas que variam com a concentração e o tempo.

Quando correlacionamos os dados deste ensaio de viabilidade com as observações colorimétricas, é clara a dissociação entre a atividade metabólica e a sua capacidade de produzir pigmentos na superfície da pedra. É importante referir que, ao longo dos 12 meses, não houve reincidência de cor na pedra. O que significa que, a solução de limpeza é eficaz na remoção dos carotenos (avaliada visualmente e por colorimetria), mas dado continuar a haver atividade metabólica, sugere-se que a solução possa ter efeito na supressão da sua via metabólica responsável pela pigmentação e não na sua erradicação.

Os picos mais pronunciados de viabilidade, especialmente em t2 (para a concentração de 10%) e t6 (para os 50%) no caso da pedra exposta ao sol (Figura 5.17 (a)), e em t3 para todas as concentrações na pedra mantida no escuro (Figura 5.17 (b)), são particularmente interessantes, pois representam momentos de ressurgimento metabólico sem que isso se traduza numa manifestação visual. A bactéria sugere-se estar viva e ativa mas sem canalizar recursos para a produção dos pigmentos. Este ressurgimento de atividade acontece provavelmente porque, muito embora o processo de limpeza remova a maior parte do biofilme - por arrastamento de células no momento da limpeza - continua a existir bactéria residual, cujas células se continuaram a desenvolver após esse processo. A estrutura porosa do calcário pode fornecer microambientes protegidos onde as bactérias podem desenvolver-se, pois a porosidade permite frequentemente a retenção de humidade e nutrientes na pedra, facilitando a sobrevivência na sua matriz.

Por outro lado, ocorre uma estabilização da viabilidade em níveis mais baixos, mas constantes, na fase final do estudo (cerca de t7 na pedra exposta ao sol e t10 no caso da pedra mantida no escuro) para todas as concentrações, o que indica o estabelecimento de uma comunidade bacteriana que permanece num estado de baixa atividade, adaptada às condições de stress impostas pela solução de limpeza.

Assim, a explicação mais plausível para este fenómeno é que a solução de álcool isopropílico atua como um fator de *stress* que não é suficientemente forte para ter efeito biocida, mas eficaz o suficiente para impedir a reincidência de coloração.

Outro fator crucial a considerar na interpretação destes resultados é o facto destes ensaios terem decorrido em laboratório, sob condições controladas e estéreis. Isto

significa que fatores externos, como chuva, vento, radiação UV ou a presença de outros microrganismos, não existiram. Por isso, a evolução da atividade bacteriana que se observa reflete unicamente a resposta da bactéria à solução de limpeza. Num ambiente real, estes fatores externos poderiam alterar os resultados: por exemplo, a chuva poderia trazer nutrientes que ajudariam a bactéria a recuperar, ou a competição com outros microrganismos poderia dificultá-lo. Neste contexto, estes resultados são um ponto de partida importante para entender a interação entre a solução e a bactéria, e entre a bactéria e o substrato de pedra, mas a situação num monumento edificado seria seguramente mais complexa.

Resumindo, o objetivo estético de eliminação de pigmentos é atingido com esta solução de limpeza, pelo que pode ser considerada eficaz, mesmo que as bactérias ainda sobrevivam em pequenas quantidades.






5.2.5. Avaliação da inibição do crescimento bacteriano

5.2.5.1. *In-vitro*

A eficácia antimicrobiana dos biocidas comerciais Biotin-T[®], Preventol[®] Ri 50, Syra-Óleovictis[®] (à base de óleos essenciais), e da solução de limpeza descrita anteriormente, foi avaliada *in-vitro* contra o isolado bacteriano CCLBMBatB3 do género *Gordonia*. Este teste foi realizado com o objetivo de determinar o potencial dos biocidas em inibir o crescimento microbiano, proporcionando dados relevantes para a escolha de agentes de controlo eficazes no que diz respeito à conservação e preservação do património.

Os resultados da avaliação antimicrobiana apresentados em baixo incluem imagens representativas dos testes de difusão em disco e os valores médios das medições dos halos de inibição (mm) para cada biocida testado (Tabela 5.1). Estes dados permitem a comparação direta entre antimicrobianos e uma visão clara sobre o comportamento e efetividade de cada um para a bactéria em estudo.

Tabela 5.1: Efeito dos compostos comerciais (mm) contra o isolado bacteriano CCLBMBatB3

Controlo	Preventol®	Biotin-T®	Syra-Óleovictis®	Sol. Limpeza
	 42,0 ± 1,1	 39,2 ± 2,1	 21,5 ± 3,4	 Sem inibição

Os ensaios de eficácia biocida *in-vitro* revelaram que o Preventol® apresentou um efeito antimicrobiano ligeiramente superior ($42,0 \pm 1,1$ mm) em comparação com o Biotin-T® ($39,2 \pm 2,1$ mm). Embora ambos os compostos tenham demonstrado um impacto significativo na inibição do crescimento bacteriano, a diferença observada sugere que o Preventol pode possuir um mecanismo inibitório mais eficaz contra *Gordonia* sp. nas condições testadas. A menor eficácia do Biotin-T®, ainda que pouco significativa, pode estar relacionada com diferenças no seu modo de ação, estabilidade da formulação ou interações com os componentes celulares da bactéria.

Adicionalmente, avaliou-se um biocida à base de OEs (Syra-Óleovictis®), que demonstrou uma atividade antimicrobiana mais modesta, cujas medições dos halos de inibição foram $21,5 \pm 3,4$ mm. Esta eficácia consideravelmente inferior, quando comparada com os biocidas mencionados anteriormente, pode dever-se a vários fatores, como uma menor concentração dos compostos ativos na formulação do óleo essencial, uma maior volatilidade que reduz o seu tempo de contacto, ou mesmo uma menor afinidade ou capacidade de penetração nas células do isolado. Relativamente à consistência, os valores de desvio padrão indicam que o efeito do Preventol® foi o mais homogéneo entre réplicas, enquanto o Biotin-T® e, especialmente, o biocida de OEs apresentaram uma maior variabilidade nos seus resultados.

Pelo contrário, a solução de limpeza composta por álcool isopropílico e água não apresentou halos de inibição, o que sugere que não inibe o crescimento bacteriano nestas condições. Demonstrou-se pelos resultados anteriores que esta solução é eficaz na remoção dos carotenos dos biofilmes de *Gordonia* sp. em calcário. No entanto, embora esta abordagem possa ser útil para atenuar a pigmentação das superfícies colonizadas, a sua incapacidade para impedir o crescimento da bactéria indica que pode não ser suficiente para estratégias de conservação a longo prazo. Quando o objetivo não é apenas reduzir a coloração, mas também inibir a proliferação bacteriana e evitar a recolonização, a solução de limpeza deve idealmente ser complementada com

agentes antimicrobianos que inibam eficazmente o crescimento, como o Preventol® e o Biotin-T®.

Para avaliar a eficácia destes biocidas em condições que se aproximem das que se verificam no mosteiro, foram realizados ensaios *in-situ* testando o seu desempenho em pedra de calcário previamente inoculadas com o mesmo isolado. Essa fase do estudo possibilitou compreender melhor a eficácia a longo prazo destes compostos e a sua aplicabilidade em cenários que se assemelhem à realidade.

5.2.5.2. *In-situ*

5.2.5.2.1. Avaliação dos parâmetros colorimétricos

- **Antes da aplicação dos antimicrobianos**

Para comparar a coloração das pedras onde os biofilmes pigmentados se desenvolveram, com as pedras controlo positivo e negativo, foram realizadas análises *in-situ* utilizando técnicas colorimétricas. A Figura 5.18 ilustra as pedras de calcário utilizadas nos ensaios, inoculadas com o isolado bacteriano CCLBMBatB3 (*Gordonia* sp.).

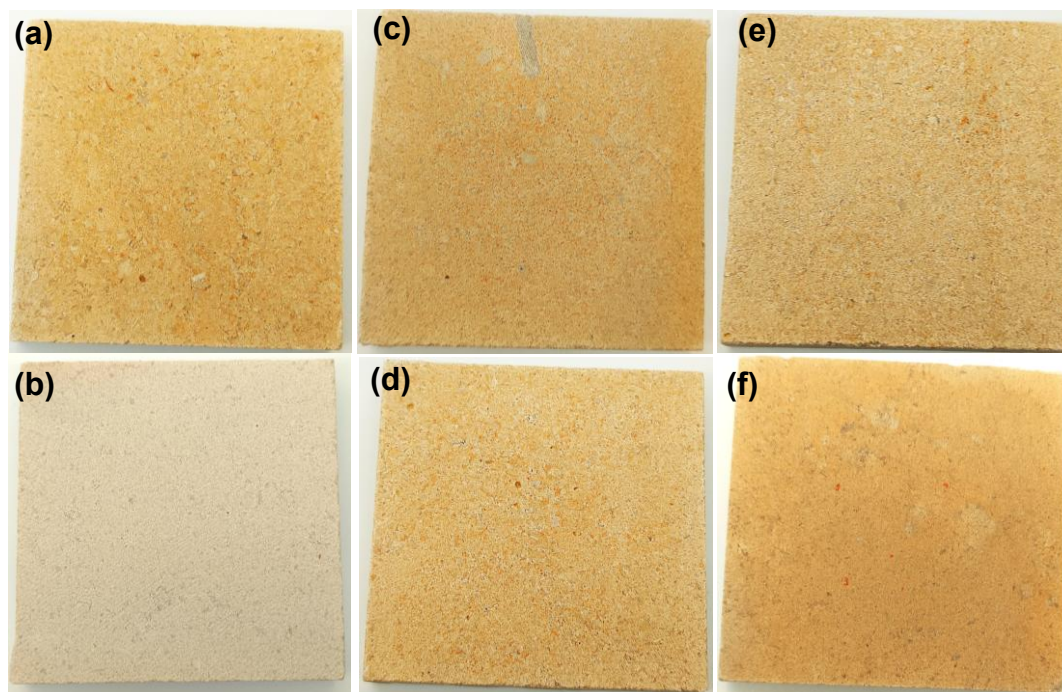


Figura 5.18: Amostras de pedra calcária inoculadas com o isolado bacteriano CCLBMBatB3. (a) e (b) representam as pedras de controlo positivo e negativo, respetivamente; (c-f) representam as pedras destinadas à aplicação dos antimicrobianos Preventol, Biotin-T, Solução de limpeza e biocida Syra-Óleovictis, respetivamente.

Os parâmetros colorimétricos das amostras de pedra destinadas à aplicação dos antimicrobianos foram avaliados pelo sistema CIELAB, permitindo a determinação da variação de cor (ΔE) (Anexo A, Tabela A.5) e visualizados no espaço de cor CIELAB da Figura 5.19.

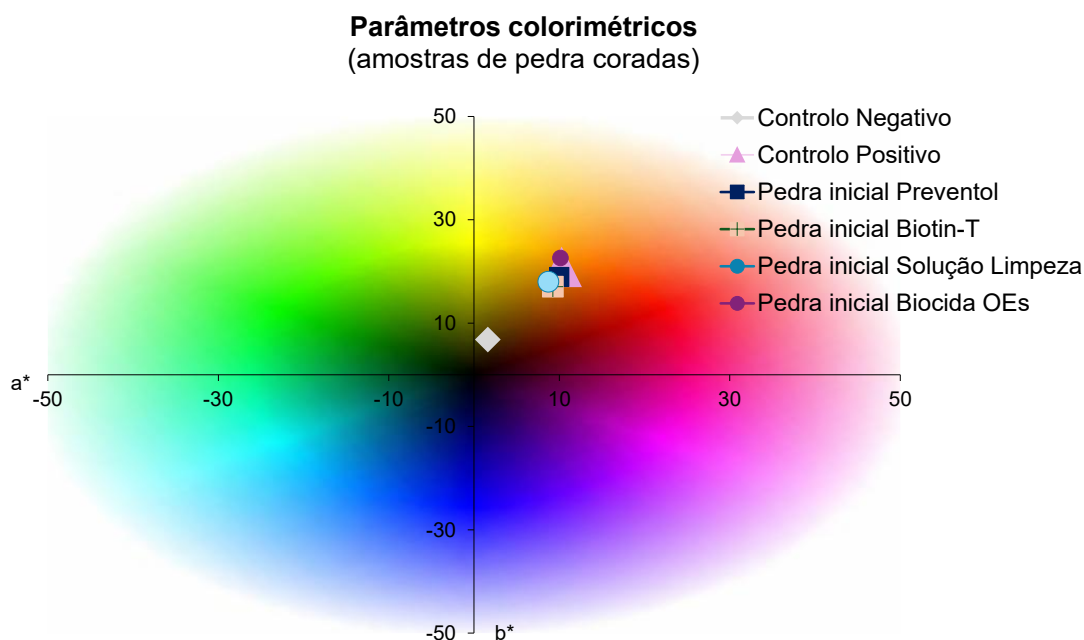


Figura 5.19: Espectro de cores CIELAB e representação comparativa entre as pedras coradas e as pedras-controlo

A análise dos parâmetros colorimétricos das pedras com biofilmes e dos controlos revela diferenças claras. A pedra de controlo negativo, representativa de uma superfície limpa e não pigmentada, apresenta um valor elevado de L^* ($87,55 \pm 0,23$), indicando uma aparência mais clara. Por outro lado, o controlo positivo mostra uma redução acentuada em L^* ($72,56 \pm 0,34$) e aumentos em a^* ($10,29 \pm 0,60$) e b^* ($20,76 \pm 0,59$). Estas alterações refletem uma superfície mais escura e pigmentada, com contribuições de tons laranja-avermelhados associados à pigmentação do biofilme.

Entre as pedras com biofilmes, as variações nos parâmetros CIELAB destacam ainda mais os impactos diferenciais da colonização. A maioria das amostras apresenta uma redução na luminosidade em comparação com o controlo negativo, com alterações em a^* e b^* que estão em conformidade com as tendências de pigmentação observadas no controlo positivo. Por exemplo, a pedra destinada ao Preventol® apresentou $L^* = 72,34 \pm 0,42$, $a^* = 10,00 \pm 0,76$ e $b^* = 18,96 \pm 0,53$, praticamente sobreponíveis aos do controlo positivo. As restantes pedras (Biotin-T®, Sol. de limpeza e Syra-Óleovictis®)

mostraram pequenas variações cromáticas, mas mantiveram-se dentro da mesma gama de valores.

Os valores de ΔE calculados, que representam a diferença total de cor em relação ao controlo negativo, reforçam estas tendências. O controlo positivo apresenta o valor de ΔE correspondente a $22,26 \pm 0,63$, e todas as outras pedras têm valores semelhantes a esse controlo, confirmando que se encontravam num estado comparável de pigmentação inicial, garantindo a sua adequação para os ensaios subsequentes.

- **Após aplicação dos antimicrobianos**

A caracterização colorimétrica das amostras de pedra após a aplicação dos antimicrobianos permitiu avaliar a sua eficácia na remoção da contaminação biológica, bem como o seu impacto na cor da superfície. A Figura 5.20 apresenta uma representação visual das amostras de pedra após a aplicação dos diferentes tratamentos, permitindo identificar alterações na tonalidade, textura e aparência geral da superfície.

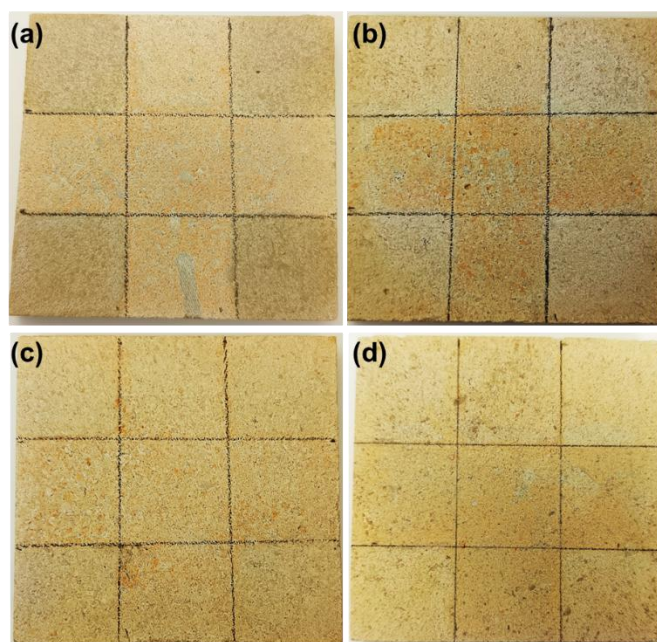


Figura 5.20: Amostras de pedra após aplicação dos biocidas (a) Preventol, (b) Biotin-T, (c) Solução de limpeza e (d) Biocida Syra-Óleovictis

Os parâmetros colorimétricos das amostras de pedra foram avaliados pelo sistema CIELAB, permitindo a determinação da variação de cor (ΔE) (Anexo A, Tabela A.6) e os resultados visualizados no espaço de cor CIELAB na Figura 5.21.

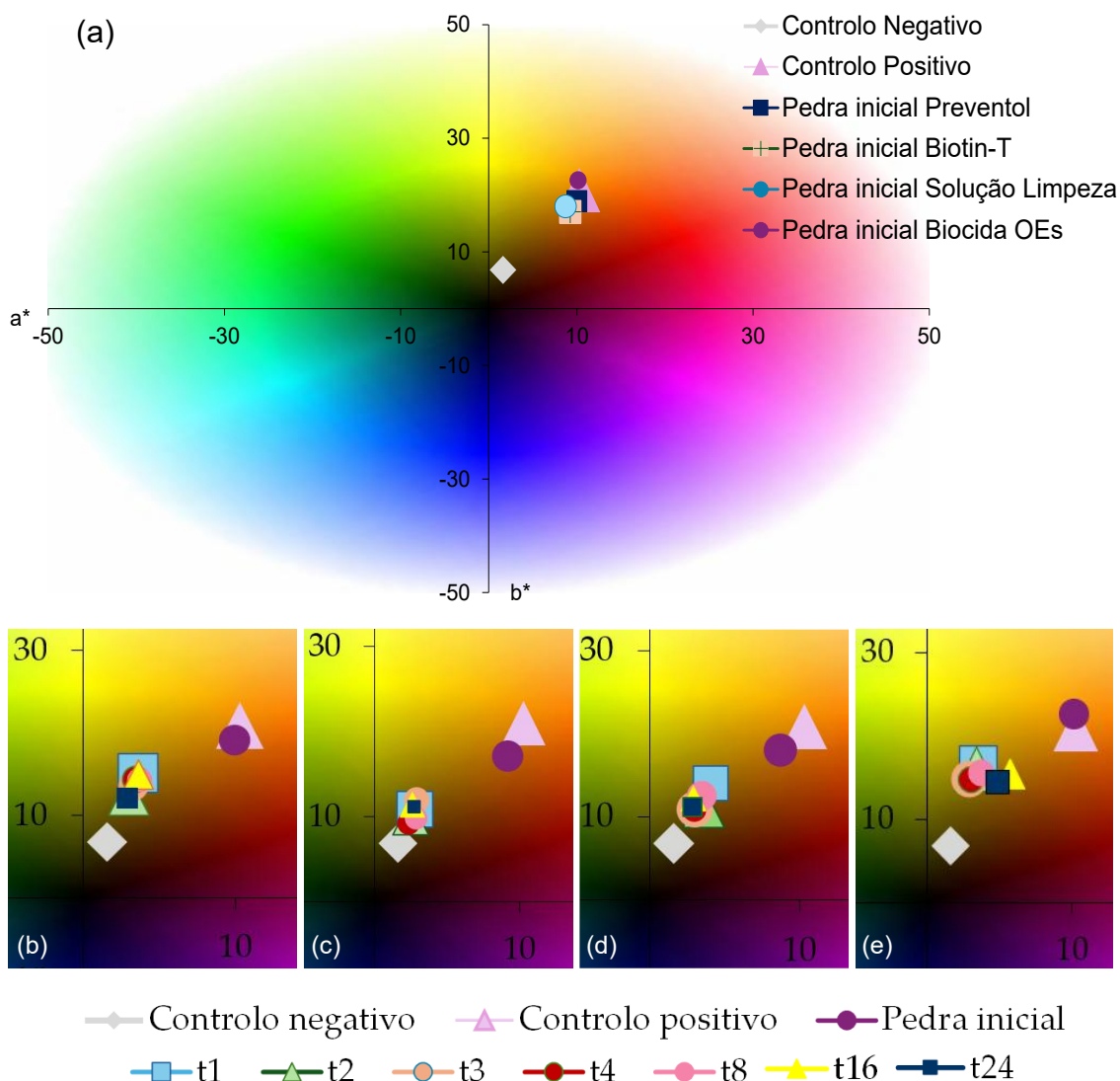


Figura 5.21: Espectro de cores CIELAB que representa o efeito dos tratamentos antimicrobianos na coloração da pedra: (a) valores iniciais para as pedras-controlo e pedras tratadas. As restantes figuras mostram as alterações de cor ao longo do tempo com cada biocida (b) Preventol; (c) Biotin-T; (d) Solução de Limpeza e (e) Biocida OES, Syra-Óleovictis.

Os resultados obtidos indicam que o biocida Biotin-T[®] promoveu a remoção mais eficiente da contaminação biológica, resultando em valores cromáticos mais próximos do controlo negativo (Figura 5.21 (c)). A análise do parâmetro L^* , associado à luminosidade, demonstra que a pedra tratada com esse biocida manteve um nível elevado de claridade, aproximando-se dos valores da pedra não inoculada. Adicionalmente, os valores de a^* e b^* , que refletem as componentes vermelho-verde e amarelo-azul, respetivamente, indicam que este biocida induziu menores variações de cor, comparativamente aos restantes tratamentos. Ou seja, após tratamento com este biocida, não só a cor se assemelha à original como também não existem variações de cor significativas ao longo das semanas.

Por outro lado, as pedras tratadas com o Preventol® (Figura 5.21 (b)) e com a solução de limpeza (Figura 5.21 (d)) apresentaram um comportamento intermédio, tendo parâmetros colorimétricos ligeiramente mais afastados em relação ao controlo negativo, e não tão próximo como o Biotin-T®, mas suficientemente perto para que seja considerado um bom resultado.

Os resultados relativos ao biocida Syra-Óleovictis® (Figura 5.21 (e)) revelam um desvio cromático muito maior comparativamente aos outros compostos utilizados, pelo que parece ser o que produz alterações cromáticas menos favoráveis. Enquanto os restantes tratamentos convergiram gradualmente para os valores do controlo negativo, o biocida de OEs manteve uma coloração distinta e afastada da pedra não inoculada. Os biocidas desta tipologia, embora não atuem na estrutura da pedra mineral em si, tendem a romper a estrutura dos biofilmes microbianos e facilitar a remoção física subsequente dos resíduos. No entanto, ao terem propriedades lipofílicas (oleosas), podem penetrar ligeiramente nas pedras porosas, como o calcário, e causar escurecimento temporário, mudança de brilho ou de tonalidade [410]. Pelo contrário, o Biotin-T®, sendo um biocida comercial de base aquosa, não tem um comportamento lipofílico pronunciado, e faz com que a sua ação seja maioritariamente superficial, causando menos impacto visual.

A análise da diferença de cor total (ΔE) reforça esta tendência, evidenciando que a pedra tratada com Biotin-T® apresentou os menores desvios cromáticos ao longo do tempo. Esta tendência foi observada de forma consistente ao longo das semanas, indicando que o Biotin-T® pode ser a opção mais adequada para combater este tipo de contaminação, onde a manutenção da estética original é um critério essencial.

Desta forma, os resultados obtidos destacam a importância da escolha criteriosa dos agentes biocidas, não apenas com base na sua capacidade de remoção da colonização biológica, mas também considerando o seu impacto na integridade visual dos materiais tratados.

5.2.5.2.2. Avaliação da viabilidade celular em biofilmes sobre pedra após tratamentos antimicrobianos

Ao estudar a colonização microbiana de materiais em pedra, e tendo em conta a realização de ensaios com antimicrobianos, é essencial avaliar se as células permanecem viáveis e metabolicamente ativas após o tratamento com esses compostos. A capacidade de os microrganismos sobreviverem e manterem a atividade metabólica pode influenciar a eficácia a longo prazo dos tratamentos biocidas pelo que, avaliar a viabilidade microbiana é crucial para determinar a persistência dos biofilmes e a potencial recolonização.

- **Quantificação da atividade metabólica por medição de ATP**

A atividade metabólica, medida por bioluminescência, foi avaliada ao longo do tempo após a aplicação de diferentes biocidas. Para permitir a comparação direta dos efeitos ao longo do tempo, os resultados foram normalizados em relação à atividade metabólica inicial (100%), sendo expressos como percentagem de viabilidade celular (Figura 5.22).

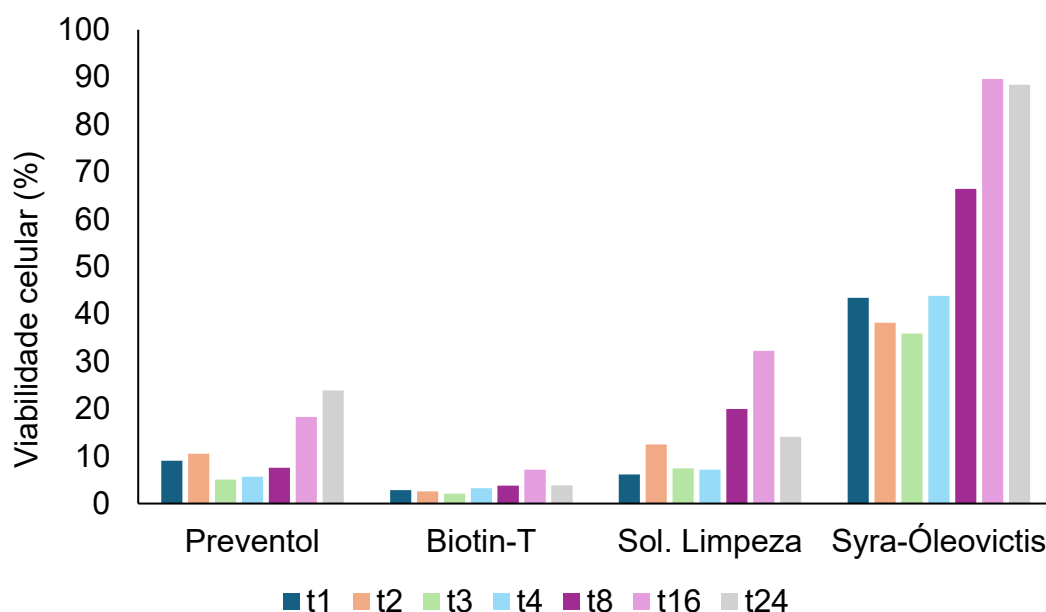


Figura 5.22: Viabilidade celular (%) ao longo do tempo, após aplicação de biocidas, por quantificação de ATP; *t* representa o tempo em semanas

A aplicação dos diferentes antimicrobianos provocou uma redução imediata e pronunciada da viabilidade celular nas superfícies tratadas, evidenciando um forte efeito biocida logo no início do ensaio (t1). Entre os compostos testados, o Preventol® reduziu a atividade metabólica para cerca de 9,0%, o Biotin-T® para aproximadamente 2,8%, a

solução de limpeza para 6,1% e o biocida Syra-Óleovictis® para 43,4%, valor que, apesar de representar uma diminuição significativa, foi o mais elevado nesta fase inicial.

Nos períodos seguintes, verificou-se um comportamento divergente entre os tratamentos. Em alguns casos, como no Preventol® e na solução de limpeza, houve um ligeiro aumento da viabilidade, atingindo cerca de 10,5% e 12,4%, respetivamente, enquanto o Biotin-T® manteve valores residuais (2,6%), reforçando a sua ação inibitória prolongada. O biocida à base de OEs apresentou um pequeno decréscimo para 38,1%, sugerindo uma resposta mais lenta da comunidade microbiana ao composto.

Com o avançar do tempo, as oscilações entre tratamentos tornaram-se mais evidentes. Na terceira semana (t3), no Preventol® e na solução de limpeza, a breve recuperação inicial foi seguida por uma nova quebra na viabilidade, descendo para 5,1% e 7,4%, respetivamente, enquanto no biocida de OEs a viabilidade decresceu também para 35,9%. O Biotin-T® continuou a mostrar a maior estabilidade, atingindo apenas 2,1% de viabilidade. Pouco tempo depois, registaram-se ligeiras recuperações com os valores de: Preventol® (5,7%), solução de limpeza (7,1%), Syra-Óleovictis® (43,8%) e Biotin-T® (3,3%), mas sem alterações gerais na eficácia dos tratamentos, pois embora com algumas variações, a viabilidade manteve-se baixa.

A partir de meados do ensaio, começaram a surgir diferenças marcantes. Enquanto o Biotin-T® se manteve consistentemente eficaz, com valores reduzidos - próximo de 4,0% após oito semanas - a solução de limpeza subiu para aproximadamente 19,9%, e o biocida Syra-Óleovictis® apresentou um aumento considerável para 66,4%, podendo ser indicativo de uma recuperação do biofilme. O Preventol® manteve valores moderados, próximos de 8,0%.

Nas medições seguintes, a tendência de recuperação foi mais acentuada para alguns tratamentos: a viabilidade no tratamento com o Preventol® subiu para 18,3%, a solução de limpeza para 32,2% e o biocida de OEs atingiu cerca de 89,6%, praticamente restaurando a viabilidade celular ao nível inicial. Em contrapartida, o Biotin-T®, embora ligeiramente mais elevado (7,1%), permaneceu com valores muito baixos, destacando-se como o único tratamento capaz de manter um efeito antimicrobiano prolongado.

Ao final das 24 semanas, observaram-se algumas diferenças: o Preventol® estabilizou em torno de 23,9%, a solução de limpeza reduziu para 14,1% e o biocida à base de OEs manteve uma viabilidade muito elevada (88,4%), confirmando a perda quase total da eficácia a longo prazo. O Biotin-T®, por sua vez, permaneceu próximo de 4,0%, comprovando a sua ação persistente e superior capacidade de prevenir a recuperação do biofilme.

No caso do biocida Syra-Óleovictis®, a recuperação acentuada da viabilidade celular ao longo do ensaio pode ser explicada por diferentes razões. A volatilidade e a instabilidade química de muitos dos seus constituintes ativos podem ter levado a uma rápida diminuição da concentração efetiva na superfície da pedra, reduzindo a duração da ação biocida. Além disso, a natureza porosa do material poderá ter favorecido a adsorção ou retenção desigual dos compostos, criando microambientes protegidos onde células sobreviventes permaneceram viáveis e, posteriormente, retomaram a atividade metabólica. É também possível que parte da população microbiana tenha entrado num estado de viabilidade reduzida, recuperando gradualmente ao longo do tempo, mesmo que não se tenham fornecido novos nutrientes à bactéria na pedra. Estas circunstâncias podem explicar o aumento do sinal de ATP observado, apesar de não se ter verificado reincidência visível de colonização ou alteração cromática da superfície.

Estes resultados sugerem que, apesar do efeito biocida inicial, alguns dos tratamentos não garantem uma inibição sustentada da atividade biológica ao longo do tempo, pelo que, na aplicação de antimicrobianos em monumentos edificados, estes dados reforçam a importância de avaliar a eficácia inicial dos biocidas, mas igualmente a sua durabilidade com o tempo.

- **Quantificação da atividade de desidrogenases**

A Figura 5.23 representa os resultados do ensaio com o corante MTT durante 24 semanas de tratamento com os compostos-teste.

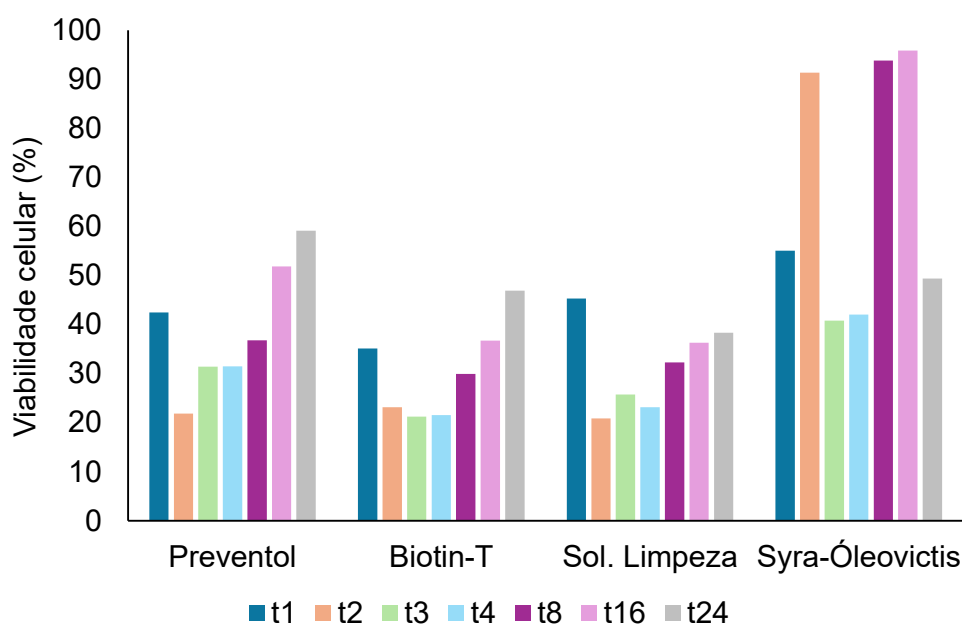


Figura 5.23: Viabilidade celular (%) ao longo do tempo, após aplicação dos antimicrobianos, por medição da atividade das desidrogenases; t representa o tempo em semanas

Logo após a aplicação dos tratamentos (t1), o biocida à base de OEs (Syra-Óleo-victis®) apresentou a maior taxa de viabilidade celular (55,1%), seguido pela solução de limpeza (45,3%) e pelo Preventol® (42,4%), enquanto o Biotin-T® registou o valor mais baixo (35,1%), sugerindo um efeito inicial mais pronunciado deste último. Nos pontos temporais seguintes, todos os tratamentos - com exceção dos OEs - evidenciaram uma descida acentuada, alcançando cerca de 21,8% para o Preventol®, 20,8% para a solução de limpeza e 23,1% para o Biotin-T®, o que indica uma forte ação inibitória inicial.

Posteriormente, verificou-se uma recuperação moderada da viabilidade no Preventol (31,4%) e na solução de limpeza (25,7%), possivelmente relacionada com reativação metabólica de células sobreviventes. O Biotin-T® manteve-se estável em torno de 21,2%, reforçando a consistência da sua ação antimicrobiana. Esta tendência manteve-se no ponto seguinte, com pequenas variações, e o Biotin-T® continuou a apresentar o valor mais baixo entre todos os compostos testados.

Com o prolongar do ensaio, ao atingir oito semanas (t8), todos os biocidas apresentaram aumento da viabilidade: Preventol® em torno de 36,8%, Biotin-T® próximo de 30,0%, solução de limpeza a 32,3% e o biocida de OEs já acima de 93,0%, sinalizando uma recuperação substancial da atividade celular neste último caso.

Às 16 semanas (t16), as diferenças acentuaram-se: o tratamento com o Preventol® ultrapassou 50,0%, a solução de limpeza atingiu cerca de 38,3%, e os OEs mantiveram valores muito elevados (95,9%), enquanto o Biotin-T®, apesar do aumento para 36,7%, permaneceu menos favorável à recuperação total quando comparado com o Syra-Óleovictis®. No final do período de observação (t24), o Preventol® registou aproximadamente 59,1%, Biotin-T® manteve-se perto do mesmo patamar com uma percentagem de 46,9%, a solução de limpeza rondou os 38,3% e o biocida de OEs apresentou uma ligeira descida para 49,4%, mantendo ainda assim um valor elevado, face ao início.

Se compararmos os dois métodos - quantificação de ATP e atividade das desidrogenases - observam-se resultados consistentes: em ambas as abordagens, o Biotin-T® manteve-se como o tratamento mais eficaz ao longo de todo o período experimental, apresentando, de forma sistemática, os valores mais baixos de viabilidade relativa. No entanto, observa-se que no ensaio com o corante MTT os valores absolutos para este biocida são superiores aos registados no ATP. Esta diferença pode dever-se à natureza distinta dos ensaios. Enquanto a medição de ATP reflete diretamente o estado energético global das células, o ensaio com o corante MTT depende da atividade

das enzimas redutoras capazes de reduzir o sal de tetrazólio amarelo a cristais de formazano roxos. Assim, células tratadas com o Biotin-T® podem ter mantido atividade enzimática residual suficiente para gerar sinal no MTT, mesmo apresentando níveis globais de ATP mais baixos, possivelmente devido a um metabolismo geral reduzido. Diferenças na sensibilidade e especificidade dos métodos, bem como no tipo de dano celular predominante induzido pelo biocida, podem justificar estas variações, sem comprometer a conclusão de que o Biotin-T® é, entre os compostos testados, o mais consistente na inibição da atividade microbiana.

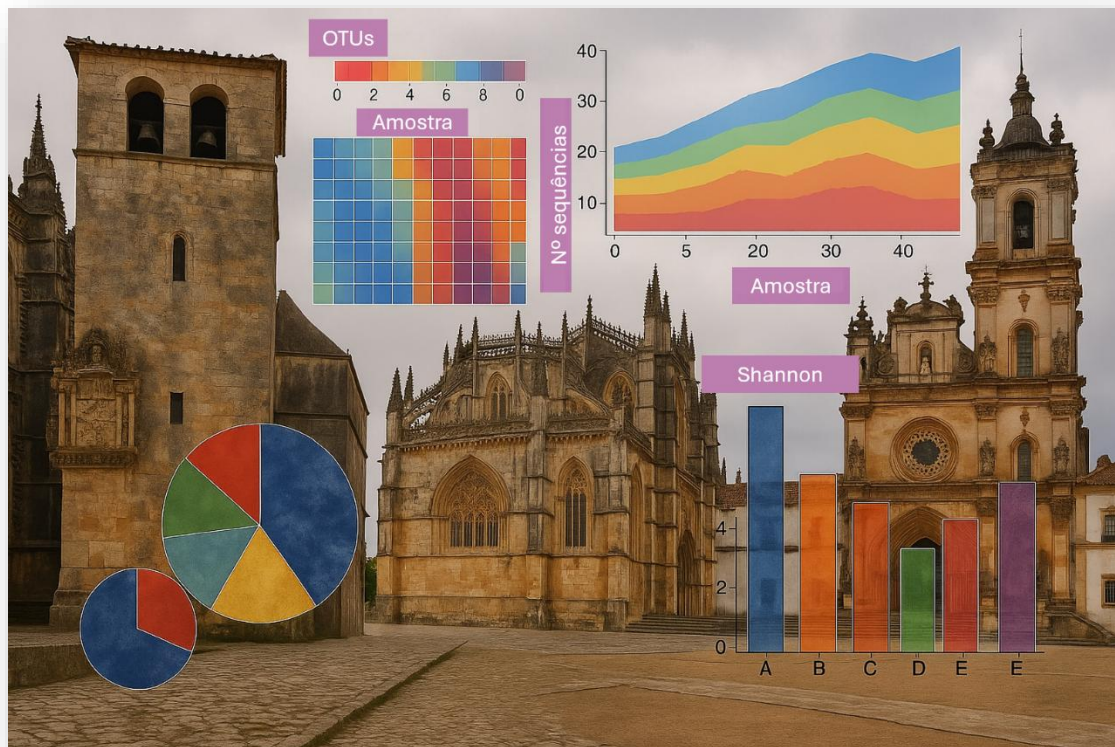
Para além disso, embora a solução de limpeza não tenha apresentado inibição do crescimento bacteriano nos ensaios *in-vitro*, os testes de viabilidade celular realizados em pedra (tanto a bioluminescência como a atividade das desidrogenases) revelaram uma diminuição significativa da atividade metabólica. Este efeito pode ser atribuído principalmente à remoção física das células bacterianas facilitada pela aplicação da solução, reduzindo a carga microbiana total na superfície da pedra sem necessariamente inibir o crescimento bacteriano, tal como demonstrado pelo ensaio de MTT anterior (subponto 5.2.4.1). Além disso, a exposição ao álcool pode induzir *stress* celular temporário, interrompendo a atividade metabólica sem causar morte celular imediata [411,412].

Como referido anteriormente, um fator crucial a ter em conta é as condições laboratoriais controladas em que os ensaios de biocolonização decorreram. A ausência de fatores ambientais externos reduz significativamente a possibilidade de recontaminação e recolonização após a aplicação, não só da solução de limpeza, como dos outros compostos-teste. É particularmente relevante para a solução de limpeza, pois foi a solução testada que não foi eficaz na inibição *in-vitro*. Contudo, a sua capacidade de reduzir, não só a carga microbiana como a acumulação de pigmentos, sugere um potencial papel para o controlo do biofilme. Assim sendo, para a preservação do Património, deve ser considerada uma combinação desta solução de limpeza com agentes antimicrobianos mais eficazes para melhorar os resultados estéticos e microbiológicos.

Capítulo 6

Padrões e Contrastes nos Processos de Biodeterioração

Análise Comparativa e Integração dos Resultados em Pintura e Monumentos de Pedra



Capítulo 6 – Padrões e Contrastes nos Processos de Biodeterioração: Análise Comparativa e Integração dos Resultados em Pintura e Monumentos de Pedra

Os diferentes artefactos do Património Cultural são feitos dos mais variados materiais e estão localizados em ambientes diversos. O tipo de substrato, a sua exposição e o ambiente em que se encontram para se desenvolver, são fatores que influenciam e moldam fortemente os tipos de comunidades microbianas que neles prosperam e os tipos específicos de danos que causam.

Ao estudar as relações entre as comunidades microbianas, os fatores ambientais e a deterioração dos materiais, cuja abordagem multidisciplinar é o principal foco desta tese de Doutorado, é possível desenvolver modelos preditivos para antecipar danos futuros e implementar medidas preventivas antes que ocorra uma degradação significativa. É neste sentido que surge o Capítulo 6.

Neste capítulo recorreu-se a um programa de análise estatística e bioinformática para analisar alguns dados de metagenómica filogenética selecionados de cada um dos casos de estudo da presente tese, cujos monumentos em pedra e as galerias/museus de onde foram amostradas as pinturas, estavam localizadas em zonas com diferenças ambientais e climáticas. Foram aplicadas métricas clássicas de alfa diversidade, para avaliar a riqueza e equitatividade das comunidades microbianas em cada local, e de beta diversidade, avaliada através de análises multivariadas como PCoA (*principal coordinates analysis*), que permitiu explorar as diferenças na composição microbiana entre locais, evidenciando possíveis agrupamentos por tipo de substrato e clima. Adicionalmente, recorreu-se a testes estatísticos como a *One way*-ANOVA (análise de variância de um fator), para avaliar diferenças significativas entre os grupos comparados, e a visualizações gráficas em *heatmap* (mapas de calor), que auxiliam na identificação de níveis taxonómicos diferencialmente abundantes.

Assim, o objetivo principal foi comparar a diversidade microbiana, o potencial de biodeterioração e fazer uma associação entre os microrganismos e os fenómenos de degradação. Através desta análise, procurou-se sobretudo identificar padrões de distribuição microbiana comuns em função das condições climáticas e da natureza do material estudado e avaliar a correlação entre composição microbiana e impacto bioquímico. A comparação transversal entre os diferentes casos de estudo é de extrema importância para se desenvolverem futuramente estratégias de conservação

personalizadas que abordem especificamente os problemas encontrados em cada um deles.

6.1. Metodologia

A análise de diversidade microbiana foi realizada na plataforma *MicrobiomeAnalyst* 2.0 (www.microbiomeanalyst.ca) e os dados de abundância taxonómica a nível de famílias e géneros eucariotas e procariotas foram carregados em formato tabular (.csv), utilizando como *input* uma tabela de abundância de OTUs, juntamente com a tabela de metadados das amostras (.txt). A anotação taxonómica foi atribuída diretamente na plataforma, com base na base de dados SILVA. A alfa (α) diversidade foi calculada pelo índice de Shannon. As comparações entre grupos foram realizadas com o teste ANOVA, considerando um valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. A beta (β) diversidade foi calculada pela distância de Bray-Curtis entre as amostras, com visualização através de PCoA. A significância da separação entre grupos foi avaliada com o teste PERMANOVA (999 permutações).

Ao longo deste capítulo, serão utilizadas as seguintes abreviaturas para identificar os casos de estudo: PintMNAA (pinturas da reserva do Museu Nacional de Arte Antiga, Lisboa, Portugal), PintGoa (pinturas da Galeria dos Vice-Reis, Goa), PintTailandia (pinturas expostas da Galeria da Universidade de Silpakorn, Tailândia), PedraBatalha (calcário interior do Mosteiro da Batalha), PedraAlcobaca (calcário interior do Mosteiro de Alcobaca), PedraCC (calcário exterior do Convento de Cristo) e PedraCasaFresco (pedra ornamentada no interior e exterior da Casa de Fresco, na análise das comunidades procariotas e eucariotas, respetivamente).

6.2. Resultados e Discussão

6.2.1. Comparação dos perfis microbianos - Procariotas

6.2.1.1. Alfa diversidade

A alfa-diversidade, conjuntamente com a beta-diversidade, são duas medidas muito comuns utilizadas em diversos estudos de microbioma. Neste contexto, a alfa-diversidade descreve a diversidade de espécies dentro de uma única amostra ou local, tendo em conta o número de microrganismos, a distribuição das suas abundâncias e a sua relação filogenética. Assim, reflete dois componentes principais: a riqueza, ou seja, o número total de táxones observados (OTUs, géneros, famílias, etc.) presentes numa amostra; e a equitatividade, que possibilita compreender quão uniformemente as abundâncias estão distribuídas. Ao contrário da beta-diversidade, que compara a

composição entre locais/amostras, a alfa-diversidade avalia a complexidade interna de cada comunidade microbiana. É, portanto, um indicador-chave para inferir sobre estabilidade ecológica e resiliência de uma comunidade [413].

O índice de Shannon é uma das métricas mais usadas para quantificar alfa-diversidade, porque combina simultaneamente riqueza e equitatividade num único valor. Para dados de microbioma, este valor varia tipicamente entre $\approx 1,5$ e >4 , sendo que valores baixos indicam baixa diversidade e uma comunidade dominada por poucos táxones muito abundantes, e pelo contrário, valores mais elevados demonstram elevada diversidade e abundâncias mais equilibradas entre táxones [414].

Para controlar o risco de falsos positivos decorrente da realização de múltiplos testes estatísticos, aplicou-se a correção FDR (*false discovery rate*), uma das abordagens mais utilizadas para comparações múltiplas em estudos de análise de microbioma [415]. Este método ajusta o *p*-value para indicar a probabilidade de que um resultado significativo seja na verdade um falso positivo, considerando o número total de comparações. Assim, consideraram-se estatisticamente significativos os resultados com FDR ajustado $< 0,05$, valor esse amplamente reconhecido na literatura como limiar para indicação de significância, após correção para múltiplas comparações [416].

Os resultados de alfa diversidade encontram-se representados sob a forma de *boxplot* na Figura 6.1 e na Tabela B.1 do Anexo B com os respectivos valores de comparação entre locais. Os resultados da ANOVA são mostrados no topo de cada gráfico e os losangos pretos representam a média do índice de Shannon para cada grupo. O gráfico de barras representado na Figura 6.2 pressupõe uma melhor e direta visualização do índice de Shannon para comparação entre grupos.

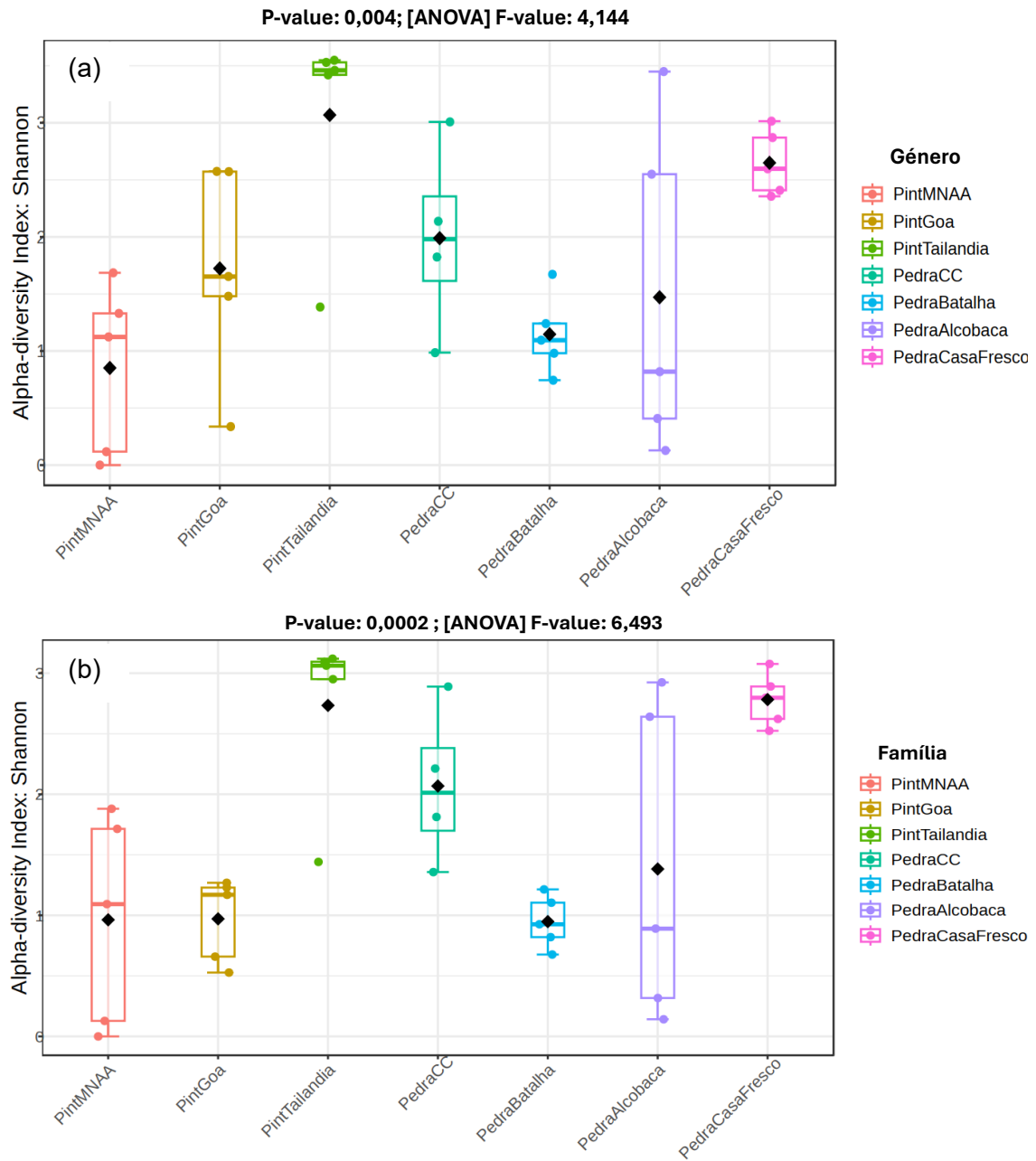


Figura 6.1: Comparação da alfa diversidade procariota entre locais. A representação gráfica em *boxplot* ilustra o índice de Shannon para cada local, agrupados por (a) Gênero e (b) Família.

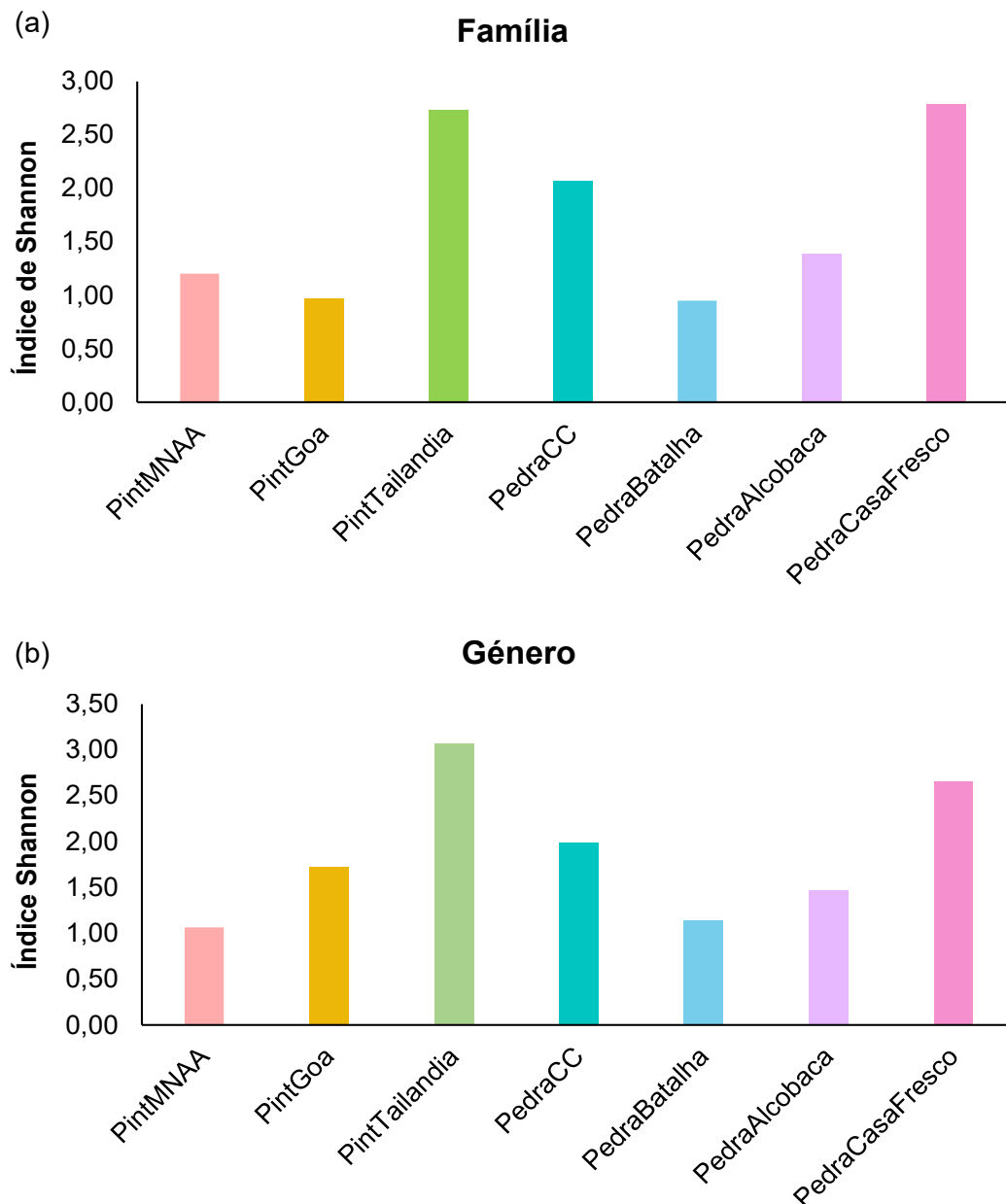


Figura 6.2: Comparação dos valores de Índice de Shannon das comunidades procariotas nas localidades amostradas para os níveis taxonómicos de (a) Família e (b) Género.

A análise da alfa diversidade (Anexo B, Tabela B.1) calculada através do índice de Shannon, revelou diferenças significativas entre os diversos locais (p -value < 0,05), tanto ao nível taxonómico de género como de família procariota. Os valores mais elevados de índice de Shannon, que sugerem uma maior diversidade interna da comunidade, observaram-se nas amostras provenientes da Tailândia e nas amostras da Casa de Fresco (Figura 6.2). Para além destes resultados sugerirem que nestes dois locais, as amostras desses grupos têm muitas espécies diferentes, o facto de se observar baixa dispersão de valores (dada pela amplitude reduzida no *boxplot* das

Figuras 6.1 (a) e (b)) indica-nos uma elevada consistência entre as amostras deste grupo, sugerindo que as condições ambientais ou estruturais que moldam estas comunidades são relativamente homogêneas entre os diferentes pontos amostrados no local. Observa-se no *boxplot*, ainda assim, uma amostra das pinturas da Tailândia, que se afasta das outras do mesmo grupo, e diz respeito à amostra F, por pertencer a um quadro diferente das outras, e por esse motivo diferir na sua composição procariota.

Relativamente à comparação entre pinturas, evidenciaram-se diferenças significativas (p -value = 0,004 para géneros; p -value = 0,009 para famílias), entre MNAA e Tailândia sugerindo uma clara divergência na riqueza e uniformidade das comunidades microbianas. Este resultado reflete não apenas o contraste climático entre um ambiente controlado e temperado (em Lisboa) e um contexto tropical húmido (que se faz sentir na Tailândia), mas também diferenças associadas ao tipo de substrato. As pinturas de cavalete, comuns ao MNAA, Goa e Tailândia, apresentam camadas orgânicas (suporte em madeira/tela, a camada de preparação e camada pictórica) ricas em proteínas, óleos e polissacáridos que funcionam como substratos para microrganismos heterotróficos. Em ambientes quentes e húmidos, estas condições potenciam a atividade enzimática (por lipases, proteases, celulases) e a produção de metabolitos secundários e pigmentos, favorecendo processos de degradação e alterações cromáticas; em contrapartida, em reservas museológicas controladas, esta atividade metabólica tende a ser mais reduzida.

Por outro lado, em território português, a Casa de Fresco apresentou diferenças significativas face ao MNAA (p -value = 0,004 géneros; p -value = 0,008 famílias) e ao Mosteiro da Batalha (p -value = 0,000 géneros; p -value = 0,000 famílias). Além das condições microclimáticas, marcadas por um ambiente semi-interior mais húmido e protegido, a natureza heterogênea do seu substrato contribui para este padrão. A Casa de Fresco conjuga calcário, pedra vulcânica e elementos ornamentais com conchas, formando superfícies rugosas, porosas e quimicamente diversas capazes de reter sais e nutrientes que favorecem a colonização. As amostras do Mosteiro da Batalha, por serem recolhidas no interior, provêm de calcário mais uniforme, mas ainda assim sujeito a colonização ativa, marcada pela produção de pigmentos bacterianos responsáveis pela coloração rosa, um exemplo claro de atividade bioquímica com forte impacto estético. Em contrapartida, o MNAA alberga pinturas de cavalete mantidas em ambiente controlado das reservas, de forma a limitar a proliferação e o metabolismo microbiano ativo.

Curiosamente, na comparação entre o Mosteiro da Batalha e o Mosteiro de Alcobaça não se verificaram diferenças estatisticamente significativas (p -value = 0,650 para géneros; p -value = 0,503 para famílias), o que pode ser explicado pelo facto de ambos os monumentos apresentarem contaminações semelhantes, marcadas pela presença de coloração rosa. Ainda assim, os *boxplots* revelaram perfis distintos de diversidade: na Batalha, a pigmentação esteve sobretudo associada à formação de biofilmes relativamente homogéneos, dominados por poucas bactérias, enquanto em Alcobaça se relacionou com a ocorrência de eflorescências salinas, que criaram microambientes com *stress* osmótico e favoreceram a colonização por bactérias halotolerantes e halofílicas. Do ponto de vista bioquímico, este contexto traduziu-se numa maior heterogeneidade na composição das comunidades, marcada pela síntese de carotenóides em condições de elevada salinidade e pela coexistência de diferentes grupos adaptados a ambientes osmoticamente variáveis, o que pode justificar as diferenças observadas graficamente apesar da ausência de significância estatística.

Estes resultados sustentam a ideia de que o substrato e o microclima (que pode variar muito dentro do mesmo monumento ou local) são fatores determinantes na diversidade observada, em sinergia com as condições macroclimáticas, que são condições regionais ou globais do clima, e que afetam toda a área onde o monumento está inserido. De facto, estudos anteriores confirmam que variações na composição mineralógica, rugosidade e higroscopicidade do suporte influenciam a composição e a diversidade das comunidades microbianas [18,64].

6.2.1.2. Beta diversidade

A beta diversidade, na análise de microbioma, refere-se às diferenças na composição da comunidade microbiana entre dois ou mais grupos de amostras, permitindo quantificar como é que a diversidade de espécies muda de um habitat para outro e possibilitando identificar e compreender padrões na biodiversidade [417].

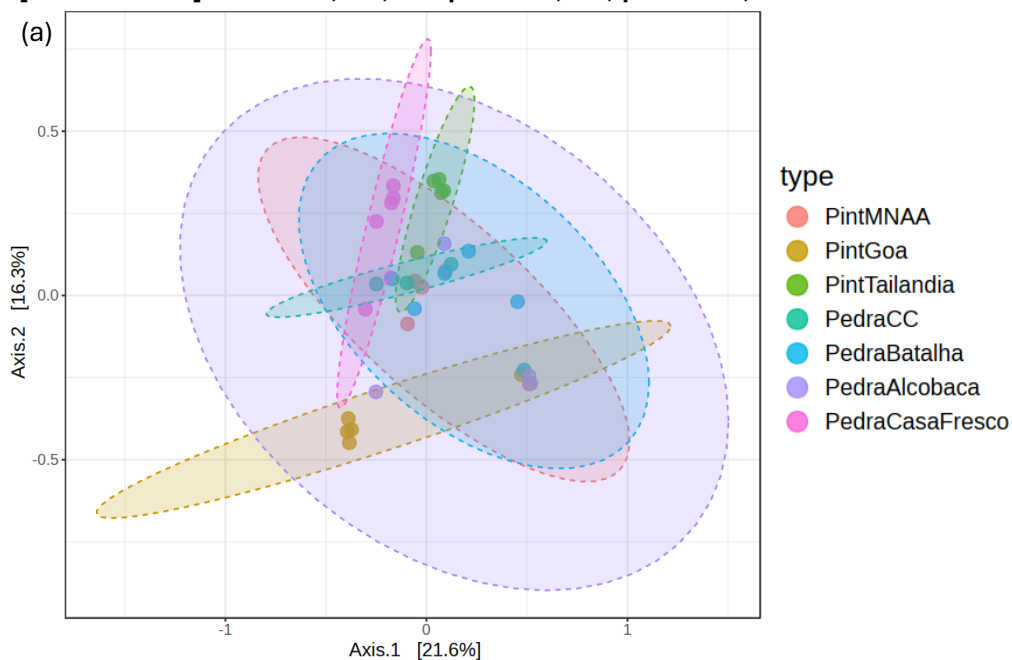
Neste estudo, a beta diversidade foi avaliada através de PCoA, uma técnica de redução de dimensionalidade utilizada para visualizar e analisar dados complexos de microbioma. Ao ajudar a reduzir a elevada dimensionalidade dos conjuntos de dados, preserva as relações entre as amostras e permite identificar padrões e tendências, sendo frequentemente utilizada em estudos de comparação de microbioma. Esta técnica projeta as distâncias entre amostras num conjunto de eixos de coordenadas, selecionando os dois primeiros eixos que melhor preservam a distribuição original das distâncias para a representação dos dados. Amostras estritamente relacionadas,

indicativas de composição de espécies semelhante, tendem a agrupar-se, enquanto aquelas com elevada variação na comunidade tendem a dispersar-se para longe umas das outras na representação gráfica [418].

Para fazer a comparação entre os vários casos de estudo, optou-se pela métrica de beta diversidade Bray–Curtis, de forma a garantir uma avaliação robusta das diferenças na composição microbiana entre os grupos estudados, pois esta métrica sugere-se ser uma das mais adequadas para comparar comunidades microbianas com base em dados de abundância relativa, considerando tanto a presença/ausência quanto a quantidade relativa dos diferentes táxons nas amostras [417].

Os resultados da beta diversidade encontram-se representados sob a forma de gráfico de dispersão PCoA na Figura 6.3, em eixos bidimensionais que mostram a localização relativa das amostras conforme a distância/dissimilaridade calculada entre elas, facilitando a visualização dos agrupamentos e diferenças entre comunidades microbianas analisadas. Cada ponto representa uma amostra, com uma coloração distinta, por localidade. As elipses indicam o intervalo de confiança de 95% para cada grupo e os resultados da análise PERMANOVA global são exibidos no topo de cada gráfico. Por outro lado, na Tabela B.2 do Anexo B constam os resultados da análise estatística comparativa da beta diversidade entre as localidades, para o género e família. São apresentados o *F*-value, o *p*-value e o valor de FDR para cada comparação.

[PERMANOVA] F-value: 3,218; R-squared: 0,417; p-value: 0,001



[PERMANOVA] F-value: 2,999; R-squared: 0,399; p-value: 0,001

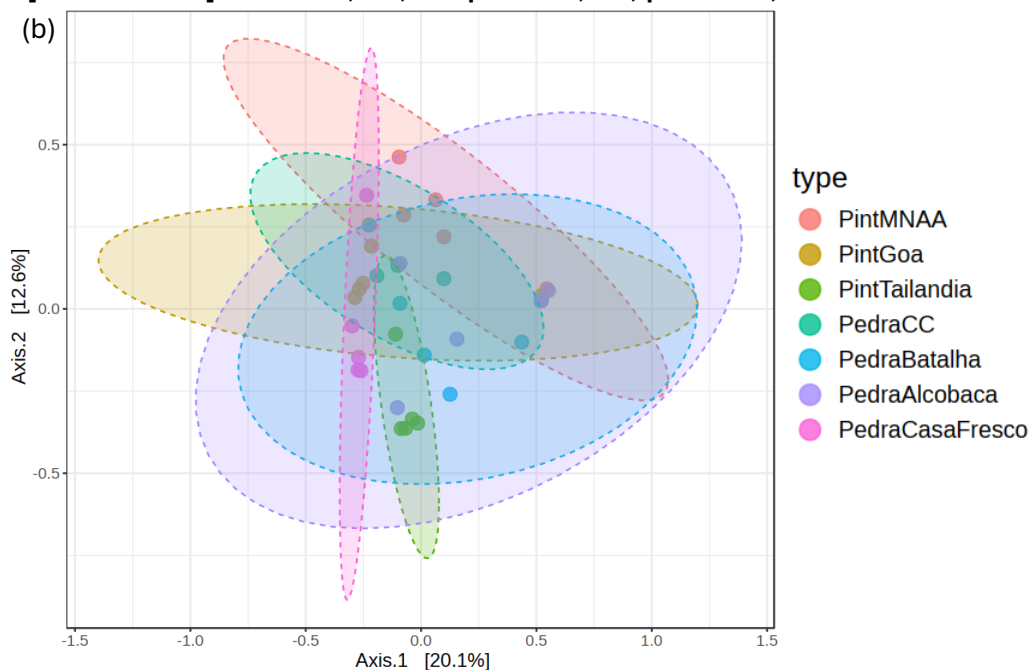


Figura 6.3: Gráfico de PCoA referente à beta diversidade das comunidades procariotas ao nível da (a) Família e (b) Género.

A beta-diversidade revelou separações claras entre grupos, tanto por tipo de substrato como por localização geográfica (Figura 6.3). Para o nível taxonómico do género, as duas primeiras componentes principais explicaram 20,1% (PCoA1) e 12,6% (PCoA2) da variação total. Para o nível da família, a PCoA1 explicou 21,6% e a PCoA2 16,3% da variação total.

O primeiro eixo (PCoA1), que explica a maior parte da variação, separa sobretudo as amostras provenientes de contextos tropicais e húmidos (Tailândia e Goa) das amostras portuguesas, de clima temperado/mediterrânico. Esta distinção evidencia o papel determinante do clima e da latitude na composição das comunidades microbianas. Já o segundo eixo (PCoA2) reflete diferenças associadas ao tipo de substrato: as pinturas de cavalete (MNAA, Goa e Tailândia) agruparam-se entre si, enquanto as amostras de pedra calcária interior (Batalha e Alcobaça), de calcário exterior (Convento de Cristo) e da Casa de Fresco, com a sua combinação de calcário, pedra vulcânica e conchas, se destacaram em posições distintas. Assim, a ordenação obtida sugere que tanto o clima como a natureza do suporte exercem influência decisiva na estruturação das comunidades microbianas observadas.

Quando se analisa ao nível da família (Figura 6.3 (a)), as elipses apresentam-se mais afastadas, revelando diferenças mais acentuadas e uma separação global mais clara entre os vários contextos. Já ao nível do género (Figura 6.3 (b)), nota-se maior sobreposição entre grupos, o que indica a presença de microrganismos comuns a diferentes ambientes, ainda que em abundâncias distintas. Esta diferença pode ser explicada porque, quando olhamos para o nível da família, estamos a agrupar vários géneros procariotas com funções metabólicas semelhantes, o que faz sobressair melhor as diferenças gerais entre ambientes. Já ao nível do género, aparecem microrganismos muito comuns e adaptáveis, que podem estar presentes em vários contextos diferentes e cuja atividade bioquímica varia consoante o tipo de suporte e as condições ambientais. É por isso que as diferenças mais amplas se destacam nas famílias, enquanto os agrupamentos mais finos, relacionados com o tipo de substrato, se tornam mais visíveis nos géneros.

As análises PERMANOVA confirmaram diferenças estatisticamente significativas para grande parte das comparações (Anexo B, Tabela B.2), como MNAA vs Tailândia (p -value = 0,014 para géneros e famílias) e Goa vs Tailândia (p -value = 0,012 para géneros; p -value = 0,008 para famílias), refletindo a forte influência do clima tropical sobre as comunidades associadas a pinturas de cavalete. A PERMANOVA indicou valores de R^2 de 0,40 (género) e 0,42 (família), sugerindo que aproximadamente 40-42% da variação na composição pode ser explicada pelo fator “local”, sendo que a variação restante pode dever-se a fatores como diferenças microambientais, histórico de intervenção ou conservação e limitações nas técnicas de sequenciação.

Entre as amostras em pedra, destacam-se diferenças entre a Casa de Fresco e o Mosteiro da Batalha (p -value = 0,007 para géneros e famílias) e entre o Convento de

Cristo e os monumentos em calcário interior, sugerindo que a exposição ao exterior e a heterogeneidade do substrato são fatores estruturantes da composição procariota. No caso do Convento de Cristo, a exposição direta ao ambiente favorece comunidades bacterianas adaptadas a variações de radiação, temperatura e desidratação, muitas delas produtoras de pigmentos fotoprotetores e metabolitos antioxidantes que contribuem para alterações cromáticas, como é o caso do género *Rubrobacter*, identificado nesse monumento. Já a heterogeneidade mineral e estrutural da Casa de Fresco potencia a atividade de microrganismos com metabolismos diferenciados, incluindo a secreção de ácidos orgânicos e exopolissacáridos, que intensificam a retenção de humidade e os processos de biodeterioração.

Para além disso, os valores de F observados, que variam entre 1,6 e 8,7, representam a razão entre a variação inter-grupos e intra-grupos. F -values superiores a 2,0 geralmente indicam separação clara entre grupos, enquanto valores acima de 4,0 sugerem diferenças muito pronunciadas. Por exemplo, PintGoa vs PintTailandia (F -value = 8,715, p -value = 0,008) demonstra uma das maiores divergências observadas, indicando que fatores geográficos específicos influenciam fortemente a composição microbiana em pinturas de cavalete.

As diferenças estatisticamente significativas observadas entre Goa e Tailândia (p -value = 0,012 para géneros; p -value = 0,008 para famílias) são multifatoriais e podem expressar-se em função da interação entre o clima local, as práticas museológicas e as dinâmicas sociais. Goa apresenta um ambiente tropical húmido, enquanto a Tailândia, mesmo que tropical, ainda possui um regime de chuvas e padrões sazonais próprios, que afetam diretamente a disponibilidade de humidade e temperatura média. Para além disso, fatores como ventilação, luminosidade e controlo de temperatura que podem diferir no interior das duas galerias e a diversidade de visitantes, podem também introduzir microrganismos distintos através do contacto ou do ar, reforçando as diferenças detectadas [419]. Até mesmo diferenças nos materiais utilizados nas camadas pictóricas (pigmentos, aglutinantes e vernizes), podem selecionar comunidades microbianas diferenciadas.

Tal como na alfa diversidade, também na beta diversidade não se detetaram diferenças estatisticamente significativas entre os monumentos em pedra da Batalha e de Alcobaça, em ambos os níveis taxonómicos. Como dito anteriormente, isso pode ser atribuído, provavelmente, à similaridade dos processos de contaminação. Como observado nos capítulos anteriores referentes a estes dois casos de estudo, ambos apresentavam condições de colonização microbiana muito semelhantes,

nomeadamente a presença de biofilmes de cor rosada persistentes nas paredes e colunas. Este tipo de biofilme de forma tão idêntica nos dois monumentos pode indicar que eles fornecem microambientes comparáveis em termos de humidade, luminosidade e porosidade da pedra, condições que favorecem o crescimento de comunidades microbianas taxonomicamente próximas. A composição idêntica do substrato (pedra calcária) pode também promover o estabelecimento de microambientes ecológicos equivalentes, permitindo a colonização por grupos microbianos idênticos.

Mesmo tratando-se de locais geográfica e climaticamente distintos, também entre as pinturas de Goa e as amostras de pedra recolhidas no Mosteiro de Alcobaça, não se observaram diferenças estatisticamente significativas (p -value = 0,069 para géneros; p -value = 0,078 para famílias). No entanto, em ambos os grupos de amostras foi identificada uma comunidade procariota enriquecida em microrganismos halotolerantes, adaptados a ambientes com elevada salinidade. Isso sugere que a proximidade a ambientes marinhos (no caso de Goa) e o fenómeno de salinização por capilaridade em Alcobaça, criou condições físicas e químicas semelhantes que favoreceram o desenvolvimento de comunidades microbianas com funções parecidas. Consequentemente, isso resulta em valores de diversidade comparáveis e reduzida separação das comunidades. Assim, o que é importante observar nestes casos é que a diversidade microbiana não depende exclusivamente da localização geográfica ou do contexto arquitetónico, mas também da combinação entre o tipo de substrato e o microambiente (disponibilidade de água e sais).

É interessante constatar igualmente que na comparação entre as amostras do Mosteiro de Alcobaça e do Convento de Cristo, observaram-se diferenças estatisticamente significativas ao nível taxonómico do género (p -value = 0,033), mas na família isso não se verificou (p -value = 0,046). Isto pode acontecer em análises metagenómicas devido ao género ser um nível taxonómico mais detalhado e permitir captar diferenças mais específicas entre as comunidades, que se podem perder quando agregamos os dados para o nível da família. Dentro de uma mesma família podem existir géneros muito distintos na sua abundância ou função, por isso a diferença apenas num, ou em poucos géneros, pode não ser suficiente para alterar significativamente todo o perfil da família. Ou seja, o agrupamento taxonómico mais amplo pode suavizar variações específicas detectadas em níveis mais finos da análise.

Em síntese, os resultados da análise de beta-diversidade demonstram que tanto os fatores ambientais como o tipo de substrato exercem um impacto significativo na estruturação das comunidades eucariotas nos diferentes contextos patrimoniais estudados. A clara separação entre grupos e as diferenças estatisticamente

significativas observadas reforçam a ideia de que a microbiota associada ao Património Cultural é altamente sensível às condições locais, sendo, por isso, essencial considerar estas variáveis na definição de estratégias de conservação e monitorização microbiana futuras.

6.2.1.3. Análise integrada das comunidades procariotas: diferenças taxonómicas e padrões de abundância

Nesta secção, foi feita uma análise conjunta dos resultados da ANOVA e dos *heatmaps* para os níveis taxonómicos de género e família. Em primeiro lugar, a ANOVA permitiu identificar os microrganismos cuja abundância relativa apresentou diferenças estatisticamente significativas (Anexo B, Tabela B.3), permitindo destacar aqueles que mais contribuem para a discriminação entre locais/substratos. De forma complementar, a observação dos *heatmaps* (Figuras 6.4 e 6.5, para a família e género, respetivamente) foi utilizada para visualizar os padrões de abundância destes mesmos géneros e famílias ao longo das diferentes amostras e locais, facilitando relacionar o perfil microbiano, o tipo de substrato e as condições ambientais. Com esta visualização pretendeu-se compreender graficamente diferenças, tendências e agrupamentos de microrganismos típicos de cada local. Assim, esta análise integrada possibilita reconhecer quais os microrganismos colonizadores que são diferentes, mas também de que forma estes se distribuem e se associam a contextos ambientais ou materiais específicos, facilitando a identificação de perfis característicos que possam servir como indicadores biológicos de biodeterioração.

Análises comparativas

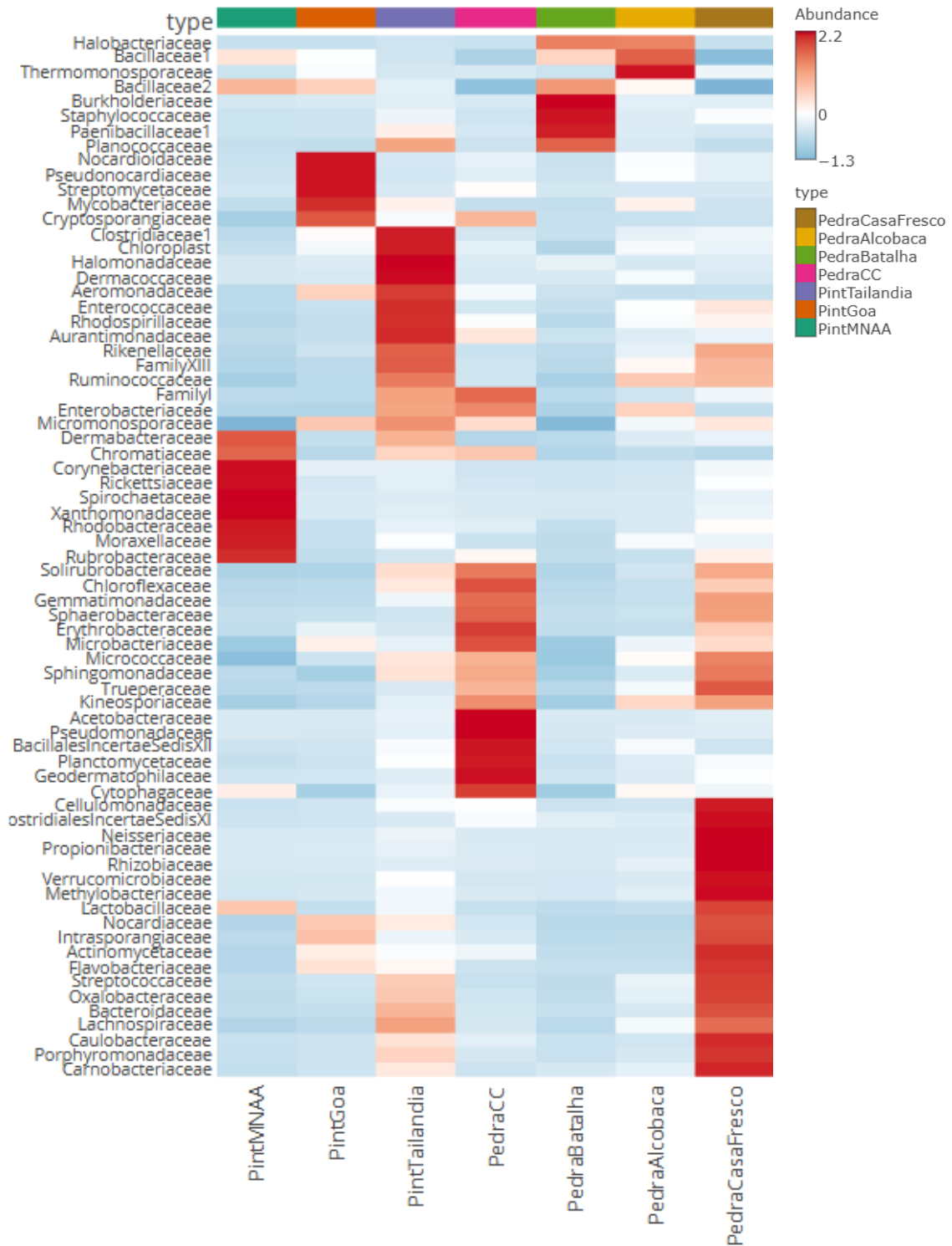


Figura 6.4: *Heatmap* da abundância relativa das principais famílias procariotas. A intensidade da cor vermelha é proporcional à abundância do táxon. As amostras foram agrupadas por localidade na barra superior

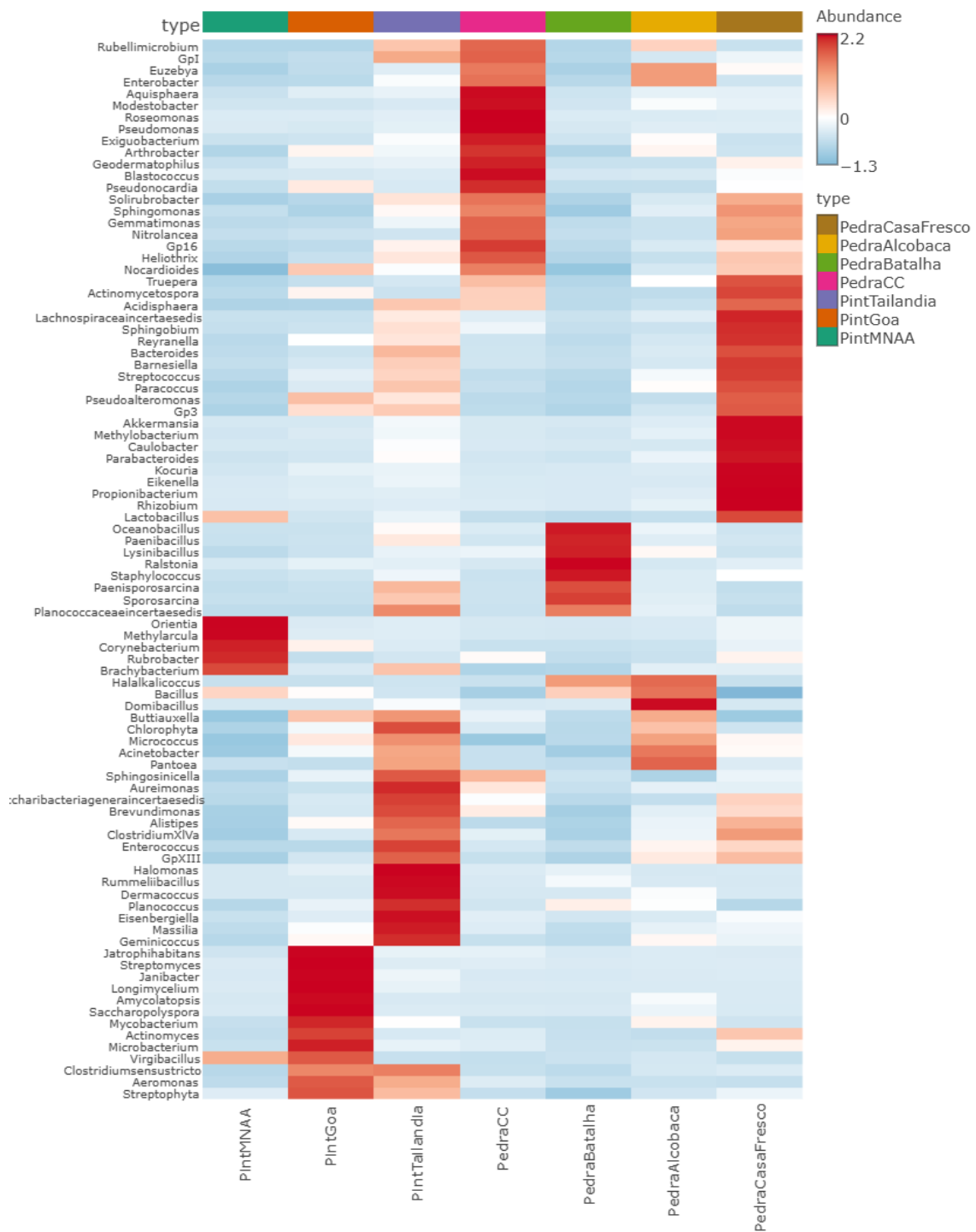


Figura 6.5: Heatmap da abundância relativa dos principais géneros procariotas. A intensidade da cor vermelha é proporcional à abundância do táxon. As amostras foram agrupadas por localidade na barra superior

A análise dos *heatmaps* referente às famílias e aos géneros procariotas (Figuras 6.4 e 6.5, respetivamente) revela que os locais apresentam assinaturas microbianas marcadamente distintas, destacando-se diferentes conjuntos estatisticamente relevantes.

A composição microbiana das **amostras de pintura do MNA** é marcada por géneros como *Orientia*, *Methylococcus*, *Corynebacterium*, *Brachybacterium* e *Rubrobacter*. O último tem sido fortemente associado à produção de pigmentos e às consequentes alterações cromáticas e estéticas em monumentos e pinturas, sugerindo que pode contribuir para a deterioração da camada pictórica [38,195]. *Brachybacterium* foi também descrito em estudos anteriores como estando presente em pinturas deterioradas [180]. Embora os géneros mencionados anteriormente não figurem entre os mais significativos na ANOVA (Anexo B, Tabela B.3), destaca-se a presença de *Virgibacillus*, partilhada com Goa, sugerindo algum grau de tolerância a fatores de *stress* ambiental e possível influência do microclima museológico, caracterizado por maior controlo de temperatura e humidade.

Relativamente às famílias, temos Corynebacteriaceae, Xanthomonadaceae, Rubrobacteraceae e Rhodobacteraceae como exemplos das mais abundantes nas pinturas do MNA. A família Corynebacteriaceae, que inclui o género *Corynebacterium*, é conhecida pela produção de ácidos orgânicos que alteram a composição química dos pigmentos e aglutinantes. Xanthomonadaceae agrupa géneros adaptados a ambientes com humidade e temperatura controladas, típicas de ambientes museológicos, enquanto Rhodobacteraceae sugere-se que possa ter influência nas camadas pictóricas das pinturas, pois os membros desta família possuem elevada versatilidade metabólica, incluindo a utilização de diversos compostos orgânicos e inorgânicos e produção de metabolitos secundários [420].

Por outro lado, o **perfil das pinturas de Goa** é dominado por uma grande diversidade de Actinobactérias, incluindo *Saccharopolyspora*, *Jatrophihabitans*, *Streptomyces*, *Janibacter* e *Amycolatopsis*, várias das quais aparecem também como significativamente diferentes pela ANOVA. Ao nível da família, esta diversidade reflete-se na predominância de Streptomycetaceae, Pseudonocardiaceae e Mycobacteriaceae, todas elas famílias características de ambientes húmidos e salinos, com elevada capacidade enzimática e de colonização de superfícies orgânicas.

Esta abundância de géneros de Actinobactérias sugere forte influência de condições subtropicais/marítimas, que promovem a proliferação de microrganismos tolerantes à salinidade e variações de temperatura. Para além disso, as actinobactérias,

sobretudo *Streptomyces* e *Amycolatopsis*, também são conhecidas pela sua capacidade de produzir uma vasta gama de metabolitos secundários [421], o que sugere uma característica metabólica descrita para estes géneros que pode influenciar diretamente a superfície da pintura. A família Streptomycetaceae, que engloba estes géneros, é reconhecida pela produção de enzimas extracelulares que podem degradar componentes orgânicos complexos, incluindo vernizes e pigmentos, sendo frequentemente documentada em estudos de biodeterioração do Património Cultural [422,423].

O género *Mycobacterium*, também ele pertencente ao filo Actinobacteria, destaca-se igualmente por ser abundante nestas pinturas e por ter uma enorme capacidade de formação de biofilmes, sendo frequentemente identificado em pinturas deterioradas [19,113]. Outro exemplo são os membros do género *Aeromonas*, adaptados a ambientes aquáticos [424], o que pode ser reforçado pela proximidade da costa e pelo clima húmido.

As amostras provenientes da **Tailândia** apresentam um perfil bastante diferenciado e dinâmico, com géneros como *Rummeliibacillus*, *Eisenbergiella*, *Massilia*, *Enterococcus*, *Aureimonas* e *Clostridium XIVa* – todos eles significativamente diferentes pela ANOVA. O predomínio destes géneros, associados a ambientes tropicais húmidos e a solos, ressalta a influência marcante do clima quente e húmido, que proporciona vantagens competitivas a microrganismos adaptados a elevadas temperaturas e humidade.

No que diz respeito aos monumentos em pedra, nas **amostras do Convento de Cristo**, os géneros mais abundantes incluem por exemplo *Rubellimicrobium*, *Pseudonocardia* (significativo na ANOVA), *Geodermatophilus*, *Blastococcus* e *Pseudomonas*, todos associados à colonização de monumentos em pedra e superfícies expostas, definindo um perfil ecológico robusto e típico de biodeterioração de substratos pétreos [21,425,426]. Estes microrganismos aderem fortemente à superfície da pedra, favorecendo a fragmentação microfísica provocada por ciclos de hidratação e desidratação, promovendo ainda a solubilização mineral via produção de ácidos orgânicos e exopolissacáridos, o que acelera o desgaste da matriz [427]. Por outro lado, a elevada presença de actinobactérias e géneros produtores de esporos reflete também a exposição do monumento a variações térmicas e à radiação solar, fatores ecológicos típicos de ambientes pétreos exteriores.

Os **mosteiros da Batalha e Alcobaça** apresentam perfis dominados por outros géneros, como *Bacillus*, *Staphylococcus* e *Paenibacillus* (Batalha) ou *Acinetobacter* e

Pantoea (Alcobaça). Apesar de apresentarem géneros distintos entre si, ambos os mosteiros têm na sua composição procariota os géneros *Bacillus* (da família Bacillaceae) e *Halalkalicoccus* (da família Halobacteriaceae), discutidos na análise metagenómica feita por NGS. Estes dados estatísticos corroboram a discussão feita na identificação destes géneros por NGS e ainda as observações feitas na amostragem, que descrevem biofilmes cor-de-rosa em ambos os monumentos, relacionados com a ação de bactérias pigmentadas e com adaptação a ambientes de salinidade elevada ou flutuação hídrica.

A **Casa de Fresco em Évora** destaca-se pela riqueza de géneros diferenciados e pela presença marcante de vários géneros com diferenças significativas na ANOVA como *Sphingobium*, *Reyranella*, *Streptococcus*, *Methylobacterium*, *Caulobacter*, *Eikenella*, *Propiniobacterium* e *Kocuria*. Também as famílias Methylobacteriaceae, Lachnospiraceae, Caulobacteraceae e Streptococcaceae se destacam não só pela sua abundância mas também por serem significativamente diferentes de outros locais estudados. A diversidade funcional e ecológica destes grupos sugere um ambiente interior heterogéneo, com presença de substratos orgânicos, humidade variável, e possível influência de microclima devido à arquitetura do espaço.

Fazendo uma integração entre o perfil microbiano, o tipo de substrato, o local e as condições ambientais, resumidas na Tabela 6.1, a análise descrita anteriormente permite compreender que as diferenças microbianas detetadas não são meramente taxonómicas, mas também refletem adaptações às condições ambientais características de cada local, sendo que:

- Os ambientes tropicais e húmidos da Tailândia favorecem o domínio de géneros procariotas específicos, ausentes ou menos abundantes em ambientes mais secos ou temperados.
- A presença de géneros marinhos ou halotolerantes nas pinturas de Goa evidencia a influência do clima costeiro e das elevadas humidades relativas associadas a esta cidade.
- O interior da Casa de Fresco apresenta um enriquecimento em géneros procariotas ausentes ou pouco frequentes nos restantes locais, provavelmente devido à sua composição heterogénea e micro habitats húmidos persistentes. Assim, mostra-se como um reservatório de elevada diversidade, com seleção para géneros procariotas associados a compostos orgânicos e condições microclimáticas particulares.

- Os mosteiros da Batalha e de Alcobaça confirmam a seleção de comunidades produtoras de pigmentos e com capacidade de produção de biofilmes em materiais pétreos, adaptadas à humidade e a condições de elevada salinidade, enquanto as amostras exteriores do Convento de Cristo selecionaram géneros procariotas frequentemente associados à deterioração de monumentos pétreos e adaptados a condições extremas.
- A composição das pinturas provenientes do MNAA inclui uma comunidade de bactérias dominada por poucos géneros mas em abundâncias elevadas e diferentes de todos os outros casos de estudo, sugerindo um perfil microbiano único.

Tabela 6.1: Comunidades procariotas - integração entre o perfil microbiano, o tipo de substrato, o local e as condições ambientais

Local	Condições ambientais dominantes	Perfil microbiano típico	Implicações biodeterioração
MNAA (Lisboa, Portugal)	Microclima museológico com controlo de temperatura e humidade	<i>Orientia</i> , <i>Methylarcula</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Brachybacterium</i> , <i>Rubrobacter</i> , <i>Brachybacterium</i> <i>Virgibacillus</i>	Descoloração, pigmentação
Galeria Vice-Reis (Goa, Índia)	Clima subtropical/marítimo, elevada humidade e influência salina	<i>Saccharopolyspora</i> , <i>Jatrophihabitans</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Janibacter</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Aeromonas</i>	Produção de metabolitos e degradação orgânica
Galeria Universidade Silpakorn (Bangkok, Tailândia)	Clima tropical húmido, elevadas temperaturas e humidade	<i>Rummeliibacillus</i> , <i>Eisenbergiella</i> , <i>Massilia</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Aureimonas</i> , <i>Clostridium XIVa</i>	Produção de ácidos orgânicos e degradação
Mosteiro de Alcobaça (Alcobaça, Portugal)	Ambiente interior de monumento em pedra com microclima estável	<i>Bacillus</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Halalkalicoccus</i> , <i>Domibacillus</i> <i>Buttiauxella</i> <i>Micrococcus</i>	Eflorescências salinas e produção de biofilmes corados/alterações estéticas
Mosteiro da Batalha (Batalha, Portugal)	Ambiente interior de monumento em pedra com microclima estável	<i>Bacillus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Paenibacillus</i> , <i>Halalkalicoccus</i> , <i>Lysinibacillus</i>	Produção de biofilmes corados/alterações estéticas

(continua)

Tabela 6.1 (continuação)

Local	Condições ambientais dominantes	Perfil microbiano típico	Implicações biodeterioração
Convento de Cristo (Tomar, Portugal)	Ambiente exterior sujeito a variações térmicas e radiação solar	<i>Rubellimicrobium</i> , <i>Pseudonocardia</i> , <i>Geodermatophilus</i> , <i>Blastococcus</i> , <i>Pseudomonas</i>	Produção de ácidos, fragmentação da pedra e desgaste
Casa de Fresco (Évora, Portugal)	Ambiente interior heterogéneo, frequentemente fresco e húmido	<i>Sphingobium</i> , <i>Methylobacterium</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Reyranella</i> , <i>Eikenella</i>	Descoloração, pigmentação, produção de biofilmes

6.2.2. Comparação dos perfis microbianos – Eucariotas

6.2.2.1. Alfa diversidade

Para além da análise das bactérias, a avaliação da diversidade fúngica é igualmente crucial para compreender os processos de biodeterioração nos locais estudados. A diversidade intra-amostral (alfa diversidade) foi avaliada de modo a compreender se as condições ambientais específicas favorecem ou limitam a riqueza e distribuição destes microrganismos dentro de cada amostra.

Os resultados da alfa diversidade encontram-se representados sob a forma de *boxplot* na Figura 6.6 e na Tabela B.4 do Anexo B com os respetivos valores estatísticos de comparação entre locais.

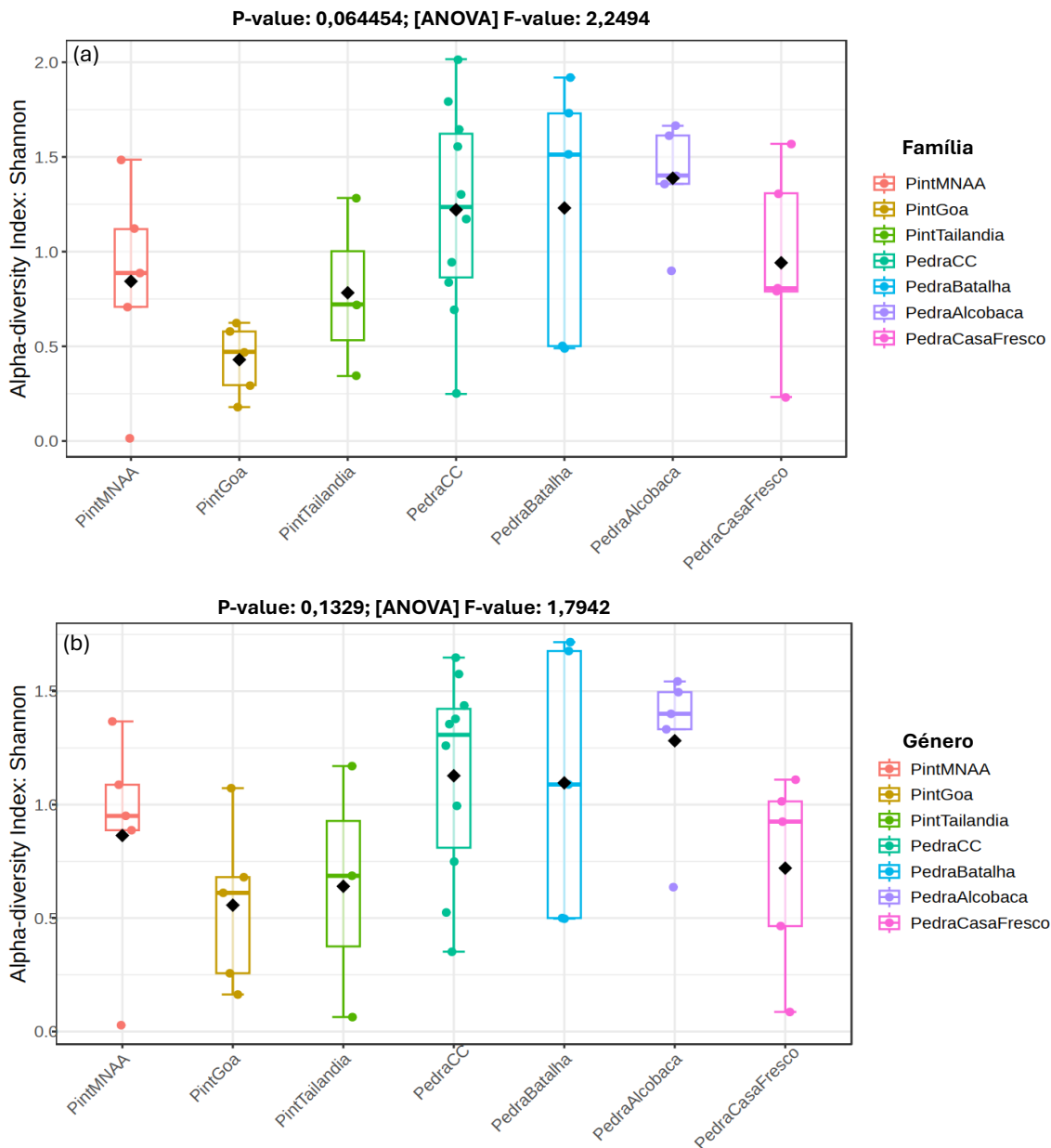


Figura 6.6: Comparação da alfa diversidade eucariota entre locais. A representação gráfica em *boxplot* ilustra o índice de Shannon para cada local, agrupados por (a) Família e (b) Género.

A análise da alfa diversidade dos microrganismos eucariotas com base no índice de Shannon não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os locais amostrados (ANOVA, $p > 0,05$), tanto ao nível taxonómico da família (Figura 6.6 (a)) como do género (Figura 6.6 (b)), contrastando claramente com os padrões observados para os microrganismos procaríotas. Esta ausência de diferenciação significativa na diversidade intra-amostral dos eucariotas sugere que a riqueza e equitatividade das comunidades eucariotas dentro de cada local mantém-se relativamente constante.

A uniformidade dos índices de Shannon entre locais indica que cada ambiente suporta um número idêntico de táxons eucariotas com abundâncias relativamente equilibradas. Esta homogeneidade na diversidade local pode refletir uma capacidade intrínseca dos eucariotas de manter comunidades estruturalmente estáveis mesmo sob condições ambientais distintas. Fungos, leveduras e outros eucariotas possuem mecanismos de resistência robustos que lhes permitem coexistir em número e abundâncias idênticas dentro de cada habitat. Esta resiliência pode dever-se à sua versatilidade metabólica e à capacidade de explorar diferentes estratégias de sobrevivência dentro do mesmo ambiente, desde formas ativas de crescimento até estados dormentes, permitindo que múltiplos táxons coexistam de forma estável em cada local [428].

A ausência de diferenças significativas na alfa diversidade pode, portanto, refletir características biológicas intrínsecas destes microrganismos - elevada resistência, capacidade de dispersão, versatilidade metabólica e menor dependência de condições microambientais específicas - que resultam numa colonização mais uniforme, mesmo em contextos patrimoniais diversos.

No entanto, apesar de o teste ANOVA global, ao nível taxonómico da família, não ter revelado diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes locais ($p = 0,0645$), observou-se que duas comparações par a par - PintGoa vs PedraAlcobaça e PintGoa vs PedraCC - apresentaram valores de p -value inferiores a 0,05 (Anexo B, Tabela B.4). Isto pode acontecer porque a ANOVA testa diferenças globais entre todos os grupos, sendo um teste mais conservador. Se houver muita variabilidade interna nos grupos, a ANOVA pode não detetar diferenças, mesmo que algumas comparações individuais sejam significativas. As comparações post-hoc (*pairwise*, par-a-par) podem ser mais sensíveis a diferenças específicas; neste caso, e tendo em conta o valor do índice de Shannon, Goa parece ter uma diversidade intra-amstral significativamente diferente (e menor) em relação a Alcobaça e Convento de Cristo.

Ainda que estas interpretações não possam ser consideradas conclusivas à luz da significância estatística global, podem constituir indicadores importantes de possíveis padrões ecológicos. Por exemplo, a menor diversidade eucariota observada em Goa pode refletir condições ambientais mais seletivas impostas pelo clima subtropical húmido e influência marítima. A acumulação contínua de sais, combinado com elevada humidade relativa, pode limitar o número de espécies eucariotas capazes de colonizar e estabelecer-se no substrato pictórico. Este tipo de ambientes costeiros, apesar de poderem suportar espécies halotolerantes, tendem a reduzir a diversidade geral devido

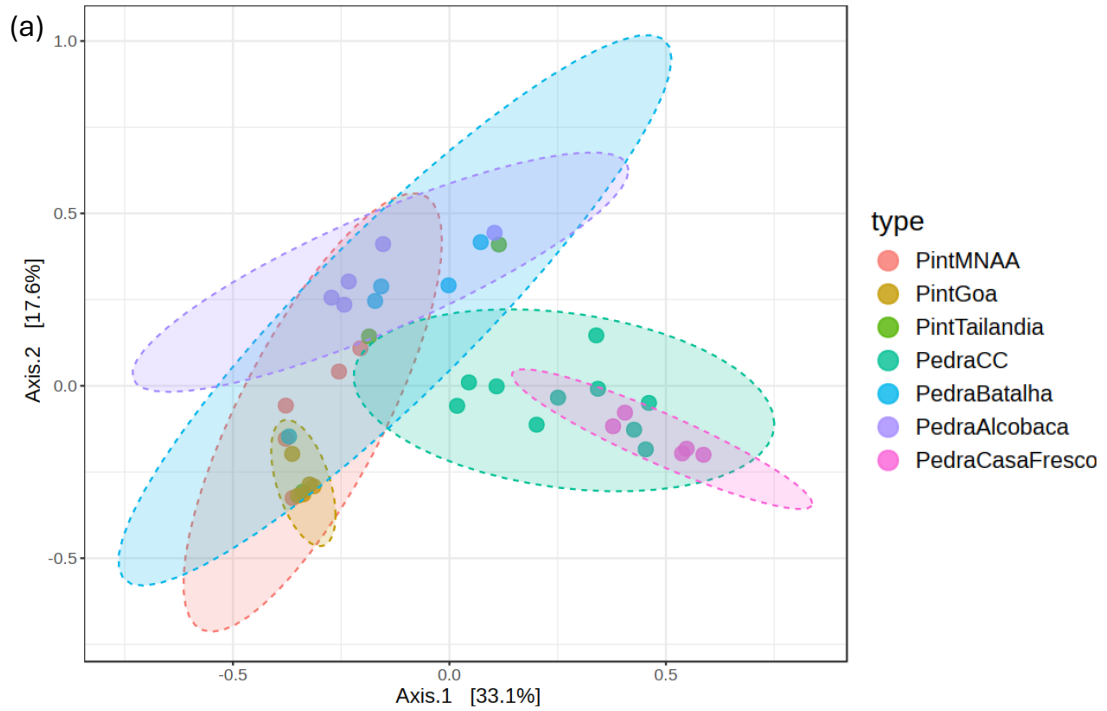
à pressão seletiva intensa que é exercida pela salinidade e flutuações de humidade. Embora esta seleção resulte numa comunidade local menos diversa, é altamente especializada e adaptada àquele ambiente. Por outro lado, os monumentos de pedra de Alcobaça e Convento de Cristo, estando em ambiente continental, com menor pressão salina e maior variabilidade de microhabitats (fissuras, poros da pedra, etc.), permite a coexistência de um maior número de espécies.

6.2.2.2. Beta diversidade

Para além da avaliação da diversidade intra-amostral, também foi analisada a diversidade entre amostras (β -diversidade) para identificar padrões de semelhança e distinção na composição fúngica entre os diferentes locais. Essa análise permite compreender como as comunidades eucariotas se estruturam em resposta às variações ambientais e ao tipo de substrato, evidenciando agrupamentos e dispersões que refletem as condições específicas de cada contexto patrimonial.

Os resultados da beta diversidade encontram-se representados sob a forma de gráfico de dispersão PCoA na Figura 6.7 e na Tabela B.5 do Anexo B constam os resultados da análise estatística comparativa entre as localidades, para o género e família eucariotas.

[PERMANOVA] F-value: 5,043; R-squared: 0,494; p-value: 0,001



[PERMANOVA] F-value: 4,387; R-squared: 0,459; p-value: 0,001

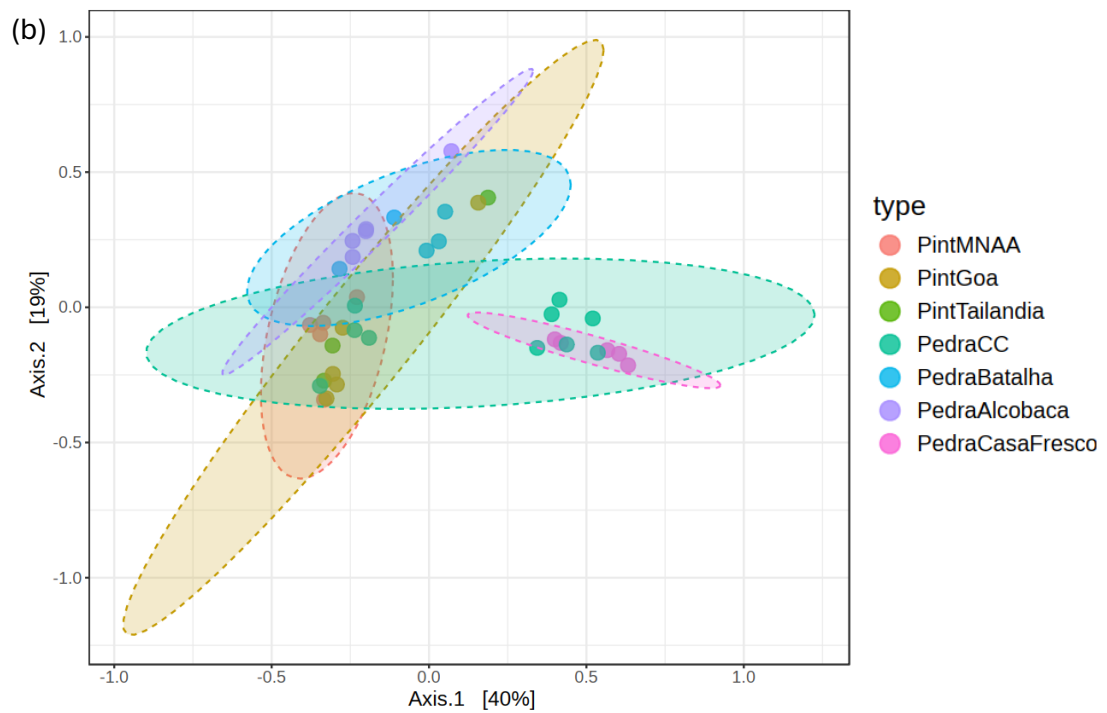


Figura 6.7: Gráfico de PCoA referente à beta diversidade das comunidades eucariotas ao nível de (a) Família e (b) Género.

A análise PERMANOVA para a beta-diversidade indicou diferenças altamente significativas entre os grupos (género: F -value = 4,38; R^2 = 0,46; p -value = 0,001 e família: F -value = 5,04; R^2 = 0,49; p -value = 0,001), evidenciando que a composição das comunidades eucariotas varia significativamente em função do local, tipo de substrato e ambiente. Os valores de R^2 de 0,46 (género) e 0,49 (família) indicam que cerca de metade da variação na composição das comunidades eucariotas pode ser explicada pelo fator "local", o que é consideravelmente elevado para estudos ecológicos, pois reforça a forte influência que fatores como tipo de substrato, exposição ambiental e localização geográfica podem exercer sobre a estrutura microbiana.

Ao nível da família (Figura 6.7 (a)), observa-se um claro agrupamento das amostras provenientes do interior, quer seja das galerias ou dos monumentos de pedra (PintMNAA, PintGoa, PintTailandia, PedraBatalha, PedraAlcobaça) separadas dos conjuntos cujas amostras são provenientes do exterior (PedraCC e PedraCasaFresco). As elipses de confiança mostram uma distinção marcada entre estes dois grandes grupos, indicando que a exposição direta a fatores ambientais como radiação solar, variações térmicas e microhabitats que são mais abertos, seleciona famílias eucariotas especializadas (de líquenes, fungos melanizados ou fototróficos), com capacidade de resistência a UV e capacidade de proliferar em superfícies rochosas expostas. Pelo contrário, as amostras interiores partilham condições de humidade mais estáveis e ausência de exposição direta à radiação, favorecendo certamente famílias típicas de ambientes mais fechados e controlados.

Neste sentido, os resultados da análise *pairwise* (Anexo B, Tabela B.5) reforçam esta separação. Por exemplo, ocorrem diferenças significativas entre as famílias de Goa e Casa de Fresco (F -value = 14,837, p -value = 0,010) e entre Goa e Convento de Cristo (F -value = 7,833, p -value = 0,002) evidenciando que a comunidade fúngica de pintura de cavalete em ambiente costeiro interior difere fortemente das comunidades de pedra exposta. Do mesmo modo, PintMNAA contrasta significativamente com PedraCC (F -value = 5,982, p -value = 0,001) e com PedraCasaFresco (F -value = 9,642, p -value = 0,007), sublinhando o impacto das condições controladas museológicas face à exposição ambiental exterior.

Adicionalmente, entre os próprios monumentos pétreos observaram-se padrões distintos, refletindo as diferenças entre ambientes interiores e exteriores. As comunidades do Mosteiro da Batalha e do Mosteiro de Alcobaça, ambos de interior, mostraram elevada semelhança, sem diferenças estatisticamente significativas, quer ao nível da família, quer ao nível do género (p -value = 0,381 para género; p -value = 0,428

para família), o que indica uma estrutura microbiana relativamente homogénea em condições interiores semelhantes. Em contraste, entre o Mosteiro da Batalha e a Casa de Fresco, e entre a Batalha e o Convento de Cristo, observam-se diferenças estatisticamente significativas, o que indica que a exposição direta ao exterior favorece comunidades fúngicas estruturalmente distintas das que se desenvolvem em ambientes interiores mais estáveis. Um padrão semelhante verifica-se para Alcobaça, com diferenças marcadas face à Casa de Fresco e ao Convento de Cristo, reforçando que fatores como a radiação solar, a amplitude térmica e as variações de humidade relativa são determinantes na seleção e atividade dos eucariotas.

Curiosamente, se compararmos dois ambientes interiores, mas de substratos distintos, ao nível do género (Figura 6.7 (b)), as diferenças ocorrem igualmente de forma significativa, por exemplo entre PintGoa vs PedraAlcobaça (F -value = 6,888, p -value = 0,006) e PintMNAA vs PedraAlcobaça (F -value = 6,749, p -value = 0,004), sublinhando que géneros eucariotas adaptados a substratos de pinturas de cavalete interiores (sob condições mais controladas) são estruturalmente diferentes daqueles capazes de colonizar materiais pétreos sujeitos à presença de sais. Estes resultados indicam que o tipo de substrato continua a exercer um efeito seletivo importante mesmo quando as condições ambientais globais (p.ex ausência de radiação solar direta) são semelhantes.

Por outro lado, as amostras da Casa de Fresco destacam-se por apresentar diferenças significativas com praticamente todos os outros grupos, tanto ao nível de género como de família ($p < 0,05$ em todas as comparações, exceto com o Convento de Cristo). Este resultado pode refletir a particularidade das amostras destes locais, que foram recolhidas em zonas expostas à radiação solar, precipitação e variações térmicas. Estas condições, aliadas a um substrato pétreo poroso, favoreceram a proliferação de líquenes e organismos fototróficos adaptados à colonização de superfícies de pedra expostas, o que justifica o perfil eucariótico observado. A ausência de diferenças significativas entre Casa de Fresco e Convento de Cristo pode ser justificada precisamente pela semelhança na exposição e substrato, que favorece ambientes ecológicos semelhantes.

É importante salientar também que, no entanto, apesar das separações claras entre grupos referidas acima, observa-se alguma sobreposição entre as elipses, sugerindo a presença de géneros e famílias com maior plasticidade ou ubiquidade, capazes de se adaptar aos diferentes microambientes.

Resumidamente, a análise da beta-diversidade revela a existência de dois grandes agrupamentos: um conjunto de amostras interiores, com comunidades

adaptadas a ambientes fechados e substratos mais protegidos, e outro exterior, com táxones especializados em sobrevivência sob condições de *stress*. Esta distinção reforça a importância de considerar o contexto ecológico de cada bem cultural na definição de estratégias de conservação microbiana.

6.2.2.3. Análise integrada das comunidades eucariotas: diferenças taxonómicas e padrões de abundância

De forma similar aos procariotas estudados anteriormente, nesta secção apresenta-se uma análise integrada dos resultados da ANOVA (Anexo B, Tabela B.6) e dos *heatmaps* referentes às famílias (Figura 6.8) e aos géneros (Figura 6.9) eucariotas, com o objetivo de identificar e visualizar quais deles mais contribuem para a diferenciação entre locais e substratos, permitindo associar padrões de abundância às condições ambientais e ao tipo de material analisado.

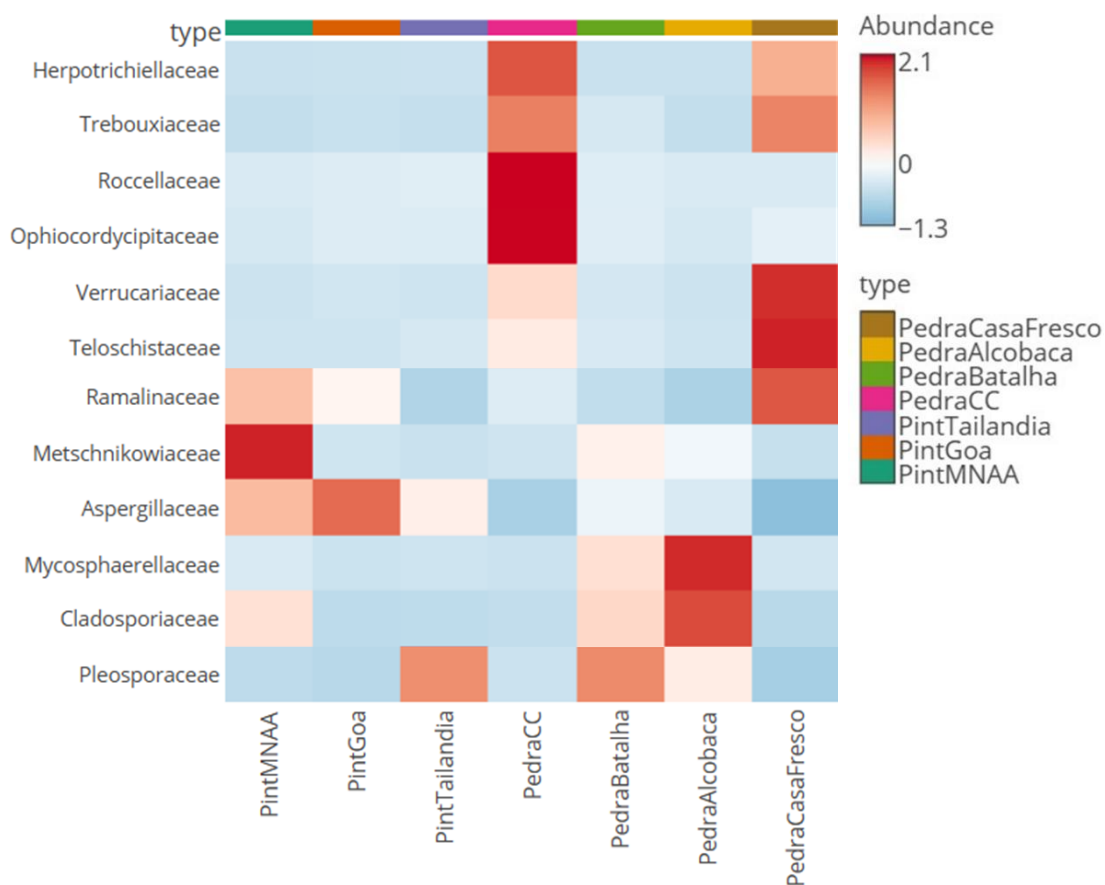


Figura 6.8: *Heatmap* da abundância relativa das principais famílias eucariotas. A intensidade da cor vermelha é proporcional à abundância do táxon. As amostras foram agrupadas por localidade na barra superior

Análises comparativas

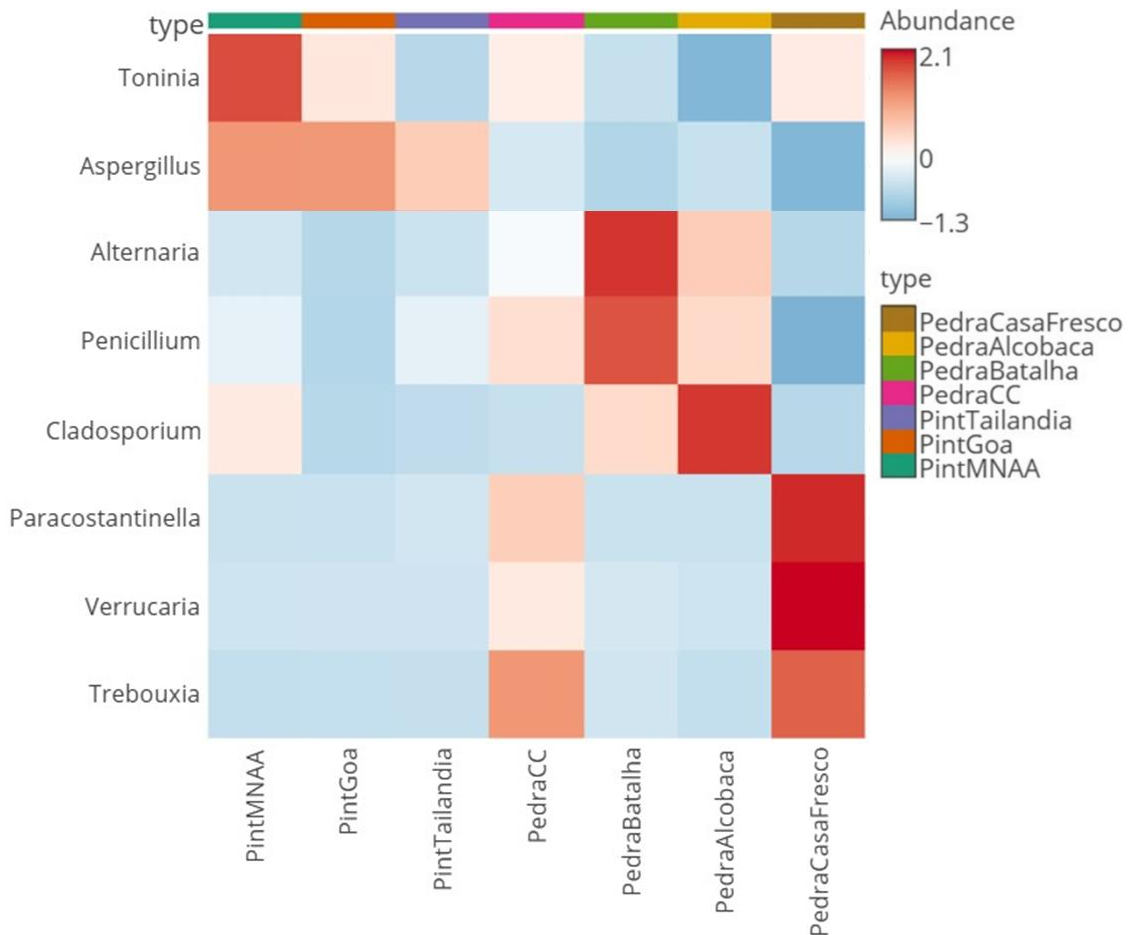


Figura 6.9: *Heatmap* da abundância relativa dos principais géneros eucariotas. A intensidade da cor vermelha é proporcional à abundância do táxon. As amostras foram agrupadas por localidade na barra superior

A análise da composição de géneros eucariotas revelou diferenças estatisticamente significativas entre locais (Anexo B, Tabela B.6), destacando-se seis géneros com valores de p -value e FDR < 0,05: *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Paracostantinella*, *Verrucaria*, *Trebouxia* e *Alternaria*, todos eles com associações frequentes à biodeterioração do Património Cultural. Ao nível taxonómico da família (Figura 6.8) destacam-se Cladosporiaceae, Aspergillaceae, Trebouxiaceae, Herpotrichiellaceae, Roccellaceae, Mycosphaerellaceae, Pleosporaceae e Teloschistaceae.

Nas pinturas estudadas do MNA, destaca-se a predominância dos géneros *Toninia* e *Aspergillus* (Figura 6.9). Este último, estatisticamente significativo (p -value = 0,001, FDR = 0,003), demonstra ser um marcador biológico importante de ambientes interiores, mas a sua presença deve ser interpretada considerando que este género é também um contaminante atmosférico ubíquo, frequentemente detetado no ar das reservas museológicas, mesmo sob condições controladas e monitorizadas. Este

gênero forma esporos muito leves e facilmente dissociáveis, tornando-os altamente dispersíveis, pelo que os membros de *Aspergillus* estão entre os mais numerosos detetados em ambientes interiores [429].

Esta dupla natureza de *Aspergillus* - como colonizador ativo e contaminante aéreo - explica a sua deteção consistente em ambientes museológicos, onde pode permanecer viável em estado latente até encontrar condições favoráveis para ativação metabólica. Quando ativo, possui elevada capacidade enzimática para degradar materiais orgânicos, incluindo aglutinantes e pigmentos da camada pictórica, mas também com elevada capacidade de deterioração da madeira, que pode igualmente influenciar o suporte, representando uma ameaça potencial à integridade das pinturas de cavalete. Aspergillaceae, em concordância com a presença abundante de *Aspergillus*, reforça o potencial biodeteriorativo destas comunidades sobre materiais orgânicos presentes nas pinturas.

Por outro lado, o género *Toninia* não se encontra na tabela de significância mas foi identificado em abundância no grupo de amostras deste local. Os membros deste género de fungo líquénico são frequentemente associados a substratos pétreos, pelo que a sua presença em contexto interior, em pintura de cavalete, é invulgar e provavelmente não reflete colonização ativa da pintura, mas sim uma contaminação ambiental, com base em esporos e fragmentos simbióticos em circulação no ar. O mesmo se pode sugerir para a presença significativa da família Ramalinaceae, a família de líquenes a que pertence *Toninia*.

Outra família de destaque nas amostras de pintura do MNAA foi Metschnikowiaceae, que inclui leveduras osmofílicas capazes de sobreviver em substratos com baixo teor de água, e que por esse motivo podem colonizar zonas ricas em aglutinantes orgânicos.

Nas amostras dos casos de estudo de Goa e Tailândia, *Aspergillus* foi identificado também como o género dominante e estatisticamente significativo, confirmando a sua adaptabilidade, pois é capaz de se desenvolver não só em ambientes mais controlados como no caso referido anteriormente, mas também em diferentes condições tropicais e subtropicais com maior humidade, onde a sua atividade enzimática e produção de metabolitos secundários podem ser intensificadas por estas condições ambientais, acelerando a degradação dos substratos pictóricos. No caso de Goa, tal predomínio está refletido a nível de família pela presença marcante de Aspergillaceae, enquanto na Tailândia a família dominante é Pleosporaceae (com diferenças significativas pela ANOVA), composta maioritariamente por fungos produtores de melanina e enzimas

lignocelulolíticas, capazes de colonizar superfícies ricas em celulose ou zonas com microfissuras, e igualmente provocar o escurecimento dos materiais, contribuindo para a degradação estética e química do substrato pictórico.

Por outro lado, as amostras recolhidas no Convento de Cristo apresentam comunidades especializadas dominadas por *Trebouxia* e *Paracostantinella*, ambos estatisticamente significativos (*Trebouxia*: p -value = 0,006, FDR = 0,012; *Paracostantinella*: p -value = 0,001, FDR = 0,003). A elevada significância de *Paracostantinella* pode indicar que este género é um marcador específico de ambientes pétreos exteriores expostos. *Trebouxia*, fotobionte liquénico extremamente resistente, é fundamental na associação com líquenes que colonizam superfícies rochosas através de penetração física, retenção de humidade e alteração mineralógica. A presença simultânea de uma alga fotossintética (*Trebouxia*) e de um fungo pertencente ao filo Ascomycota (*Paracostantinella*) pode sugerir a formação de estruturas liquénicas, compatíveis com o que se observava na amostragem, nas superfícies calcárias expostas à luz. Estes organismos contribuem para a biodeterioração endolítica e estética, por penetração no substrato e alteração da cor superficial.

Ao nível de família, a pedra do Convento de Cristo apresenta uma abundância elevada em famílias estatisticamente significativas, nomeadamente Herpotrichiellaceae (fungos melanizados resistentes à radiação UV frequentemente identificados em pedra [430,431]), Trebouiaceae (fotobiontes verdes) e Roccellaceae (uma família de líquenes pigmentados [432]). A combinação destas famílias aponta para uma comunidade de fungos e líquenes adaptada a condições exteriores extremas, com elevada resistência física e química, capaz de induzir alterações cromáticas e microfissuração superficial.

As amostras de pedra dos mosteiros da Batalha e Alcobaça distinguem-se também por comunidades com géneros estatisticamente significativos. No mosteiro da Batalha, *Alternaria* e *Penicillium* predominam, sendo *Alternaria* frequentemente descrita na literatura como um género com elevada afinidade por substratos pétreos, e capaz de formar biofilmes pigmentados em condições adequadas [433].

Em Alcobaça, é o género *Cladosporium* que domina com a maior significância estatística observada (p -value = 0,000, FDR = 0,000), indicando que este género é um marcador biológico extremamente específico deste ambiente. *Cladosporium* é amplamente conhecido pela sua resistência e pela capacidade de formar biofilmes superficiais e causar alterações cromáticas em pedra. Apesar de nestes dois locais os biofilmes rosa observados estarem maioritariamente relacionados com a presença de bactérias pigmentadas, é possível que os fungos presentes contribuam para outros tipos

de modificações superficiais ou interajam com as comunidades bacterianas na colonização do substrato. Por exemplo, podem facilitar a retenção de partículas, formar hifas que aumentam a rugosidade superficial ou produzir metabolitos secundários que, em conjunto com outras espécies microbianas, potenciam variações cromáticas ou a degradação do substrato.

Estas observações são coerentes com os resultados a nível da família, onde Pleosporaceae, Cladosporiaceae e Mycosphaerellaceae se destacam na Batalha, e Cladosporiaceae e Mycosphaerellaceae em Alcobaça. Estas famílias incluem fungos filamentosos frequentemente associados a colonização de superfícies minerais, capazes de produzir pigmentos e metabolitos orgânicos que favorecem a alteração química e física da pedra.

A Casa de Fresco apresenta o perfil mais diverso, com três géneros estatisticamente significativos: *Paracostantinella* (p -value = 0,001, FDR = 0,003), *Verrucaria* (p -value = 0,007, FDR = 0,012) e *Trebouxia* (p -value = 0,006, FDR = 0,012). A exposição à luz solar direta, aliada à porosidade da pedra e à disponibilidade de humidade proveniente de precipitação e condensação, cria condições favoráveis para a colonização de comunidades liquénicas e de fungos melanizados. A presença de *Verrucaria* aponta para uma comunidade liquénica bem desenvolvida e para um potencial de biodeterioração endolítica; *Paracostantinella*, sendo um género de fungo Ascomycota, pode estar associado a comunidades microbianas resistentes a condições ambientais extremas e contribuir para a estabilidade estrutural do biofilme; e *Trebouxia*, sendo uma alga fotossintética, reforça o carácter simbiótico da comunidade. Estas características sugerem que a superfície pétrea porosa e ornamentada deste local funciona como um potencial *hotspot* de biodeterioração biológica, tornando o controlo preventivo particularmente relevante.

Ao nível da família, a Casa de Fresco apresenta Herpotrichiellaceae, Trebouxiaceae, Verrucariaceae, Teloschistaceae e Ramalinaceae - todas fortemente associadas a comunidades liquénicas e fungos melanizados resistentes. Teloschistaceae, por exemplo, inclui líquenes fortemente pigmentados (laranja-amarelo) que provocam alterações cromáticas evidentes, enquanto Verrucariaceae e Ramalinaceae estão associadas a biodeterioração endolítica e fissuração superficial da pedra. Esta composição é indicativa de comunidades microbianas extremófilas, cuja atividade contribui significativamente para as alterações visuais observadas no substrato.

A correspondência entre os géneros mais abundantes no *heatmap* e aqueles identificados como estatisticamente significativos pela ANOVA demonstra que estas comunidades eucariotas representam marcadores biológicos fiáveis das condições ambientais específicas e que a composição de géneros eucariotas varia significativamente entre locais, com padrões bem distintos entre ambientes interiores e exteriores, e também entre tipos de substrato. Enquanto as pinturas dos locais interiores (MNAA, Goa e Tailândia) são dominados por géneros fúngicos ubíquos, com grande versatilidade metabólica e tolerantes a várias condições ambientais, como é o caso de *Aspergillus*, os exteriores apresentam géneros liquénicos melanizados, algas fotossintéticas e fungos Ascomycota frequentemente colonizadores de pedra (*Verrucaria*, *Trebouxia*, *Paracostantinella*). Estes dados reforçam mais uma vez a interação entre tipo de substrato, condições ambientais e grau de exposição, com implicações diretas na biodeterioração do Património, quer por processos químicos, físicos ou estéticos.

Ao nível taxonómico da família, observam-se tendências paralelas: ambientes interiores apresentam maior abundância de Aspergillaceae e Metschnikowiaceae, associadas a fungos ubíquos e leveduras adaptadas a baixa humidade, enquanto os exteriores são caracterizados por famílias liquénicas como Ramalinaceae, Verrucariaceae e Teloschistaceae, bem como por famílias de fungos melanizados, de que são exemplo Herpotrichiellaceae e Cladosporiaceae. Estas últimas, para além de conferirem maior resistência às comunidades face à radiação UV e à desidratação, também estão diretamente implicadas em biodeterioração endolítica, pigmentação superficial e fissuração da pedra, reforçando o papel destas famílias como marcadores ecológicos e indicadores de risco para a conservação.

Assim, a análise integrada das comunidades eucariotas (Tabela 6.2), considerando simultaneamente o tipo de substrato, o contexto ambiental e a localização geográfica, demonstra, tal como nas comunidades procariotas, respostas adaptativas a condições ecológicas específicas. De forma resumida:

- Os ambientes interiores de museus e galerias (MNAA, Goa, Tailândia) são dominados por famílias como Aspergillaceae e Metschnikowiaceae, associadas a fungos ubíquos e leveduras com potencial enzimático para degradar pigmentos e aglutinantes das pinturas.
- As pinturas de Goa e da Tailândia, embora partilhem o género *Aspergillus* como dominante, estão sujeitas a fatores ambientais distintos: Goa com maior influência marinha e humidade constante, Tailândia com regime de monções e variações

sazonais, refletindo-se na seleção de famílias adaptadas a oscilações climáticas, como Pleosporaceae.

- Os monumentos pétreos exteriores (Convento de Cristo e Casa de Fresco) apresentam um claro enriquecimento em famílias liquénicas e fotossintéticas, indicativas de colonização endolítica e pigmentação superficial e desempenham um papel central na alteração físico-química da pedra exposta.
- A diversidade e abundância de famílias liquénicas e melanizadas na Casa de Fresco reflete a sua fachada lateral exposta, funcionando como *hotspot* de biodiversidade e um ponto crítico de biodeterioração biológica.
- Os mosteiros da Batalha e de Alcobaça são marcados pela presença de Pleosporaceae, Cladosporiaceae e Mycosphaerellaceae, famílias adaptadas a microclimas estáveis mas com potencial para formação de biofilmes e alteração cromática da pedra.

Tabela 6.2: Comunidades eucariotas - integração entre o perfil microbiano, o tipo de substrato, o local e as condições ambientais

Local	Condições ambientais dominantes	Perfil microbiano típico	Implicações biodeterioração
MNAA (Lisboa, Portugal)	Microclima museológico com controlo de temperatura e humidade	Ramalinaceae; Metschnikowiaceae; Aspergillaceae	Colonização ativa e capacidade enzimática: degradação de materiais orgânicos da camada pictórica
Galeria Vice-Reis (Goa, Índia)	Clima subtropical/marítimo, elevada humidade e influência salina	Aspergillaceae	Elevada capacidade de adaptação a condições salinas e degradação dos substratos pictóricos
Galeria Universidade Silpakorn (Bangkok, Tailândia)	Clima tropical húmido, elevadas temperaturas e humidade	Pleosporaceae	Produção de melanina e enzimas lignocelulolíticas
Mosteiro de Alcobaça (Alcobaça, Portugal)	Ambiente interior de monumento em pedra com microclima estável	Cladosporiaceae; Mycosphaerellaceae	Produção de pigmentos e metabolitos orgânicos: alteração química e física da pedra

(continua)

Tabela 6.2 (continuação)

Local	Condições ambientais dominantes	Perfil microbiano típico	Implicações biodeterioração
Mosteiro da Batalha (Batalha, Portugal)	Ambiente interior de monumento em pedra com microclima estável	Pleosporaceae; Cladosporiaceae; Mycosphaerellaceae	Produção de pigmentos e metabolitos orgânicos: alteração química e física da pedra
Convento de Cristo (Tomar, Portugal)	Ambiente exterior de pedra porosa sujeito a variações térmicas e radiação solar	Herpotrichiellaceae; Trebouxiaceae; Roccellaceae; Ophiocordycipitaceae	Alterações cromáticas e microfissuração superficial
Casa de Fresco (Évora, Portugal)	Ambiente exterior de pedra porosa sujeito a variações térmicas e radiação solar	Herpotrichiellaceae; Trebouxiaceae; Verrucariaceae; Teloschistaceae; Ramalinaceae	Biodeterioração endolítica, pigmentação superficial e fissuração da pedra

Apesar dos contributos alcançados, importa reconhecer algumas limitações metodológicas deste estudo. Em primeiro lugar, a dependência de dados metagenómicos filogenéticos significa que a presença de determinados microrganismos não pode ser diretamente interpretada como atividade biodeteriogénica efetiva. Embora ferramentas preditivas como PICRUSt2 ou FUNGuild possam gerar hipóteses funcionais, optou-se por não as aplicar nesta fase, devido à escassa representação de microrganismos patrimoniais em bases de dados de referência, o que poderia enviesar os resultados. Em alternativa, privilegiou-se a integração com dados bioquímicos (ex.: ensaios ATP e desidrogenases). Futuramente, a utilização combinada de abordagens preditivas com validação experimental poderá acrescentar uma camada funcional mais completa à interpretação dos resultados.

Um segundo ponto a considerar é a potencial presença de contaminantes ambientais ou de reagentes, particularmente em géneros ubíquos como *Aspergillus* ou *Cladosporium*. Para mitigar este risco, foram aplicados procedimentos laboratoriais rigorosos (esterilização de material e utilização de controlos negativos).

Por fim, a heterogeneidade dos dados analisados, envolvendo simultaneamente pinturas e substratos pétreos, constitui um desafio metodológico. Diferenças no tipo de suporte, condições de amostragem e ambientes de recolha podem introduzir vieses na comparação integrada. No entanto, esta diversidade também representa a realidade

multifacetada do Património Cultural e reforça a pertinência da abordagem transversal aqui adotada.

Capítulo 7

Síntese e perspectivas futuras

Capítulo 7 – Síntese e Perspetivas Futuras

A preservação do Património Cultural permanece um desafio central para a ciência e para a sociedade, uma vez que está em causa a salvaguarda e transmissão de bens que sustentam a nossa herança histórica e identidade coletiva. Entre os vários agentes de degradação, a atividade microbiana tem vindo a destacar-se pela sua relevância crescente, tornando imperativa a avaliação de estratégias de controlo que sejam simultaneamente eficazes e compatíveis com os materiais originais.

Partindo desta premissa, a presente tese desenvolveu uma abordagem multidisciplinar, combinando técnicas de análise molecular com metodologias complementares, com o objetivo de responder a problemáticas concretas relacionadas com a preservação de monumentos e obras de arte. Os resultados obtidos ao longo desta investigação constituem um contributo para o aprofundamento do conhecimento nos domínios da biodeterioração do património, fornecendo dados relevantes para a definição de práticas de conservação mais informadas e cientificamente sustentadas. Ao integrar ferramentas da bioquímica analítica na avaliação da biodeterioração, esta tese sublinha o papel da bioquímica enquanto disciplina-chave no estudo e controlo de processos microbiológicos que afetam o Património Cultural. Em particular, os dados gerados mostraram-se úteis no apoio a intervenções de restauro realizadas em monumentos analisados no âmbito deste trabalho.

Este capítulo final sintetiza os contributos essenciais desta investigação para o avanço do conhecimento científico na interface entre bioquímica, microbiologia e conservação do Património Cultural.

A presente tese centrou-se na caracterização e compreensão dos processos de biodeterioração microbiana em Património Cultural, com especial foco em pinturas antigas e monumentos pétreos de elevado valor histórico. Os resultados obtidos ao longo dos diferentes capítulos permitiram identificar padrões de colonização específicos, com comunidades microbianas que variam em função do tipo de substrato, das condições ambientais e do estado de conservação das obras. Foram identificados microrganismos recorrentes, como *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, líquenes e bactérias pigmentadas, com impacto direto na alteração estética e estrutural dos materiais. Adicionalmente, os ensaios de simulação permitiram observar, em contexto

controlado, o comportamento destes microrganismos e testar a eficácia de diferentes compostos antimicrobianos.

Do ponto de vista bioquímico, a utilização de ensaios de quantificação da atividade metabólica revelou-se essencial para a avaliação funcional das comunidades microbianas. Estes métodos forneceram indicadores objetivos da viabilidade celular antes e após a aplicação de biocidas, contribuindo de forma determinante para a validação da eficácia dos tratamentos testados.

As análises comparativas realizadas entre diferentes locais e tipologias patrimoniais evidenciaram a importância de considerar o ambiente como fator de seleção ecológica das comunidades microbianas. Fatores como salinidade, radiação UV, humidade relativa e exposição ao ar livre moldam a composição e resiliência dos microrganismos, influenciando diretamente a natureza e intensidade dos processos de biodeterioração.

Em termos globais, esta tese reforça a relevância da bioquímica enquanto disciplina fundamental para a compreensão dos mecanismos de biodeterioração, não apenas ao nível da identificação microbiana, mas sobretudo na avaliação da sua atividade funcional e impacto nos materiais patrimoniais. A aplicação de marcadores bioquímicos complementares às abordagens moleculares revelou-se uma mais-valia na definição de estratégias de conservação mais eficazes, sustentadas e ajustadas à realidade microbiológica de cada objeto ou monumento.

Este trabalho reforça a importância de abordagens integradas na conservação do património, destacando a bioquímica como uma ferramenta crítica para diagnosticar, quantificar e mitigar os efeitos da atividade microbiana em materiais históricos. Ao conjugar investigação laboratorial com aplicação prática, a tese contribui para o desenvolvimento de soluções mais eficazes, fundamentadas e ajustadas aos desafios reais da preservação do Património Cultural.

Com base nos estudos apresentados nos capítulos anteriores, é possível extrair um conjunto de conclusões que sintetizam os principais contributos desta investigação.

Os estudos de **biodeterioração em pintura antiga** revelaram que:

- As pinturas revelaram-se substratos seletivos, colonizados por microrganismos com capacidades adaptativas específicas, como resistência a ambientes extremos, salinidade elevada ou produção de enzimas hidrolíticas.

- A composição das comunidades microbianas variou consoante fatores como o estado de conservação, tipo de suporte (madeira, tela, etc.), exposição à luz e condições ambientais, reforçando a importância do contexto local.
- Fungos do filo Ascomycota e géneros como *Aspergillus*, *Penicillium* ou *Cladosporium* surgem de forma recorrente, confirmando o seu papel central nos processos de deterioração pictórica.
- Bactérias pertencentes aos filós *Actinobacteria*, *Firmicutes* e *Proteobacteria* também foram identificadas, indicando que, mesmo em cenários dominados por fungos, os procariontes podem contribuir para alterações estéticas e estruturais.
- Ensaíos *in vitro* demonstraram a eficácia de alguns biocidas no controlo de comunidades biodeteriogénicas, embora se reforce a necessidade de validar estes resultados em contextos reais.
- A compreensão detalhada da composição e dinâmica das comunidades microbianas é fundamental para definir estratégias de conservação e intervenção mais adequadas às necessidades específicas de cada obra de arte.

No que respeita aos estudos de biodeterioração em **monumentos construídos em pedra**, os resultados demonstraram que:

- A biocolonização constitui um dos problemas mais evidentes em monumentos pétreos, envolvendo comunidades complexas de fungos, bactérias e líquenes, muitas vezes responsáveis por alterações cromáticas, manchas e degradação estrutural.
- Os líquenes e fungos filamentosos (sobretudo Ascomycota) desempenham um papel central nos processos de biodeterioração, frequentemente em associação com comunidades bacterianas adaptadas a ambientes extremos, como géneros halotolerantes ou pigmentados.
- As comunidades microbianas revelaram variações significativas mesmo entre zonas distintas do mesmo monumento, destacando como a localização interna ou externa, a proximidade a fontes de humidade ou a natureza do substrato influenciam a biodeterioração observada.
- A utilização de metodologias complementares — desde técnicas tradicionais de cultura até abordagens independentes de cultura, como NGS ou sequenciação de terceira geração — mostrou-se essencial para obter uma caracterização mais completa das comunidades e para superar limitações de cada método isolado.
- A identificação de microrganismos associados a pigmentação intensa confirmou a relação direta entre atividade microbiana e alterações estéticas observáveis nos monumentos.

- A aplicação de antimicrobianos, em particular do Biotin-T[®], mostrou-se eficaz na inibição do crescimento fúngico e, no caso da Casa de Fresco, foi inclusive incorporado no processo real de restauro, demonstrando a relevância prática dos ensaios laboratoriais para intervenções concretas de conservação.
- Os resultados obtidos nestes estudos, que combinam monitorização microbiológica e aplicação seletiva de tratamentos, são fundamentais para a proteção e preservação destes monumentos de elevado valor cultural e histórico.

No âmbito dos **ensaios de biocolonização e simulação** realizados em pedra calcária, os dados obtidos evidenciaram os seguintes aspetos:

- O isolado do género *Gordonia*, utilizado no estudo, tem uma elevada capacidade de produção de carotenos, quer seja *in-vitro* como *in-situ*, e parece produzi-los com uma cor mais intensa quando exposta à luz solar.
- O efeito antimicrobiano *in-vitro*, contra o isolado referido acima, foi consideravelmente notório para os biocidas Biotin-T[®] e Preventol[®], sendo menor para o biocida à base de OEs (Syrá-Óleovictis[®]) e inexistente para a solução de limpeza utilizada.
- Quando aplicados em pedra calcária, todos os compostos testados apresentaram um efeito biocida inicial, refletido numa redução significativa da atividade celular logo após a aplicação, confirmando a eficácia imediata dos tratamentos.
- O comportamento ao longo do tempo revelou diferenças marcadas entre os biocidas: alguns mantiveram a eficácia de forma mais consistente, enquanto outros permitiram uma ligeira recuperação da atividade metabólica.
- O Biotin-T[®] destacou-se como o tratamento mais eficaz e estável, demonstrando não apenas a preservação da aparência original do substrato após a aplicação, mas também baixos níveis residuais de atividade metabólica e viabilidade celular. Estes resultados reforçam o seu elevado potencial para aplicação em contextos de conservação patrimonial.
- O Preventol[®] revelou oscilações na eficácia ao longo das semanas, enquanto os ensaios com o biocida à base de OEs apresentaram os níveis mais elevados de viabilidade microbiana ao longo do tempo, evidenciando menor eficácia. A solução de limpeza com álcool isopropílico e água destilada foi eficaz na remoção dos pigmentos carotenoides, mas revelou-se ineficaz na inibição do crescimento da bactéria em estudo.

- Do ponto de vista bioquímico, esta investigação destaca a relevância de métodos baseados em quantificação da atividade celular, na avaliação da viabilidade microbiana após tratamentos antimicrobianos. Estas abordagens permitiram uma análise funcional das comunidades colonizadoras para além da sua composição taxonómica, oferecendo indicadores bioquímicos objetivos da eficácia dos biocidas testados.

A análise integrada de substrato, microbiota e ambiente revelou que:

- A interação entre microrganismos, substrato e ambiente é determinante para a dinâmica de colonização, refletindo-se tanto na diversidade como na intensidade dos processos de degradação.
- A composição e dinâmica das comunidades microbianas refletem a interação entre fatores ambientais (humidade, exposição solar, salinidade) e características intrínsecas do substrato, revelando variações significativas entre diferentes monumentos ou pinturas.
- Nos ambientes interiores predominam *Aspergillaceae* e *Metschnikowiaceae*, fungos ubíquos e leveduras com potencial enzimático para degradar pigmentos e aglutinantes, enquanto nos exteriores destacam-se comunidades liquénicas e melanizadas (por exemplo *Verrucaria*), adaptadas à radiação e a outros fatores de stress.
- As condições ambientais específicas de cada local, de que se destacam a influência marinha em Goa, o regime de clima tropical na Tailândia ou a salinidade em Alcobaça, funcionam como filtros ecológicos, conduzindo à seleção de comunidades particulares.
- Em suportes pétreos, famílias liquénicas e fotossintéticas associam-se à alteração físico-química da pedra, enquanto fungos melanizados contribuem para a fissuração e escurecimento.

A investigação aqui desenvolvida abre caminho para novas abordagens e aprofundamentos que merecem ser explorados em trabalhos futuros, entre os quais se destacam:

- Simulação Ambiental: Ensaios com *Gordonia sp.* em câmaras de envelhecimento acelerado, que simulem condições ambientais (radiação,

temperatura, humidade), permitirão estudar a pigmentação e resistência bacteriana de forma mais próxima da realidade.

- **Ampliação do Repertório de Biocidas:** A inclusão de novos compostos, com diferentes mecanismos de ação, poderá enriquecer a base comparativa e levar à identificação de soluções mais eficazes e seguras para a conservação.
- **Integração com Técnicas Não Invasivas:** A combinação de dados moleculares com técnicas de imagem (ex: fluorescência, hiperespectral) poderá permitir uma monitorização contínua, não destrutiva e mais precisa das áreas colonizadas.
- **Modelação Preditiva de Risco:** O desenvolvimento de modelos ecológicos que integrem dados ambientais e microbiológicos poderá apoiar a previsão de cenários de biodeterioração e otimizar estratégias preventivas.

Referências

Referências

1. Bauer, M.A.; Kainz, K.; Ruckenstuhl, C.; Madeo, F.; Carmona-Gutierrez, D. Murals Meet Microbes: At the Crossroads of Microbiology and Cultural Heritage. *Microb. Cell* **2021**, *8*, 276–279, doi:10.15698/MIC2021.12.765.
2. Ding, X.; Lan, W.; Gu, J.D. A Review on Sampling Techniques and Analytical Methods for Microbiota of Cultural Properties and Historical Architecture. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, 1–15, doi:10.3390/app10228099.
3. Tiano, P. Biodegradation of Cultural Heritage: Decay Mechanisms and Control Methods. *CNR-Centro di Stud. Sulle Cause Deperimento e Metod. Conserv. Opere d'Arte* **2009**.
4. Cardoni, M.; Caracciolo, A.; Grenni, P. Fluorescence in Situ Hybridization Technique: A Tool Useful for Detecting Cultural Heritage Biodeteriogens. In *Sciences and Technologies applied to Cultural Heritage I*; Baldi, M., Vittozzi, G., Eds.; Copyright: Itália, 2019; pp. 34–44.
5. Yadav, M.; Gupta, V. Biodeterioration of Cultural Heritage: An Overview. *J. Nat. Remedies* **2020**, *21*, 80–85.
6. Hueck, H.. The Biodeterioration of Materials—an Appraisal. *Int. Biodeterior. Biodegradation* **2001**, *48*, 5–11, doi:https://doi.org/10.1016/S0964-8305(01)00061-0.
7. Rosado, T.; Silva, M.; Dias, L.; Candeias, A.; Gil, M.; Mirão, J.; Pestana, J.; Caldeira, A.T. Microorganisms and the Integrated Conservation-Intervention Process of the Renaissance Mural Paintings from Casas Pintadas in Évora – Know to Act, Act to Preserve Tânia. *J. King Saud Univ. - Sci.* **2017**, *29*, 478–486, doi:10.1016/j.jksus.2017.09.001.
8. Gaylarde, C.; Ribas Silva, M.; Warscheid, T. Microbial Impact on Building Materials: An Overview. *Mater. Struct.* **2003**, *36*, 342–352, doi:10.1617/13867.
9. McNamara, C.; Konkol, N.; Mitchell, R. Microbial Deterioration of Cultural Heritage Materials. In *Environmental Microbiology*; Mitchell, R., Gu, J.-D., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, 2010; pp. 137–152 ISBN 9780470177907.
10. Beata, G. The Use of -Omics Tools for Assessing Biodeterioration of Cultural Heritage: A Review. *J. Cult. Herit.* **2020**, *45*, 351–361, doi:10.1016/j.culher.2020.03.006.
11. Joseph, E. *Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage*; Joseph, E., Ed.; Springer, 2021; ISBN 9783030694104.
12. Grottoli, A.; Beccaccioli, M.; Zoppis, E.; Fratini, R.S.; Schifano, E.; Santarelli, M.L.; Uccelletti, D.; Reverberi, M. Nanopore Sequencing and Bioinformatics for Rapidly Identifying Cultural Heritage Spoilage Microorganisms. *Front. Mater.* **2020**, *7*, 1–11, doi:10.3389/fmats.2020.00014.
13. Dakal, T.C.; Cameotra, S.S. Microbially Induced Deterioration of Architectural Heritages: Routes and Mechanisms Involved. *Environ. Sci. Eur.* **2012**, *24*, 1–13, doi:10.1186/2190-4715-24-36.
14. Pyzik, A.; Ciuchcinski, K.; Dziurzynski, M.; Dziewit, L. The Bad and the Good-Microorganisms in Cultural Heritage Environments-an Update on Biodeterioration and Biotreatment Approaches. *Materials (Basel)*. **2021**, *14*, 1–15,

Referências

- doi:10.3390/ma14010177.
15. Tyagi, P.; Verma, R.K.; Jain, N. Fungal Degradation of Cultural Heritage Monuments and Management Options. *Curr. Sci.* **2021**, *121*, 1553–1560, doi:10.18520/cs/v121/i12/1553-1560.
 16. Allsopp, D.; Seal, K.J.; Gaylarde, C.C. *Introduction to Biodeterioration*; Second.; Cambridge University Press, 2004; Vol. 24; ISBN 0521821355.
 17. Palla, F.; Barresi, G. *Biotechnology and Conservation of Cultural Heritage*; Palla, F., Barresi, G., Eds.; Springer: Palermo, Italy, 2017; ISBN 9783319461687.
 18. Gaylarde, C. Influence of Environment on Microbial Colonization of Historic Stone Buildings with Emphasis on Cyanobacteria. *Heritage* **2020**, *3*, 1469–1482, doi:10.3390/heritage3040081.
 19. Sterflinger, K.; Piñar, G. Microbial Deterioration of Cultural Heritage and Works of Art - Tilting at Windmills? *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 9637–9646, doi:10.1007/s00253-013-5283-1.
 20. Negi, A.; Sarethy, I.P. Microbial Biodeterioration of Cultural Heritage: Events, Colonization, and Analyses. *Microb. Ecol.* **2019**, *78*, 1014–1029, doi:10.1007/s00248-019-01366-y.
 21. Li, Q.; Zhang, B.; He, Z.; Yang, X. Distribution and Diversity of Bacteria and Fungi Colonization in Stone Monuments Analyzed by High-Throughput Sequencing. *PLoS One* **2016**, *11*, 1–17, doi:10.1371/journal.pone.0163287.
 22. Keshari, N.; Adhikary, S.P. Ecology of Cyanobacteria on Stone Monuments, Biodeterioration, and the Conservation of Cultural Heritage. In *Cyanobacteria: An Economic Perspective*; Sharma, N., Rai, A., Stal, L., Eds.; West Bengal, India, 2013; pp. 73–90 ISBN 9781118402238.
 23. Ferrari, C.; Santunione, G.; Libbra, A.; Muscio, A.; Sgarbi, E.; Siligardi, C.; Barozzi, G.S. Review on the Influence of Biological Deterioration on the Surface Properties of Building Materials: Organisms, Materials, and Methods. *Int. J. Des. Nat. Ecodynamics* **2015**, *10*, 21–39, doi:10.2495/DNE-V10-N1-21-39.
 24. Zhao, A.; Sun, J.; Liu, Y. Understanding Bacterial Biofilms: From Definition to Treatment Strategies. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2023**, *13*, 1–23, doi:10.3389/fcimb.2023.1137947.
 25. Mihajlovski, A.; Seyer, D.; Benamara, H.; Bousta, F.; Di Martino, P. An Overview of Techniques for the Characterization and Quantification of Microbial Colonization on Stone Monuments. *Ann. Microbiol.* **2015**, *65*, 1243–1255, doi:10.1007/s13213-014-0956-2.
 26. Scheerer, S. *Microbial Biodeterioration of Outdoor Stone Monuments*, Cardiff, 2008.
 27. Popović, S.; Krizmanić, J.; Vidaković, D.; Karadžić, V.; Milovanović, Ž.; Pečić, M.; Subakov Simić, G. Biofilms in Caves: Easy Method for the Assessment of Dominant Phototrophic Groups/Taxa in Situ. *Environ. Monit. Assess.* **2020**, *192*, doi:10.1007/s10661-020-08686-4.
 28. Gu, J.-D.; Katayama, Y. Microbiota and Biochemical Processes Involved in Biodeterioration of Cultural Heritage and Protection. In *Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage*; Joseph, E., Ed.; Springer, Cham, 2021; pp. 37–58.

29. Warscheid, T.; Braams, J. Biodeterioration of Stone: A Review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2000**, *46*, 343–368, doi:10.1016/S0964-8305(00)00109-8.
30. Martínez-Cámara, S.; Ibañez, A.; Rubio, S.; Barreiro, C.; Barredo, J.-L. Main Carotenoids Produced by Microorganisms. *Encyclopedia* **2021**, *1*, 1223–1245, doi:10.3390/encyclopedia1040093.
31. Vila, E.; Hornero-Méndez, D.; Azziz, G.; Lareo, C.; Saravia, V. Carotenoids from Heterotrophic Bacteria Isolated from Fildes Peninsula, King George Island, Antarctica. *Biotechnol. Reports* **2019**, *21*, e00306, doi:10.1016/j.btre.2019.e00306.
32. Sajjad, W.; Din, G.; Rafiq, M.; Iqbal, A.; Khan, S.; Zada, S.; Ali, B.; Kang, S. Pigment Production by Cold-Adapted Bacteria and Fungi: Colorful Tale of Cryosphere with Wide Range Applications. *Extremophiles* **2020**, *24*, 447–473, doi:10.1007/s00792-020-01180-2.
33. Silva, T.P.; Paixão, S.M.; Alves, L. Ability of *Gordonia* Alkanivorans Strain 1B for High Added Value Carotenoids Production. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 58055–58063, doi:10.1039/c6ra08126f.
34. Cojoc, L.R.; Enache, M.I.; Neagu, S.E.; Lungulescu, M.; Setnescu, R.; Ruginescu, R.; Gomoiu, I. Carotenoids Produced by Halophilic Bacterial Strains on Mural Paintings and Laboratory Conditions. *FEMS Microbiol. Lett.* **2019**, *366*, 1–8, doi:10.1093/femsle/fnz243.
35. Naz, T.; Ullah, S.; Nazir, Y.; Li, S.; Iqbal, B.; Liu, Q.; Mohamed, H.; Song, Y. Industrially Important Fungal Carotenoids: Advancements in Biotechnological Production and Extraction. *J. Fungi* **2023**, *9*, 1–29, doi:10.3390/jof9050578.
36. Lepinay, C.; Mihajlovski, A.; Tournon, S.; Seyer, D.; Bousta, F.; Di Martino, P. Bacterial Diversity Associated with Saline Efflorescences Damaging the Walls of a French Decorated Prehistoric Cave Registered as a World Cultural Heritage Site. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2018**, *130*, 55–64, doi:10.1016/j.ibiod.2018.03.016.
37. Pinna, D. Microbial Growth and Its Effects on Inorganic Heritage Materials. In *Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage*; Joseph, E., Ed.; Springer, Cham: Neuchâtel, Switzerland, 2021; pp. 3–35 ISBN 978-3-030-69411-1.
38. Ettenauer, J.D.; Jurado, V.; Piñar, G.; Miller, A.Z.; Santner, M.; Saiz-Jimenez, C.; Sterflinger, K. Halophilic Microorganisms Are Responsible for the Rosy Discolouration of Saline Environments in Three Historical Buildings with Mural Paintings. *PLoS One* **2014**, *9*, 1–8, doi:10.1371/journal.pone.0103844.
39. Lewandowski, Z.; Beyenal, H. Mechanisms of Microbially Influenced Corrosion. In *Marine and Industrial Biofouling*; Flemming, H.-C., Murthy, P.S., Venkatesan, R., Cooksey, K., Eds.; Springer, Berlin: Los Angeles, USA, 2009; pp. 35–64 ISBN 9783540681137.
40. Kip, N.; Van Veen, J.A. The Dual Role of Microbes in Corrosion. *Int. Soc. Microb. Ecol.* **2015**, *9*, 542–551, doi:10.1038/ismej.2014.169.
41. Ejileugha, C.; Ezealisiji, K.M.; Ezejiofor, A.N.; Orisakwe, O.E. Microbiologically Influenced Corrosion: Uncovering Mechanisms and Discovering Inhibitor—Metal and Metal Oxide Nanoparticles as Promising Biocorrosion Inhibitors. *J. Bio-Tribo-Corrosion* **2021**, *7*, 1–21, doi:10.1007/s40735-021-00545-0.
42. Money, N.P. The Fungal Dining Habit: A Biomechanical Perspective. *Mycologist*

Referências

- 2004**, 18, 71–76, doi:10.1017/S0269915X04002034.
43. Tonon, C.; Breitenbach, R.; Voigt, O.; Turci, F.; Gorbushina, A.A.; Favero-Longo, S.E. Hyphal Morphology and Substrate Porosity -Rather than Melanization- Drive Penetration of Black Fungi into Carbonate Substrates. *J. Cult. Herit.* **2021**, 48, 244–253, doi:10.1016/j.culher.2020.11.003.
 44. Hoffland, E.; Kuyper, T.W.; Wallander, H.; Plassard, C.; Gorbushina, A.A.; Haselwandter, K.; Holmström, S.; Landeweert, R.; Lundström, U.S.; Rosling, A.; et al. The Role of Fungi in Weathering. *Front. Ecol. Environ.* **2004**, 2, 258–264, doi:10.1890/1540-9295(2004)002[0258:TROFIW]2.0.CO;2.
 45. Marques, J.; Gonçalves, J.; Oliveira, C.; Favero-Longo, S.E.; Paz-Bermúdez, G.; Almeida, R.; Prieto, B. On the Dual Nature of Lichen-Induced Rock Surface Weathering in Contrasting Micro-Environments. *Ecology* **2016**, 97, 2844–2857, doi:10.1002/ecy.1525.
 46. Willis, A.; Woodhouse, J.N. Defining Cyanobacterial Species: Diversity and Description Through Genomics. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* **2020**, 39, 101–124, doi:10.1080/07352689.2020.1763541.
 47. Sciuto, K.; Moro, I. Cyanobacteria: The Bright and Dark Sides of a Charming Group. *Biodivers. Conserv.* **2015**, 24, 711–738, doi:10.1007/s10531-015-0898-4.
 48. Crispim, C.A.; Gaylarde, C.C. Cyanobacteria and Biodeterioration of Cultural Heritage: A Review. *Microb. Ecol.* **2005**, 49, 1–9, doi:10.1007/s00248-003-1052-5.
 49. Mallo, A.C.; Nitiu, D.S.; Elfades, L.A.; Saparrat, M.C.N. Fungal Degradation of Cellulosic Materials Used as Support for Cultural Heritage. *Int. J. Conserv. Sci.* **2017**, 8, 619–632.
 50. Sterflinger, K. Fungi: Their Role in Deterioration of Cultural Heritage. *Fungal Biol. Rev.* **2010**, 24, 47–55, doi:10.1016/j.fbr.2010.03.003.
 51. Gadd, G.M.; Fomina, M.; Pinzari, F. Fungal Biodeterioration and Preservation of Cultural Heritage, Artwork, and Historical Artifacts: Extremophily and Adaptation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2024**, 88, 1–62, doi:https://doi.org/10.1128/membr.00200-22.
 52. Salvadori, O.; Municchia, A.C. The Role of Fungi and Lichens in the Biodeterioration of Stone Monuments. *Open Conf. Proc. J.* **2016**, 7, 39–54, doi:10.2174/22102892016070.
 53. Gu, J.-D.; Katayama, Y. Microbiota and Biochemical Processes Involved in Biodeterioration of Cultural Heritage and Protection. In *Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage*; Joseph, E., Ed.; Springer: Switzerland, 2021; pp. 37–53 ISBN 9783030694104.
 54. Ranković, B.; Kosanić, M. Biotechnological Substances in Lichens. In *Natural Bioactive Compounds*; Sinha, R., Häder, D.-P., Eds.; Academic Press: Kragujevac, Serbia, 2021; pp. 249–265 ISBN 9780128206553.
 55. Speranza, M.; Sanz, M.; Oujja, M.; de los Rios, A.; Wierzchos, J.; Pérez-Ortega, S.; Castillejo, M.; Ascaso, C. Nd-YAG Laser Irradiation Damages to *Verrucaria Nigrescens*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2013**, 84, 281–290, doi:10.1016/j.ibiod.2012.02.010.
 56. Shahid, M.; Rasool, A.; Anjum, F.; Rehman, M.T. Biomedical Perspectives of Lichen-Derived Products. In *Lichen-Derived Products: Extraction and*

- Applications*; Yusuf, M., Ed.; Wiley-Scrivener, 2020; pp. 263–276 ISBN 9781119593249.
57. Dias, L.; Rosado, T.; Candeias, A.; Mirão, J.; Caldeira, A.T. A Change in Composition, a Change in Colour: The Case of Limestone Sculptures from the Portuguese National Museum of Ancient Art. *J. Cult. Herit.* **2020**, *42*, 255–262, doi:10.1016/j.culher.2019.07.025.
 58. Guillitte, O. Bioreceptivity: A New Concept for Building Ecology Studies. *Sci. Total Environ.* **1995**, *167*, 215–220, doi:10.1016/0048-9697(95)04582-L.
 59. Vázquez-Nion, D.; Silva, B.; Prieto, B. Influence of the Properties of Granitic Rocks on Their Bioreceptivity to Subaerial Phototrophic Biofilms. *Sci. Total Environ.* **2018**, *610–611*, 44–54, doi:10.1016/j.scitotenv.2017.08.015.
 60. Savković, Ž.; Stupar, M.; Unković, N.; Knežević, A.; Vukojević, J.; Ljaljević, M. Fungal Deterioration of Cultural Heritage Objects. In *Biodegradation Technology of Organic and Inorganic Pollutants*; Ferreira Mendes, K., Nogueira de Sousa, R., Cabral Mielke, C., Eds.; IntechOpen, 2021; pp. 9–11 ISBN 0000957720.
 61. Ding, X.; Lan, W.; Yan, A.; Li, Y.; Katayama, Y.; Gu, J.D. Microbiome Characteristics and the Key Biochemical Reactions Identified on Stone World Cultural Heritage under Different Climate Conditions. *J. Environ. Manage.* **2022**, *302*, 114041, doi:10.1016/j.jenvman.2021.114041.
 62. Mascaro, M.E.; Pellegrino, G.; Palermo, A.M. Analysis of Biodeteriogens on Architectural Heritage. An Approach of Applied Botany on a Gothic Building in Southern Italy. *Sustain.* **2022**, *14*, doi:10.3390/su14010034.
 63. Li, Q.; Zhang, B.; Yang, X.; Ge, Q. Deterioration-Associated Microbiome of Stone Monuments: Structure, Variation, and Assembly. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*, 1–19, doi:10.1128/AEM.02680-17.
 64. Stanaszek-Tomal, E. Environmental Factors Causing the Development of Microorganisms on the Surfaces of National Cultural Monuments Made of Mineral Building Materials—Review. *Coatings* **2020**, *10*, 1–19, doi:10.3390/coatings10121203.
 65. Chen, J.; Blume, H.-P.; Beyer, L. Weathering of Rocks Induced by Lichen Colonization — a Review. *Catena* **2000**, *39*, 121–146.
 66. Chimienti, G.; Piredda, R.; Pepe, G.; van der Werf, I.D.; Sabbatini, L.; Crecchio, C.; Ricciuti, P.; D’Erchia, A.M.; Manzari, C.; Pesole, G. Profile of Microbial Communities on Carbonate Stones of the Medieval Church of San Leonardo Di Siponto (Italy) by Illumina-Based Deep Sequencing. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 8537–8548, doi:10.1007/s00253-016-7656-8.
 67. Schröer, L.; De Kock, T.; Cnudde, V.; Boon, N. Differential Colonization of Microbial Communities Inhabiting Lede Stone in the Urban and Rural Environment. *Sci. Total Environ.* **2020**, *733*, 139339, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139339.
 68. Barka, E.A.; Vatsa, P.; Sanchez, L.; Nathalie Gaveau-Vaillant, C.J.; Klenk, H.; Clément, C.; Ouhdouch, Y.; P. van Wezeld, G. Taxonomy, Physiology and Natural Products of Actinobacteria. *Am. Soc. Microbiol.* **2016**, *80*, 1–43, doi:10.1128/MMBR.00019-15.Address.
 69. Piñar, G.; Ettenauer, J.; Sterflinger, K. “La Vie En Rose”: A Review of the Rosy Discoloration of Subsurface Monuments. In *The Conservation of Subterranean Cultural Heritage*; Saiz-Jimenez, C., Ed.; CRC Press, 2014; pp. 113–124 ISBN

Referências

- 9781315739977.
70. Montañó-Salazar, S.M.; Lizarazo-Marriaga, J.; Brandão, P.F.B. Isolation and Potential Biocementation of Calcite Precipitation Inducing Bacteria from Colombian Buildings. *Curr. Microbiol.* **2018**, *75*, 256–265, doi:10.1007/s00284-017-1373-0.
 71. Paiva, D.S.; Fernandes, L.; Trovão, J.; Mesquita, N.; Tiago, I.; Portugal, A. Uncovering the Fungal Diversity Colonizing Limestone Walls of a Forgotten Monument in the Central Region of Portugal by High-Throughput Sequencing and Culture-Based Methods. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 10650, doi:10.3390/app122010650.
 72. Trovão, J.; Soares, F.; Tiago, I.; Catarino, L.; Portugal, A.; Gil, F. A Contribution to Understand the Portuguese Emblematic Ançã Limestone Bioreceptivity to Fungal Colonization and Biodeterioration. *J. Cult. Herit.* **2021**, *49*, 305–312, doi:10.1016/j.culher.2021.04.003.
 73. Văcar, C.L.; Mircea, C.; Pârvu, M.; Podar, D. Diversity and Metabolic Activity of Fungi Causing Biodeterioration of Canvas Paintings. *J. Fungi* **2022**, *8*, 589, doi:10.3390/jof8060589.
 74. Poyatos, F.; Morales, F.; Nicholson, A.W.; Giordano, A. Physiology of Biodeterioration on Canvas Paintings. *J. Cell. Physiol.* **2017**, *233*, 2741–2751, doi:10.1002/JCP.26088.
 75. Kujović, A.; Gostinčar, C.; Kavkler, K.; Govedić, N.; Gunde-Cimerman, N.; Zalar, P. Degradation Potential of Xerophilic and Xerotolerant Fungi Contaminating Historic Canvas Paintings. *J. Fungi* **2024**, *10*, doi:10.3390/jof10010076.
 76. Rosado, T.; Martins, M.; Pires, M.; Mirão, J.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. Enzymatic Monitorization of Mural Paintings Biodegradation and Biodeterioration. *Int. J. Conserv. Sci.* **2013**, *4*, 603–612.
 77. Kumar, S.; Priyanka; Kumar, U. Microbial Community Present on the Reverse Side of a Deteriorated Canvas. In *Microbial Biotechnology Approaches to Monuments of Cultural Heritage*; Yadav, A.N., Rastegari, A.A., Gupta, V.K., Yadav, N., Eds.; Springer Nature Singapore, 2020; pp. 1–12 ISBN 9789811534010.
 78. Zalar, P.; Graf Hriberšek, D.; Gostinčar, C.; Breskvar, M.; Džeroski, S.; Matul, M.; Novak Babič, M.; Čremožnik Zupančič, J.; Kujović, A.; Gunde-Cimerman, N.; et al. Xerophilic Fungi Contaminating Historically Valuable Easel Paintings from Slovenia. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, doi:10.3389/fmicb.2023.1258670.
 79. Ciferri, O. Microbial Degradation of Paintings. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 879–885, doi:10.1128/aem.65.3.879-885.1999.
 80. Paiva de Carvalho, H.; Sequeira, S.O.; Pinho, D.; Trovão, J.; da Costa, R.M.F.; Egas, C.; Macedo, M.F.; Portugal, A. Combining an Innovative Non-Invasive Sampling Method and High-Throughput Sequencing to Characterize Fungal Communities on a Canvas Painting. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2019**, *145*, 104816, doi:10.1016/j.ibiod.2019.104816.
 81. Rudakiya, D.M.; Gupte, A. Assessment of White Rot Fungus Mediated Hardwood Degradation by FTIR Spectroscopy and Multivariate Analysis. *J. Microbiol. Methods* **2019**, *157*, 123–130, doi:10.1016/j.mimet.2019.01.007.
 82. Reyes, C.; Poulin, A.; Nyström, G.; Schwarze, F.W.M.R.; Ribera, J. Enzyme Activities of Five White-Rot Fungi in the Presence of Nanocellulose. *J. Fungi* **2021**, *7*, 9–13, doi:10.3390/jof7030222.

83. Li, T.; Cui, L.; Song, X.; Cui, X.; Wei, Y.; Tang, L.; Mu, Y.; Xu, Z. Wood Decay Fungi: An Analysis of Worldwide Research. *J. Soils Sediments* **2022**, *22*, 1688–1702, doi:10.1007/s11368-022-03225-9.
84. Barry, G.; Jerrold, E.W.; Jeffrey, J.M. Fungal Degradation of Wood: Emerging Data, New Insights and Changing Perceptions. *Coatings* **2020**, *10*, 1210, doi:doi:10.3390/coatings10121210.
85. Poyatos-Jiménez, F.; Morales, F.; Morales-Carrera, R.; Boffo, S.; Giordano, A.; Romero-Noguera, J. Fungal and Bacterial Biodeterioration of Outdoor Canvas Paintings: The Case of the Cloisters of Quito, Ecuador. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **2021**, *31*, 45–63, doi:10.1615/CritRevEukaryotGeneExpr.2021038254.
86. Kchouk, M.; Gibrat, J.F.; Elloumi, M. Generations of Sequencing Technologies: From First to Next Generation. *Biol. Med.* **2017**, *09*, doi:10.4172/0974-8369.1000395.
87. Gomes, A.; Korf, B.R. *Genetic Testing Techniques*; Elsevier Inc., 2018; ISBN 9780323495967.
88. Zhang, P.; Seth, A.; Fernandes, H. *Other Post-PCR Detection Technologies*; Elsevier Inc., 2014; ISBN 9780123864567.
89. Vester, J.K.; Glaring, M.A.; Stougaard, P. Improved Cultivation and Metagenomics as New Tools for Bioprospecting in Cold Environments. *Extremophiles* **2015**, *19*, 17–29, doi:10.1007/s00792-014-0704-3.
90. Vaz-Moreira, I.; Egas, C.; Nunes, O.C.; Manaia, C.M. Culture-Dependent and Culture-Independent Diversity Surveys Target Different Bacteria: A Case Study in a Freshwater Sample. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **2011**, *100*, 245–257, doi:10.1007/s10482-011-9583-0.
91. Li, A.Z.; Han, X. Bin; Zhang, M.X.; Zhou, Y.; Chen, M.; Yao, Q.; Zhu, H.H. Culture-Dependent and -Independent Analyses Reveal the Diversity, Structure, and Assembly Mechanism of Benthic Bacterial Community in the Ross Sea, Antarctica. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1–14, doi:10.3389/fmicb.2019.02523.
92. Stefani, F.O.P.; Bell, T.H.; Marchand, C.; De La Providencia, I.E.; El Yassimi, A.; St-Arnaud, M.; Hijri, M. Culture-Dependent and -Independent Methods Capture Different Microbial Community Fractions in Hydrocarbon-Contaminated Soils. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–16, doi:10.1371/journal.pone.0128272.
93. Fenske, G.J.; Ghimire, S.; Antony, L.; Christopher-Hennings, J.; Scaria, J. Integration of Culture-Dependent and Independent Methods Provides a More Coherent Picture of the Pig Gut Microbiome. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2020**, *96*, 1–10, doi:10.1093/femsec/fiaa022.
94. Carraro, L.; Maifreni, M.; Bartolomeoli, I.; Martino, M.E.; Novelli, E.; Frigo, F.; Marino, M.; Cardazzo, B. Comparison of Culture-Dependent and -Independent Methods for Bacterial Community Monitoring during Montasio Cheese Manufacturing. *Res. Microbiol.* **2011**, *162*, 231–239, doi:10.1016/j.resmic.2011.01.002.
95. Rosado, T.; Dias, L.; Lança, M.; Nogueira, C.; Santos, R.; Martins, M.R.; Candeias, A.; Mirão, J.; Caldeira, A.T. Assessment of Microbiota Present on a Portuguese Historical Stone Convent Using High-Throughput Sequencing Approaches. *Microbiologyopen* **2020**, *9*, 1067–1084, doi:10.1002/mbo3.1030.
96. Piñar, G.; Lubitz, W. Molecular Techniques : Application to the Analysis of Microbial Communities Colonising Art Works and to the Monitoring of Changes. Case

Referências

- Study: Wall Paintings of the Castle of Herberstein. **2004**, 12.
97. Fanning, S.; Proos, S.; Jordan, K.; Srikumar, S. A Review on the Applications of next Generation Sequencing Technologies as Applied to Food-Related Microbiome Studies. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1–16, doi:10.3389/fmicb.2017.01829.
 98. Gutarowska, B.; Celikkol-Aydin, S.; Bonifay, V.; Otlewska, A.; Aydin, E.; Oldham, A.L.; Brauer, J.I.; Duncan, K.E.; Adamiak, J.; Sunner, J.A.; et al. Metabolomic and High-Throughput Sequencing Analysis-Modern Approach for the Assessment of Biodeterioration of Materials from Historic Buildings. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 1–13, doi:10.3389/fmicb.2015.00979.
 99. Boers, S.A.; Jansen, R.; Hays, J.P. Understanding and Overcoming the Pitfalls and Biases of Next-Generation Sequencing (NGS) Methods for Use in the Routine Clinical Microbiological Diagnostic Laboratory. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *38*, 1059–1070, doi:10.1007/s10096-019-03520-3.
 100. Szoboszlay, M.; Schramm, L.; Pinzauti, D.; Scerri, J.; Sandionigi, A.; Biazzo, M. Nanopore Is Preferable over Illumina for 16S Amplicon Sequencing of the Gut Microbiota When Species-Level Taxonomic Classification, Accurate Estimation of Richness, or Focus on Rare Taxa Is Required. *Microorganisms* **2023**, *11*, 804, doi:10.3390/microorganisms11030804.
 101. Perito, B.; Cavalieri, D. Innovative Metagenomic Approaches for Detection of Microbial Communities Involved in Biodeterioration of Cultural Heritage. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2018**, *364*, doi:10.1088/1757-899X/364/1/012074.
 102. Wang, F.; Men, X.; Zhang, G.; Liang, K.; Xin, Y.; Wang, J.; Li, A.; Zhang, H.; Liu, H.; Wu, L. Assessment of 16S rRNA Gene Primers for Studying Bacterial Community Structure and Function of Aging Flue-Cured Tobaccos. *AMB Express* **2018**, *8*, 1–9, doi:10.1186/s13568-018-0713-1.
 103. Park, C.; Kim, S.B.; Choi, S.H.; Kim, S. Comparison of 16S rRNA Gene Based Microbial Profiling Using Five Next-Generation Sequencers and Various Primers. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 1–15, doi:10.3389/fmicb.2021.715500.
 104. Fuks, G.; Elgart, M.; Amir, A.; Zeisel, A.; Turnbaugh, P.J.; Soen, Y.; Shental, N. Combining 16S rRNA Gene Variable Regions Enables High-Resolution Microbial Community Profiling. *Microbiome* **2018**, *6*, 1–13, doi:10.1186/s40168-017-0396-x.
 105. Barak, N.; Fadeev, E.; Brekhman, V.; Aharonovich, D.; Lotan, T.; Sher, D. Selecting 16S rRNA Primers for Microbiome Analysis in a Host–Microbe System: The Case of the Jellyfish *Rhopilema Nomadica*. *Microorganisms* **2023**, *11*, doi:10.3390/microorganisms11040955.
 106. Yohe, S.; Thyagarajan, B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2017**, *141*, 1544–1557, doi:10.5858/arpa.2016-0501-RA.
 107. Chala, G. A Short Review on Illumina Sequencing Technology. *Austin J. Vet. Sci. Anim. Husb.* **2022**, *9*, 9–11, doi:10.26420/austinjvetscianimhusb.2022.1107.
 108. Ambardar, S.; Gupta, R.; Trakroo, D.; Lal, R.; Vakhlu, J. High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry. *Indian J. Microbiol.* **2016**, *56*, 394–404, doi:10.1007/s12088-016-0606-4.
 109. Hu, T.; Chitnis, N.; Monos, D.; Dinh, A. Next-Generation Sequencing Technologies: An Overview. *Hum. Immunol.* **2021**, *82*, 801–811, doi:10.1016/j.humimm.2021.02.012.

110. Magi, A.; Semeraro, R.; Mingrino, A.; Giusti, B.; D'Aurizio, R. Nanopore Sequencing Data Analysis: State of the Art, Applications and Challenges. *Brief. Bioinform.* **2017**, *19*, 1256–1272, doi:10.1093/bib/bbx062.
111. Wang, Y.; Zhao, Y.; Bollas, A.; Wang, Y.; Au, K.F. Nanopore Sequencing Technology, Bioinformatics and Applications. *Nat. Biotechnol.* **2021**, *39*, 1348–1365, doi:10.1038/s41587-021-01108-x.
112. Nygaard, A.B.; Tunsjø, H.S.; Meisal, R.; Charnock, C. A Preliminary Study on the Potential of Nanopore MinION and Illumina MiSeq 16S RRNA Gene Sequencing to Characterize Building-Dust Microbiomes. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 3209, doi:10.1038/s41598-020-59771-0.
113. Piñar, G.; Poyntner, C.; Lopandic, K.; Tafer, H.; Sterflinger, K. Rapid Diagnosis of Biological Colonization in Cultural Artefacts Using the MinION Nanopore Sequencing Technology. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2020**, *148*, doi:10.1016/j.ibiod.2020.104908.
114. Fidanza, M.R.; Caneva, G. Natural Biocides for the Conservation of Stone Cultural Heritage: A Review. *J. Cult. Herit.* **2019**, *38*, 271–286, doi:10.1016/j.culher.2019.01.005.
115. Micheluz, A.; Sulyok, M.; Manente, S.; Krska, R.; Varese, G.C.; Ravagnan, G. Fungal Secondary Metabolite Analysis Applied to Cultural Heritage: The Case of a Contaminated Library in Venice. *World Mycotoxin J.* **2016**, *9*, 397–407, doi:10.3920/WMJ2015.1958.
116. Ricci, C.; Gambino, F.; Nervo, M.; Piccirillo, A.; Scarcella, A.; Zenucchini, F.; Pozo-Antonio, J.S. Developing New Cleaning Strategies of Cultural Heritage Stones: Are Synergistic Combinations of a Low-Toxic Solvent Ternary Mixtures Followed by Laser the Solution? *Coatings* **2020**, *10*, doi:10.3390/COATINGS10050466.
117. Sassoni, E.; Delhomme, C.; Forst, S.; Graziani, G.; Hénin, J.; Masi, G.; Palazzo, A.; Rolland, O.; Vergès-Belmin, V. Phosphate Treatments for Stone Conservation: 3-Year Field Study in the Royal Palace of Versailles (France). *Mater. Struct. Constr.* **2021**, *54*, 1–21, doi:10.1617/s11527-021-01717-7.
118. Lo Schiavo, S.; De Leo, F.; Urzi, C. Present and Future Perspectives for Biocides and Antifouling Products for Stone-Built Cultural Heritage: Ionic Liquids as a Challenging Alternative. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, doi:10.3390/APP10186568.
119. Kakakhel, M.A.; Wu, F.; Gu, J.D.; Feng, H.; Shah, K.; Wang, W. Controlling Biodeterioration of Cultural Heritage Objects with Biocides: A Review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2019**, *143*, doi:10.1016/j.ibiod.2019.104721.
120. Michalak, I.; Chojnacka, K. Biocides. In *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*; Wexler, P., Ed.; Academic Press: Wroclaw, Poland, 2014; Vol. 1, pp. 461–463 ISBN 9780123864543.
121. Casanova Municchia, A.; Fidanza, M.R.; Caneva, G. Advances in Testing the Interference of Biocides on Stone Materials: A Comparative Analysis and Guidelines for a Standardised Approach. *J. Cult. Herit.* **2023**, *64*, 23–41, doi:10.1016/j.culher.2023.08.001.
122. Vannini, A.; Contardo, T.; Paoli, L.; Scattoni, M.; Favero-Longo, S.E.; Loppi, S. Application of Commercial Biocides to Lichens: Does a Physiological Recovery Occur over Time? *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2018**, *129*, 189–194, doi:10.1016/j.ibiod.2018.02.010.
123. Caldeira, A.T. Green Mitigation Strategy for Cultural Heritage Using Bacterial

Referências

- Biocides. In *Microorganisms in the Deterioration and Preservation of Cultural Heritage*; Joseph, E., Ed.; Springer: Switzerland, 2021; pp. 137–148 ISBN 978-3-030-69410-4.
124. Antonelli, F.; Iovine, S.; Sacco Perasso, C.; Macro, N.; Gioventù, E.; Capasso, F.E.; Bartolini, M. Essential Oils and Essential Oil-Based Products Compared to Chemical Biocides Against Microbial Patinas on Stone Cultural Heritage. *Coatings* **2024**, *14*, 1–15, doi:10.3390/coatings14121546.
125. Antonelli, F.; Bartolini, M.; Plissonnier, M.; Galotta, G.; Ricci, S.; Petriaggi, B.D.; Giovanni, A. Di; Piazza, S.; Antonelli, F.; Bartolini, M.; et al. Essential Oils as Alternative Biocides for the Preservation of Waterlogged Archaeological Wood. *Microorganisms* **2020**, *8*, 2015, doi:10.3390/microorganisms8122015.
126. Cirone, M.; Figoli, A.; Galiano, F.; La Russa, M.F.; Macchia, A.; Mancuso, R.; Ricca, M.; Rovella, N.; Taverniti, M.; Ruffolo, S.A. Innovative Methodologies for the Conservation of Cultural Heritage against Biodeterioration: A Review. *Coatings* **2023**, *13*, doi:10.3390/coatings13121986.
127. Spada, M.; Cuzman, O.A.; Tosini, I.; Galeotti, M.; Sorella, F. Essential Oils Mixtures as an Eco-Friendly Biocidal Solution for a Marble Statue Restoration. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2021**, *163*, doi:10.1016/j.ibiod.2021.105280.
128. Ranalli, G.; Zanardini, E. Biocleaning on Cultural Heritage: New Frontiers of Microbial Biotechnologies. *J. Appl. Microbiol.* **2021**, *131*, 583–603, doi:10.1111/jam.14993.
129. Yesankar, P.J.; Pal, M.; Salok, A.; Qureshi, A. Assessment of Biofilm Inhabitants of Deteriorated Surfaces of Heritage Sites. *Geomicrobiol. J.* **2022**, *39*, 906–915, doi:10.1080/01490451.2022.2097342.
130. Reis, A.T.M.B.T. *A Galeria Dos Vice-Reis e Governadores Da India Portuguesa: Percorso Para a Definição de Uma Metodologia de Intervenção*, Universidade Católica Portuguesa, 2014.
131. Romero, S.M.; Giudicessi, S.L.; Vitale, R.G. Is the Fungus *Aspergillus* a Threat to Cultural Heritage? *J. Cult. Herit.* **2021**, *51*, 107–124, doi:10.1016/j.culher.2021.08.002.
132. Rai, J.N.; Agarwal, S.C. *Aspeugillus Elongatus* Sp. Nov. from Indian Alkaline Soils. *Can. J. Bot.* **1970**, *48*, 791–792, doi:https://doi.org/10.1139/b70-108.
133. Anderson, R. Hypoxylon in Britain and Ireland - 1. Changing Perspectives in Hypoxylon. *F. Mycol.* **2008**, *9*, 5–12, doi:10.1016/S1468-1641(10)60393-3.
134. Lee, Y.-S.; Whalley, A.J.S. The Genus *Hypoxylon*, Wood Decay Fungi – I. Teleomorph of *Hypoxylon* Section. *Mycobiology* **2000**, *28*, 5–10, doi:10.1080/12298093.2000.12015715.
135. Cruz, K.S.; Cortez, V.G. *Hypoxylon* (Xylariaceae, Ascomycota) from Western Paraná, Brazil. *Brazilian J. Bot.* **2015**, *38*, 889–901, doi:10.1007/s40415-015-0189-z.
136. Thaler, N.; Lesar, B.; Kariž, M.; Humar, M. Biocincising of Norway Spruce Wood Using Wood Inhabiting Fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2012**, *68*, 51–55, doi:10.1016/j.ibiod.2011.11.014.
137. Zanellati, A.; Spina, F.; Bonaterra, M.; Dinuccio, E.; Varese, G.C.; Scarpeci, T.E. Screening and Evaluation of Phenols and Furans Degrading Fungi for the Biological Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*

- 2021**, 161, 105246, doi:10.1016/j.ibiod.2021.105246.
138. Samson, R.A.; Houbraken, J.; Varga, J.; Frisvad, J.C. Polyphasic Taxonomy of the Heat Resistant Ascomycete Genus *Byssochlamys* and Its *Paecilomyces* Anamorphs. *Persoonia Mol. Phylogeny Evol. Fungi* **2009**, *22*, 14–27, doi:10.3767/003158509X418925.
 139. Liu, Z.; Zhang, Y.; Zhang, F.; Hu, C.; Liu, G.; Pan, J. Microbial Community Analyses of the Deteriorated Storeroom Objects in the Tianjin Museum Using Culture-Independent and Culture-Dependent Approaches. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1–12, doi:10.3389/fmicb.2018.00802.
 140. Sandoval-Denis, M.; Gené, J.; Sutton, D.A.; Wiederhold, N.P.; Guarro, J. *Acrophialophora*, a Poorly Known Fungus with Clinical Significance. *J. Clin. Microbiol.* **2015**, *53*, 1549–1555, doi:10.1128/JCM.00279-15.
 141. Ghosh, A.; Kaur, H.; Gupta, A.; Singh, S. Emerging Dematiaceous and Hyaline Fungi Causing. *Cornea* **2020**, *00*, 1–9.
 142. A. Attia, E.; M. Abdel-Azeem, A. *Chaetomium* in Indoor Environment and Medically Important Species of *Chaetomium*. In *Recent Developments on Genus Chaetomium*; M. Abdel-Azeem, A., Ed.; Springer: Ismailia, Egypt, 2020; pp. 161–177 ISBN 9783030316112.
 143. Kedves, O.; Kocsubé, S.; Bata, T.; Andersson, M.A.; Salo, J.M.; Mikkola, R.; Salonen, H.; Szcs, A.; Kedves, A.; Kónya, Z.; et al. *Chaetomium* and *Chaetomium*-like Species from European Indoor Environments Include *Dichotomopilus Finlandicus* Sp. Nov. *Pathogens* **2021**, *10*, 1133, doi:https://doi.org/10.3390/pathogens10091133.
 144. M. Abdel-Azeem, A. Taxonomy and Biodiversity of the Genus *Chaetomium* in Different Habitats. In *Recent Developments on Genus Chaetomium*; M. Abdel-Azeem, A., Ed.; Springer: Ismailia, Egypt, 2020; pp. 3–79 ISBN 9783030316112.
 145. Zucconi, L.; Canini, F.; Isola, D.; Caneva, G. Fungi Affecting Wall Paintings of Historical Value: A Worldwide Meta-Analysis of Their Detected Diversity. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 2988, doi:10.3390/app12062988.
 146. Liu, Y.; Wu, Y.; Zhang, Y.; Yang, X.; Yang, E.; Xu, H.; Yang, Q.; Chagan, I.; Cui, X.; Chen, W.; et al. Lignin Degradation Potential and Draft Genome Sequence of *Trametes Trogii* S0301. *Biotechnol. Biofuels* **2019**, *12*, 1–13, doi:10.1186/s13068-019-1596-3.
 147. Olou, B.A.; Krah, F.S.; Piepenbring, M.; Yorou, N.S.; Langer, E. Diversity of *Trametes* (Polyporales, Basidiomycota) in Tropical Benin and Description of New Species *Trametes Parvispora*. *MycKeys* **2020**, *65*, 25–47, doi:10.3897/mycokeys.65.47574.
 148. M. De Wet, M.M.; G. Brink, H. Fungi in the Bioremediation of Toxic Effluents. *Fungi Bio-prospects Sustain. Agric. Environ. Nano-technology Vol. 2 Extrem. Fungi Myco-mediated Environ. Manag.* **2020**, 407–431, doi:10.1016/B978-0-12-821925-6.00018-6.
 149. Riba, A.; Bouras, N.; Mokrane, S.; Mathieu, F.; Lebrihi, A.; Sabaou, N. *Aspergillus* Section *Flavi* and Aflatoxins in Algerian Wheat and Derived Products. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, *48*, 2772–2777, doi:10.1016/j.fct.2010.07.005.
 150. Kurtzman, C.P.; Horn, B.W.; Hesseltine, C.W. *Aspergillus Nomius*, a New Aflatoxin-Producing Species Related to *Aspergillus Flavus* and *Aspergillus Tamarii*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **1987**, *53*, 147–158,

Referências

- doi:10.1007/BF00393843.
151. Frisvad, J.C.; Hubka, V.; Ezekiel, C.N.; Hong, S.B.; Nováková, A.; Chen, A.J.; Arzanlou, M.; Larsen, T.O.; Sklenář, F.; Mahakarnchanakul, W.; et al. Taxonomy of *Aspergillus* Section *Flavi* and Their Production of Aflatoxins, Ochratoxins and Other Mycotoxins. *Stud. Mycol.* **2019**, *93*, 1–63, doi:10.1016/j.simyco.2018.06.001.
 152. Samson, R.A.; Houbraken, J.A.M.P.; Kuijpers, A.F.A.; Frank, J.M.; Frisvad, J.C. New Ochratoxin A or Sclerotium Producing Species in *Aspergillus* Section *Nigri*. *Stud. Mycol.* **2004**, *50*, 45–61.
 153. Taniwaki, M.H.; Pitt, J.I.; Magan, N. *Aspergillus* Species and Mycotoxins: Occurrence and Importance in Major Food Commodities. *Curr. Opin. Food Sci.* **2018**, *23*, 38–43, doi:10.1016/j.cofs.2018.05.008.
 154. Ito, Y.; Peterson, S.W.; Wicklow, D.T.; Goto, T. *Aspergillus Pseudotamarii*, a New Aflatoxin Producing Species in *Aspergillus* Section *Flavi*. *Mycol. Res.* **2001**, *105*, 233–239, doi:10.1017/S0953756200003385.
 155. Houbraken, J.; Samson, R.A.; Frisvad, J.C. *Byssochlamys*: Significance of Heat Resistance and Mycotoxin Production. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*; Hocking, A.D., Pitt, J.I., Samson, R.A., Thrane, U., Eds.; Springer, 2006; Vol. 571, pp. 211–224 ISBN 9780387283852.
 156. Nielsen, K.F.; Frisvad, J.C. Mycotoxins on Building Materials. In *Fundamentals of mold growth in indoor environments and strategies for healthy living*; Adan, O.C.G., Samson, R.A., Eds.; Wageningen Academic: Lyngby, Denmark, 2011; pp. 245–275 ISBN 9789086867226.
 157. Tuomi, T.; Reijula, K.; Johnsson, T.; Hemminki, K.; Hintikka, E.L.; Lindroos, O.; Kalso, S.; Koukila-Kähkölä, P.; Mussalo-Rauhamaa, H.; Haahtela, T. Mycotoxins in Crude Building Materials from Water-Damaged Buildings. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 1899–1904, doi:10.1128/AEM.66.5.1899-1904.2000.
 158. Jarvis, B.B.; Miller, J.D. Mycotoxins as Harmful Indoor Air Contaminants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *66*, 367–372, doi:10.1007/s00253-004-1753-9.
 159. Vaali, K.; Tuomela, M.; Mannerström, M.; Heinonen, T.; Tuuminen, T. Toxic Indoor Air Is a Potential Risk of Causing Immuno Suppression and Morbidity—A Pilot Study. *J. Fungi* **2022**, *8*, 2–13, doi:10.3390/jof8020104.
 160. Singh, J. Nature and Extent of Deterioration in Buildings Due to Fungi. In *Building Mycology: Management of Decay and Health*; Singh, J., Ed.; Copyright: Londres, 1995; p. 23 ISBN 978-0419190202.
 161. Ravikumar, H.R.; Rao, S.S.; Karigar, C.S. Biodegradation of Paints: A Current Status. *Indian J. Sci. Technol.* **2012**, *5*, 1977–1987, doi:10.17485/ijst/2012/v5i1.33.
 162. Tian, X.P.; Zhi, X.Y.; Qiu, Y.Q.; Zhang, Y.Q.; Tang, S.K.; Xu, L.H.; Zhang, S.; Li, W.J. *Sciscionella Marina* Gen. Nov., Sp. Nov., a Marine Actinomycete Isolated from a Sediment in the Northern South China Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2009**, *59*, 222–228, doi:10.1099/ijss.0.001982-0.
 163. Tao, P.; Li, H.; Yu, Y.; Gu, J.; Liu, Y. Ectoine and 5-Hydroxyectoine Accumulation in the Halophile *Virgibacillus Halodenitrificans* PDB-F2 in Response to Salt Stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 6779–6789, doi:10.1007/s00253-016-7549-x.

164. Fayez, D.; Youssif, A.; Sabry, S.; Ghozlan, H.; Eltarahony, M. Carotegenic *Virgibacillus Halodenitrificans* from Wadi El-Natron Salt Lakes: Isolation, Optimization, Characterization and Biological Activities of Carotenoids. *Biology (Basel)*. **2022**, *11*, doi:10.3390/biology11101407.
165. Piñar, G.; Kraková, L.; Pangallo, D.; Piombino-Mascoli, D.; Maixner, F.; Zink, A.; Sterflinger, K. Halophilic Bacteria Are Colonizing the Exhibition Areas of the Capuchin Catacombs in Palermo, Italy. *Extremophiles* **2014**, *18*, 677–691, doi:10.1007/s00792-014-0649-6.
166. López-Miras, M.; Piñar, G.; Romero-Noguera, J.; Bolívar-Galiano, F.C.; Etenauer, J.; Sterflinger, K.; Martín-Sánchez, I. Microbial Communities Adhering to the Obverse and Reverse Sides of an Oil Painting on Canvas: Identification and Evaluation of Their Biodegradative Potential. *Aerobiologia (Bologna)*. **2013**, *29*, 301–314, doi:10.1007/s10453-012-9281-z.
167. Sakr, A.A.; Ghaly, M.F.; Edwards, H.G.M.; Ali, M.F.; Abdel-Haliem, M.E.F. Involvement of *Streptomyces* in the Deterioration of Cultural Heritage Materials Through Biomineralization and Bio-Pigment Production Pathways: A Review. *Geomicrobiol. J.* **2020**, *37*, 653–662, doi:10.1080/01490451.2020.1754533.
168. Meklat, A.; Bouras, N.; Zitouni, A.; Sabaou, N.; Mathieu, F.; Schumann, P.; Spröer, C.; Klenk, H.P. *Saccharopolyspora Ghardaiensis* Sp. Nov., an Extremely Halophilic Actinomycete Isolated from Algerian Saharan Soil. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **2014**, *67*, 299–303, doi:10.1038/ja.2013.136.
169. Sayed, A.M.; Abdel-Wahab, N.M.; Hassan, H.M.; Abdelmohsen, U.R. *Saccharopolyspora*: An Underexplored Source for Bioactive Natural Products. *J. Appl. Microbiol.* **2020**, *128*, 314–329, doi:10.1111/jam.14360.
170. Duan, Y.; Wu, F.; Wang, W.; He, D.; Gu, J.D.; Feng, H.; Chen, T.; Liu, G.; An, L. The Microbial Community Characteristics of Ancient Painted Sculptures in Maijishan Grottoes, China. *PLoS One* **2017**, *12*, doi:10.1371/journal.pone.0179718.
171. Gurtner, C.; Heyrman, J.; Piñar, G.; Lubitz, W.; Swings, J.; Rölleke, S. Comparative Analyses of the Bacterial Diversity on Two Different Biodeteriorated Wall Paintings by DGGE and 16S rDNA Sequence Analysis. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2000**, *46*, 229–239, doi:10.1016/S0964-8305(00)00079-2.
172. Kelly, D.P.; McDonald, I.R.; Wood, A.P. The Family *Mehylobacteriaceae*. In *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*; Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2014; pp. 313–340 ISBN 9783642301971.
173. Xu, F.F.; Morohoshi, T.; Wang, W.Z.; Yamaguchi, Y.; Liang, Y.; Ikeda, T. Evaluation of Intraspecies Interactions in Biofilm Formation by *Methylobacterium* Species Isolated from Pink-Pigmented Household Biofilms. *Microbes Environ.* **2014**, *29*, 388–392, doi:10.1264/jsme2.ME14038.
174. Silva, N.C.; Madureira, A.R.; Pintado, M.; Moreira, P.R. Biocontamination and Diversity of Epilithic Bacteria and Fungi Colonising Outdoor Stone and Mortar Sculptures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2022**, *106*, 3811–3828, doi:10.1007/s00253-022-11957-4.
175. Singh, A.P.; Kim, Y.S.; Singh, T. Bacterial Degradation of Wood. In *Secondary Xylem Biology: Origins, Functions, and Applications*; Kim, Y.S., Funada, R., Singh, A.P., Eds.; Elsevier Inc., 2016; pp. 169–190 ISBN 9780128021859.

Referências

176. Johnston, S.R.; Boddy, L.; Weightman, A.J. Bacteria in Decomposing Wood and Their Interactions with Wood-Decay Fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2016**, *92*, 1–12, doi:10.1093/femsec/fiw179.
177. Clausen, C.A. Bacterial Associations with Decaying Wood: A Review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **1996**, *37*, 101–107, doi:10.1016/0964-8305(95)00109-3.
178. MA, Z.; JE, O.; I, Y.; KU, N.; AA, A.; IM, A.; OO, O. Molecular Characterization of Bacillus Species Associated with Deterioration of Painted Surfaces in Nasarawa State University, Keffi. *Greener J. Epidemiol. Public Heal.* **2023**, *11*, 35–40.
179. Noohi, N.; Papizadeh, M. Study of Biodeterioration Potential of Microorganisms Isolated in the Paintings Storeroom of Mouze Makhsus Museum, Golestan Palace, Tehran. *Stud. Conserv.* **2023**, *68*, 720–730, doi:10.1080/00393630.2022.2118269.
180. Avdanina, D.A.; Zhgun, A.A. Rainbow Code of Biodeterioration to Cultural Heritage Objects. *Herit. Sci.* **2024**, *12*, 1–24, doi:10.1186/s40494-024-01298-y.
181. Shivaji, S.; Chaturvedi, P.; Begum, Z.; Pindi, P.K.; Manorama, R.; Padmanaban, D.A.; Shouche, Y.S.; Pawar, S.; Vaishampayan, P.; Dutt, C.B.S.; et al. Janibacter Hoylei Sp. Nov., Bacillus Isronensis Sp. Nov. and Bacillus Aryabhatai Sp. Nov., Isolated from Cryotubes Used for Collecting Air from the Upper Atmosphere. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2009**, *59*, 2977–2986, doi:10.1099/ijs.0.002527-0.
182. Hong, B.H.; Joe, M.M.; Selvakumar, G.; Kim, K.Y.; Choi, J.H.; Sa, T.M. Influence of Salinity Variations on Exocellular Polysaccharide Production, Biofilm Formation and Flocculation in Halotolerant Bacteria. *J. Environ. Biol.* **2017**, *38*, 657–664, doi:10.22438/jeb/38/4/MRN-284.
183. Paiva de Carvalho, H.; Mesquita, N.; Trovão, J.; Fernández Rodríguez, S.; Pinheiro, A.C.; Gomes, V.; Alcoforado, A.; Gil, F.; Portugal, A. Fungal Contamination of Paintings and Wooden Sculptures inside the Storage Room of a Museum: Are Current Norms and Reference Values Adequate? *J. Cult. Herit.* **2018**, *34*, 268–276, doi:10.1016/j.culher.2018.05.001.
184. Pangallo, D.; Chovanová, K.; Šimonovičová, A.; Ferienc, P. Investigation of Microbial Community Isolated from Indoor Artworks and Air Environment: Identification, Biodegradative Abilities, and DNA Typing. *Can. J. Microbiol.* **2009**, *55*, 277–287, doi:10.1139/W08-136.
185. Văcar, C.L.; Mircea, C.; Pârvu, M.; Podar, D. Diversity and Metabolic Activity of Fungi Causing Biodeterioration of Canvas Paintings. *J. Fungi* **2022**, *8*, doi:10.3390/jof8060589.
186. Bastholm, C.J.; Richter, J.; Aalling, A.; Bjerre, A.; Madsen, A.M. Xerophilic Fungi Have a Taste for Danish Art and Cultural Heritage. In Proceedings of the 2nd International Conference on Moisture in Buildings (ICMB23); ScienceOpen, 2023.
187. Ceballos, S.J.; Yu, C.; Claypool, J.T.; Singer, S.W.; Simmons, B.A.; Thelen, M.P.; Simmons, C.W.; VanderGheynst, J.S. Development and Characterization of a Thermophilic, Lignin Degrading Microbiota. *Process Biochem.* **2017**, *63*, 193–203, doi:10.1016/j.procbio.2017.08.018.
188. Haniffadli, A.; Ban, Y.; Rahmat, E.; Kang, C.H.; Kang, Y. Unforeseen Current and Future Benefits of Uncommon Yeast: The Metschnikowia Genus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2024**, *108*, 1–16, doi:10.1007/s00253-024-13369-y.
189. Sala-Luis, A.; Oliveira-Urquiri, H.; Bosch-Roig, P.; Martín-Rey, S. Eco-Sustainable Approaches to Prevent and/or Eradicate Fungal Biodeterioration on Easel

- Painting. *Coatings* **2024**, *14*, 124, doi:10.3390/coatings14010124.
190. López-Miras, M.D.M.; Martín-Sánchez, I.; Yebra-Rodríguez, Á.; Romero-Noguera, J.; Bolívar-Galiano, F.; Ettenauer, J.; Sterflinger, K.; Piñar, G. Contribution of the Microbial Communities Detected on an Oil Painting on Canvas to Its Biodeterioration. *PLoS One* **2013**, *8*, doi:10.1371/journal.pone.0080198.
 191. Salvador, C.; Sandu, I.; Sandbakken, E.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. Biodeterioration in Art: A Case Study of Munch's Paintings. *Eur. Phys. J. Plus* **2022**, *137*, 2–19, doi:10.1140/epjp/s13360-021-02187-0.
 192. N. Williams, A.; S. MacLea, K. Draft Genome Sequence of *Dermacoccus Nishinomiyaensis* TSA37, Isolated from Wood Ash. *Am. Soc. Microbiol.* **2019**, *8*, 1–2, doi:https://doi.org/10.1128/MRA.01370-19.
 193. Herrera-Sancho, O.; Rivera Romero, M.; Varela Mejia, B.; Ugalde Campos, L.; Jaikel-Viquez, D.; Calderón-Mesén, P.; Marin Delgado, R.; Urena Alvarado, K.; Rojas Gonzalez, A.; Urcuyo, R.; et al. Assessment of Chemical and Antimicrobial Components of Artworks Attributed to the Costa Rican Painter Fausto Pacheco. *Res. Sq.* **2023**, doi:https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3353007/v1.
 194. Caneva, G.; Isola, D.; Lee, H.J.; Chung, Y.J. Biological Risk for Hypogea: Shared Data from Etruscan Tombs in Italy and Ancient Tombs of the Baekje Dynasty in Republic of Korea. *Appl. Sci.* **2020**, *10*, doi:10.3390/app10176104.
 195. Dias, L.; Gil, M.; Silva, I.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. Assessment of Microbial Communities Affecting Almada Negreiros' Mural Paintings at a Maritime Station in Lisbon. *npj Herit. Sci.* **2025**, *13*, doi:10.1038/s40494-025-01656-4.
 196. Capodicasa, S.; Fedi, S.; Porcelli, A.M.; Zannoni, D. The Microbial Community Dwelling on a Biodeteriorated 16th Century Painting. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2010**, *64*, 727–733, doi:10.1016/j.ibiod.2010.08.006.
 197. Gorbushina, A.A.; Heyrman, J.; Dornieden, T.; Gonzalez-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. Martins Church (Greene-Kreiensen, Germany). *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2004**, *53*, 13–24, doi:10.1016/j.ibiod.2003.07.003.
 198. Laiz, L.; Piñar, G.; Lubitz, W.; Saiz-Jimenez, C. Monitoring the Colonization of Monuments by Bacteria: Cultivation versus Molecular Methods. *Environ. Microbiol.* **2003**, *5*, 72–74, doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00381.x.
 199. Caselli, E.; Pancaldi, S.; Baldisserotto, C.; Petrucci, F.; Impallaria, A.; Volpe, L.; D'Accolti, M.; Soffritti, I.; Coccagna, M.; Sassu, G.; et al. Characterization of Biodegradation in a 17 Th Century Easel Painting and Potential for a Biological Approach. *PLoS One* **2018**, *13*, 1–18, doi:10.1371/journal.pone.0207630.
 200. Pavić, A.; Ilić-Tomić, T.; Pačevski, A.; Nedeljković, T.; Vasiljević, B.; Morić, I. Diversity and Biodeteriorative Potential of Bacterial Isolates from Deteriorated Modern Combined-Technique Canvas Painting. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2015**, *97*, 40–50, doi:10.1016/j.ibiod.2014.11.012.
 201. Zhgun, A.; Avdanina, D.; Shumikhin, K.; Simonenko, N.; Lyubavskaya, E.; Volkov, I.; Ivanov, V. Detection of Potential Biodeterioration Risks for Tempera Painting in 16th Century Exhibits from State Tretyakov Gallery. *PLoS One* **2020**, *15*, 1–20, doi:10.1371/journal.pone.0230591.
 202. Oliver, A.; Kay, M.; Cooper, K.K. Comparative Genomics of Cocci-Shaped *Sporosarcina* Strains with Diverse Spatial Isolation. *BMC Genomics* **2018**, *19*, 1–

Referências

- 17, doi:10.1186/s12864-018-4635-8.
203. Radaelli, A.; Paganini, M.; Basavecchia, V.; Elli, V.; Neri, M.; Zanotto, C.; Pontieri, E.; De Giuli Morghen, C. Identification, Molecular Biotyping and Ultrastructural Studies of Bacterial Communities Isolated from Two Damaged Frescoes of St Damian's Monastery in Assisi. *Let. Appl. Microbiol.* **2004**, *38*, 447–453, doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01514.x.
204. Pettersson, O.V.; Leong, S.L.L.; Lantz, H.; Rice, T.; Dijksterhuis, J.; Houbraken, J.; Samson, R.A.; Schnürer, J. Phylogeny and Intraspecific Variation of the Extreme Xerophile, *Xeromyces Bisporus*. *Fungal Biol.* **2011**, *115*, 1100–1111, doi:10.1016/j.funbio.2011.06.012.
205. Leong, S. lin L.; Pettersson, O.V.; Rice, T.; Hocking, A.D.; Schnürer, J. The Extreme Xerophilic Mould *Xeromyces Bisporus* - Growth and Competition at Various Water Activities. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *145*, 57–63, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.025.
206. Leong, S. lin L.; Lantz, H.; Pettersson, O. V.; Frisvad, J.C.; Thrane, U.; Heipieper, H.J.; Dijksterhuis, J.; Grabherr, M.; Pettersson, M.; Tellgren-Roth, C.; et al. Genome and Physiology of the Ascomycete Filamentous Fungus *Xeromyces Bisporus*, the Most Xerophilic Organism Isolated to Date. *Environ. Microbiol.* **2015**, *17*, 496–513, doi:10.1111/1462-2920.12596.
207. Micheluz, A.; Manente, S.; Tigini, V.; Prigione, V.; Pinzari, F.; Ravagnan, G.; Varese, G.C. The Extreme Environment of a Library: Xerophilic Fungi Inhabiting Indoor Niches. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2015**, *99*, 1–7, doi:10.1016/j.ibiod.2014.12.012.
208. Wang, K.; Xu, C.; Li, D.; Gu, Z. Physiological and Biochemical Responses of *Sagittaria Trifolia* L. to Phytotoxic Ethyl Acetate Fungal Extract from *Curvularia Lunata* Strain CLST-01. *Plants* **2023**, *12*, 1–12, doi:10.3390/plants12091758.
209. Kalra, R.; Conlan, X.A.; Goel, M. Fungi as a Potential Source of Pigments: Harnessing Filamentous Fungi. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 1–23, doi:10.3389/fchem.2020.00369.
210. Boniek, D.; de Castro Mendes, I.; Abreu Oliveira Paiva, C.; Gomes de Paula Lana, U.; Fernando Batista dos Santos, A.; Aparecida de Resende Stoianoff, M. Ecology and Identification of Environmental Fungi and Metabolic Processes Involved in the Biodeterioration of Brazilian Soapstone Historical Monuments. *Let. Appl. Microbiol.* **2017**, *65*, 431–438, doi:https://doi.org/10.1111/lam.12794.
211. Senbua, W.; Wichitwechkarn, J. Molecular Identification of Fungi Colonizing Art Objects in Thailand and Their Growth Inhibition by Local Plant Extracts. *3 Biotech* **2019**, *9*, 1–10, doi:10.1007/s13205-019-1879-1.
212. Lourenço e Silva, A. Conservação e Restauro de Embrechados. In Proceedings of the Conservação e Restauro de Artes Decorativas de Aplicação Arquitectónica; Porto, 2012; p. 167.
213. Silva, I.; Salvador, C.; Arantes, S.; Miller, A.Z.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. The Decorated Garden Grotto of Condes de Basto Palace in Évora, Portugal: Microbial Community Characterization and Biocide Tests for Conservation. *Micro* **2024**, *4*, 117–131, doi:10.3390/micro4010008.
214. Ali AL-AMOODY, A.; Yayman, D.; Kaan, T.; Aysu ÖZKÖK, E.; Özcan, A.; Özen, E.; Çobanoğlu Özyiğitoğlu, G. Role of Lichen Secondary Metabolites and Pigments in UV-Screening Phenomenon in Lichens. *Acta Biol. Turc.* **2020**, *33*,

- 35–48.
215. Boluda, C.G.; Rico, V.J.; Hawksworth, D.L. Fluorescence Microscopy as a Tool for the Visualization of Lichen Substances within Bryoria Thalli. *Lichenol.* **2014**, *46*, 723–726, doi:10.1017/S0024282914000292.
 216. Grube, M.; Lücking, R. Fine Structures of Follicolous Lichens and Their Lichenicolous Fungi Studied by Epifluorescence. *Symbiosis* **2002**, *32*, 229–246.
 217. Šimonovičová, A.; Gódyová, M.; Ševc, J. Airborne and Soil Microfungi as Contaminants of Stone in a Hypogean Cemetery. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2004**, *54*, 7–11, doi:10.1016/j.ibiod.2003.11.004.
 218. Marco, A.; Santos, S.; Caetano, J.; Pintado, M.; Vieira, E.; Moreira, P.R. Basil Essential Oil as an Alternative to Commercial Biocides against Fungi Associated with Black Stains in Mural Painting. *Build. Environ.* **2020**, *167*, 106–459, doi:10.1016/j.buildenv.2019.106459.
 219. Elsayed, Y.; Shabana, Y. The Effect of Some Essential Oils on Aspergillus Niger and Alternaria Alternata Infestation in Archaeological Oil Paintings. *Mediterr. Archaeol. Archaeom.* **2018**, *18*, 71–87, doi:10.5281/zenodo.1461616.
 220. Dobretsov, S.; Al-Shibli, H.; Maharachchikumbura, S.S.N.; Al-Sadi, A.M. The Presence of Marine Filamentous Fungi on a Copper-Based Antifouling Paint. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 1–4, doi:10.3390/app11188277.
 221. Leplat, J.; François, A.; Bousta, F. Parengyodontium Album, a Frequently Reported Fungal Species in the Cultural Heritage Environment. *Fungal Biol. Rev.* **2020**, *34*, 126–135, doi:10.1016/j.fbr.2020.06.002.
 222. Mang, S.M.; Scrano, L.; Camele, I. Preliminary Studies on Fungal Contamination of Two Rupestrian Churches from Matera (Southern Italy). *Sustain.* **2020**, *12*, doi:10.3390/su12176988.
 223. Ponizovskaya, V.B.; Rebrikova, N.L.; Kachalkin, A. V.; Antropova, A.B.; Bilanenko, E.N.; Mokeeva, V.L. Micromycetes as Colonizers of Mineral Building Materials in Historic Monuments and Museums. *Fungal Biol.* **2019**, *123*, 290–306, doi:10.1016/j.funbio.2019.01.002.
 224. Trovão, J.; Tiago, I.; Catarino, L.; Gil, F.; Portugal, A. In Vitro Analyses of Fungi and Dolomitic Limestone Interactions: Bioreceptivity and Biodeterioration Assessment. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2020**, *155*, 105–107, doi:10.1016/j.ibiod.2020.105107.
 225. Trovão, J.; Portugal, A.; Soares, F.; Paiva, D.S.; Mesquita, N.; Coelho, C.; Pinheiro, A.C.; Catarino, L.; Gil, F.; Tiago, I. Fungal Diversity and Distribution across Distinct Biodeterioration Phenomena in Limestone Walls of the Old Cathedral of Coimbra, UNESCO World Heritage Site. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2019**, *142*, 91–102, doi:10.1016/j.ibiod.2019.05.008.
 226. Park, J.M.; Park, S.J.; Ghim, S.Y. Characterization of Three Antifungal Calcite-Forming Bacteria, Arthrobacter Nicotianae KNUC2100, Bacillus Thuringiensis KNUC2103, and Stenotrophomonas Maltophilia KNUC2106, Derived from the Korean Islands, Dokdo and Their Application on Mortar. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *23*, 1269–1278, doi:10.4014/jmb.1303.03085.
 227. Shirakawa, M.A.; Beech, I.B.; Tapper, R.; Cincotto, M.A.; Gambale, W. The Development of a Method to Evaluate Bioreceptivity of Indoor Mortar Plastering to Fungal Growth. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2003**, *51*, 83–92, doi:10.1016/S0964-8305(01)00129-9.

Referências

228. Borrego, S.; Molina, A.; Abrante, T. Sampling and Characterization of the Environmental Fungi in the Provincial Historic Archive of Pinar Del Río, Cuba. *J. Biomed. Res. Environ. Sci.* **2020**, *1*, 404–420, doi:10.37871/jbres1172.
229. Segers, F.J.J.; Meijer, M.; Houbraeken, J.; Samson, R.A.; Wösten, H.A.B.; Dijksterhuis, J. Xerotolerant *Cladosporium Sphaerospermum* Are Predominant on Indoor Surfaces Compared to Other *Cladosporium* Species. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–15, doi:10.1371/journal.pone.0145415.
230. Schoch, C.L.; Sung, G.H.; López-Giráldez, F.; Townsend, J.P.; Miadlikowska, J.; Hofstetter, V.; Robbertse, B.; Matheny, P.B.; Kauff, F.; Wang, Z.; et al. The Ascomycota Tree of Life: A Phylum-Wide Phylogeny Clarifies the Origin and Evolution of Fundamental Reproductive and Ecological Traits. *Syst. Biol.* **2009**, *58*, 224–239, doi:10.1093/sysbio/syp020.
231. Mihajlovski, A.; Lepinay, C.; Mirval, A.L.; Touron, S.; Boustia, F.; Di Martino, P. Characterization of the Archaeal and Fungal Diversity Associated with Gypsum Efflorescences on the Walls of the Decorated Sorcerer's Prehistoric Cave. *Ann. Microbiol.* **2019**, *69*, 1071–1078, doi:10.1007/s13213-019-01506-2.
232. Han, Y.; Huang, X.; Wang, Y.; Du, J.; Ma, K.; Chen, Y.; Li, N.; Zhang, Z.; Pan, J. Fungal Community and Biodeterioration Analysis of Hull Wood and Its Storage Environment of the Nanhai No. 1 Shipwreck. *Front. Microbiol.* **2021**, *11*, 1–14, doi:10.3389/fmicb.2020.609475.
233. Gheorghe, I.; Sarbu, L.; Pecete, I.; Blajan, I.; Balotescu, I. Multi-Level Characterization of Microbial Consortia Involved in the Biodeterioration of Wooden and Stone Romanian Heritage Churches. *Conserv. Sci. Cult. Herit.* **2020**, *20*, 289–308.
234. Sanders, W.B.; Masumoto, H. Lichen Algae: The Photosynthetic Partners in Lichen Symbioses. *Lichenol.* **2021**, *53*, 347–393, doi:10.1017/S0024282921000335.
235. Bungartz, F.; Söchting, U.; Arup, U. Teloschistaceae (Lichenized Ascomycota) from the Galapagos Islands: A Phylogenetic Revision Based on Morphological, Anatomical, Chemical, and Molecular Data. *Plant Fungal Syst.* **2020**, *65*, 515–576, doi:10.35535/pfsyst-2020-0030.
236. Ravera, S.; Vizzini, A.; Puglisi, M.; Assini, S.; Benesperi, R.; Bianchi, E.; Boccardo, F.; Bottegoni, F.; von Brackel, W.; Clericuzio, M.; et al. Notulae to the Italian Flora of Algae, Bryophytes, Fungi and Lichens: 13. *Ital. Bot.* **2022**, *13*, 1–17, doi:10.3897/italianbotanist.13.82155.
237. Cannon, P.; Arup, U.; Coppins, B.; Aptroot, A.; Sanderson, N.; Simkin, J.; Yahr, R. Teloschistales. *Revis. Br. Irish Lichens* **2024**, *43*, 1–75.
238. Gaya, E.; Fernández-Brime, S.; Vargas, R.; Lachlan, R.F.; Gueidang, C.; Ramírez-Mejía, M.; Lutzoni, F. The Adaptive Radiation of Lichen-Forming Teloschistaceae Is Associated with Sunscreening Pigments and a Bark-to-Rock Substrate Shift. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, 11600–11605, doi:10.1073/pnas.1507072112.
239. Mascalchi, M.; Osticioli, I.; Riminesi, C.; Cuzman, O.A.; Salvadori, B.; Siano, S. Preliminary Investigation of Combined Laser and Microwave Treatment for Stone Biodeterioration. *Stud. Conserv.* **2015**, *60*, S19–S27, doi:10.1179/0039363015Z.000000000203.
240. Abkouh, A.S.K.; Iranbakhsh, A.; Moniri, M.H.; Asri, Y. Statistical Comparison of

- Morphological and Anatomical Characters from *Verrucaria Nigrescens* Pers . Based on the Substrate along with Insects Attraction in the Northeast Zone of Iran. *Int. J. Entomol. Res.* **2020**, *5*, 115–124.
241. Cámara, B.; De Buergo, M.Á.; Fort, R.; Souza-Egipsy, V.; Perez-Ortega, S.; De Los Ríos, A.; Wierzchos, J.; Ascaso, C. Anthropoc Effect on the Lichen Colonization in Building Stones from Cultural Heritage. *Period. di Mineral.* **2015**, *84*, 539–552, doi:10.2451/2015PM0030.
242. Carter, N.E.A.; Viles, H.A. Lichen Hotspots: Raised Rock Temperatures beneath *Verrucaria Nigrescens* on Limestone. *Geomorphology* **2004**, *62*, 1–16, doi:10.1016/j.geomorph.2004.02.001.
243. Fröoberg, L.; Stoll, P.; Baur, A.; Baur, B. Snail Herbivory Decreases Cyanobacterial Abundance and Lichen Diversity along Cracks of Limestone Pavements. *Ecosphere* **2011**, *2*, doi:10.1890/ES10-00197.1.
244. Caneva, G.; Fidanza, M.R.; Tonon, C.; Favero-Longo, S.E. Biodeterioration Patterns and Their Interpretation for Potential Applications to Stone Conservation: A Hypothesis from Allelopathic Inhibitory Effects of Lichens on the Caestia Pyramid (Rome). *Sustain.* **2020**, *12*, doi:10.3390/su12031132.
245. Pinna, D.; Galeotti, M.; Perito, B.; Daly, G.; Salvadori, B. In Situ Long-Term Monitoring of Recolonization by Fungi and Lichens after Innovative and Traditional Conservative Treatments of Archaeological Stones in Fiesole (Italy). *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2018**, *132*, 49–58, doi:10.1016/j.ibiod.2018.05.003.
246. Morando, M.; Matteucci, E.; Nascimbene, J.; Borghi, A.; Piervittori, R.; Favero-Longo, S.E. Effectiveness of Aerobiological Dispersal and Microenvironmental Requirements Together Influence Spatial Colonization Patterns of Lichen Species on the Stone Cultural Heritage. *Sci. Total Environ.* **2019**, *685*, 1066–1074, doi:10.1016/j.scitotenv.2019.06.238.
247. Tonon, C.; Favero-Longo, S.E.; Matteucci, E.; Piervittori, R.; Croveri, P.; Appolonia, L.; Meirano, V.; Serino, M.; Elia, D. Microenvironmental Features Drive the Distribution of Lichens in the House of the Ancient Hunt, Pompeii, Italy. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2019**, *136*, 71–81, doi:10.1016/j.ibiod.2018.10.012.
248. Favero-Longo, S.E.; Castelli, D.; Fubini, B.; Piervittori, R. Lichens on Asbestos-Cement Roofs: Bioweathering and Biocovering Effects. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *162*, 1300–1308, doi:10.1016/j.jhazmat.2008.06.060.
249. Nascimbene, J.; Salvadori, O. Lichen Recolonization on Restored Calcareous Statues of Three Venetian Villas. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2008**, *62*, 313–318, doi:10.1016/j.ibiod.2007.11.005.
250. Altieri, A.; Pietrini, M.; Ricci, S.; Roccardi, A.; Piervittori, R. The Temples of the Archaeological Area of Paestum (Italy): A Case Study on Biodeterioration. In *Proceedings of the 9th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*; Fassina, V., Ed.; Elsevier Science B.V., 2000; pp. 433–443 ISBN 9780444505170.
251. de los Ríos, A.; Cámara, B.; García del Cura, M.Á.; Rico, V.J.; Galván, V.; Ascaso, C. Deteriorating Effects of Lichen and Microbial Colonization of Carbonate Building Rocks in the Romanesque Churches of Segovia (Spain). *Sci. Total Environ.* **2009**, *407*, 1123–1134, doi:10.1016/j.scitotenv.2008.09.042.
252. Bajpai, R.; Upreti, D.K.; Nayaka, S. The Lichen Genera *Lepraria* (Stereocaulaceae) and *Leprocaulon* (Leprocaulaceae) in India. *Phytotaxa* **2018**,

Referências

- 356, 101–116, doi:10.11646/phytotaxa.356.2.1.
253. Kroken, S.; Taylor, J.W. Phylogenetic Species, Reproductive Mode, and Specificity of the Green Alga *Trebouxia* Forming Lichens with the Fungal Genus *Letharia*. *Bryologist* **2000**, *103*, 645–660.
254. Ahmadjian, V. *Trebouxia*: Reflections on a Perplexing and Controversial Lichen Photobiont. In *Symbiosis: Mechanisms and Model Systems*; Seckbach, J., Ed.; Springer, 2001; Vol. 4, pp. 373–383.
255. Kosecka, M.; Kukwa, M.; Jabłońska, A.; Flakus, A.; Rodriguez-Flakus, P.; Ptach, L.; Guzow-Krzemińska, B. Phylogeny and Ecology of *Trebouxia* Photobionts From Bolivian Lichens. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, doi:10.3389/fmicb.2022.779784.
256. Nyati, S.; Scherrer, S.; Werth, S.; Honegger, R. Green-Algal Photobiont Diversity (*Trebouxia* Spp.) in Representatives of Teloschistaceae (Lecanoromycetes, Lichen-Forming Ascomycetes). *Lichenologist* **2014**, *46*, 189–212, doi:10.1017/S0024282913000819.
257. Gärtner, G.; Stoyneva, M.P. First Study of Aerophytic Cryptogams on Monuments in Bulgaria. *Berichte-Naturwissenschaftlich Medizinischen Vereins in Innsbruck* **2003**, *90*, 73–82.
258. Antonelli, F.; Esposito, A.; Calvo, L.; Licursi, V.; Tisseyre, P.; Ricci, S.; Romagnoli, M.; Piazza, S.; Guerrieri, F. Characterization of Black Patina from the Tiber River Embankments Using Next-Generation Sequencing. *PLoS One* **2020**, *15*, 1–24, doi:10.1371/journal.pone.0227639.
259. Grube, M.; Cernava, T.; Soh, J.; Fuchs, S.; Aschenbrenner, I.; Lassek, C.; Wegner, U.; Becher, D.; Riedel, K.; Sensen, C.W.; et al. Exploring Functional Contexts of Symbiotic Sustain within Lichen-Associated Bacteria by Comparative Omics. *ISME J.* **2015**, *9*, 412–424, doi:10.1038/ismej.2014.138.
260. Grimm, M.; Grube, M.; Schiefelbein, U.; Zühlke, D.; Bernhardt, J.; Riedel, K. The Lichens' Microbiota, Still a Mystery? *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 1–25, doi:10.3389/fmicb.2021.623839.
261. Bates, S.T.; Cropsey, G.W.G.; Caporaso, J.G.; Knight, R.; Fierer, N. Bacterial Communities Associated with the Lichen Symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 1309–1314, doi:10.1128/AEM.02257-10.
262. Grube, M.; Wedin, M. Lichenized Fungi and the Evolution of Symbiotic Organization. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4*, 749–765, doi:10.1128/9781555819583.ch36.
263. Skipper, P.J.A.; Skipper, L.K.; Dixon, R.A. A Metagenomic Analysis of the Bacterial Microbiome of Limestone, and the Role of Associated Biofilms in the Biodeterioration of Heritage Stone Surfaces. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 1–18, doi:10.1038/s41598-022-08851-4.
264. El Othmany, R.; Zahir, H.; Ellouali, M.; Latrache, H. Current Understanding on Adhesion and Biofilm Development in Actinobacteria. *Int. J. Microbiol.* **2021**, *2021*, 3–4, doi:10.1155/2021/6637438.
265. Ding, Y.; Salvador, C.S.C.; Caldeira, A.T.; Angelini, E.; Schiavon, N. Biodegradation and Microbial Contamination of Limestone Surfaces: An Experimental Study from Batalha Monastery, Portugal. *Corros. Mater. Degrad.* **2021**, *2*, 31–45, doi:10.3390/cmd2010002.
266. Rikkinen, J. Molecular Studies on Cyanobacterial Diversity in Lichen Symbioses.

- MycKeys* **2013**, 6, 3–32, doi:10.3897/mycokeys.6.3869.
267. Erlacher, A.; Cernava, T.; Cardinale, M.; Soh, J.; Sensen, C.W.; Grube, M.; Berg, G. Rhizobiales as Functional and Endosymbiotic Members in the Lichen Symbiosis of *Lobaria Pulmonaria* L. *Front. Microbiol.* **2015**, 6, 53, doi:10.3389/fmicb.2015.00053.
268. Bjelland, T.; Grube, M.; Hoem, S.; Jorgensen, S.L.; Daae, F.L.; Thorseth, I.H.; Øvreås, L. Microbial Metacommunities in the Lichen-Rock Habitat. *Environ. Microbiol. Rep.* **2011**, 3, 434–442, doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00206.x.
269. Noh, H.-J.; Park, Y.; Hong, S.G.; Lee, Y.M. Diversity and Physiological Characteristics of Antarctic Lichens-Associated Bacteria. *Microorganisms* **2021**, 9, 607, doi:10.3390/microorganisms9030607.
270. Miller, A.Z.; Leal, N.; Laiz, L.; Rogerio-Candelera, M.A.; Silva, R.J.C.; Dionísio, A.; Macedo, M.F.; Saiz-Jimenez, C. Primary Bioreceptivity of Limestones Used in Southern European Monuments. *Geol. Soc. Spec. Publ.* **2010**, 331, 79–92, doi:10.1144/SP331.6.
271. Ding, Y.; Mirao, J.; Redol, P.; Dias, L.; Moita, P.; Angelini, E.; Grassini, S.; Schiavon, N. Provenance Study of the Limestone Used in the Construction and Restoration of the Batalha Monastery (Portugal). *Acta IMEKO* **2021**, 10, 122–128, doi:10.21014/ACTA_IMEKO.V10I1.857.
272. Ding, Y.; Mirao, J.; Redol, P.; Dias, L.; Moita, P.; Angelini, E.; Grassini, S.; Schiavon, N. A Combined Petrographic and Geochemical Metrological Approach to Assess the Provenance of the Building Limestone Used in the Batalha Monastery (Portugal). *Acta IMEKO* **2021**, 10, 122–128, doi:https://doi.org/10.21014/acta_imeko.v10i1.857.
273. Mateus, D.M.R.; Silva, R.B.; Costa, F.M.C.; Coroado, J.P.F. Diversidade Microbiológica Do Edifício Da Sacristia Incompleta Do Convento de Cristo, Em Tomar, e Avaliação Do Seu Controlo Por Biocidas. *Conserv. Patrim.* **2013**, 17, 11–20, doi:10.14568/cp2012005.
274. Rosado, T.; Silva, M.; Galvão, A.; Mirão, J.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. A First Insight on the Biodegradation of Limestone: The Case of the World Heritage Convent of Christ. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* **2016**, 122, 1–7, doi:10.1007/s00339-016-0525-6.
275. Manhita, A.; Martins, S.; Dias, C.B.; Cardoso, A.; Candeias, A.; Gil, M. An Unusual Mural Paintings at the Charola of the Convent of Tomar: Red Lakes and Organic Binders. *Color Res. Appl.* **2016**, 41, 258–262, doi:10.1002/col.22009.
276. Rosado, T.; Silva, M.T.C. da; Candeias, A.; Caldeira, A.T.; Mirão, J.; Galvão, A.; Santos, A. Stone Biodegradation and Mitigation—the Case of Convent of Christ, Portugal. In *Conserving Cultural Heritage*; Gil Almoraima, M., Mosquera, M.J., Eds.; CRC Press, 2018; pp. 307–309 ISBN 9781315158648.
277. Lutzoni, F.; Pagel, M.; Reeb, V. Major Fungal Lineages Are Derived from Lichen Symbiotic Ancestors. *Nature* **2001**, 411, 937–940, doi:10.1038/35082053.
278. Seaward, M. Lichens as Subversive Agents of Biodeterioration. In *Biodeterioration of Stone Surfaces*; Clair, L., Seaward, M., Eds.; Springer Dordrecht, 2004; pp. 9–18 ISBN 978-1-4020-2845-8.
279. Carballal, R.; Paz-Bermúdez, G.; Sánchez-Biezma, M.J.; Prieto, B. Lichen Colonization of Coastal Churches in Galicia: Biodeterioration Implications. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2001**, 47, 157–163, doi:10.1016/S0964-8305(01)00044-

Referências

- 0.
280. Nattah, I.; Touhami, A.O.; Benkirane, R.; Douira, A. Etude Des Lichens Du Site de Chellah, Monument Historique de Rabat , Dont Placidium Squamulosum (Ach.) Breuss, Nouvelle Espèce Pour La Flore Lichénique Du Maroc. *Int. J. Innov. Sci. Res.* **2015**, *19*, 377–401.
281. Llewellyn, T.; Nowell, R.W.; Aptroot, A.; Temina, M.; Prescott, T.A.K.; Barraclough, T.G.; Gaya, E. Metagenomics Shines Light on the Evolution of “Sunscreen” Pigment Metabolism in the Teloschistales (Lichen-Forming Ascomycota). *Genome Biol. Evol.* **2023**, *15*, 1–19, doi:10.1093/gbe/evad002.
282. Kwan, J. Bright Orange Lichens Can Use Their Pigments as a ‘Sunscreen’ Available online: <https://www.imperial.ac.uk/news/243094/bright-orange-lichens-their-pigments-sunscreen/> (accessed on 27 September 2024).
283. Leo, F. De; Dominguez-moñino, I.; Jurado, V.; Bruno, L.; Saiz-jimenez, C.; Urzi, C. Fungal Outbreak in the Catacombs of SS. Marcellino and Pietro Rome (Italy): From Diagnosis to an Emergency Treatment. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 982–933, doi:10.3389/fmicb.2022.982933.
284. Escudero-Leyva, E.; Vieto, S.; Avendaño, R.; Rojas-Gätjens, D.; Agüero, P.; Pacheco, C.; Montero, M.L.; Chaverri, P.; Chavarría, M. Fungi with History: Unveiling the Mycobiota of Historic Documents of Costa Rica. *PLoS One* **2023**, *18*, 1–17, doi:10.1371/journal.pone.0279914.
285. Gutarowska, B. Moulds in Biodeterioration of Technical Materials. *Folia Biol. Oecologica* **2014**, *10*, 27–39, doi:10.2478/fobio-2014-0012.
286. Ramírez, N.; Sigurbjörnsdóttir, M.A.; Monteil, C.; Berge, O.; Heiðmarsson, S.; Jackson, R.W.; Morris, C.; Vilhelmsson, O. Pseudomonas Syringae Isolated in Lichens for the First Time: Unveiling Peltigera Genus as the Exclusive Host. *Environ. Microbiol.* **2023**, *25*, 3502–3511, doi:10.1111/1462-2920.16490.
287. Ramírez, N.; Vinchira-Villarraga, D.; Rabiey, M.; Sigurbjörnsdóttir, M.A.; Heiðmarsson, S.; Vilhelmsson, O.; Jackson, R.W. Exploring the Exclusive Isolation of Pseudomonas Syringae in Peltigera Lichens via Metabolite Analysis and Growth Assays. *Environ. Microbiol.* **2025**, *27*, e70057, doi:10.1111/1462-2920.70057.
288. Nahar, S.; Jeong, M.-H.; Hur, J.-S. Lichen-Associated Bacterium, a Novel Bioresource of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production and Simultaneous Degradation of Naphthalene and Anthracene. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *29*, 79–90, doi:10.4014/jmb.1808.08037.
289. Rosendahl, S. The Templar Town Tomar. Stories, Stones and Streets. *J. Tour. Herit. Res.* **2022**, *5*, 77–94.
290. Nguyen, K.H.; Chollet-Krugler, M.; Gouault, N.; Tomasi, S. UV-Protectant Metabolites from Lichens and Their Symbiotic Partners. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 1490–1508, doi:10.1039/c3np70064j.
291. Lin, L.; Xu, J. Production of Fungal Pigments: Molecular Processes and Their Applications. *J. Fungi* **2023**, *9*, doi:10.3390/jof9010044.
292. Mafole, T.C.; Solhaug, K.A.; Minibayeva, F.V.; Beckett, R.P. Occurrence and Possible Roles of Melanic Pigments in Lichenized Ascomycetes. *Fungal Biol. Rev.* **2019**, *33*, 159–165, doi:10.1016/j.fbr.2018.10.002.
293. Devi, S.; Karuppan, P. Reddish Brown Pigments from Alternaria Alternata for

- Textile Dyeing and Printing. *Indian J. Fibre Text. Res.* **2015**, *40*, 315–319.
294. Wang, X.W.; Bai, F.Y.; Bensch, K.; Meijer, M.; Sun, B.D.; Han, Y.F.; Crous, P.W.; Samson, R.A.; Yang, F.Y.; Houbraken, J. Phylogenetic Re-Evaluation of *Thielavia* with the Introduction of a New Family Podosporeaceae. *Stud. Mycol.* **2019**, *93*, 155–252, doi:10.1016/j.simyco.2019.08.002.
295. Ibrahim, S.R.M.; Altyar, A.E.; Mohamed, S.G.A.; Mohamed, G.A. Genus *Thielavia*: Phytochemicals, Industrial Importance and Biological Relevance. *Nat. Prod. Res.* **2022**, *36*, 5108–5123, doi:10.1080/14786419.2021.1919105.
296. Blanchette, R.A.; Held, B.W.; Arenz, B.E.; Jurgens, J.A.; Baltes, N.J.; Duncan, S.M.; Farrell, R.L. An Antarctic Hot Spot for Fungi at Shackleton's Historic Hut on Cape Royds. *Microb. Ecol.* **2010**, *60*, 29–38, doi:10.1007/s00248-010-9664-z.
297. Harutyunyan, S.; Muggia, L.; Grube, M. Black Fungi in Lichens from Seasonally Arid Habitats. *Stud. Mycol.* **2008**, *61*, 83–90, doi:10.3114/sim.2008.61.08.
298. Jurado, V.; Miller, A.Z.; Cuezva, S.; Fernandez-Cortes, A.; Benavente, D.; Rogerio-Candellera, M.A.; Reyes, J.; Cañaveras, J.C.; Sanchez-Moral, S.; Saiz-Jimenez, C. Recolonization of Mortars by Endolithic Organisms on the Walls of San Roque Church in Campeche (Mexico): A Case of Tertiary Bioreceptivity. *Constr. Build. Mater.* **2014**, *53*, 348–359, doi:10.1016/j.conbuildmat.2013.11.114.
299. Cannon, P.; Orange, A.; Aptroot, A.; Coppins, B.; Fletcher, A.; Fryday, A.; Sanderson, N.; Simkin, J.; Van den Boom, P. Caliciales: Catillariaceae, Including the Genera *Catillaria* and *Solenopsora*. *Revis. Br. Irish Lichens* **2022**, *22*, 1–13.
300. Biswas, J.; Sharma, K.; Harris, K.K.; Rajput, Y. Biodeterioration Agents: Bacterial and Fungal Diversity Dwelling in or on the Pre-Historic Rock-Paints of Kabra-Pahad, India. *Iran. J. Microbiol.* **2013**, *5*, 309–314.
301. Nugari, M.P.; Pietrini, A.M.; Caneva, G.; Imperi, F.; Visca, P. Biodeterioration of Mural Paintings in a Rocky Habitat: The Crypt of the Original Sin (Matera, Italy). *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2009**, *63*, 705–711, doi:10.1016/j.ibiod.2009.03.013.
302. Moura Soares, C. The Archival Sources of the Batalha Monastery (Portugal): Unique Collections for the Study of the Monument's Restoration Work in the 19th Century. *An. Hist. del Arte* **2022**, *32*, 255–288, doi:10.5209/anha.83072.
303. Valadas, S.; Candeias, A.; Dias, C.; Schiavon, N.; Cotovio, M.; Pestana, J.; Gil, M.; Mirão, J. A Multi-Analytical Study of the Fifteenth Century Mural Paintings of the Batalha Monastery (Portugal) in View of Their Conservation. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* **2013**, *113*, 989–998, doi:10.1007/s00339-013-7727-y.
304. Ding, Y.; Redol, P.; Angelini, E.; Mirão, J.; Schiavon, N. Surface Orange Patinas on the Limestone of the Batalha Monastery (Portugal): Characterization and Decay Patterns. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2022**, *29*, 29467–29477, doi:10.1007/s11356-021-15490-1.
305. Silva, I.; Salvador, C.; Miller, A.Z.; Candeias, A.; Caldeira, A.T. The Role of Bacteria in Pink Stone Discoloration: Insights from Batalha Monastery. *Micro* **2024**, *4*, 778–797, doi:10.3390/micro4040048.
306. Rinta-Kanto, J.M.; Ouellette, A.J.A.; Boyer, G.L.; Twiss, M.R.; Bridgeman, T.B.; Wilhelm, S.W. Quantification of Toxic *Microcystis* Spp. during the 2003 and 2004 Blooms in Western Lake Erie Using Quantitative Real-Time PCR. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 4198–4205, doi:10.1021/es048249u.
307. Goswami, G.; Panda, D.; Samanta, R.; Boro, R.C.; Modi, M.K.; Bujarbaruah, K.M.;

Referências

- Barooh, M. *Bacillus Megaterium* Adapts to Acid Stress Condition through a Network of Genes: Insight from a Genome-Wide Transcriptome Analysis. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–12, doi:10.1038/s41598-018-34221-0.
308. Mitchell, C.; Iyer, S.; Skomurski, J.F.; Vary, J.C. Red Pigment in *Bacillus Megaterium* Spores. *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, *52*, 64–67, doi:10.1128/aem.52.1.64-67.1986.
309. Khaneja, R.; Perez-Fons, L.; Fakhry, S.; Baccigalupi, L.; Steiger, S.; To, E.; Sandmann, G.; Dong, T.C.; Ricca, E.; Fraser, P.D.; et al. Carotenoids Found in *Bacillus*. *J. Appl. Microbiol.* **2010**, *108*, 1889–1902, doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04590.x.
310. Moeller, R.; Horneck, G.; Facius, R.; Stackebrandt, E. Role of Pigmentation in Protecting *Bacillus* Sp. Endospores against Environmental UV Radiation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2005**, *51*, 231–236, doi:10.1016/j.femsec.2004.08.008.
311. Bang Hong, L.; Huynh Nguyen, N.; Nguyen Le Thanh, D.; Nguyen, M.C. Isolation and Screening of Carotenoid-Producing *Bacillus* Spp. from Seashore Saline Soil and Seawater at Hon Son Islet. *Can Tho Univ. J. Sci.* **2021**, *13*, 39–47, doi:10.22144/ctu.jen.2021.005.
312. Van Dien, S.J.; Marx, C.J.; O'Brien, B.N.; Lidstrom, M.E. Genetic Characterization of the Carotenoid Biosynthetic Pathway in *Methylobacterium Exorquens* AM1 and Isolation of a Colorless Mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 7563–7566, doi:10.1128/AEM.69.12.7563-7566.2003.
313. Mo, X.H.; Sun, Y.M.; Bi, Y.X.; Zhao, Y.; Yu, G.H.; Tan, L. ling; Yang, S. Characterization of C30 Carotenoid and Identification of Its Biosynthetic Gene Cluster in *Methylobacterium Exorquens* AM1. *Synth. Syst. Biotechnol.* **2023**, *8*, 527–535, doi:10.1016/j.synbio.2023.08.002.
314. Yano, T.; Kubota, H.; Hanai, J.; Hitomi, J.; Tokuda, H. Stress Tolerance of *Methylobacterium* Biofilms in Bathrooms. *Microbes Environ.* **2013**, *28*, 87–95, doi:10.1264/jsme2.ME12146.
315. Ochsner, A.M.; Sonntag, F.; Buchhaupt, M.; Schrader, J.; Vorholt, J.A. *Methylobacterium Exorquens*: Methylo-trophy and Biotechnological Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 517–534, doi:10.1007/s00253-014-6240-3.
316. Tescari, M.; Visca, P.; Frangipani, E.; Bartoli, F.; Rainer, L.; Caneva, G. Celebrating Centuries: Pink-Pigmented Bacteria from Rosy Patinas in the House of Bicentenary (Herculaneum, Italy). *J. Cult. Herit.* **2018**, *34*, 43–52, doi:10.1016/j.culher.2018.02.015.
317. Jeon, B.Y.; Kim, B.Y.; Jung, I.L.; Park, D.H. Metabolic Roles of Carotenoid Produced by Non-Photosynthetic Bacterium *Gordonia Alkanivorans* SKF120101. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *22*, 1471–1477, doi:10.4014/jmb.1207.07038.
318. Kummer, C.; Schumann, P.; Stackebrandt, E. *Gordonia Alkanivorans* Sp. Nov., Isolated from Tar-Contaminated Soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1999**, *49*, 1513–1522, doi:10.1099/00207713-49-4-1513.
319. Pacheco, M. Production of *Gordonia Alkanivorans* Strain 1B Biomass in Bioreactor and Further Application towards Fossil Fuels Desulfurization, Faculdade de Ciências, Lisboa, 2015.
320. Arenskötter, M.; Bröker, D.; Steinbüchel, A. Biology of the Metabolically Diverse Genus *Gordonia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 3195–3204, doi:10.1128/AEM.70.6.3195-3204.2004.

321. Frantsuzova, E.; Bogun, A.; Shishkina, L.; Vetrova, A.; Solyanikova, I.; Delegan, Y. Insights into the Potential Role of *Gordonia Alkanivorans* Strains in Biotechnologies. *Processes* **2023**, *11*, 3184, doi:10.3390/pr11113184.
322. Rheims, H.; Schumann, P.; Rohde, M.; Stackebrandt, E. *Verrucospora Giffhornensis* Gen. Nov., Sp. Nov., a New Member of the Actinobacterial Family Micromonosporaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1998**, *48*, 1119–1127, doi:10.1099/00207713-48-4-1119.
323. Zhang, C.X.; Yang, S.Y.; Xu, M.X.; Sun, J.; Liu, H.; Liu, J.R.; Liu, H.; Kan, F.; Sun, J.; Lai, R.; et al. *Serratia Nematodiphila* Sp. Nov., Associated Symbiotically with the Entomopathogenic Nematode *Heterorhabditoides Chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2009**, *59*, 1603–1608, doi:10.1099/ij.s.0.003871-0.
324. Gondil, V.S.; Asif, M.; Bhalla, T.C. Optimization of Physicochemical Parameters Influencing the Production of Prodigiosin from *Serratia Nematodiphila* RL2 and Exploring Its Antibacterial Activity. *3 Biotech* **2017**, *7*, 1–8, doi:10.1007/s13205-017-0979-z.
325. Zhang, Y.; Su, M.; Wu, F.; Gu, J.D.; Li, J.; He, D.; Guo, Q.; Cui, H.; Zhang, Q.; Feng, H. Diversity and Composition of Culturable Microorganisms and Their Biodeterioration Potentials in the Sandstone of Beishiku Temple, China. *Microorganisms* **2023**, *11*, doi:10.3390/microorganisms11020429.
326. Turnbull, P.C.B. *Bacillus*. In *Medical Microbiology*; Baron, S., Turnbull, P.C.B., Eds.; Copyright: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
327. Scheerer, S.; Ortega-Morales, O.; Gaylarde, C. Microbial Deterioration of Stone Monuments - An Updated Overview. In *Advances in Applied Microbiology*; Laskin, A.I., Sariaslani, S., Gadd, Geoffrey, M., Eds.; Elsevier Inc., 2009; Vol. 66, pp. 97–139.
328. Kiel, G.; Gaylarde, C.C. Bacterial Diversity in Biofilms on External Surfaces of Historic Buildings in Porto Alegre. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *22*, 293–297, doi:10.1007/s11274-005-9035-y.
329. Ahmed, E.A.-E.; Mohamed, R.M. Bacterial Deterioration in the Limestone Minaret of Prince Muhammad and Suggested Treatment Methods, Akhmim, Egypt. *Geomaterials* **2022**, *12*, 37–58, doi:10.4236/gm.2022.123004.
330. Pane, L.; Radin, L.; Franconi, G.; Carli, A. The Carotenoid Pigments of a Marine *Bacillus Firmus* Strain. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **1996**, *72*, 303–308.
331. Steiger, S.; Perez-Fons, L.; Fraser, P.D.; Sandmann, G. Biosynthesis of a Novel C 30 Carotenoid in *Bacillus Firmus* Isolates. *J. Appl. Microbiol.* **2012**, *113*, 888–895, doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05377.x.
332. Ngo, H.T.; Nguyen, T.T.N.; Nguyen, Q.M.; Tran, A. V.; Do, H.T.V.; Nguyen, A.H.; Phan, T.N.; Nguyen, A.T.V. Screening of Pigmented *Bacillus Aquimaris* SH6 from the Intestinal Tracts of Shrimp to Develop a Novel Feed Supplement for Shrimp. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, *121*, 1357–1372, doi:10.1111/jam.13274.
333. Suresh, L.; Nagaraju, A.; Chouhan, R.; Podeti, S. Isolation and Molecular Characterization of *Rummelii Bacillus Stabekisii*: An Efficient Protease Producing Bacterial Strain Identified from Environmental Waste Samples of Warangal District in Telangana. *J. Pure Appl. Microbiol.* **2020**, *14*, 461–472, doi:10.22207/JPAM.14.1.48.
334. Harirchi, S.; Sar, T.; Ramezani, M.; Aliyu, H.; Etemadifar, Z.; Nojoumi, S.A.;

Referências

- Yazdian, F.; Awasthi, M.K.; Taherzadeh, M.J. Bacillales: From Taxonomy to Biotechnological and Industrial Perspectives. *Microorganisms* **2022**, *10*, 1–46, doi:10.3390/microorganisms10122355.
335. Mudgil, D.; Baskar, S.; Baskar, R.; Paul, D.; Shouche, Y.S. Biomineralization Potential of *Bacillus Subtilis*, *Rummeliibacillus Stabekisii* and *Staphylococcus Epidermidis* Strains In Vitro Isolated from Speleothems, Khasi Hill Caves, Meghalaya, India. *Geomicrobiol. J.* **2018**, *35*, 675–694, doi:10.1080/01490451.2018.1450461.
336. Afroz Toma, M.; Rahman, M.H.; Rahman, M.S.; Arif, M.; Nazir, K.H.M.N.H.; Dufossé, L. Fungal Pigments: Carotenoids, Riboflavin, and Polyketides with Diverse Applications. *J. Fungi* **2023**, *9*, doi:10.3390/jof9040454.
337. So, K.K.; Chung, Y.J.; Kim, J.M.; Kim, B.T.; Park, S.M.; Kim, D.H. Identification of a Polyketide Synthase Gene in the Synthesis of Phleochrome of the Phytopathogenic Fungus *Cladosporium Phlei*. *Mol. Cells* **2015**, *38*, 1105–1110, doi:10.14348/molcells.2015.0208.
338. Singh, R.S.; Saini, G.K.; Kennedy, J.F. Downstream Processing and Characterization of Pullulan from a Novel Colour Variant Strain of *Aureobasidium Pullulans* FB-1. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *78*, 89–94, doi:10.1016/j.carbpol.2009.03.040.
339. Isola, D.; Lee, H.J.; Chung, Y.J.; Zucconi, L.; Pelosi, C. Once upon a Time, There Was a Piece of Wood: Present Knowledge and Future Perspectives in Fungal Deterioration of Wooden Cultural Heritage in Terrestrial Ecosystems and Diagnostic Tools. *J. Fungi* **2024**, *10*, doi:10.3390/jof10050366.
340. Fernandes Barreira, C.; João Melo, M.; Araújo, R.; Casanova, C. Through the Eyes of Science and Art: A Fourteenth-Century Winter Breviary from Alcobça Scriptorium. *J. Mediev. Iber. Stud.* **2016**, *8*, 252–282, doi:10.1080/17546559.2016.1221119.
341. Villa, F.; Wu, Y.L.; Zerboni, A.; Cappitelli, F. In Living Color: Pigment-Based Microbial Ecology At the Mineral-Air Interface. *Bioscience* **2022**, *72*, 1156–1175, doi:10.1093/biosci/biac091.
342. Ricciardi, M.; Pironti, C.; Motta, O.; Fiorillo, R.; Camin, F.; Faggiano, A.; Proto, A. Investigations on Historical Monuments' Deterioration through Chemical and Isotopic Analyses: An Italian Case Study. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2022**, *29*, 29409–29418, doi:10.1007/s11356-021-15103-x.
343. Vazquez, P.; Sartor, L.; Thomachot-Schneider, C. Influence of Substrate and Temperature on the Crystallization of KNO₃ Droplets Studied by Infrared Thermography. *Prog. Earth Planet. Sci.* **2018**, *5*, doi:10.1186/s40645-018-0229-y.
344. Zhao, C.; Zhang, Y.; Wang, C.C.; Hou, M.; Li, A. Recent Progress in Instrumental Techniques for Architectural Heritage Materials. *Herit. Sci.* **2019**, *7*, 1–50, doi:10.1186/s40494-019-0280-z.
345. Romano, I.; Abbate, M.; Poli, A.; D'Orazio, L. Bio-Cleaning of Nitrate Salt Efflorescence on Stone Samples Using Extremophilic Bacteria. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–11, doi:10.1038/s41598-018-38187-x.
346. Ruiz-Agudo, E.; Lubelli, B.; Sawdy, A.; van Hees, R.; Price, C.; Rodriguez-Navarro, C. An Integrated Methodology for Salt Damage Assessment and Remediation: The Case of San Jerónimo Monastery (Granada, Spain). *Environ.*

- Earth Sci.* **2011**, *63*, 1475–1486, doi:10.1007/s12665-010-0661-9.
347. Siedel, H. Salt Efflorescence as Indicator for Sources of Damaging Salts on Historic Buildings and Monuments: A Statistical Approach. *Environ. Earth Sci.* **2018**, *77*, 1–20, doi:10.1007/s12665-018-7752-4.
348. Maguregui, M.; Sarmiento, A.; Martínez-Arkarazo, I.; Angulo, M.; Castro, K.; Arana, G.; Etxebarria, N.; Madariaga, J.M. Analytical Diagnosis Methodology to Evaluate Nitrate Impact on Historical Building Materials. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1361–1370, doi:10.1007/s00216-008-1844-z.
349. Benavente, D.; de Jongh, M.; Cañaveras, J.C. Weathering Processes and Mechanisms Caused by Capillary Waters and Pigeon Droppings on Porous Limestones. *Minerals* **2021**, *11*, 1–16, doi:10.3390/min11010018.
350. Stahlbuhk, A.; Steiger, M. Damage Potential and Supersaturation of KNO₃ and Relevance in the Field of Salt Damage to Porous Building Material. *Constr. Build. Mater.* **2022**, *325*, 126516, doi:10.1016/j.conbuildmat.2022.126516.
351. Mason, C.; Randhawa, A.; Watson, K.; Friedman, C.R.; Cheeptham, N. Using Scanning Electron Microscopy to Study Microbial Communities in Speleothem Samples Collected from Iron Curtain Cave. *J. Exp. Microbiol. Immunol.* **2016**, *2*, 1–7.
352. Kenzaka, T.; Tani, K. Scanning Electron Microscopy Imaging of Bacteria Based on Nucleic Acid Sequences. In *Scanning Electron Microscopy*; Kazmiruk, V., Ed.; IntechOpen, 2012 ISBN 0000957720.
353. Li, D.; Li, Y.; Wang, Z.; Wang, X.; Li, Y. Quantitative, SEM-Based Shape Analysis of Sediment Particles in the Yellow River. *Int. J. Sediment Res.* **2016**, *31*, 341–350, doi:10.1016/j.ijsrc.2016.05.006.
354. Moropoulou, A.; Zendri, E.; Ortiz, P.; Delegou, E.T.; Ntoutsis, I.; Balliana, E.; Becerra, J.; Ortiz, R. Scanning Microscopy Techniques as an Assessment Tool of Materials and Interventions for the Protection of Built Cultural Heritage. *Scanning* **2019**, *2019*, doi:10.1155/2019/5376214.
355. Khan, M.S.I.; Oh, S.W.; Kim, Y.J. Power of Scanning Electron Microscopy and Energy Dispersive X-Ray Analysis in Rapid Microbial Detection and Identification at the Single Cell Level. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–10, doi:10.1038/s41598-020-59448-8.
356. Song, Q.; Zha, J.; Bai, Y.; Chen, L.; Zhang, Y.; Guo, H. Type and Sources of Salt Efflorescence in Painted Stone Carvings from Pujiang Museum, Sichuan, China. *Crystals* **2023**, *13*, doi:10.3390/cryst13020273.
357. Freney, E.J.; Martin, S.T.; Buseck, P.R. Deliquescence and Efflorescence of Potassium Salts Relevant to Biomass-Burning Aerosol Particles. *Aerosol Sci. Technol.* **2009**, *43*, 799–807, doi:10.1080/02786820902946620.
358. Zhang, H.; Gu, W.; Li, Y.J.; Tang, M. Hygroscopic Properties of Sodium and Potassium Salts as Related to Saline Mineral Dusts and Sea Salt Aerosols. *J. Environ. Sci. (China)* **2020**, *95*, 65–72, doi:10.1016/j.jes.2020.03.046.
359. Adamiak, J.; Otlewska, A.; Gutarowska, B. Halophilic Microbial Communities in Deteriorated Buildings. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *31*, 1489–1499, doi:10.1007/s11274-015-1913-3.
360. Pinheiro, A.C.; Mesquita, N.; Trovão, J.; Soares, F.; Tiago, I.; Coelho, C.; de Carvalho, H.P.; Gil, F.; Catarino, L.; Piñar, G.; et al. Limestone Biodeterioration: A

Referências

- Review on the Portuguese Cultural Heritage Scenario. *J. Cult. Herit.* **2019**, *36*, 275–285, doi:10.1016/j.culher.2018.07.008.
361. Oren, A. The Family Halobacteriaceae. In *The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea*; DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F., Eds.; Springer: Berlin, Heidelberg, 2014; Vol. 42, pp. 41–121 ISBN 9783642301230.
362. Tichy, J.; Waldherr, M.; Ortbauer, M.; Graf, A.; Sipek, B.; Jembrih-Simbuenger, D.; Sterflinger, K.; Piñar, G. Pretty in Pink? Complementary Strategies for Analysing Pink Biofilms on Historical Buildings. *Sci. Total Environ.* **2023**, *904*, 166737, doi:10.1016/j.scitotenv.2023.166737.
363. Coelho, C.; Mesquita, N.; Costa, I.; Soares, F.; Trovão, J.; Freitas, H.; Portugal, A.; Tiago, I. Bacterial and Archaeal Structural Diversity in Several Biodeterioration Patterns on the Limestone Walls of the Old Cathedral of Coimbra. *Microorganisms* **2021**, *9*, doi:10.3390/microorganisms9040709.
364. Wu, F.; Zhang, Y.; He, D.; Gu, J.D.; Guo, Q.; Liu, X.; Duan, Y.; Zhao, J.; Wang, W.; Feng, H. Community Structures of Bacteria and Archaea Associated with the Biodeterioration of Sandstone Sculptures at the Beishiku Temple. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2021**, *164*, 105290, doi:10.1016/j.ibiod.2021.105290.
365. Ventosa, A.; Sánchez-Porro, C. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*; Whitman B., W., Ed.; First.; John Wiley & Sons, Inc., 2017; ISBN 9781118960608.
366. Xue, Y.; Fan, H.; Ventosa, A.; Grant, W.D.; Jones, B.E.; Cowan, D.A.; Ma, Y. Halalkalicoccus Tibetensis Gen. Nov., Sp. Nov., Representing a Novel Genus of Haloalkaliphilic Archaea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2005**, *55*, 2501–2505, doi:10.1099/ijs.0.63916-0.
367. Egas, C.; Barroso, C.; Froufe, H.J.C.; Pacheco, J.; Albuquerque, L.; da Costa, M.S. Complete Genome Sequence of the Radiation-Resistant Bacterium *Rubrobacter Radiotolerans* RSPS-4. *Stand. Genomic Sci.* **2015**, *9*, 1062–1075, doi:10.4056/sigs.5661021.
368. Schabereiter-Gurtner, C.; Piñar, G.; Vybiral, D.; Lubitz, W.; Rölleke, S. *Rubrobacter*-Related Bacteria Associated with Rosy Discolouration of Masonry and Lime Wall Paintings. *Arch. Microbiol.* **2001**, *176*, 347–354, doi:10.1007/s002030100333.
369. Kusumi, A.; Li, X.; Osuga, Y.; Kawashima, A.; Gu, J.D.; Nasu, M.; Katayama, Y. Bacterial Communities in Pigmented Biofilms Formed on the Sandstone Bas-Relief Walls of the Bayon Temple, Angkor Thom, Cambodia. *Microbes Environ.* **2013**, *28*, 422–431, doi:10.1264/jsme2.ME13033.
370. Ghosh, A.; Goyal, A.; Jain, R.K. Study of Methanol-Induced Phenotypic Changes in a Novel Strain of *Acinetobacter Lwoffii*. *Arch. Microbiol.* **2007**, *188*, 533–539, doi:10.1007/s00203-007-0268-z.
371. Zhang, Y.G.; Wang, H.F.; Yang, L.L.; Zhou, X.K.; Zhi, X.Y.; Duan, Y.Q.; Xiao, M.; Zhang, Y.M.; Li, W.J. *Egibacter Rhizosphaerae* Gen. Nov., Sp. Nov., an Obligately Halophilic, Facultatively Alkaliphilic Actinobacterium and Proposal of *Egibacteraceae* Fam. Nov. and *Egibacterales* Ord. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2016**, *66*, 271–275, doi:10.1099/ijsem.0.000713.
372. Seiler, H.; Wenning, M.; Scherer, S. *Domibacillus Robiginosus* Gen. Nov., Sp. Nov., Isolated from a Pharmaceutical Clean Room. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*

- 2013**, 63, 2054–2061, doi:10.1099/ijls.0.044396-0.
373. Narsing Rao, M.P.; Dong, Z.Y.; Liu, G.H.; Li, L.; Xiao, M.; Li, W.J. Reclassification of *Bacillus Aryabhatai* Shivaji et Al. 2009 as a Later Heterotypic Synonym of *Bacillus Megaterium* de Bary 1884 (Approved Lists 1980). *FEMS Microbiol. Lett.* **2020**, 366, 1–3, doi:10.1093/femsle/fnz258.
374. Wang, D.; Zhan, Y.; Cai, D.; Li, X.; Wang, Q.; Chen, S. Regulation of the Synthesis and Secretion of the Iron Chelator Cyclodipeptide Pulcherriminic Acid in *Bacillus Licheniformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, 84, 1–14, doi:10.1128/AEM.00262-18.
375. Li, X.; Wang, D.; Cai, D.; Zhan, Y.; Wang, Q.; Chen, S. Identification and High-Level Production of Pulcherrimin in *Bacillus Licheniformis* DW2. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2017**, 183, 1323–1335, doi:10.1007/s12010-017-2500-x.
376. Laiz, L.; Recio, D.; Hermosin, B.; Saiz-Jimenez, C. Microbial Communities in Salt Efflorescences. *Microbes Art* **2000**, 77–88, doi:10.1007/978-1-4615-4239-1_6.
377. Niesler, A.; Górný, R.L.; Wlazło, A.; Ludzeń-Izbińska, B.; Lawniczek-Walczyk, A.; Golofit-Szymczak, M.; Meres, Z.; Kasznia-Kocot, J.; Harkawy, A.; Lis, D.O.; et al. Microbial Contamination of Storerooms at the Auschwitz-Birkenau Museum. *Aerobiologia (Bologna)*. **2010**, 26, 125–133, doi:10.1007/s10453-009-9149-z.
378. Bensch, K.; Braun, U.; Groenewald, J.Z.; Crous, P.W. The Genus *Cladosporium*. *Stud. Mycol.* **2012**, 72, 1–401, doi:10.1016/s0166-0616(14)60217-7.
379. Zalar, P.; De Hoog, G.S.; Schroers, H.J.; Crous, P.W.; Groenewald, J.Z.; Gunde-Cimerman, N. Phylogeny and Ecology of the Ubiquitous Saprobe *Cladosporium Sphaerospermum*, with Descriptions of Seven New Species from Hypersaline Environments. *Stud. Mycol.* **2007**, 58, 157–183, doi:10.3114/sim.2007.58.06.
380. Segers, F.J.J.; van Laarhoven, K.A.; Huinink, H.P.; Adan, O.C.G.; Wösten, H.A.B.; Dijksterhuis, J. The Indoor Fungus *Cladosporium Halotolerans* Survives Humidity Dynamics Markedly Better than *Aspergillus Niger* and *Penicillium Rubens* despite Less Growth at Lowered Steady-State Water Activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, 82, 5089–5098, doi:10.1128/AEM.00510-16.
381. Bensch, K.; Groenewald, J.Z.; Meijer, M.; Dijksterhuis, J.; Jurjević; Andersen, B.; Houbraken, J.; Crous, P.W.; Samson, R.A. *Cladosporium* Species in Indoor Environments. *Stud. Mycol.* **2018**, 89, 177–301, doi:10.1016/j.simyco.2018.03.002.
382. Erkan Türkmen, K.; Aksöz, N.; Erdönmez, D. A New Approach for Quorum Sensing System in Several Halophilic Bacteria Isolated from Salt Lake in Central Anatolia. *Hacettepe J. Biol. Chem.* **2018**, 2, 177–185, doi:10.15671/hjbc.2018.227.
383. Amador, C.I.; Stannius, R.O.; Røder, H.L.; Burmølle, M. High-Throughput Screening Alternative to Crystal Violet Biofilm Assay Combining Fluorescence Quantification and Imaging. *J. Microbiol. Methods* **2021**, 190, 106343, doi:10.1016/j.mimet.2021.106343.
384. Wilson, C.; Lukowicz, R.; Merchant, S.; Valquier-Flynn, H.; Caballero, J.; Sandoval, J.; Okuom, M.; Huber, C.; Durham Brooks, T.; Wilson, E.; et al. Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-Review. *Res. Rev. J. Eng. Technol.* **2017**, 6.
385. Borowicz, M.; Krzyżanowska, D.M.; Jafra, S. Crystal Violet-Based Assay for the Assessment of Bacterial Biofilm Formation in Medical Tubing. *J. Microbiol.*

Referências

- Methods* **2023**, *204*, 106656, doi:10.1016/j.mimet.2022.106656.
386. Fraser, N.J.; Hashimoto, H.; Cogdell, R.J. Carotenoids and Bacterial Photosynthesis: The Story so Far... *Photosynth. Res.* **2001**, *70*, 249–256, doi:10.1023/A:1014715114520.
387. Sanmartín, P.; Silva, B.; Prieto, B. Effect of Surface Finish on Roughness, Color, and Gloss of Ornamental Granites. *J. Mater. Civ. Eng.* **2011**, *23*, doi:https://doi.org/10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0000285.
388. Dias, L.; Rosado, T.; Bhattacharya, S.; Candeias, A.; Caldeira, A.T.; Mirão, J. Assessing Aesthetic and Structural Deterioration in Historic Buildings - a Contribution. In Proceedings of the Construction Pathology, Rehabilitation Technology and Heritage Management; Blanco, H., Boffill, Y., Lombillo, I., Eds.; University of Cantabria - Building Technology R&D Group: Granada, Spain, 2022; pp. 596–605.
389. Fernandes, A.S.; Paixão, S.M.; Silva, T.P.; Roseiro, J.C.; Alves, L. Influence of Culture Conditions towards Optimal Carotenoid Production by *Gordonia Alkanivorans* Strain 1B. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2018**, *41*, 143–155, doi:10.1007/s00449-017-1853-4.
390. Udensi, J.; Loughman, J.; Loskutova, E.; Byrne, H.J. Raman Spectroscopy of Carotenoid Compounds for Clinical Applications—A Review. *Molecules* **2022**, *27*, 1–32, doi:10.3390/molecules27249017.
391. Zha, W.L.; Cheng, Y.; Yu, W.; Zhang, X.B.; Shen, A.G.; Hu, J.M. HPLC Assisted Raman Spectroscopic Studies on Bladder Cancer. *Laser Phys. Lett.* **2015**, *12*, doi:10.1088/1612-2011/12/4/045701.
392. Horiue, H.; Sasaki, M.; Yoshikawa, Y.; Toyofuku, M.; Shigeto, S. Raman Spectroscopic Signatures of Carotenoids and Polyenes Enable Label-Free Visualization of Microbial Distributions within Pink Biofilms. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–10, doi:10.1038/s41598-020-64737-3.
393. Shao, Y.; Gu, W.; Jiang, L.; Zhu, Y. Study on the Visualization of Pigment in *Haematococcus Pluvialis* by Raman Spectroscopy Technique. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 12097, doi:10.1038/s41598-019-47208-2.
394. Gellermann, W.; Ermakov, I. V.; Ermakova, M.R.; McClane, R.W.; Zhao, D.-Y.; Bernstein, P.S. In Vivo Resonant Raman Measurement of Macular Carotenoid Pigments in the Young and the Aging Human Retina. *J. Opt. Soc. Am. A* **2002**, *19*, 1172, doi:10.1364/josaa.19.001172.
395. Arteni, A.A.; Fradot, M.; Galzerano, D.; Mendes-Pinto, M.M.; Sahel, J.A.; Picaud, S.; Robert, B.; Pascal, A.A. Structure and Conformation of the Carotenoids in Human Retinal Macular Pigment. *PLoS One* **2015**, *10*, doi:10.1371/journal.pone.0135779.
396. Chen, C.; Huang, W.; Gao, Q.; Fan, L.; Shen Andy, H. Assignments on Raman Peaks of Red Coral Based on Experimental Raman Spectroscopy and Density Functional Theory Calculation. *Spectrosc. Spectr. Anal.* **2021**, *41*, 127, doi:10.3964/j.issn.1000-0593(2021)01-0127-04.
397. Indelicato, C.; Osticioli, I.; Agresti, J.; Ciofini, D.; Mencaglia, A.A.; Perotti, M.; Viti, C.; Moreschi, R.; Siano, S. Exploring Grain Sizing of Sedimentary Calcareous Rocks Using Raman Spectroscopy. *Eur. Phys. J. Plus* **2022**, *137*, doi:10.1140/epjp/s13360-022-02536-7.
398. Sun, J.; Wu, Z.; Cheng, H.; Zhang, Z.; Frost, R.L. A Raman Spectroscopic

- Comparison of Calcite and Dolomite. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2014**, *117*, 158–162, doi:10.1016/j.saa.2013.08.014.
399. Rianasari, I.; Benyettou, F.; Sharma, S.K.; Blanton, T.; Kirmizialtin, S.; Jagannathan, R. A Chemical Template for Synthesis of Molecular Sheets of Calcium Carbonate. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 25393, doi:10.1038/srep25393.
400. Ta-Chen, L.; Chang, J.-S.; Young, C.-C. Exopolysaccharides Produced by *Gordonia Alkanivorans* Enhance Bacterial Degradation Activity for Diesel. *Biotechnol. Lett.* **2008**, *30*, 1201–1206, doi:10.1007/s10529-008-9667-8.
401. Frantsuzova, E.; Bogun, A.; Solomentsev, V.; Vetrova, A.; Streletskii, R.; Solyanikova, I.; Delegan, Y. Whole Genome Analysis and Assessment of the Metabolic Potential of *Gordonia Rubripertincta* Strain 112, a Degrader of Aromatic and Aliphatic Compounds. *Biology (Basel)*. **2023**, *12*, 721, doi:10.3390/biology12050721.
402. Frantsuzova, E.; Bogun, A.; Vetrova, A.; Delegan, Y. Methods of Identifying *Gordonia* Strains in Clinical Samples. *Pathogens* **2022**, *11*, doi:10.3390/pathogens11121496.
403. Alvarenga, G.L.; Cuevas, M.S.; Capellini, M.C.; Crevellin, E.J.; de Moraes, L.A.B.; Rodrigues, C.E. da C. Extraction of Carotenoid-Rich Palm Pressed Fiber Oil Using Mixtures of Hydrocarbons and Short Chain Alcohols. *Food Res. Int.* **2020**, *128*, doi:10.1016/j.foodres.2019.108810.
404. Ulfah, M.; Raharjo, S.; Hastuti, P.; Darmadji, P. Adsorption of β -Carotene in Isopropyl Alcohol with Decolorized Activated Carbon as Model for β -Carotene Adsorption in Crude Palm Oil. *Indones. J. Chem.* **2017**, *17*, 105–112, doi:10.22146/ijc.23637.
405. Sarti, B.; Villa, F.; Cappitelli, F.; Rizzi, A. Chromatic Bio-Indicators of Biofilm Community Structure on Stone Heritage. In Proceedings of the 15th Congress of the International Colour Association; Thailand, 2023; pp. 412–418.
406. Wang, Y.; Zhang, H.; Liu, X.; Liu, X.; Song, W. Fungal Communities in the Biofilms Colonizing the Basalt Sculptures of the Leizhou Stone Dogs and Assessment of a Conservation Measure. *Herit. Sci.* **2021**, *9*, 1–12, doi:10.1186/s40494-021-00508-1.
407. Morgado, D.; Fanesi, A.; Martin, T.; Tebbani, S.; Bernard, O.; Lopes, F. Non-Destructive Monitoring of Microalgae Biofilms. *Bioresour. Technol.* **2024**, *398*, 130520, doi:10.1016/j.biortech.2024.130520.
408. Vázquez-Nion, D.; Sanmartín, P.; Silva, B.; Prieto, B. Reliability of Color Measurements for Monitoring Pigment Content in a Biofilm-Forming Cyanobacterium. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2013**, *84*, 220–226, doi:10.1016/j.ibiod.2012.05.037.
409. Dias, L.; Pires, V.; Sitzia, F.; Lisci, C.; Candeias, A.; Caldeira, A.T.; Mirão, J. Evaluating the Biosusceptibility of Natural Stone as an Supporting Tool to Prevent Cultural Heritage Biodeterioration. *Eur. Phys. J. Plus* **2023**, *138*, doi:10.1140/epjp/s13360-023-04185-w.
410. Santo, A.P.; Agostini, B.; Cuzman, O.A.; Michelozzi, M.; Salvatici, T.; Perito, B. Essential Oils to Contrast Biodeterioration of the External Marble of Florence Cathedral. *Sci. Total Environ.* **2023**, *877*, doi:10.1016/j.scitotenv.2023.162913.
411. Cao, H.; Wei, D.; Yang, Y.; Shang, Y.; Li, G.; Zhou, Y.; Ma, Q.; Xu, Y. Systems-Level Understanding of Ethanol-Induced Stresses and Adaptation in *E. Coli*. *Sci.*

Referências




- Rep.* **2017**, 7, doi:10.1038/srep44150.
412. Chatterjee, I.; Somerville, G.A.; Heilmann, C.; Sahl, H.G.; Maurer, H.H.; Herrmann, M. Very Low Ethanol Concentrations Affect the Viability and Growth Recovery in Post-Stationary-Phase *Staphylococcus Aureus* Populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, 72, 2627–2636, doi:10.1128/AEM.72.4.2627-2636.2006.
413. Cassol, I.; Ibañez, M.; Bustamante, J.P. Key Features and Guidelines for the Application of Microbial Alpha Diversity Metrics. *Sci. Rep.* **2025**, 15, 1–13, doi:10.1038/s41598-024-77864-y.
414. Feranchuk, S.; Belkova, N.; Potapova, U.; Kuzmin, D.; Belikov, S. Evaluating the Use of Diversity Indices to Distinguish between Microbial Communities with Different Traits. *Res. Microbiol.* **2018**, 169, 254–261, doi:10.1016/j.resmic.2018.03.004.
415. Jiang, L.; Amir, A.; Morton, J.T.; Heller, R.; Arias-Castro, E.; Knight, R. Discrete False-Discovery Rate Improves Identification of Differentially Abundant Microbes. *mSystems* **2017**, 2, 1–15, doi:10.1128/msystems.00092-17.
416. Xiao, J.; Cao, H.; Chen, J. False Discovery Rate Control Incorporating Phylogenetic Tree Increases Detection Power in Microbiome-Wide Multiple Testing. *Bioinformatics* **2017**, 33, 2873–2881, doi:10.1093/bioinformatics/btx311.
417. Kers, J.G.; Saccenti, E. The Power of Microbiome Studies: Some Considerations on Which Alpha and Beta Metrics to Use and How to Report Results. *Front. Microbiol.* **2022**, 12, 1–18, doi:10.3389/fmicb.2021.796025.
418. Armstrong, G.; Rahman, G.; Martino, C.; McDonald, D.; Gonzalez, A.; Mishne, G.; Knight, R. Applications and Comparison of Dimensionality Reduction Methods for Microbiome Data. *Front. Bioinforma.* **2022**, 2, 1–14, doi:10.3389/fbinf.2022.821861.
419. Chen, J.; Gu, J.D. The Environmental Factors Used in Correlation Analysis with Microbial Community of Environmental and Cultural Heritage Samples. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2022**, 173, doi:10.1016/j.ibiod.2022.105460.
420. Pohlner, M.; Dlugosch, L.; Wemheuer, B.; Mills, H.; Engelen, B.; Reese, B.K. The Majority of Active Rhodobacteraceae in Marine Sediments Belong to Uncultured Genera: A Molecular Approach to Link Their Distribution to Environmental Conditions. *Front. Microbiol.* **2019**, 10, 1–16, doi:10.3389/fmicb.2019.00659.
421. Cuervo, L.; Méndez, C.; Salas, J.A.; Olano, C.; Malmierca, M.G. Volatile Communication in Actinobacteria: A Language for Secondary Metabolism Regulation. *Microb. Cell Fact.* **2024**, 23, 1–18, doi:10.1186/s12934-024-02456-4.
422. Abdel-Haliem, M.E.F.; Sakr, A.A.; Ali, M.F.; Ghaly, M.F.; Sohlenkamp, C. Characterization of *Streptomyces* Isolates Causing Colour Changes of Mural Paintings in Ancient Egyptian Tombs. *Microbiol. Res.* **2013**, 168, 428–437, doi:10.1016/j.micres.2013.02.004.
423. Sarmiento-Tovar, A.A.; Silva, L.; Sánchez-Suárez, J.; Diaz, L. *Streptomyces*-Derived Bioactive Pigments: Ecofriendly Source of Bioactive Compounds. *Coatings* **2022**, 12, 1–35, doi:10.3390/coatings12121858.
424. Grilo, M.L.; Sousa-Santos, C.; Robalo, J.; Oliveira, M. The Potential of *Aeromonas* Spp. from Wildlife as Antimicrobial Resistance Indicators in Aquatic Environments. *Ecol. Indic.* **2020**, 115, doi:10.1016/j.ecolind.2020.106396.

425. Sbissi, I.; Chouikhi, F.; Ghodhbane-Gtari, F.; Gtari, M. Ecogenomic Insights into the Resilience of Keystone Blastococcus Species in Extreme Environments: A Comprehensive Analysis. *BMC Genomics* **2025**, *26*, doi:10.1186/s12864-025-11228-2.
426. Urzi, C.; Brusetti, L.; Salamone, P.; Sorlini, C.; Stackebrandt, E.; Daffonchio, D. Biodiversity of Geodermatophilaceae Isolated from Altered Stones and Monuments in the Mediterranean Basin. *Environ. Microbiol.* **2001**, *3*, 471–479, doi:10.1046/j.1462-2920.2001.00217.x.
427. Greengrass, K.S. Geodermatophilaceae Biofilm Formation and Rock Recolonization, University of New Hampshire, Durham, 2020.
428. Selbmann, L.; Egidì, E.; Isola, D.; Onofri, S.; Zucconi, L.; de Hoog, G.S.; Chinaglia, S.; Testa, L.; Tosi, S.; Balestrazzi, A.; et al. Biodiversity, Evolution and Adaptation of Fungi in Extreme Environments. *Plant Biosyst.* **2013**, *147*, 237–246, doi:10.1080/11263504.2012.753134.
429. Savković, Ž.; Stupar, M.; Unković, N.; Ivanović, Ž.; Blagojević, J.; Vukojević, J.; Ljaljević Grbić, M. In Vitro Biodegradation Potential of Airborne Aspergilli and Penicillia. *Sci. Nat.* **2019**, *106*, doi:10.1007/s00114-019-1603-3.
430. Costa, F. de F.; da Silva, N.M.; Voidaleski, M.F.; Weiss, V.A.; Moreno, L.F.; Schneider, G.X.; Najafzadeh, M.J.; Sun, J.; Gomes, R.R.; Raittz, R.T.; et al. Environmental Prospecting of Black Yeast-like Agents of Human Disease Using Culture-Independent Methodology. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 14229, doi:10.1038/s41598-020-70915-0.
431. Thitla, T.; Kumla, J.; Hongsanan, S.; Senwanna, C.; Khuna, S.; Lumyong, S.; Suwannarach, N. Exploring Diversity Rock-Inhabiting Fungi from Northern Thailand: A New Genus and Three New Species Belonged to the Family Herpotrichiellaceae. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2023**, *13*, 1252482, doi:10.3389/fcimb.2023.1252482.
432. Tehler, A.; Irestedt, M. Parallel Evolution of Lichen Growth Forms in the Family Roccellaceae (Arthoniales, Ascomycota). *Cladistics* **2007**, *23*, 432–454, doi:10.1111/j.1096-0031.2007.00156.x.
433. Abdel Ghany, T.M.; Omar, A.M.; Elwkeel, F.M.; Al Abboud, M.A.; Alawlaqi, M.M. Fungal Deterioration of Limestone False-Door Monument. *Heliyon* **2019**, *5*, doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02673.

Anexos







Anexos

Anexo A: Parâmetros colorimétricos e medição de ΔE pelo sistema CIELAB**Tabela A.1:** Medição de parâmetros colorimétricos dos biofilmes corados utilizando o sistema CIELAB

Amostra	Coloração	L*	a*	b*	ΔE^1
Pedra Controlo		82,48 ± 0,68	2,19 ± 0,06	10,24 ± 0,13	-
Pedra (escuro)		67,39 ± 0,25	14,46 ± 0,76	24,21 ± 0,66	23,95 ± 0,85
Pedra (luz)		70,33 ± 2,40	20,68 ± 4,38	28,57 ± 4,64	28,74 ± 6,61







¹ calculado com base na diferença entre a pedra-controlo e as pedras coradas

Tabela A.2: Medição de parâmetros colorimétricos: ensaio de limpeza com caroteno comercial

Amostra	Coloração	L*	a*	b*	ΔE^1
Pedra-teste (caroteno)		74,86 ± 2,10	16,49 ± 3,65	29,51 ± 4,23	-
Sol. 100%		77,75 ± 3,09	6,27 ± 1,03	14,13 ± 0,40	18,92 ± 1,06
Sol. 75%		78,55 ± 0,63	4,49 ± 0,86	14,14 ± 0,76	19,86 ± 0,99
Sol. 50%		82,10 ± 0,63	4,35 ± 1,25	13,21 ± 1,61	21,58 ± 2,10
Sol. 25%		80,35 ± 1,07	6,23 ± 1,88	14,81 ± 1,96	18,76 ± 2,83
Sol. 10%		81,23 ± 1,06	4,32 ± 0,64	14,79 ± 1,04	20,14 ± 1,44






¹ calculado com base na diferença entre os quadrados em que foi aplicada sol. de limpeza e a pedra-teste com caroteno comercial.

Tabela A.3: Medição de parâmetros colorimétricos: ensaio de limpeza na pedra-controlo

Amostra	Coloração	L*	a*	b*	ΔE^1
Pedra Controlo		82,48 ± 0,68	2,19 ± 0,06	10,24 ± 0,13	-
Sol. 100%		82,13 ± 1,81	2,10 ± 0,20	9,67 ± 0,51	1,75 ± 0,82
Sol. 75%		81,91 ± 1,98	2,04 ± 0,17	9,29 ± 0,67	1,83 ± 1,43
Sol. 50%		81,12 ± 2,47	1,97 ± 0,14	9,34 ± 0,17	2,48 ± 1,52
Sol. 10%		81,11 ± 2,18	2,15 ± 0,14	9,86 ± 0,56	2,01 ± 1,68
Sol. 25%		82,38 ± 0,98	2,08 ± 0,14	9,83 ± 0,53	0,96 ± 0,67





¹ calculado com base na diferença entre os quadrados em que foi aplicada sol. de limpeza e a pedra-controlo sem caroteno

Tabela A.4: Efeito da limpeza nas pedras pigmentadas pela medição de parâmetros colorimétricos

Pedra mantida no escuro					
	Cor	L*	a*	b*	ΔE
Pedra original		67,39 ± 0,25	14,46 ± 0,76	24,21 ± 0,66	-
50%		77,82 ± 0,50	5,33 ± 0,18	15,51 ± 0,24	16,37 ± 0,44
25%		74,73 ± 0,86	5,49 ± 0,24	16,40 ± 0,27	13,99 ± 0,68
10%		71,95 ± 3,90	4,76 ± 0,45	15,40 ± 1,12	14,40 ± 0,74
5%		74,32 ± 0,16	4,71 ± 0,07	15,83 ± 0,30	14,60 ± 0,26







(continua)

Tabela A.4 (continuação)

Pedra mantida sob exposição solar					
Pedra	Cor	L*	a*	b*	ΔE
original		70,33 ± 2,40	20,68 ± 4,38	28,57 ± 4,64	-
50%		76,51 ± 1,01	5,33 ± 0,38	16,65 ± 0,82	20,61 ± 0,93
25%		75,47 ± 0,71	5,02 ± 0,15	17,05 ± 0,47	20,12 ± 0,47
10%		75,32 ± 0,44	5,35 ± 0,23	16,84 ± 0,23	19,24 ± 0,28
5%		75,22 ± 0,85	4,68 ± 0,32	16,55 ± 0,82	20,42 ± 0,90

¹ calculado com base na diferença entre os quadrados em que foi aplicada sol. de limpeza e a respetiva pedra corada

Tabela A.5: Medição de parâmetros colorimétricos nas pedras destinadas aos ensaios antimicrobianos, utilizando o sistema CIELAB e determinação de ΔE

Pedra inicial	Cor	L*	a*	b*	ΔE^1
Controlo negativo		87,55 ± 0,23	1,61 ± 0,07	6,81 ± 0,29	-
Controlo positivo		72,56 ± 0,34	10,29 ± 0,60	20,76 ± 0,59	22,26 ± 0,63
Preventol®		72,34 ± 0,42	10,00 ± 0,76	18,96 ± 0,53	21,21 ± 0,86
Biotin-T®		76,59 ± 0,57	9,24 ± 0,56	17,05 ± 0,53	16,83 ± 0,93
Sol. Limpeza		75,21 ± 0,47	8,74 ± 0,55	18,00 ± 0,67	18,13 ± 0,93
Syra-Óleovictis®		71,05 ± 0,97	10,15 ± 0,39	22,60 ± 0,26	24,39 ± 0,72

¹ calculado com base na diferença entre a pedra controlo negativo e as pedras coradas

Tabela A.6: Medição dos parâmetros colorimétricos ao longo do tempo após tratamento dos modelos de pedra com os respectivos antimicrobianos

Tratamento pedra	Semana	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)	ΔE
Controlo negativo	-	87,55 ± 0,23	1,61 ± 0,07	6,81 ± 0,29	-
Controlo positivo	-	72,56 ± 0,34	10,29 ± 0,60	20,76 ± 0,59	22,26 ± 0,63
Preventol®	Inicial	72,34 ± 0,42	10,00 ± 0,76	18,96 ± 0,53	21,21 ± 0,86
	1 ^a	73,54 ± 1,17	3,65 ± 0,05	14,99 ± 0,14	7,66 ± 0,13
	2 ^a	76,36 ± 0,34	3,01 ± 0,04	12,38 ± 0,26	10,41 ± 0,17
	3 ^a	75,29 ± 0,87	3,35 ± 0,20	13,44 ± 0,48	9,15 ± 0,71
	4 ^a	74,02 ± 0,61	3,50 ± 0,08	14,28 ± 0,09	8,20 ± 0,23
	8 ^a	72,56 ± 0,30	3,80 ± 0,09	14,11 ± 0,40	7,88 ± 0,32
	16 ^a	73,15 ± 0,33	3,65 ± 0,08	14,96 ± 0,37	7,56 ± 0,28
	24 ^a	71,59 ± 1,34	2,98 ± 0,19	12,05 ± 0,71	9,96 ± 0,68
Biotin-T®	Inicial	76,59 ± 0,57	9,24 ± 0,56	17,05 ± 0,53	16,83 ± 0,93
	1 ^a	82,44 ± 0,31	2,73 ± 0,05	10,88 ± 0,19	10,71 ± 0,23
	2 ^a	82,92 ± 0,24	2,44 ± 0,06	9,93 ± 0,24	11,70 ± 0,27
	3 ^a	83,30 ± 0,18	2,89 ± 0,03	11,87 ± 0,29	10,60 ± 0,23
	4 ^a	84,59 ± 0,28	2,30 ± 0,05	9,22 ± 0,16	13,17 ± 0,28
	8 ^a	81,38 ± 0,55	2,79 ± 0,09	9,84 ± 0,24	10,81 ± 0,38
	16 ^a	82,14 ± 0,40	2,59 ± 0,10	11,32 ± 0,17	10,39 ± 0,35
	24 ^a	81,94 ± 0,14	2,68 ± 0,11	11,16 ± 0,28	10,32 ± 0,29
Syra-Óleovictis®	Inicial	71,05 ± 0,97	10,15 ± 0,39	22,60 ± 0,26	24,39 ± 0,72
	1 ^a	80,55 ± 0,30	3,56 ± 0,06	16,51 ± 0,16	13,06 ± 0,27
	2 ^a	78,89 ± 2,84	3,42 ± 0,14	16,04 ± 0,77	12,52 ± 0,94
	3 ^a	81,43 ± 0,43	2,98 ± 0,22	14,63 ± 0,42	14,92 ± 0,51
	4 ^a	81,26 ± 0,23	3,06 ± 0,16	14,64 ± 0,19	14,76 ± 0,30
	8 ^a	80,58 ± 0,37	3,77 ± 0,23	15,44 ± 0,56	13,52 ± 0,59
	16 ^a	80,08 ± 0,37	5,74 ± 0,09	15,43 ± 0,16	12,35 ± 0,28
	24 ^a	81,32 ± 0,70	4,93 ± 0,18	14,43 ± 0,32	14,13 ± 0,73
Solução de Limpeza	Inicial	75,21 ± 0,47	8,74 ± 0,55	18,00 ± 0,67	18,13 ± 0,93
	1 ^a	80,14 ± 0,79	4,03 ± 0,08	14,13 ± 0,43	7,87 ± 0,60
	2 ^a	83,11 ± 0,22	3,61 ± 0,11	11,20 ± 0,14	11,63 ± 0,23
	3 ^a	82,31 ± 0,15	3,03 ± 0,15	10,91 ± 0,38	11,55 ± 0,37
	4 ^a	83,50 ± 0,15	2,97 ± 0,07	10,79 ± 0,27	12,41 ± 0,20
	8 ^a	81,79 ± 0,36	3,54 ± 0,13	12,47 ± 0,19	10,06 ± 0,28
	16 ^a	82,89 ± 0,21	2,90 ± 0,07	12,15 ± 0,15	11,28 ± 0,21
	24 ^a	83,54 ± 0,46	2,86 ± 0,13	11,22 ± 0,20	12,25 ± 0,34

Anexo B: Análise estatística referente às comparações múltiplas entre locais do Capítulo 6

Tabela B.1: Resultados do teste estatístico post-hoc para a comparação de alfa diversidade procariota entre locais de amostragem. São apresentados os p -value e os valores de FDR. As linhas destacadas indicam a comparação com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Local	Gênero		Família	
	p -value	FDR	p -value	FDR
PintMNAA vs PintGoa	0,142	0,253	0,986	0,986
PintMNAA vs PintTailandia	0,004	0,027	0,009	0,030
PintMNAA vs PedraCC	0,077	0,233	0,066	0,154
PintMNAA vs PedraBatalha	0,457	0,565	0,972	0,986
PintMNAA vs PedraAlcobaca	0,429	0,563	0,570	0,704
PintMNAA vs PedraCasaFresco	0,004	0,027	0,008	0,030
PintGoa vs PintTailandia	0,052	0,220	0,003	0,021
PintGoa vs PedraCC	0,666	0,699	0,034	0,094
PintGoa vs PedraBatalha	0,248	0,371	0,906	0,986
PintGoa vs PedraAlcobaca	0,753	0,753	0,530	0,696
PintGoa vs PedraCasaFresco	0,089	0,233	0,000	0,000
PintTailandia vs PedraCC	0,112	0,253	0,191	0,309
PintTailandia vs PedraBatalha	0,008	0,040	0,004	0,021
PintTailandia vs PedraAlcobaca	0,079	0,233	0,089	0,169
PintTailandia vs PedraCasaFresco	0,387	0,540	0,893	0,986
PedraCC vs PedraBatalha	0,135	0,253	0,036	0,094
PedraCC vs PedraAlcobaca	0,525	0,613	0,346	0,518
PedraCC vs PedraCasaFresco	0,214	0,334	0,112	0,196
PedraBatalha vs PedraAlcobaca	0,650	0,699	0,503	0,696
PedraBatalha vs PedraCasaFresco	0,000	0,002	0,000	0,000
PedraAlcobaca vs PedraCasaFresco	0,144	0,253	0,075	0,166

Tabela B.2: Análise estatística comparativa entre localidades para a beta diversidade, aos níveis de Género e Família procariotas. As linhas destacadas indicam a comparação com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Local	Género			Família		
	F-value	p-value	FDR	F-value	p-value	FDR
PintMNAA vs PintGoa	3,646	0,025	0,033	3,862	0,015	0,030
PintMNAA vs PintTailandia	4,831	0,014	0,033	4,011	0,014	0,030
PintMNAA vs PedraCC	2,198	0,022	0,033	1,846	0,022	0,035
PintMNAA vs PedraBatalha	2,163	0,024	0,033	2,020	0,031	0,041
PintMNAA vs PedraAlcobaca	1,927	0,067	0,072	1,628	0,143	0,150
PintMNAA vs PedraCasaFresco	3,802	0,023	0,033	3,307	0,011	0,029
PintGoa vs PintTailandia	5,238	0,012	0,033	8,715	0,008	0,027
PintGoa vs PedraCC	2,993	0,024	0,033	3,800	0,033	0,041
PintGoa vs PedraBatalha	3,061	0,027	0,033	4,664	0,026	0,036
PintGoa vs PedraAlcobaca	2,511	0,069	0,072	2,538	0,078	0,086
PintGoa vs PedraCasaFresco	4,381	0,006	0,033	6,029	0,016	0,030
PintTailandia vs PedraCC	3,650	0,014	0,033	3,410	0,006	0,027
PintTailandia vs PedraBatalha	2,476	0,019	0,033	2,629	0,007	0,027
PintTailandia vs PedraAlcobaca	2,658	0,017	0,033	2,847	0,023	0,035
PintTailandia vs PedraCasaFresco	4,723	0,005	0,033	4,667	0,005	0,027
PedraCC vs PedraBatalha	2,370	0,022	0,033	2,789	0,009	0,027
PedraCC vs PedraAlcobaca	2,096	0,033	0,039	1,867	0,046	0,054
PedraCC vs PedraCasaFresco	2,735	0,027	0,033	2,789	0,009	0,027
PedraBatalha vs PedraAlcobaca	0,713	0,633	0,633	1,0785	0,374	0,374
PedraBatalha vs PedraCasaFresco	4,049	0,007	0,033	4,879	0,007	0,027
PedraAlcobaca vs PedraCasaFresco	2,068	0,036	0,036	2,068	0,036	0,036

Tabela B.3: Resultados da análise estatística ANOVA para a identificação de gêneros e famílias procariotas que apresentaram diferenças estatisticamente significativas (p -value, FDR < 0,05).

Gênero	p-value	FDR	Família	p-value	FDR
<i>Rummeliibacillus</i>	0,000	0,000	Pseudonocardiaceae	0,000	0,000
<i>Eisenbergiella</i>	0,000	0,002	Aeromonadaceae	0,000	0,000
<i>Sphingobium</i>	0,000	0,003	Cellulomonadaceae	0,000	0,000
<i>Methylobacterium</i>	0,000	0,003	Lachnospiraceae	0,000	0,000
<i>Massilia</i>	0,000	0,003	Enterococcaceae	0,000	0,001
<i>Pseudonocardia</i>	0,000	0,003	Caulobacteraceae	0,000	0,001
<i>Saccharopolyspora</i>	0,000	0,004	Aurantimonadaceae	0,000	0,001
<i>Enterococcus</i>	0,000	0,004	Nocardioideaceae	0,000	0,001
<i>Aureimonas</i>	0,000	0,004	Nocardiaceae	0,000	0,002
<i>Kocuria</i>	0,001	0,006	Methylobacteriaceae	0,000	0,002
<i>Jatrophihabitans</i>	0,001	0,006	Neisseriaceae	0,001	0,006
<i>Janibacter</i>	0,001	0,011	Streptococcaceae	0,001	0,006
<i>Gp3</i>	0,002	0,013	Clostridiaceae1	0,001	0,006
<i>Eikenella</i>	0,002	0,014	Actinomycetaceae	0,002	0,011
<i>Gp16</i>	0,004	0,022	Flavobacteriaceae	0,003	0,014
<i>Streptococcus</i>	0,005	0,025	Propionibacteriaceae	0,004	0,016
<i>Propionibacterium</i>	0,005	0,027	Planococcaceae	0,007	0,026
<i>Caulobacter</i>	0,007	0,035	Oxalobacteraceae	0,007	0,026
<i>ClostridiumXIVa</i>	0,009	0,038	Rikenellaceae	0,008	0,028
<i>Streptomyces</i>	0,009	0,038	Rickettsiaceae	0,010	0,035
<i>Reyranella</i>	0,012	0,048	Trueperaceae	0,015	0,047
<i>Aeromonas</i>	0,012	0,049	Porphyromonadaceae	0,015	0,047

Tabela B.4: Resultados do teste estatístico post-hoc para a comparação de alfa diversidade para a comunidade eucariota entre locais de amostragem. São apresentados os p -value e os valores de FDR. As linhas destacadas indicam a comparação com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Local	Género		Família	
	p -value	FDR	p -value	FDR
PintMNAA vs PintTailandia	0,598	0,738	0,875	0,919
PintMNAA vs PintGoa	0,303	0,619	0,171	0,448
PintMNAA vs PedraCasaFresco	0,640	0,747	0,779	0,861
PintMNAA vs PedraAlcobaca	0,176	0,528	0,097	0,408
PintMNAA vs PedraBatalha	0,527	0,738	0,354	0,540
PintMNAA vs PedraCC	0,354	0,619	0,242	0,526
PintTailandia vs PintGoa	0,831	0,884	0,324	0,540
PintTailandia vs PedraCasaFresco	0,842	0,884	0,678	0,791
PintTailandia vs PedraAlcobaca	0,170	0,528	0,141	0,431
PintTailandia vs PedraBatalha	0,328	0,619	0,320	0,540
PintTailandia vs PedraCC	0,263	0,619	0,250	0,526
PintGoa vs PedraCasaFresco	0,537	0,738	0,092	0,408
PintGoa vs PedraAlcobaca	0,014	0,262	0,001	0,013
PintGoa vs PedraBatalha	0,132	0,528	0,058	0,403
PintGoa vs PedraCC	0,025	0,262	0,001	0,015
PedraCasaFresco vs PedraAlcobaca	0,059	0,414	0,144	0,431
PedraCasaFresco vs PedraBatalha	0,292	0,619	0,475	0,623
PedraCasaFresco vs PedraCC	0,127	0,528	0,360	0,540
PedraAlcobaca vs PedraBatalha	0,575	0,738	0,657	0,791
PedraAlcobaca vs PedraCC	0,496	0,738	0,463	0,623
PedraBatalha vs PedraCC	0,497	0,750	0,470	0,653

Tabela B.5: Análise estatística comparativa entre localidades para a beta diversidade, aos níveis de Género e Família eucariotas. As linhas destacadas indicam a comparação com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Local	Género			Família		
	F-value	p-value	FDR	F-value	p-value	FDR
PintMNAA vs PintTailandia	1,131	0,294	0,325	2,382	0,103	0,114
PintMNAA vs PintGoa	1,533	0,127	0,167	3,466	0,042	0,056
PintMNAA vs PedraCasaFresco	14,398	0,007	0,024	9,642	0,007	0,016
PintMNAA vs PedraAlcobaca	6,749	0,004	0,024	4,982	0,004	0,016
PintMNAA vs PedraBatalha	4,201	0,008	0,024	2,419	0,056	0,067
PintMNAA vs PedraCC	4,826	0,007	0,024	5,982	0,001	0,007
PintTailandia vs PintGoa	0,133	0,805	0,805	4,804	0,057	0,067
PintTailandia vs PedraCasaFresco	5,056	0,018	0,034	4,263	0,018	0,029
PintTailandia vs PedraAlcobaca	3,084	0,108	0,151	2,737	0,040	0,056
PintTailandia vs PedraBatalha	1,635	0,146	0,180	0,606	0,730	0,730
PintTailandia vs PedraCC	1,913	0,167	0,195	2,502	0,010	0,019
PintGoa vs PedraCasaFresco	9,529	0,010	0,026	14,837	0,010	0,019
PintGoa vs PedraAlcobaca	6,888	0,006	0,024	19,955	0,006	0,016
PintGoa vs PedraBatalha	4,225	0,017	0,034	7,049	0,007	0,016
PintGoa vs PedraCC	3,234	0,024	0,040	7,833	0,002	0,011
PedraCasaFresco vs PedraAlcobaca	13,539	0,011	0,026	9,792	0,011	0,019
PedraCasaFresco vs PedraBatalha	6,947	0,007	0,024	6,003	0,007	0,016
PedraCasaFresco vs PedraCC	2,901	0,050	0,075	2,508	0,043	0,056
PedraAlcobaca vs PedraBatalha	1,048	0,381	0,400	0,928	0,428	0,449
PedraAlcobaca vs PedraCC	5,298	0,004	0,024	5,944	0,001	0,007
PedraBatalha vs PedraCC	5,320	0,005	0,027	5,950	0,002	0,008

Tabela B.6: Resultados da análise estatística ANOVA para a identificação de géneros e famílias eucariotas que apresentaram diferenças estatisticamente significativas (p -value, FDR < 0,05).

Género	p-value	FDR	Família	p-value	FDR
<i>Cladosporium</i>	0,000	0,000	Cladosporiaceae	0,000	0,000
<i>Aspergillus</i>	0,001	0,003	Aspergillaceae	0,000	0,000
<i>Paracostantinella</i>	0,001	0,003	Trebouxiaceae	0,001	0,002
<i>Verrucaria</i>	0,007	0,012	Herpotrichiellaceae	0,001	0,002
<i>Trebouxia</i>	0,006	0,012	Roccellaceae	0,001	0,002
<i>Alternaria</i>	0,008	0,013	Mycosphaerellaceae	0,003	0,006
			Pleosporaceae	0,018	0,029
			Teloschistaceae	0,019	0,029