

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE**

**DIVERSIDADE BACTERIANA EM BIOFILMES DE
SUPERFÍCIES EXTERNAS DE PRÉDIOS HISTÓRICOS NA
CIDADE DE PORTO ALEGRE**

GREICY KIEL
Bióloga

Dissertação apresentada como requisito na obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, ênfase em Biodeterioração, Biocorrosão e Biodegradação.

Porto Alegre
Fevereiro de 2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE**

**DIVERSIDADE BACTERIANA EM BIOFILMES DE
SUPERFÍCIES EXTERNAS DE PRÉDIOS HISTÓRICOS NA
CIDADE DE PORTO ALEGRE**

GREICY KIEL
Bióloga

Porto Alegre
Fevereiro de 2005

Orientador: Prof. Eng. Agr. Dr. João Ruy Jardim Freire

Co-Orientador: Prof^a. Dra. Christine Claire Gaylarde

Local: Laboratório de Microbiologia do Solo

Área de Concentração: Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Linha de Pesquisa: Biodegradação, Biocorrosão e Biodeterioração

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. João Ruy Jardim Freire pela orientação deste trabalho.

A minha co-orientadora Dr^a Christine Claire Gaylarde, por me apresentar o fascinante mundo da biodeterioração, pelo encorajamento para conclusão deste trabalho, quando tudo parecia perdido.

Ao professor Dr. Enilson S. Sá pela oportunidade de realizar este trabalho no laboratório de Microbiologia dos Solos e pelo grande apoio durante apresentações de seminários e durante a pesquisa.

A professora Dr^a Gertrudes Corção pelo incentivo desde o princípio dessa nova etapa em minha vida.

Ao professor Dr. Vladimir Pavan Margarido pelo apoio, pelo acompanhamento na parte final da realização deste trabalho, pela amizade e incentivo.

A Maristela Jorge Padoin, pois sem seu apoio e até mesmo “puxada de orelha” talvez não tivesse tido tanta determinação para enfrentar todos os obstáculos enfrentados até hoje. Eu enfrentar Porto Alegre sozinha, foi responsabilidade sua. Obrigada!

A amiga Monika Müller pelos bons momentos juntas, em aulas, durante os intervalos, fins de semana; e pela amizade que nunca vou esquecer. Você é muito especial. Obrigada mesmo!

Aos colegas Cássia, Carlos, Mariel, Jonathas, Rafael (parceiro de jogos...), Rodrigo pelos bons momentos no laboratório e fora dele (mesmo não sendo muitos).

Ao Márcio, responsável técnico do laboratório, pelos papos, risadas e amizade, além que me ensinar a mexer com os reagentes químicos, e a fazer cálculos.

Ao meu namorado André Luiz Brun por ter sido compreensivo o suficiente para aceitar que eu ficasse tanto tempo longe e por agüentar todas as vezes que liguei chorando e querendo abandonar tudo.

Aos meus pais, pelo apoio incentivo e por acompanharem mais uma etapa da vida, com tanta dedicação.

A CAPES e CNPq por financiarem este trabalho.

RESUMO

DIVERSIDADE BACTERIANA EM BIOFILMES DE SUPERFÍCIES EXTERNAS DE PRÉDIOS HISTÓRICOS NA CIDADE DE PORTO ALEGRE¹

Autora: Greicy Kiel

Orientador: João Ruy Jardim Freire

A preocupação em conservar monumentos históricos tem aumentado a cada dia na comunidade científica, o que tem desencadeado na formação de grupos de pesquisa, os quais se dedicam a estudos de fatores que possam estar levando os monumentos à ruína, e formas de solucioná-los ou minimizá-los. A presença de bactérias em rochas ou em pedras de monumentos históricos tem sido confirmados por vários pesquisadores. Foram estudadas em Porto Alegre quatro igrejas e o gabinete do Vice Governador, todos de importância histórica, utilizando-se de técnicas microbiológicas tradicionais, objetivando avaliar a diversidade bacteriana em prédios de patrimônio em termos de morfologia celular e de desenvolvimento em diferentes meios de cultivo em laboratório. Foi encontrado um grande número de microrganismos em cada biofilme. Muitas bactérias Gram positivas eram do gênero *Bacillus*. Os isolados identificados com sendo *Bacillus* spp. se mostraram resistentes a concentrações de sal (NaCl) a 5% e algumas a 10%, indicando sua adaptação a superfícies secas. Este estudo, associado à literatura, indica que há muitos problemas em classificar a diversidade microbiana e que esta deve ser levada em consideração em processos de controle de biodeterioração em prédios.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (78p.). Fevereiro, 2005)

ABSTRACT

BACTERIAL DIVERSITY IN BIOFILMS ON EXTERNAL SURFACES OF HISTORIC BUILDINGS IN PORTO ALEGRE¹

Author: Greicy Kiel

Adviser: João Ruy Jardim Freire

The preoccupation in conserve of historic monuments has increased day by day in the scientific community. New research groups have arisen, dedicated to studying factors that can be taken historic monuments in ruin , and methods to solve them. The presence of bacteria in rocks or historic monuments of stone has been confirmed in many studies. Four churches and the Vice-Governor's office, all of historic importance, were studied in Porto Alegre, using traditional microbiological methods, with the aim of valuing bacterial diversity of historic and cultural patrimony and to assess microdiversity on historic buildings using cell morphology and culture in the laboratory. A large number of microorganisms was found in each biofilm. Most of the Gram positive bacteria were of the *Bacillus* genus. The isolates identifying of *Bacillus* spp. were resistant to 5% salt (NaCl) and some to 10%, indicating their adaptation to dry exposed surfaces. This study, together with the current literature, suggests that there are many problems with the classification of microbial diversity and that must be considered in attempts to control biodeterioration of buildings.

¹ Master's Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (78p.). February, 2005)

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
1- INTRODUÇÃO.....	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1- BIODEGRADAÇÃO E BIODETERIORAÇÃO.....	4
2.1.1- Definição.....	5
2.1.2- Histórico.....	7
2.1.3 – Fatores que influenciam a deterioração.....	8
2.1.3.1- <i>Ação física e química</i>	9
2.1.4- Danos e patologias.....	10
2.1.5- Biodeterioração em monumentos históricos.....	11
2.2- BIOFILMES.....	16
2.2.1- Microrganismos envolvidos nos processos de deterioração.....	18
2.2.1.1- <i>Bactérias</i>	20
2.2.1.2- <i>Fungos</i>	23
2.2.1.3- <i>Algas e Líquens</i>	23
2.2.2- Formação do biofilme.....	24
2.2.2.1- <i>Aderência e biossurfactantes</i>	26

2.3- COMO EVITAR A BIODETERIORAÇÃO.....	28
2.3.1- Biocidas.....	28
2.3.2- Resistência a biodeterioração.....	30
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1- OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	31
3.2- CULTURA E ISOLAMENTO.....	34
3.3- CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS.....	34
3.3.1- Coloração de Gram.....	35
3.3.2- Produção de endósporos.....	35
3.3.2.1- Teste de resistência à temperatura.....	35
3.3.2.2- Teste por coloração.....	36
3.3.3- Produção de catalase.....	36
3.3.4- Produção de oxidase.....	37
3.3.5- Crescimento em duas concentrações de sal.....	37
3.3.6- Precipitação de carbonato de cálcio.....	38
3.3.7- Produção de ácidos.....	39
3.3.8- Produção de bioemulsificantes.....	39
3.3.9- Crescimento em anaerobiose e motilidade.....	40
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1- ISOLAMENTO DAS BACTÉRIAS.....	42
4.2- CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS.....	44
4.3- PRODUÇÃO DE ENDÓSPORO.....	47

4.4- PRODUÇÃO DE CATALASE.....	49
4.5- PRODUÇÃO DE OXIDASE.....	49
4.6- CARACTERIZAÇÃO DE <i>Bacillus</i>	50
4.6.1- Crescimento em duas concentrações de sal.....	51
4.6.2- Precipitação de carbonato de cálcio.....	52
4.6.3- Produção de ácidos e surfactantes.....	52
4.6.4- Capacidade de desenvolvimento em anaerobiose e motilidade.....	55
4.6.5- Caracterização em grupos.....	56
5-CONCLUSÕES.....	61
6- PERSPECTIVAS FUTURAS.....	63
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
APÊNDICES.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Consequências da ação dos microrganismos sobre as superfícies da edificação.....	16
Tabela 2:	Número de isolados bacterianos em cada coleta.....	43
Tabela 3:	Número de isolados Gram positivos e Gram negativos em diferentes épocas e locais de coleta.....	45
Tabela 4:	Especificação do isolado quanto ao local de coleta e morfologia celular.....	46
Tabela 5:	Isolados com características formadoras de esporos e resistentes ao calor.....	48
Tabela 6:	Capacidade dos isolados produzirem oxidase.....	50
Tabela 7:	Membros do gênero <i>Bacillus</i> isolados dos prédios.....	51
Tabela 8:	Caracterização geral dos isolados de <i>Bacillus</i>	55
Tabela 9:	Caracterização dos isolados segundo metodologia de Priest (1993).....	57
Tabela 10:	Resumo das características relevantes dos isolados do gênero <i>Bacillus</i>	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Igreja Nossa Senhora das Dores.....	32
Figura 2:	Biofilme Igreja Nossa Senhora das Dores.....	32
Figura 3:	Gabinete do Vice-Governador.....	32
Figura 4:	Igreja São Geraldo.....	32
Figura 5:	Vista frontal Igreja Santo Antônio.....	33
Figura 6:	Vista lateral Igreja Santo Antônio.....	33
Figura 7	Biofilme Igreja Santo Antônio.....	33
Figura 8:	Igreja São Judas.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

ASTM – American Society for Testing and Materials

BRS – Bactérias redutoras de sulfato

DBO – Demanda bioquímica de oxigênio

IE – Índice de Emulsão

MKM – Meio de Knop Modificado

SPE – Substância polimérica extracelular

Th – Meio Thornton

1- INTRODUÇÃO

Há uma crescente preocupação com a preservação de monumentos que fazem parte do patrimônio histórico e cultural. Este fato tem levado ao maior interesse nos problemas causados por microrganismos presentes nas superfícies destas construções.

A colonização de superfícies de prédios por microrganismos como bactérias, algas, fungos e outros microrganismos acarretam em danos estéticos e estruturais, podendo levar inclusive a danos da saúde de pessoas com potencial alérgico, e hipersensibilidade, devido à liberação de esporos de fungos.

Em relação às atividades microbianas, as quais são importantes na deterioração de superfícies, pode ser citado o crescimento de microrganismos, os quais metabolicamente ativos produzem ácidos tanto orgânicos como inorgânicos, que agem no material. Há ainda a produção de enzimas hidrolíticas e surfactantes, os quais agem para permitir o consumo de matéria orgânica, proveniente de partículas de solo, outros organismos e fontes poluidoras, as quais servem como fonte de carbono e são encontrados na parede. As bactérias autotróficas e heterotróficas estão envolvidas em todos estes processos. O grande problema desses metabólitos produzidos é o dano gerado no material.

Os microrganismos encontrados nas superfícies externas dos prédios são organismos capazes de viver em condições limitadas, como a baixa concentração de nutrientes e resistir à secagem por ação de radiação.

Isso permite que estes microrganismos sobrevivam a altos níveis de luz ultravioleta. No caso de bactérias não fotossintetizantes, a sua sobrevivência nessas condições pode ser garantida pela produção de endósporos.

Bactérias são detectadas por meios de cultivo com meio de nutriente, tanto rico, como pobre, e com um pH variável, para que seja possível o desenvolvimento de um espectro maior de microrganismos. Porém, mesmo com testes de cultivo, grande parte das bactérias não são cultiváveis em laboratório, limitando muito a análise de biofilmes.

O objetivo geral desse trabalho é avaliar a diversidade bacteriana em biofilmes do patrimônio histórico e cultural. Os objetivos específicos são avaliar a microdiversidade em prédios de patrimônio em termos de morfologia de colônia em meios de cultivo em laboratório, bem como determinar a proporção de bactérias Gram positivas e Gram negativas; investigar o efeito do sal (NaCl) em duas concentrações sobre o crescimento dos microrganismos detectados e estudar a capacidade de sobrevivência de bactérias formadoras de endósporos sobre superfície coberta com tinta, presentes nas superfícies externas de prédios históricos na cidade de Porto Alegre, através de métodos tradicionais de cultivo e testes bioquímicos voltados a atividades fundamentais nos processos de deterioração de parede.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A preocupação em desenvolver métodos para monitorar a conservação de monumentos históricos tem aumentado a cada dia na comunidade científica. Grupos de pesquisa têm se consolidado para auxiliar no processo em vários países.

Institutos tecnológicos estão, portanto, se dedicando a estudos de problemas estruturais e ambientais, assim como a métodos para prevenção (Meira, 2001). Estes grupos estão sendo formados no Brasil em Minas Gerais e no Rio Grande do Sul, muito recentemente e tem se expandindo com o passar do tempo.

Para que se conserve, deve-se minimizar a intervenção e não usar a “conservação” como forma de justificar restaurações mais destrutivas e menos conservadoras. Porém se faz necessário o conhecimento de atividades que geram a degradação, levando os monumentos à ruína, assim como o entendimento dos mecanismos que geram estes danos, para que se possa promover a prevenção. Não se pode, no entanto, combater o efeito do mecanismo sem conhecer as causas que levam a tal fim, pois o problema não seria eliminado (Jiménez, 1999).

Os monumentos criados, em geral sofrem com a degradação, sendo que somente uma pequena fração dos objetos, prédios e monumentos criados no passado sobrevivem aos estragos causados pelo tempo, o que resiste torna-se patrimônio. Este por sua vez é destruído através de ataques de agentes naturais (de forma lenta) e antropogênicos (de forma

assustadoramente rápida), agindo sobre os materiais que compõem o objeto ou estrutura monumental (Feilden, 1982).

Os estudos sobre o processo deteriorativo são importantes para que se detecte a evolução do problema, diminuindo o custo de reparo de construções históricas, sendo possível também a divulgação de manifestações patológicas incidentes (Andrade, 1997)

Em edificações históricas estes estudos agem proporcionando um maior conhecimento para que se faça um manuseio adequado da obra, visando a integridade dos materiais e componentes de preservação.

A norma ASTM (American Society for Testing and Materials) E632 (1998) define fator de degradação como “qualquer fator externo que afete de maneira desfavorável o desempenho de um edifício ou de suas partes, incluindo nisto as intempéries, agentes biológicos, esforços, incompatibilidade e fatores de uso”.

Neste trabalho será pesquisado somente sobre a ação ambiental e em especial de microrganismos procariotos, as bactérias, responsáveis pela biodeterioração, caracterizando-os através de técnicas tradicionais.

2.1- Biodegradação e Biodeterioração:

A colonização microbiana de pedras e concreto geralmente tem início com microrganismos fototróficos que formam um biofilme enriquecido com biomassa orgânica e inorgânica. Estas possui nutrientes diversos para essa comunidade (Darlington, 1981).

Dentre os membros danosos desta comunidade, destacam-se as bactérias heterotróficas e os fungos filamentosos, cuja contaminação em materiais de construção e em monumentos históricos eleva os custos de manutenção e reparos. No Reino Unido este valor é de aproximadamente 400 milhões de libras ao ano (Singh, 1994).

É muito importante o conhecimento da diversidade microbiana presente em objetos ou monumentos, para que se possa desenvolver de forma mais efetiva a conservação e possíveis estratégias de restauração (Gurtner et al., 2000).

2.1.1- Definição:

Existem muitas definições para classificação de biodegradação e biodeterioração. Para Hueck (2001), biodeterioração de materiais é qualquer mudança nas propriedades do material causada por atividades vitais dos organismos (Morton & Surman, 1994).

O fato é que os materiais de construção em sua interação com o meio sofrem transformações constantes. Quando estas transformações são irreversíveis, gerando perda de valor, o processo é a deterioração. O conjunto das características físicas e químicas do material e como reage diante do ambiente são todos os fatores de degradação (John, 1987).

Quando esse processo se dá pela atividade metabólica de organismos é chamado de biodegradação, podendo ser usado também de forma comum, o termo biodeterioração, que é uma classificação da biodegradação. (Allsopp & Seal, 1986).

Porém, a biodeterioração é vista como um processo que diminui o valor do que está sofrendo a ação, e biodegradação como aquela que aumenta o valor, tendo, contudo princípios idênticos. A definição de biodeterioração de materiais de importância econômica por organismos, é certamente um fenômeno preocupante e necessita de métodos apropriados de estudos.

Convencionalmente, a biodeterioração se refere ao dano em materiais, construção e processos de relativamente alto valor, uma vez que a biodegradação refere-se somente a materiais e é distinguida de processos biológicos principalmente porque se aplica a materiais de baixo valor ou valores negativos (Eggins & Oxley, 1980), como por exemplo o uso de microrganismos na biodegradação de um derrame de óleo diesel.

A biodeterioração vem sendo considerada um processo de degradação que segue o efeito de agentes inorgânicos em seu processo inicial. Tal processo, em especial os biofilmes que são formados por microrganismos e cobrem as superfícies, pode proteger os monumentos de fatores ambientais prejudiciais, porém tem sido descoberto que os estágios iniciais de exposição à pedra agem com efeito biodeteriorante (Gaylarde & Morton, 1999).

Essa contaminação microbiana age na formação de crostas em superfícies rochosas, produzindo corrosão pela produção de ácidos e ação oxidoreductora em estruturas minerais (Warscheid & Braams, 2000).

O crescimento destes microrganismos em paredes causa danos estéticos (mudanças de coloração das superfícies, manchas e formação de biofilme na parede) e afeta a integridade física (rachadura e desintegração de camadas de tintas) (Ciferri, 1999; Krumbein, 1988).

O estudo da biodeterioração procura auxiliar na compreensão dos fenômenos químicos e biológicos que levam à degradação de diferentes tipos de materiais. A influência de agentes biológicos sobre construções de valor histórico e cultural fez com que se intensificasse a pesquisa da ação em prédios e monumentos históricos (Agrawal & Dhawan, 1989).

2.1.2- Histórico:

A história de recentes investigações de biodeterioração microbiana é diretamente relacionada com a história de cada local (Zyska, 2004).

Uma evidência mais direta de ocorrência de deterioração por microrganismos foi pontuada por Bunker, em 1946, durante a escavação da tumba de Tut Anch Amon no Egito observando a pintura de paredes. Pôde-se notar que havia regiões com um pigmento amarelo, que continham sulfato de arsênico. Esta tumba era de 1350 a.C., portanto com grande tempo para ação de microrganismos e ação dos mesmos (Hueck, 2001).

Em uma caverna na França, onde havia várias inscrições do período Paleolítico, o fluxo de trabalhadores e visitantes acabou carregando para o interior desta uma grande quantidade de solo e compostos orgânicos presentes em seu corpo e vestimentas, aumentando a concentração de dióxido de carbono a níveis quase patológicos.

O sistema de luz instalado nesta mesma caverna, para que fosse permitida a visitação, e operando quase que continuamente, criou condições de crescimento exacerbado de organismos fotossintéticos. Por todos esses

motivos o local foi fechado, a fim de não permitir o processo de biodeterioração acelerada em um local de tão grande importância histórica (Ciferri, 1999).

Tendo como base estes dados, pode-se notar que cianobactérias podiam crescer sob condições heterotróficas utilizando moléculas orgânicas carregadas para a caverna por visitantes, não o fazendo somente de forma autotrófica (Ciferri, 1999). O fechamento e isolamento desses locais do ambiente externo é uma das principais maneiras de se conservar as rochas e pinturas artísticas (González et al., 1999).

2.1.3- Fatores que influenciam a deterioração:

Os materiais de construção de modo geral são constantemente submetidos à ação de esforços mecânicos e a fatores naturais, dentre os quais podem ser salientados: a temperatura, a umidade, a radiação solar, bem como a ação de agentes microbiológicos (Brown, 1999; Warscheid & Braams, 2000).

A poluição atmosférica, as fontes antropogênicas e transportes aos quais são submetidas às construções aumentam a concentração de compostos orgânicos e inorgânicos na atmosfera, os quais acabam por se depositar em superfícies de monumentos, acelerando drasticamente a degradação destas (Arnold, 1993; Zanardini et al., 2000).

Este processo acaba sendo agravado pelo tempo de exposição, além do que, o descaso em preservação e restauração desses prédios e monumentos históricos agrava ainda mais o processo deteriorativo (Charola, 1993).

O meio natural onde o biofilme deteriorativo se encontra possui poucos nutrientes e uma concentração elevada de sal em função do estado seco da superfície. A concentração do sal pode até atingir o nível necessário para produzir danos em ambientes externos, onde a rocha está sujeita a chuva e secagem subsequente (Price, 1996).

No entanto, nem todas as bactérias conseguem se desenvolver num ambiente que possua uma maior quantidade de sal (acima de 5%). Quando estas bactérias são capazes de se desenvolver em meios hipersalinos, elas apresentam uma maior capacidade de desenvolvimento nestas superfícies e como consequência podem ser responsáveis pela aceleração na velocidade de deterioração, apesar desta ainda ser lenta e gradativa (Rölleke et. al., 1998).

2.1.3.1- Ação física e química:

Além dos microrganismos, que se instalam sobre esses materiais, serem capazes de crescerem sobre a superfície da pedra (sendo desta forma denominados de microrganismos epilíticos), também as algas e cianobactérias podem penetrar alguns milímetros através de poros encontrados nas rochas (agora chamados de fototróficos endolíticos) (Golubic et al., 1981).

Esses organismos são importantes na deterioração de pedras, especialmente quando associado à poluição em climas moderados, sendo que este processo é caracterizado por:

- 1-Excreção de ácidos orgânicos corrosivos (Cavena et al., 1992)
- 2-Absorção e acúmulo de enxofre e cálcio nas células (Ortega-Calvo et al., 1994)

3-Alteração de minerais que compõem as pedras (Jones et al., 1988)

4-Aumento dos poros devido à penetração de filamentos dos microrganismos (Jaton et al., 1985)

Dos problemas químicos causados pelos mesmos, citam-se a redução e oxidação, a produção de ácidos orgânicos e a destruição mecânica através da penetração no substrato das estruturas filamentosas de fungos, bem como a produção de surfactantes (Becker et al., 1994; Resende, 1997; Berner et al., 1997).

Uma característica comum de organismos em biofilmes é a produção de polímeros. Os polímeros agem como colas, retendo sujeira e demais partículas, aumentando sua ação desfigurante e dificultando a limpeza dos prédios (Gaylarde & Morton, 1999).

2.1.4- Danos e patologias:

Biodeterioração e patologia de organismos diferem em que é descrito como o fenômeno ocorrido em sistemas de diferentes níveis de complexidade. Algumas diferenças quantitativas existem devido ao fato de alguns materiais serem mais apropriados para o desenvolvimento de organismos que outros (Hueck, 2001). A biodeterioração não é uma patologia propriamente dita, porém é geradora de patologias, como fissuras (Eggins & Oxley, 1980).

É claro que tanto os danos estéticos, como os danos estruturais são fortemente ligados, e que em longo prazo, o dano estrutural afeta

profundamente a qualidade estética da pintura de um monumento (Ciferri, 1999).

2.1.5-Biodeterioração em monumentos históricos:

O patrimônio de muitas cidades do mundo, representado tanto por edifícios como por obras de arte e monumentos, está sendo submetido há algum tempo à degradação, deterioração e até destruição. É um fenômeno que afeta grandes ou pequenas obras, históricas ou contemporâneas (Giúdice, 2002).

Paredes de obras medievais sofrem deterioração causada por ruína biológica, devido ao grande tempo de exposição e ação dos microrganismos nestas obras (Täubel et al., 2003).

Pinturas e paredes de monumentos pertencentes ao patrimônio histórico-cultural possuem uma grande cadeia de constituintes orgânicos e inorgânicos, e diferentes nichos ecológicos que podem ser explorados pela grande variedade de espécies microbianas.

Muitos dos componentes da parede ou pintura são biodegradáveis, outros são aditivos que facilitam a aplicação de camadas de tinta ou prejudicam a qualidade do produto final (Ciferri, 1999).

A colonização e biodeterioração dos prédios e monumentos que são expostos ao ar por um período de tempo, são determinadas pelas condições ambientais (temperatura, umidade, velocidade do vento, sol, intensidade da luz, poluição atmosférica) e pelo tipo de material do qual é composto o objeto. Em

monumentos as rochas geralmente são silicáceas ou calcáreas, embora exista uma variação entre os dois tipos (Gaylarde, 2002; Flores et al., 1997).

Um sistema de biofilmes pode desenvolver-se em paredes de edifícios e construções. Atrás da natureza orgânica de suporte, as pinturas contêm moléculas orgânicas que muitos microrganismos utilizam para crescer, como açúcares, goma, e outros polissacarídeos como proteínas, óleos e graxas. A sujeira, a fuligem e outros contaminantes ambientais, que se acumulam na superfície, podem representar outras fontes significantes de nutrientes (Ciferri, 1999).

É conhecido que a maioria dos microrganismos (bactérias, fungos, algas e cianobactérias) desempenha papéis colonizadores e degradadores de pedras e rochas encontradas em construções e monumentos, e que atuam também no desgaste de rochas. Vários mecanismos têm sido sugeridos sobre como eles agem para que sejam capazes de deteriorar rochas (Allsopp & Seal, 1986).

Os processos de biodeterioração em pedra podem dividir-se em dois grandes tipos: processos biogeoquímicos e processos biogeofísicos (Warscheid & Krumbein, 1996). O crescimento microbiano causa deterioração química (produção de substâncias químicas, como ácidos orgânicos e inorgânicos, e surfactantes, que geram lixiviação do substrato), e física.

A deterioração física se produz principalmente pelo crescimento de fungos e cianobactérias que conseguem penetrar na estrutura rochosa, sendo organismos endolíticos, causando danos estruturais, como rachaduras e fissuras. Diferentes mecanismos biogeoquímicos alteram a aparência estética e

a integridade do material estrutural, sendo grande a importância da biodeterioração de monumentos de pedra do patrimônio cultural (Warscheid & Krumbein, 1996).

Dentre os processos de deterioração biogeoquímica, é mais freqüente a produção metabólica de ácidos, tanto orgânicos como inorgânicos os quais dissolvem o substrato por biolixiviação de certos componentes minerais de material estrutural.

A deterioração de concreto e rochas é um fenômeno dirigido por diferentes microrganismos através de diversos mecanismos. Por exemplo, a redução química de sulfato, presente no concreto, pode resultar em inúmeros produtos, como tiosulfato, sulfeto e enxofre elementar (Nica, 2000), desta maneira prejudicando a integridade estrutural do material.

Estes processos de redução acontecem na presença das bactérias redutoras de sulfato, organismos anaeróbicos capazes de crescer sob depósitos e juntos com outros organismos utilizadores de oxigênio.

Os microrganismos podem ainda aumentar a taxa de transformação pelas outras atividades metabólicas, tais como a absorção de íons e a produção de agentes quelantes. Eles também alteram a permeabilidade e hidrofobicidade de minerais pela deposição de materiais poliméricos e surfactantes (Gaylarde & Morton, 1999).

As pedras constituem ambientes heterogêneos, contendo matéria orgânica e com variações espaciais de pH, potencial redox, temperatura e umidade. Estas características heterogêneas originam variações no número e atividade dos microrganismos (Videla, 2002).

As bactérias heterotróficas que atacam as pedras de monumentos e edifícios do patrimônio cultural apresentam um amplo espectro de características taxonômicas e metabólicas.

Em um habitat tão específico como dos monumentos, as técnicas microbiológicas tradicionais têm proporcionado o isolamento de grande número de bactérias dos gêneros *Arthrobacter*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* e *Streptomyces* (Tiano, 1993; Saiz-Jiménez, 1994; González et al., 1999; Groth et al., 1999; Laiz et al., 2000), além de bactérias do gênero *Bacillus* (Guiamet et al., 1998) com ampla ação acidificante.

Bactérias produtoras de biofilmes mucilaginosos do gênero *Pseudomonas* e bactérias heterótrofas anaeróbicas redutoras de sulfatos (BRS), podem ser encontradas em biofilmes aéreos (Videla et al., 2000). Recentemente, os estudos são enfocados em buscas de comunidades halófilas e *Archaea* em monumentos deteriorados (Rölleke et al., 1998; Piñar et al., 2001).

As cianobactérias geralmente são colonizadores primários de pedra, servindo como fontes de carbono para as demais comunidades se proliferarem. Os fungos deterioram pedras, química e mecanicamente por penetração do micélio fúngico por fendas ou fissuras, produzindo metabólitos ácidos, que debilitam suas características.

O crescimento do micélio fúngico em revestimentos internos e externos em edificações causa o aparecimento de manchas escuras e sua permanência em longo prazo pode levar a biodeterioração de argamassas (Shirakawa et al., 1999). Estes também são capazes de crescer dentro das

rochas, mas não se pode afirmar, se tal crescimento endolítico segue a degradação primária pelos metabólitos microbianos.

Os fungos presentes nas superfícies dos prédios históricos de Minas Gerais (Resende et al., 1997; 2002) e as bactérias heterotróficas em prédios históricos da Europa (Warscheid et al., 1993; May et al., 1993; Wollenzien, 1995) já foram estudados utilizando-se técnicas tradicionais de identificação. Entretanto, estas técnicas não permitem a detecção de todos os microrganismos presentes devido o processo seletivo de cultivo.

As cianobactérias foram melhor estudadas no Brasil, utilizando-se técnicas tradicionais e de biologia molecular (Crispim et al., 2004). Não se tem conhecimento de nenhum tipo de estudo sobre bactérias não fotossintetizantes no Brasil.

Os líquens estão relacionados com a biodeterioração da pedra de maneira similar a musgos e plantas superiores (Monte, 1991), que produzem ácido oxálico.

A biodeterioração causa alterações na distribuição do tamanho dos poros em pedras, alargamento e fissuras, mudanças na circulação de umidade, mudança da coloração de superfícies de pedra e finalmente, corrosão acidolítica e óxido-redutora e conseqüente enfraquecimento dos minerais que compõe a pedra (Griffin et al., 1991).

Os principais efeitos iniciais do crescimento microbiano nas fachadas das edificações são a coloração e a aparência suja. Acrescido à presença da poluição, estes têm sido visualmente um dos danos mais marcantes nas edificações do patrimônio cultural.

A ação dos microrganismos pode resultar em danos característicos sobre as superfícies da edificação, segundo o produto do metabolismo, a ação de cada um está representada na Tabela 01 (Gaylarde, 2000).

2.2- Biofilmes:

Dada a grande cadeia de moléculas orgânicas e inorgânicas que estão presentes em todos os tipos de pintura, diferentes tipos de microrganismos podem crescer em um substrato que possua condições ambientais favoráveis como umidade, temperatura, luz e pH. (Ciferri, 1999).

Tabela 1: Conseqüências da ação dos microrganismos sobre as superfícies da edificação

ORGANISMO	PRODUTOS METABÓLICOS	CONSEQÜÊNCIA NA SUPERFÍCIE
Bactérias	Ácidos Inorgânicos	Dissolução e coloração
Fungos	Ácidos Orgânicos	Fragilização mecânica e coloração
Algas e Cianobactérias	Ácidos Orgânicos	Retenção de água, dissolução mineral
Líquens	Ácidos Orgânicos	Aumento da porosidade e ataque químico

FONTE: Gaylarde, 2000

Os organismos associados aos processos de biodeterioração crescem em forma de biofilmes, que são constituídos por comunidades complexas de microrganismos, substância polimérica extracelular (SPE) de natureza polissacarídica, partículas de origem diversas e uma alta porcentagem de água, formando películas mucilaginosas (Geesey, 1982; Morton & Surman, 1994).

Estas partículas se mantêm aderidas ao substrato onde, além de promoverem sua degradação, afetam seu aspecto estético e promovem danos à superfície. A formação de biofilmes pigmentados, biomineralização, dissolução de metais pela produção de ácidos e agentes quelantes são alguns dos fenômenos danosos causados na superfície pelo crescimento de microrganismos (Gurtner et al., 2000).

Estas comunidades microbianas são freqüentemente compostas de múltiplas espécies as quais vivem bem ecologicamente. A adesão de resíduos orgânicos como fuligem e muitas outras substâncias ajudam no crescimento de organismos como bactérias e fungos, dentre outros (Flores et al., 1997).

Os biofilmes nas superfícies externas e internas de prédios contêm uma ampla faixa de microrganismos, cuja presença física e atividades metabólicas acarretam a degradação do material (Gaylarde e Morton, 1999; Shirakawa et al., 2002).

Até recentemente, a falta de métodos para proporcionar conhecimento pleno dessas comunidades *in situ* tem dificultado análises mais detalhadas.

A maioria desses microrganismos persiste aderida à superfície dentro de um ecossistema estruturado, como se pode notar através de seu estudo, funcionando como um consórcio cooperativo de forma relativamente complexa e coordenada, não vivendo da mesma forma que os organismos de vida livre (Costerton et al., 1995).

Os biofilmes ativos são encontrados em qualquer local onde haja microrganismos e umidade. Sua formação é afetada pelos tipos de organismos,

natureza da superfície e condições ambientais (Costerton et al., 1987; Walker & Keevil, 1995).

A importância dos biofilmes na biodeterioração de materiais está relacionada com as drásticas modificações que produzem nos valores de pH, concentrações iônicas e condições de óxido-redução na superfície do substrato e no meio circundante. Estas características físico-químicas nas interfaces criam áreas localizadas de grande agressividade e que estão presentes nas zonas cobertas por biofilmes (Videla & Characklis, 1992).

2.2.1- Microrganismos envolvidos nos processos de deterioração:

Existe uma enormidade de microrganismos que vivem no ambiente e que formam biofilmes. Entretanto, métodos microbiológicos convencionais permitem o cultivo de somente uma pequena proporção destes em condições laboratoriais.

Esses fatores laboratoriais limitam os tipos e números de bactérias, gerando um entendimento não acurado das espécies que compõem o biofilme e da interação dos microrganismos no processo de ruína do material (Röller et al., 1998). Isso se dá pelo fato que é muito difícil reproduzir a diversidade de microflora e microfauna do biofilme e sua relação interespaçial (Morton & Surman, 1994).

Além do que, é possível perceber algumas limitações nas capacidades experimentais, como na amostragem, o que não permite que se saiba ao certo, quão diversas são as comunidades, se é uma comunidade estável, dentre outros dados. De uma forma tradicional, os microrganismos têm

sido classificados de acordo com características morfofisiológicas da cultura pura, não se levando em consideração sua classificação evolutiva (Valinski et al., 2002)

Os principais microrganismos envolvidos na biodeterioração são as bactérias, os fungos, as algas e os líquens. Os fungos e a maioria de bactérias se alimentam de materiais orgânicos, vivendo em condições de parasitos, porque estão privados da realização de fotossíntese.

Entre os microrganismos isolados de paredes através de cultivo em meios artificiais no laboratório, é comum se encontrar a presença de leveduras de gênero *Rhodotorula*, bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Micrococcus* e *Pseudomonas*, e alguns fungos como *Ulocladium*, *Phoma*, *Alternaria*, *Penicilium* e *Cladosporium* (Flores et al., 1997).

Quando se analisa a deterioração de concreto, nota-se uma grande variedade de microrganismos presentes neste, o que confirma a complexidade de população microbiológica também neste material, aumentando muito a capacidade de deterioração (Nica, 2000).

Essas comunidades polimicrobianas formam associações onde muitos microrganismos obtêm vantagens mútuas, como estocagem e liberação de água e metabólitos (Flores et al., 1997).

A microflora que se forma nas pedras de construção com o passar dos anos representa um ecossistema complexo, que se desenvolve variavelmente dependendo de condições ambientais e propriedades físico-químicas dos materiais em que se instalam, sendo apresentados em grupos (Brock et al., 1994):

- 1- Organismos fotolitoautotróficos, onde se encontram as algas, cianobactérias, musgos e plantas superiores, os quais são fotossintéticos, dando suporte para início da sucessão ecológica (Warscheid et al., 1993).
- 2- Bactérias quimiolitoautotróficas, as quais obtêm sua energia pela oxidação de compostos inorgânicos e fixam o gás carbônico da atmosfera, resultando na liberação de ácidos.
- 3- Fungos e bactérias quimiorganotróficas que usam substratos orgânicos como sua fonte de carbono e energia, liberando ácidos orgânicos biocorrosivos que acabam por enfraquecer a estrutura mineral dos monumentos.
- 4- Os líquens que são formados por associação simbiótica de um fungo e uma cianobactéria ou alga, onde os fungos utilizam compostos orgânicos produzidos pelas algas e as cianobactérias/algas realizam fotossíntese, fazendo uso de minerais lixiviados da pedra pelos ácidos secretados pelas hifas de líquen.

2.2.1.1- Bactérias:

A presença de bactérias em rochas ou trabalhos em pedras de monumentos históricos tem sido confirmados por vários pesquisadores (Paine et al.,1933; Webley et al.,1963; Eckhardt, 1978, 1985, 1988; Lewis et al.,1988; Warscheid et al.,1988; Tayler & May, 1991, 1994, 2000).

As bactérias e os fungos atuam originando fenômenos de decomposição química (Pace, 1997). Em alguns trabalhos é destacado que sua presença sugere que, em adição de agentes químicos e físicos, podem ter um papel na deterioração da rocha (Eckhardt, 1985; Krumbein, 1988; Tayler & May, 1991).

Este fato tem sido mostrado pela capacidade de causar danos em rochas sob condições laboratoriais (Wood & Macrae, 1972; Vuorinen et al., 1981; Eckhardt, 1978, 1985; Lewis et al., 1987; Tayler & May, 2000).

Os procaríotos podem habitar em qualquer ambiente que seja apropriado para formas de vida superiores, assim como locais praticamente inabitáveis para estes indivíduos (Madigan et al., 1997). Esta habilidade deve-se à sua versatilidade metabólica e plasticidade fenotípica.

Bactérias possuem mecanismos próprios como motilidade flagelar e diferentes métodos de se translocar em superfícies. Algumas produzem celulose formando uma película fibrosa que auxilia na aderência de superfícies (Ross et al., 1991).

Os organismos podem existir independentemente num dado ambiente, mas em muitos casos eles proliferam mais eficientemente interagindo e formando comunidades (Caldwell et al., 1997). Em ambientes extremos, comunidades estruturadas de forma complexa conduzem uma variedade de processos biológicos, como fotossíntese, fixação de nitrogênio e fermentação.

Bactérias heterotróficas têm sido encontradas com frequência em monumentos de rochas deteriorados e em deterioração. Acredita-se que tenham ação ativas no processo de ruína como resultado de atividades mineralizadoras, similar àquele observado com bactérias do solo.

Esta atividade realizada por bactérias em rocha é governada pela disponibilidade de matéria orgânica armazenada no local. A maioria das rochas disponibilizam matéria orgânica suficiente, permitindo desta forma o crescimento e a atividade de microrganismos (Flores et al., 1997).

Estas bactérias heterotróficas aparecem em rochas, formando associações, as quais são hábeis na criação de biofilmes que retém umidade, o que contribui para remoção e imobilização de poluentes, e protegem os organismos de substâncias tóxicas que são comumente produzidas (Govan, 1975).

Bactérias quimioautotróficas são raras na natureza, mas algumas espécies de *Thiobacillus*, que oxidam compostos de enxofre e transformam enxofre elementar em sulfatos, são encontradas em monumentos históricos, mas sua ação na rocha não é muito clara (Flores et al., 1997).

Para se desenvolver um trabalho de investigação de bactérias em rochas muitas técnicas têm sido testadas, envolvendo isolamento e subsequente identificação de culturas puras. Porém é um método que consome tempo e limita a detecção de bactérias para aquelas que só são capazes de crescer em meios específicos (Tayler & May, 1994).

2.2.1.2- Fungos:

Inicialmente o fungo forma um micélio que auxilia na sua nutrição, o que é chamado de micélio vegetativo ou de sustentação, para posteriormente formar o micélio aéreo ou de reprodução, que como o próprio nome indica, tem função reprodutiva, produzindo esporos. É exatamente o micélio de sustentação que acaba penetrando pelos poros e fissuras do concreto e de rochas, agravando ainda mais o processo biodeteriorante.

Estes organismos são muito importantes na deterioração de concreto e rochas, e se desenvolvem em condições diferenciais quando comparado a bactérias, crescendo em pH normalmente mais drásticos que bactérias, podendo variar de 4,5 à 13 (Nica et al., 2000).

Os fungos são encontrados em grandes quantidades em biofilmes, apresentando diferentes linhagens e cores. Em ambientes extremos, como alta temperatura, seco, ambiente hipersalino, exposição direta a luz solar (raios ultravioletas, conseqüentemente), os fungos pretos, as leveduras negras e actinomicetos (que na realidade são procariotos) são os principais responsáveis pela mudança na coloração nas superfícies das paredes (Zanardini et al., 2000).

2.2.1.3- Algas e líquens:

As algas produzem seus próprios materiais orgânicos, complexados de fontes inorgânicas, fazendo uso da luz solar. Os líquens, que são formados pela simbiose de fungos com algas ou cianobactérias, são responsáveis pela

formação de camadas escorregadias sobre superfícies de edificações (Allsopp, 2001).

Algumas das ações químicas atribuídas a algas que colonizam construções de rochas, são produzidas pela liberação de produtos metabólicos ácidos e quelantes (Flores et al., 1997).

2.2.2- Formação do Biofilme:

Colonizadores biodeteriorantes de materiais de pedras são considerados como microrganismos autotróficos, sendo capazes de sobreviver em substratos inorgânicos, utilizando o dióxido de carbono como fonte de nutrientes.

Os heterotróficos poderiam colonizar os substratos de pedra somente mais tarde, de acordo com sucessão ecológica real, utilizando-se de substâncias orgânicas liberadas pela lise celular de seres autotróficos e de contaminação do ar que se deposita sobre a superfície (Gurtner et al., 2000; Zanardini, 2000).

Os fungos são considerados colonizadores secundários uma vez que os primeiros colonizadores são microrganismos fototróficos, bem como bactérias do ciclo do enxofre, conhecidas pelo seu importante papel na deterioração de rochas.

Isso ocorre principalmente em regiões industrializadas, nas quais existe uma emissão direta de poluentes para atmosfera, especialmente dióxido de enxofre. O ácido sulfúrico produzido do dióxido dissolve o carbonato de

cálcio, da qual se formam muitas rochas constituintes de monumentos e esta ação química acelera o processo deteriorativo (Urzi et al., 1992).

A morte de células que se aderem à parede vai permitindo a colonização por outros tipos de microrganismos, ocorrendo a sucessão microbiana. O crescimento de fungos é considerado o fator predominante de deterioração física, sendo responsável por manchas coloridas presentes nas superfícies de paredes, já que os fungos produzem hifas que podem penetrar pelos poros de rochas e ainda liberar um pigmento de difícil remoção.

O crescimento de fungos por sua vez estimula o crescimento e sobrevivência de bactérias, a qual é suprida por produtos de hidrólise de macromoléculas, como celulose e proteínas presentes na pintura (Ciferri, 1999).

A formação de um biofilme é um processo cumulativo desuniforme em tempo e espaço (Characklis & Marshall, 1990). O biofilme é formado de forma muito lenta. A princípio ocorre o transporte de moléculas orgânicas e organismos autotróficos vão se depositando na superfície formando uma camada inicial fina e retilínea.

Quando estes conseguem se fixar, organismos heterotróficos também podem se instalar utilizando como fonte de energia, a matéria orgânica que é proveniente do transporte atmosférico, ou gerada pela lise celular dos organismos formadores da camada de colonização do biofilme. A camada de microrganismos passa a não ser mais de forma homogênea e retilínea; é formada uma camada irregular que passa por modificações constantes (Hamilton & Characklis, 1989; Morton & Surman, 1994).

Essas modificações se dão devido à ação dos microrganismos e da camada de ar que passa constantemente pelo biofilme transportando os organismos ali presentes para outros locais e mesmo os retirando da camada. Outro fator é a quelação de cátions por ácidos orgânicos produzidos microbiologicamente tem importante papel na deterioração de materiais de construções rochosos (Wainwright et al., 1993; Morton & Surman, 1994)

2.2.2.1- Aderência e biossurfactantes

Uma das fundamentais estratégias de sobrevivência dos microrganismos é sua habilidade de colonizar determinado nicho ecológico onde eles possam se multiplicar. O elemento chave para esta estratégia são estruturas presente nas superfícies celulares que são responsáveis pela aderência dos microrganismos em uma dada superfície (Rosenberger & Ron, 1999).

Os microrganismos podem produzir moléculas surfactantes (biossurfactantes) ligados á parede para regular as propriedades da superfície, visando a adesão ou a liberação das células de um determinado local de acordo com sua necessidade para encontrar novos habitats com maior disponibilidade de nutrientes ou se o ambiente é desfavorável.

Neu (1996) fez uma revisão sobre como os surfactantes podem afetar a interação entre bactérias e interfaces. Se um biossurfactante é excretado ele pode formar um filme condicionante sobre a interface, e desta forma estimular a aderência de certos microrganismos e inibir outros.

Os biossurfactantes são sintetizados por bactérias, leveduras e fungos filamentosos durante o crescimento em diferentes fontes de carbono, desde substâncias hidrofílicas como a glicose até substratos hidrofóbicos como os hidrocarbonetos (Mulligan, 2005). Neste caso, pode-se encontrar dois tipos possíveis de produção: a) extracelulares, quando eles causam emulsificação do hidrocarboneto dentro da célula; b) associados à parede celular, que podem facilitar a penetração do hidrocarboneto no espaço periplásmico.

Embora a exata função fisiológica dos biossurfactantes ainda não tenha sido completamente elucidada, algumas funções como emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, facilitam o crescimento de microrganismos nestes substratos; transporte de hidrocarbonetos; aderência-liberação da célula a superfícies e atividade antibiótica (Nitschke & Pastore, 2002, Mulligan, 2005).

Os biossurfactantes apresentam glicolipídeos de alto e baixo peso molecular, tais como lipopeptídeos, complexos lipopolissacarídeo - proteínas, ácido graxos e polímeros como lipoproteínas, que geralmente são classificados com base no seu tipo de lipídeo. Esses biopolímeros apresentam uma porção hidrofílica e uma hidrofóbica.

Na porção hidrofóbica encontram-se lipídeos ligados a um ou mais ácidos graxos, os quais podem ser saturadas ou insaturadas. Na porção polar, a parte solúvel em água do biossurfactante pode ter uma carboxila, uma hidroxila ou uma mistura complexa de fosfato, carboidratos, aminoácidos. Segundo Willumsen & Karlson, (1997) os biossurfactantes podem ser divididos

em duas grandes categorias, os surfactantes de baixo peso molecular e o de alto peso molecular.

Os surfactantes de baixo peso molecular (glicolipídios, ácidos graxos e fosfolípidios), que quando presentes no meio aquoso apresentam a propriedade de diminuir a tensão superficial do meio. Enquanto que os surfactantes de alto peso molecular, chamados de bioemulsificantes, formados por polissacarídeos, não apresentam a mesma composição anfipática, ou seja, uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica.

No meio aquoso estes bioemulsificantes, são responsáveis pela formação e estabilidade da emulsão, porém não causam necessariamente a redução da tensão superficial. A habilidade de um microrganismo em reduzir a tensão superficial e/ou formar uma emulsão pode ser devido à excreção de produtos extracelulares ou pode estar associado com as características da superfície celular (Desai & Banat, 1997).

2.3- Como evitar a biodeterioração:

2.3.1- Biocidas:

Sob condições físicas e químicas apropriadas os microrganismos têm papel crucial na deterioração de objetos de arte, particularmente sobre materiais expostos ao ar livre. Esforços para eliminar microrganismos que contribuem para o processo não seria efetivo, sem o melhor conhecimento da diversidade microbiana.

O mero uso de biocidas e outros tratamentos podem agir prejudicando ainda mais o objeto a ser preservado. Outros podem destruir

apenas alguns microrganismos, permitindo que os não destruídos se desenvolvam de forma exacerbada. Portanto é melhor entender a interdependência com e entre os microrganismos e seu impacto no processo de deterioração de materiais (Röllerke et al., 1998). Segundo Russel (1992), citado por Morton et.al (1998) a efetividade do biocida é determinada pela sua natureza e microrganismos envolvidos no biofilme.

O mecanismo de resistência bacteriana a alguns biocidas se dá devido à presença de um polímero de exopolissacarídeo associado ao consórcio. Porém essa barreira física pode ser menos importante do que fatores intrínsecos (fenotípicos) ou adquiridos vistos no interior do biofilme (Morton et al., 1998).

Outro possível mecanismo de resistência ao biocida está associado ao aumento da produção de enzimas degradativas pelas células e sua ação no glicocálice, agindo juntamente na quelagem química ou física de biocidas pela matriz do biofilme e detritos celulares. (Morton et al., 1998)

O uso de alguns biocidas pode causar sérias contaminações ambientais, devendo-se ter muito cuidado. A segurança do uso de atividades biológicas e compostos tóxicos como os biocidas e em menor grau daquelas moléculas usadas como detergentes, dependem muito da biodegradação de suas moléculas no ambiente (Eggins & Oxley, 1980).

A biodegradabilidade dessas moléculas é um critério importante para sua segurança durante o uso, já que se deve ter uma preocupação com o meio ambiente, no qual se encontra o patrimônio (Eggins & Oxley, 1980).

2.3.2- Resistência à biodeterioração:

Nem todos os compostos orgânicos liberados são utilizados pelos microrganismos, sendo que estes podem desencadear uma certa resistência ao crescimento e como consequência à deterioração.

Segundo Alexander (1965), citado por Hueck (2001), pode-se selecionar algumas categorias de resistência de biodeterioração, as quais podem ser adaptadas aos problemas encontrados: o material pode ser inacessível aos organismos; ambiente estar tóxico; agente de dano estar inativado; a composição química e física do material ser inadequado para ataque biótico, como a presença de lignina e hidrocarbonetos complexos, fatores estes que dificultam a ação de microrganismos.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Obtenção das amostras:

As amostras foram coletadas de biofilmes visíveis de paredes externas de prédios históricos, localizados em Porto Alegre. Alguns destes prédios que serviram como local de coleta das amostras encontram-se em avançado estado de deterioração; outras, em processo mais lento.

Todos os prédios datam do começo à metade do século XX, sendo estes: Igreja Nossa Senhora da Dores (1903), Gabinete do Vice-Governador, Igreja São Geraldo (1940), Igreja Santo Antônio do Partenon (1932) e Igreja São Judas (1943), sendo que com exceção do Gabinete do Vice Governador, os demais pontos foram estudados por Crispim et.al. (2004), porém em relação a presença de cianobactérias.

A Igreja São Judas foi construída com tijolos sem qualquer revestimento, ficando evidente a ação do tempo em sua estrutura. A Igreja Santo Antônio é construída por arenitos, sem nenhuma espécie de pintura e revestimento apresentando muito biofilme, apesar de seu estado de conservação ser razoável. Os demais prédios apresentam-se pintados e estão em bom estado de conservação externa, porém os biofilmes eram evidentes nas edificações (Figuras 1 à 8).

As amostras foram coletadas destes cinco prédios, sendo cada uma feita em três repetições e em três diferentes meses do ano, sendo estes setembro, novembro e janeiro. A coleta foi feita pela técnica de raspagem de biofilmes, com espátula esterilizada, pois esta é a mais indicada para cultivo de

bactérias, apesar de poder agredir de alguma forma a superfície. Todas as amostras foram coletadas de pontos localizados a aproximadamente um à 1,5 metros acima do solo e depositadas em tubos de microcentrífugas previamente esterilizados.



Fig 1: Igreja N. S. das Dores

Fig 2: Biofilme Igreja N. S. das Dores



Fig 3: Gabinete do Vice Governador

Fig 4: Igreja São Geraldo

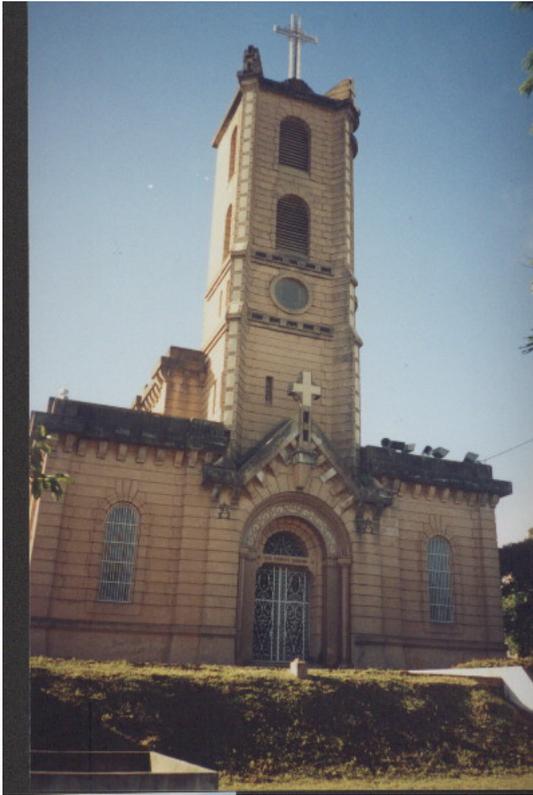


Fig 5: Vista frontal Igreja Santo Antônio



Fig 6: Vista Lateral Igreja S. Antônio



Fig 7: Biofilme Igreja Santo Antônio

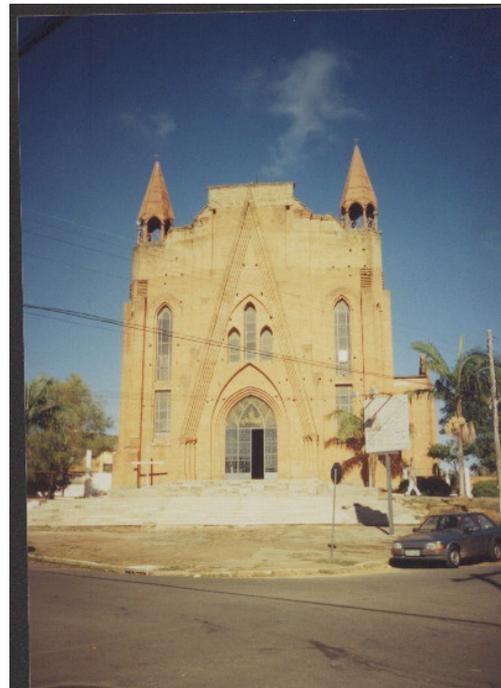


Fig 8: Igreja São Judas

3.2- Cultura e isolamento:

Após a coleta de amostras do biofilme, o material foi hidratado por cerca de 5 minutos, com 1 mL de água destilada e homogeneizado sendo posteriormente 100µL do material colocado em uma placa de Petri contendo meio ágar nutriente (Apêndice 1), e espalhado com uma alça de Drigalski. As placas foram então incubadas numa estufa D.B.O. (Fanem, modelo 374FG), a 25°C por 24 horas. Todo o processo foi feito em triplicata.

Foi também testado o cultivo e isolamento com meio de cultivo Thornton (Th) e meio de Knop modificado (MKM) (Shirakawa et.al, 2002), sendo nestes casos incubados por 15 dias sob as mesmas condições de temperatura. A composição destes meios encontram-se nos apêndices 2 e 3.

Após este período, as colônias foram selecionadas por variação morfológica e isoladas por técnica de semeadura de esgotamento, em uma nova placa contendo também ágar nutriente e incubados por mais 24 horas.

3.3- Caracterização dos isolados:

As colônias desenvolvidas foram inicialmente caracterizadas de acordo com sua morfologia colonial, quanto a: forma, brilho, coloração, estrutura de bordas e textura. As colônias que apresentavam morfologias diferenciadas foram selecionadas para realização de outros testes padrões a fim de determinar as características celulares.

3.3.1- Coloração de Gram:

Passadas às 24 horas para crescimento dos isolados na placa foi feita a coloração de Gram (Apêndice 4) para que se pudesse distinguí-los em dois grandes grupos. Todas as células que apresentavam coloração Gram positiva, foram selecionadas para análises mais detalhadas deste trabalho. Os isolados selecionados foram transferidos para um tubo contendo ágar nutriente inclinado, e incubados em estufa D.B.O. (Fanem, modelo 374FG), a 25°C por 24 horas para permitir o desenvolvimento destes, sendo posteriormente armazenados em geladeira comum à 4°C.

3.3.2- Produção de Endósporo:

O teste da produção de endósporos foi feito de duas forma: através do teste de resistência a temperatura e por coloração de endósporo.

3.3.2.1- Teste de resistência à temperatura:

Foram preparados tubos de ensaio com caldo nutriente, os quais foram esterilizados a 121°C por 15 minutos. Foi adicionado a cada tubo, uma pequena porção do isolado com uma alça de platina, e deixado em banho maria a 60° C por 20 minutos. O procedimento foi repetido com temperaturas de 80°C, 94°C e 100°C também por 20 minutos.

Todos os tubos, independentemente da temperatura foram então incubados à 28° C durante 24h. Quando não apresentavam crescimento, os tubos permaneciam incubados por mais 24 horas, totalizando 48 horas. Após

este período foi feita a análise de presença ou ausência de crescimento por turbidez.

3.3.2.2- Teste por coloração:

Passado um mês de incubação inicial dos isolados em tubos contendo ágar nutriente inclinado, tempo este para permitir o desenvolvimento de endósporos, devida a escassez de nutrientes dentre outros fatores limitantes, foi feito um esfregaço numa lâmina de vidro, e posteriormente fixado através de calor.

As lâminas foram então coradas com verde malaquita (Apêndice 5) para permitir a visualização de endósporos através da técnica de coloração de endósporos. Depois de coradas e secas, as lâminas foram visualizadas por microscopia óptica em aumento de 1000X, com utilização de óleo de imersão e analisadas quanto à presença ou ausência de endósporos.

3.3.3- Produção de Catalase:

Existem algumas bactérias que são capazes de produzir catalase, a qual é uma enzima oxidante e está localizada no espaço periplasmático, que é o espaço entre a membrana plasmática e a parede celular.

A catalase encontrada pode atuar em moléculas tóxicas que são transportadas no interior celular ou que se encontram no ambiente. A enzima é produzida por bactérias para que sirva como proteção contra efeitos que possam causar sua lise e morte (Jouve, 1991). A catalase age catalisando a reação que converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular

Para que se verificasse a produção de catalase por parte dos isolados, foi feito com cada um deles o teste de catalase, com uso de peróxido de hidrogênio 30%, sendo observada a produção de bolhas de oxigênio.

3.3.4- Produção de Oxidase:

Citocromo oxidase é uma enzima encontrada em algumas bactérias que transferem elétrons do oxigênio para a cadeia transportadora de elétrons. A enzima reduz citocromo e faz com que este transfira energia. A presença de oxidase pode ser detectada através do uso de reagente citocromo oxidase, o qual pode reagir com a oxidase do microrganismo (Dröge, 2002)

Para que fosse possível a verificação da produção de oxidase por parte dos isolados, foi feito com cada um deles o teste de oxidase, com uso de solução do reagente citocromo oxidase. Na solução foram mergulhadas tiras de papel filtro estéreis. Sobre a fita foi acrescentado, com auxílio de alça de platina, uma pequena quantidade de bactérias anteriormente isoladas, sendo observada a mudança de coloração no papel quando em contato com os isolados.

Quando a reação ocorreu a fita teve sua coloração alterada tornando-se roxa, quando não, a fita permanecia sem alteração.

3.3.5- Crescimento em duas concentrações de sal:

Alguns microrganismos são capazes de crescer em meio contendo concentração de sal (NaCl) acima da indicada em meios de cultivo, como por

exemplo acima de 5%. Os que o fazem são mais danosos no processo deteriorativo porque serão capazes de sobreviver nas superfícies secas. Foi feito então um teste com ágar nutriente, sendo acrescentado neste 5% de cloreto de sódio.

Este material foi inoculado com os isolados com uso de alça de platina e incubado por 96 horas à 25°C em uma estufa D.B.O., para permitir o crescimento de todos os isolados capazes de se desenvolver neste meio. O mesmo teste foi realizado com meio ágar nutriente acrescido de 10% de cloreto de sódio, incubado nas mesmas condições.

3.3.6- Precipitação de carbonato de cálcio:

Algumas cianobactérias são capazes de solubilizar carbonato de cálcio (CaCO_3). Este carbonato de cálcio pode se aderir na parede da cianobactéria gerando assim uma resistência ainda maior.

Esta resistência auxilia a atuação na degradação de substratos calcáreos (Ortega-Morales et al., 2000) e leva desta forma à degradação de pedras calcáreas (Danin & Caneva, 1990). Realizou-se um teste para observar a mesma capacidade em bactérias Gram positivas, as quais tinham sido isoladas dos biofilmes.

Foi preparado um meio ágar nutriente, contendo 1% de carbonato de cálcio, a qual é a concentração recomendada (Hernandez-Marine, M.; comunicação pessoal), alterando a característica de coloração do meio. Os isolados foram inoculados com agulha de platina, e incubados em estufa D.B.O. a 28°C por 24 horas. Após este período, foi feita análise das placas

quanto ao crescimento e a mineralização do carbonato, pela presença ou ausência de halo.

3.3.7- Produção de ácidos:

a produção de ácidos é uma característica na ação de biofilmes agentes de deterioração (Golubic, 1981; Cavena et al, 1992). No entanto, nem todos os microrganismos produzem ácidos. Alguns gêneros ao se desenvolverem geram produtos básicos, aumentando, portanto o pH do meio e minimizando a ação de outros organismos que produzam ácidos (Griffin et al, 1991; Warscheid et al., 1991; Crispim et al., 2004).

Foram preparados tubos de ensaio contendo caldo nutriente com pH inicial 7,6. Foi inoculada neste caldo, uma porção de cada um destes isolados, com auxílio de uma alça de platina e incubados em estufa D.B.O. a 28°C por 96 horas, a fim de permitir o desenvolvimento destes. Após este período, foi medido novamente o pH e analisados os resultados.

Posteriormente, para melhor avaliação de ação na parede dos prédios onde causam deterioração o processo foi repetido, porém em meio Knop modificado (Shirakawa, 2002), sendo este um meio pobre em nutrientes e com menor poder tamponante.

3.3.8- Produção de bioemulsificantes:

Vários microrganismos responsáveis pelo processo biodeteriorativo são capazes de produzir surfactantes e bioemulsificantes (Tayler & May, 2000).

Para que se pudesse caracterizar os isolados quanto a esta capacidade, foram preparados tubos de ensaio contendo 2mL de caldo nutriente.

Nestes tubos com meio de cultura foi inoculado uma porção de cada um dos isolados, com auxílio de alça de platina, e foram incubados em estufa D.B.O. a 25°C por 96 horas. Passado este período para que as bactérias pudessem se desenvolver foi acrescentado neste, 2mL de hexano, um composto hidrofóbico, formando assim fases.

Foi feita agitação utilizando um vortex, por dois minutos e aguardado 24 minutos para se fazer a leitura, quanto a produção ou não de bioemulsificantes.

A leitura positiva, que apresentava esta faixa, foi feita medindo-se a fase emulsificada (X), onde havia a produção de emulsão e medindo-se toda a extensão do líquido no tubo (Y), onde estas medidas foram utilizadas para calcular o índice de emulsificação através da fórmula: $IE = (X/Y) \times 100$ (Cooper & Goldenberg, 1987).

3.3.9- Crescimento em anaerobiose e motilidade:

Alguns microrganismos são capazes de se desenvolver em meios aeróbico, outros em meios anaeróbicos, e ainda, outros que vivem em ambos sendo facultativos.

Foi feito então um teste com tubo de ensaio contendo ágar nutriente em coluna. Os isolados foram inoculados com agulha de platina e posteriormente nova camada de meio de cultura tipo ágar nutriente foi adicionada nos tubos, os quais foram incubado por 24 horas à 28°C em uma

estufa D.B.O., para permitir que todos os isolados capazes de se desenvolver neste meio cresçam.

Com esta técnica experimental também foi possível observar a capacidade de motilidade dos microrganismos isolados, observando o ponto de desenvolvimento microbiano no meio em coluna.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Isolamento das bactérias:

Para o isolamento das bactérias inicialmente foram utilizados os meios Thornton e Knop Modificado. Porém, estes propiciam o desenvolvimento muito lento de microrganismos, devido à escassez de nutrientes presente, o que influencia diretamente as características dos microrganismos que ali se desenvolvem.

Apesar disso, a diversidade dos organismos nestes meios foi maior em relação ao do meio ágar nutriente, fato este determinado em um pré – experimento. Apesar da grande diversidade houve uma inibição no desenvolvimento de bactérias do gênero *Bacillus*, que também possuem importância no processo de deterioração de paredes (Flores et. al., 1997).

Por esta razão, os meios menos nutritivos não se mostraram indicados para o desenvolvimento de bactérias deteriorantes potenciais (Flores et al., 1997) e foram substituídos por meio nutriente (rico em nutrientes), no qual foram feitos todos os testes e desenvolvimento.

Em função disso, foram isoladas somente as bactérias heterotróficas de crescimento rápido, as quais cresceram até 24 horas de incubação no meio nutriente.

As bactérias que são espécies causadoras de biodeterioração encontram-se frequentemente em biofilmes, nos quais estão associadas a outros microrganismos. No caso de paredes externas de prédios estes outros organismos incluem fungos, algas e cianobactérias (Crispim et. al., 2004),

sendo, portanto necessário um isolamento repetitivo das colônias, apesar do pouco tempo de incubação necessário para que bactérias heterotróficas se desenvolvam.

As amostras foram inoculadas em meio sólido, com uso de alça de platina. Desta forma, algumas vezes havia presença de outros microrganismos, como fungos, necessitando de novas repicagens para que fosse possível obter colônias puras de bactérias.

Três coletas foram realizadas, a primeira em setembro, a segunda em novembro e a terceira em janeiro, sendo, portanto existente um período de dois meses entre cada uma delas. Foram encontrados no total das coletas 71 isolados, diferenciados de acordo com as características morfológicas coloniais (sessão 3.3), distribuídos conforme tabela 2:

Tabela 2: Número de isolados bacterianos em cada coleta

LOCAL DE COLETA	Nº DE ISOLADOS TOTAIS		
	SETEMBRO	NOVEMBRO	JANEIRO
Igreja N. S. das Dores	6	7	6
Gabinete do Vice Governador	3	3	6
Igreja São Geraldo	8	4	3
Igreja Santo Antônio	5	2	6
Igreja São Judas Tadeu	2	6	4
TOTAL	24	22	25

Com estes dados foi possível perceber que na Igreja Nossa Senhora das Dores houve pouca variação no número de isolados, independente do mês na qual foi realizada. Já nos outros pontos, como no Gabinete do Vice Governador, na Igreja São Geraldo, na Igreja Santo Antônio e na Igreja São Judas Tadeu esse número varia em diferentes meses.

Como a água é essencial para o desenvolvimento de microrganismos, inclusive àqueles que atuam em processos deteriorativos (Warscheid & Braams, 2000), a umidade pode estar exercendo uma importante influência para alguns organismos.

Isso é facilmente percebido na Igreja Nossa Senhora das Dores que apresentou maior número de isolados. A Igreja tem uma das suas paredes laterais constantemente encoberta do sol, está localizada em um local de pavimento em paralelepípedo (que retém maior umidade) e com o tato é possível perceber a concentração de água em suas paredes.

4.2- Caracterização dos isolados:

Quando os isolados foram corados por método de Gram e visualizados por microscopia óptica, foi feita uma seleção de Gram positivas, as quais tem maior importância no processo biodeteriorativo em relação às negativas (Gaylarde, comunicação pessoal).

Dos 71 isolados, 45 são Gram negativos (63,4%), os quais são geralmente mais comuns no solo, embora uma proporção maior de Gram positivas se encontre no solo do que na água (Atlas, 1988).

Vinte e seis isolados são Gram positivos (apenas 36,6%), os quais foram, portanto, selecionados para estudo mais aprofundado, com objetivo de selecionar os do gênero *Bacillus*, já que comprovadamente possui poder deteriorativo (Urzi et al., 1992; Flores, 1997)

Esse número elevado de bactérias Gram negativas presentes nos biofilmes é um dado comum, pois segundo Walsh (2001), organismos

envolvidos em biodeterioração são geralmente os mesmos encontrados no solo do local, sendo que resultados obtidos de trabalhos com solo podem ter grande relevância para estudos de biodeterioração quanto à diversidade.

Quando analisados os resultados de Gram positivos e Gram negativos em diferentes épocas do ano (Tabela 3), pode-se observar que os isolados Gram positivos tem uma variação numérica menor em relação aos Gram negativos. Isso se dá em decorrência das bactérias Gram positivas serem mais resistentes a variações ambientais (Walsh, 2001).

Tabela 3: Número de isolados Gram positivos e Gram negativos em diferentes épocas e locais de coleta

	SETEMBRO		NOVEMBRO		JANEIRO	
	G+	G-	G+	G-	G+	G-
Igreja N. S. Dores	3	3	1	6	2	4
Gabinete Vice Governador	1	2	2	1	3	3
Igreja São Geraldo	2	6	3	1	2	1
Igreja Santo Antônio	2	3	2	5	2	4
Igreja São Judas	0	2	1	5	1	3

Dentre as bactérias Gram positivas há a presença de cocos, bacilos e bacilos formadores de cadeias. De todos os isolados Gram positivos, 42,3% são bacilos, 30,8% são cocos, 26,9% são bacilos formadores de cadeia. A indicação de época da coleta, local e morfologia, assim como denominações do número do isolado (doravante assim indicado), estão determinados na tabela 4.

Dos 26 isolados Gram positivos, pode-se perceber que somente oito são cocos, enquanto os outros 18 são bacilos, formadores ou não de cadeias. Dentre as espécies de cocos Gram positivos há um predomínio de indivíduos

anaeróbios (Murdoch, 1998), fato este que pode explicar a pouca incidência de cocos dentre os isolados, uma vez que só foram avaliados os microrganismos aeróbios e de crescimento rápido.

Tabela 4: Especificação do isolado, quanto ao local de coleta e morfologia celular.

	Nº ISOLADO	LOCAL	MORFOLOGIA CELULAR
Setembro	1	Igreja N. S. das Dores	Cocos
	2	Igreja N. S. das Dores	Cocos
	3	Igreja N. S. das Dores	Bacilos formadores de cadeias
	4	Gabinete do Vice Governador	Bacilos formadores de cadeias
	5	Igreja São Geraldo	Bacilos
	6	Igreja São Geraldo	Cocos
	7	Igreja Santo Antônio	Cocos
	8	Igreja Santo Antônio	Cocos
Novembro	9	Igreja N. S. das Dores	Bacilos formadores de cadeias
	10	Gabinete do Vice Governador	Cocos
	11	Gabinete do Vice Governador	Bacilos
	12	Igreja São Geraldo	Bacilos formadores de cadeias
	13	Igreja São Geraldo	Bacilos
	14	Igreja São Geraldo	Bacilos
	15	Igreja Santo Antônio	Cocos
	16	Igreja São Judas Tadeu	Bacilos
Janeiro	17	Igreja N. S. das Dores	Bacilos
	18	Igreja N. S. das Dores	Bacilos
	19	Gabinete do Vice Governador	Bacilos formadores de cadeias
	20	Gabinete do Vice Governador	Bacilos
	21	Gabinete do Vice Governador	Bacilos
	22	Igreja São Geraldo	Cocos
	23	Igreja São Geraldo	Bacilos formadores de cadeias
	24	Igreja Santo Antônio	Bacilos formadores de cadeias
	25	Igreja Santo Antônio	Bacilos
	26	Igreja São Judas Tadeu	Bacilos

* todos os isolados selecionados são Gram positivos

4.3- Produção de Endósporo:

Quando todos os isolados foram submetidos a teste de formação de endósporo, tanto através de resistência ao calor, quanto através de coloração, os resultados foram diferentes. Porém o teste por coloração se mostrou mais eficiente e correto uma vez que foi possível a visualização dos endósporos através de microscopia.

Quando observados, todos os isolados que apresentaram tendência de formação de endósporo através do teste de calor também puderam ser visualizados através do método de coloração, porém a recíproca não foi verdadeira. Com isso separou-se em duas diferentes características, sendo estas a produção de endósporos propriamente dita e resistência ao calor, conforme demonstrado a seguir na tabela 5.

No teste de resistência ao calor, quando utilizadas as temperaturas de 60°C, 80°C e 94°C, todos os tubos apresentaram desenvolvimento microbiano. A temperatura do meio foi avaliada pela temperatura de um tubo controle sem inóculo.

O fato da resistência em todos os tubos não seria comum, porém, pode ter sido decorrente da temperatura do tubo controle estar maior que a dos demais tubos, não tendo esses atingido a temperatura adequada. Isso pode ter desencadeado a resistência de bactérias formadoras de endósporos em temperaturas inferiores a 100°C.

Foi utilizada então a temperatura de 100°C ao invés da temperatura padrão tendo apresentado resultados mais satisfatórios, onde houve resistência em apenas alguns tubos. Apesar deste fato, tais isolados puderam

ter seus endósporos visualizados posteriormente por processo de coloração, assim como alguns isolados que não se apresentaram resistentes, tornando desta forma o método de coloração mais eficiente para tal experimento.

Tabela 5: Isolados com características formadoras de endósporos e resistentes ao calor:

ISOLADO	MORFOLOGIA	ENDÓSPORO	FORMA/POSIÇÃO DO ENDÓSPORO	RESISTÊNCIA AO CALOR
1	Cocos	-	-	-
2	Cocos	-	-	-
3	Bacilos formadores de cadeias	+	Elipsoidais/ Terminal	+
4	Bacilos formadores de cadeias	+	Elipsoidais/ Terminal	+
5	Bacilos	+	Elipsoidais/ Terminal	-
6	Bacilos	+	Elipsoidais/ Central	-
7	Cocos	-	-	-
8	Cocos	-	-	-
9	Bacilos formadores de cadeias	+	Elipsoidais/ Terminal	+
10	Cocos	-	-	-
11	Bacilos	-	-	-
12	Bacilos formadores de cadeias	+	Elipsoidais/ Terminal	-
13	Bacilos	-	-	-
14	Bacilos	-	-	-
15	Cocos	-	-	-
16	Bacilos	-	-	-
17	Bacilos	+	Elipsoidais/ Terminal	+
18	Bacilos	-	-	-
19	Bacilos formadores de cadeias	+	Elipsoidais/ Terminal	-
20	Bacilos	+	Elipsoidais/ Terminal	-
21	Bacilos	+	Elipsoidais/ Terminal	+
22	Cocos	+	Elipsoidais/ Terminal	-
23	Bacilos formadores de cadeias	+	Elipsoidais/ Terminal	+
24	Bacilos formadores de cadeias	+	Elipsoidais/ Terminal	-
25	Bacilos	-	-	-
26	Bacilos	-	-	-

* os pontos de coleta de cada isolado estão indicados na tabela 3

4.4- Produção de Catalase:

Todas as bactérias do gênero *Bacillus* são capazes de produzir catalase, sendo, portanto um teste importante para a caracterização de gênero *Bacillus*, o qual atua diretamente na biodeterioração (Tayler & May, 1991; Flores, 1997; Ciferri, 1999).

Dentre os isolados, somente o isolado 4, não apresentou produção de catalase. Tal isolado é um bacilo formador de cadeia coletado na superfície externa das paredes do Gabinete do Vice Governador (localizada num ponto de grande tráfego de veículos), no início do mês de setembro, quando as temperaturas ainda se apresentavam amenas. Todos os demais isolados foram considerados catalase positivo (produzem tal enzima).

4.5- Produção de Oxidase:

O teste da capacidade de produção da oxidase é mais comum em se tratando de bactérias Gram negativas, sendo um dos testes utilizados para identificação das mesmas. Porém, foi realizado para que fosse possível uma melhor caracterização dos isolados Gram positivos.

Existe um número maior de isolados capazes de produzir oxidase, em relação aos que não produzem, havendo também variação nos pontos de coleta e período onde esta foi realizada, conforme demonstrado na tabela 6.

Dentre os bacilos formadores de cadeias somente um é oxidase negativo; com relação a cocos e bacilos, existe um equilíbrio numérico entre os isolados oxidase positivos e negativos.

Tabela 6: Capacidade dos isolados produzirem oxidase:

	Nº	MORFOLOGIA CELULAR	OXIDASE
Coleta 1	1	Cocos	-
	2	Cocos	+
	3	Bacilos formadores de cadeias	+
		Bacilos formadores de cadeias	+
	4	Bacilos	+
	5	Cocos	+
	6	Cocos	+
	7	Cocos	-
Coleta 2	8	Bacilos formadores de cadeias	-
	9	Cocos	-
	10	Bacilos	+
	11	Bacilos formadores de cadeias	+
		Bacilos	-
	12	Bacilos	+
	13	Cocos	+
	14	Bacilos	+
15	Bacilos	+	
Coleta 3	16	Bacilos	+
	17	Bacilos	-
	18	Bacilos formadores de cadeias	+
		Bacilos	-
	19	Bacilos	+
	20	Cocos	+
	21	Bacilos formadores de cadeias	+
		Bacilos formadores de cadeias	+
	22	Bacilos	-
	23	Bacilos	-
	24	Bacilos	-
25	Bacilos	-	
26	Bacilos	-	

* os pontos de coleta de cada isolado estão indicados na tabela 3

4.6- Caracterização de *Bacillus*:

Através dos testes de morfologia colonial e celular, coloração de Gram, produção de endósporos, produção de catalase e oxidase, foi possível que todos os isolados do gênero *Bacillus* fossem caracterizados, sendo que

este gênero é uma bactéria Gram positiva, produtora de endósporo, de catalase e oxidase, e que sua colônia não possui brilho, sendo opaca, possui bordos desuniformes e aspecto coreáceo (Holt et. al., 1994)

Conforme demonstrado na tabela 7, os isolados antes indicados com numeração simples, passam a ser indicados com numeração diferencial, por se tratarem apenas dos isolados que pertenciam ao gênero de interesse.

Tabela 7: Membros do gênero *Bacillus* isolados dos prédios

INDICAÇÃO ISOLADO DIFERENCIAL	INDICAÇÃO NUMERICA COMUM	PONTO DE COLETA
B1	3	Igreja Nossa Senhora das Dores
B2	4	Gabinete Vice Governador
B3	5	Igreja São Geraldo
B4	6	Igreja São Geraldo
B5	9	Igreja Nossa Senhora das Dores
B6	12	Igreja São Geraldo
B7	17	Igreja Nossa Senhora das Dores
B8	19	Gabinete Vice Governador
B9	20	Gabinete Vice Governador
B10	21	Gabinete Vice Governador
B11	22	Igreja São Geraldo
B12	23	Igreja São Geraldo
B13	24	Igreja Santo Antônio

4.6.1- Crescimento em duas concentrações de sal:

Dentre os isolados, todos toleram cloreto de sódio em baixa concentração (5% de cloreto de sódio adicionados ao meio), mas quando esta é aumentada (10%), o desenvolvimento passa a não ser viável. Porém, mesmo assim, pouco mais de 46% dos isolados (isolados B7, B8, B9, B10, B11 e B13) toleram concentração de 10% de sal no meio de cultura, sendo que estes

podem ter importante papel deteriorante, uma vez que suportam as grandes concentrações de sal encontradas nas paredes (Saiz-Jimenez & Laiz, 2000).

É importante salientar que todos os isolados, são organismos de crescimento rápido e, portanto, no meio de cultura que foram inicialmente cultivados e isolados havia uma pequena quantidade de cloreto de sódio (0,5%).

4.6.2- Precipitação de carbonato de cálcio:

Em isolados de *Bacillus* essa característica não foi comprovada, sendo que nenhum isolado se mostrou capaz de tal ação. Todos os isolados de *Bacillus* mostraram-se capazes de se desenvolverem em meio contendo 1% de carbonato de cálcio ou na sua ausência, porém não o solubilizaram, não formando halo em seu crescimento.

É interessante salientar que este teste não foi anteriormente realizado em nenhuma pesquisa com bactérias heterotróficas. Em trabalhos futuros, este teste poderia ser repetido, porém com outras concentrações de carbonato de cálcio, porém estas sendo suficientes para conferir a turbidez no meio.

4.6.3- Produção de ácidos e surfactantes:

A produção de ácidos e surfactantes é uma característica destacada na ação de biofilmes agentes de deterioração, pois estas substâncias agem na superfície de paredes ou rochas e aceleram o processo deteriorativo que se

agrava com o passar do tempo (Golubic, 1981; Jatón et al., 1985; Cavena et al., 1992).

Dos 13 isolados analisados, quando em meio nutriente, apenas cinco produziram ácido durante seu desenvolvimento e oito isolados produziram algum tipo de base (Tabela 8). Essa produção no entanto, variou muito entre os isolados, tanto para os ácidos, quanto para os álcalis.

Já quando testados os mesmos isolados, em meio Knop Modificado (com menor poder tamponante), nove deles foram capazes de produzir ácidos, enquanto quatro produziram algum tipo de álcalis, conforme apresentado na tabela 8 posteriormente.

Vários autores comentam sobre a produção de ácidos, mas não se referem à produção de bases, acredita-se então que a produção de ácido seria um parâmetro mais relevante na deterioração (Tayler & May, 2000; Warscheid & Braams, 2000). Outros se referem a produção de ácidos e bases, mas nunca somente de bases (Griffin et al., 1991; Warscheid et al., 1991; Garcia Valles et al., 1997).

Apesar de haver variação no pH esta é muito menor que o esperado, sendo que pôde ser notada pouca diferença entre o pH inicial do meio de cultura (7,6) e do pH após incubação de 96 horas. Entretanto, é importante destacar que o meio nutriente apresenta um poder tamponante maior, o qual não permite que o pH varie muito e esta variação acontece de forma muito lenta.

Nas superfícies dos prédios, nas quais os nutrientes se aproximam mais as concentrações de nutrientes do meio MKM, esta variação seria maior,

sendo então a ação sobre este muito maior, gerando maiores conseqüências indesejáveis.

Os surfactantes são um produto gerado para auxiliar na nutrição dos microrganismos que utilizam substratos hidrofóbicos, já que agem como agentes solubilizantes do substrato (Cooper & Goldberg, 1987). Nem todos os microrganismos produzem surfactantes e emulsificantes. A produção de surfactantes foi medida através do índice de emulsificação. Este índice pode variar de acordo com o desenvolvimento dos microrganismos, substrato hidrofóbico e até mesmo de acordo com o tempo de leitura (Cooper & Goldberg, 1987).

A maioria dos isolados foi capaz de produzir emulsificantes. Pode-se observar a existência de índices de produção variáveis, tanto dentre os isolados, como também sua variação com o passar do tempo, mesmo não estando estes isolados incubados, conforme tabela 8.

Alguns isolados aumentaram o índice de emulsificação quando este foi medido em 24 horas, outros diminuíram seu valor. Nenhum dos isolados que não apresenta emulsificação em 10 minutos foi capaz de produzi-la em 24 horas, o que era esperado já que sua capacidade de produção ou não, pode ser detectada imediatamente após o teste.

A capacidade de produzir emulsificantes é uma atividade importante com respeito a organismos formadores de biofilmes em paredes, uma vez que tais bactérias podem mudar a característica da superfície, aumentando sua hidroflicidade e facilitando a colonização microbiana (Warscheid & Braams,

2000). A capacidade de produção de surfactantes, que agem reduzindo a tensão superficial não foi testada.

Toda a caracterização por testes bioquímicos, de resistência e desenvolvimento em variações ambientais, será demonstrada em uma tabela única (Tabela 8).

4.6.4- Capacidade de desenvolvimento em anaerobiose e motilidade:

Apenas dois dos treze isolados de *Bacillus* não foi capaz de se desenvolver em anaerobiose, todos os demais isolados apresentam características de serem facultativos.

Quanto a motilidade, todos os isolados apresentaram motilidade, sendo capazes portanto de se “locomover” dentro de um biofilme, tendo um maior desenvolvimento, pois age minimizando a competição existente por espaço e principalmente por nutrientes.

Tabela 8: Caracterização geral dos isolados de *Bacillus*

ISOL	CAT	OXI	SAL (5%)	SAL (10%)	pH (NUT)	pH (MKM)	IE %	ANAER.	MOT
B1	+	+	+	-	7,50±0,2	7,57±0,1*	42,1	+	+
B2	-	+	+	-	7,42±0,1	7,17±0,1	31,8	+	+
B3	+	+	+	-	8,28±0,3	6,98±0,2	72,3	+	+
B4	+	+	+	-	8,20±0,2	7,21±0,2	54,6	+	+
B5	+	-	+	-	8,26±0,4	7,57±0,1*	59,3	+	+
B6	+	+	+	-	7,53±0,1*	6,98±0,3	57,9	+	+
B7	+	+	+	+	7,30±0,2	7,18±0,3	-	+	+
B8	+	+	+	+	7,50±0,3	8,18±0,5	52	-	+
B9	+	-	+	+	7,88±0,2	7,98±0,2	60	+	+
B10	+	+	+	+	7,64±0,1*	7,12±0,6	55,6	-	+
B11	+	+	+	+	8,07±0,5	7,51±0,1	63	+	+
B12	+	+	+	-	7,87±0,4	7,92±0,3	63,6	+	+
B13	+	+	+	+	7,99±0,5	7,36±0,4	53,6	+	+

pH inicial: 7,6
 CAT- produção de catalase
 OXI – produção de oxidase
 IE- índice de emulsificação
 MOT- capacidade de motilidade

ANAER.- capacidade de desenvolvimento em anaerobiose
 *pouca variação no pH inicial

4.6.5- Caracterização em grupos:

Segundo Priest (1993), *Bacillus* é um gênero muito versátil e pode ter uma variedade de ações, tanto na área alimentar, como controle biológico e ainda na biodeterioração.

Há uma grande dificuldade de classificar a espécie de cada isolado, sem o uso de técnicas moleculares, devido ao grande número e similaridade entre elas (Holt et al., 1984). No entanto, Priest (1993), cita uma classificação conforme algumas das suas características, permitindo então que esta seja feita em grupos, porém não é possível afirmar a qual espécie pertence tal isolado, somente a qual grupo ele se encaixa.

Esta divisão é feita em seis diferentes grupos. No grupo I (grupo do *B. polymyxa*), encontram-se todas as espécies de *Bacillus* que são anaeróbios facultativos, e crescem fortemente em ausência de oxigênio. Produzem ácido de várias fontes de açúcar e que possuem endósporos elipsoidais.

No grupo II (grupo do *B. subtilis*), encontram-se as espécies que produzem ácido de uma variedade de açúcar, inclusive a glicose, a maioria é capaz de crescer na ausência de oxigênio, particularmente se houver nitrato presente, seus endósporos são elipsoidais.

No grupo III (grupo do *B. brevis*), são aeróbios estritos que não produzem ácidos em açúcar (há raras exceções), e produzem endósporos elipsoidais.

No grupo IV (*B. sphaericus*), todas as espécies produzem endósporos esféricos, são estritamente aeróbios, mas tem habilidade limitada para produzir ácidos através de açúcares.

No grupo V (grupo dos termófilos) todas as bactérias tem crescimento ótimo em 50°C, são heterogêneos fisiologicamente e morfologicamente, mas todos produzem endósporos esféricos.

No grupo VI (grupo dos *Alicyclobacillus*), encontram-se os termófilos, acidófilos com membrana contendo ácidos graxos (Priest, 1993).

Baseada nestas informações, e nos resultados anteriores realizados com testes bioquímicos e de microscopia, é possível enquadrar os isolados, conforme indicado na tabela 09, porém não se pode afirmar a que espécie pertencem. Todos os isolados são classificados nos grupos I, II, III ou IV. Não há isolados pertencentes ao grupo V ou VI, pois não há microrganismos termófilos dentre os isolados do gênero *Bacillus*.

Tabela 09: Caracterização dos isolados, segundo metodologia de Priest (1993).

ISOLADOS	GRUPO	ESPÉCIES PERTENCENTES AO GRUPO
B1	Grupo I	<i>B. alvei</i>
B2		<i>B. azotofixans</i>
B6		<i>B. flucanolyticus</i>
B9		<i>B. amylolyticus</i>
B12		<i>B. apiarius</i>
		<i>B. circulans</i>
		<i>B. gluconolyticus</i>
		<i>B. larvae</i>
		<i>B. lautus</i>
		<i>B. lentimorbus</i>
		<i>B. macerans</i>
		<i>B. pabuli</i>
		<i>B. polymyxa</i>
		<i>B. popolliae</i>
	<i>B. psychrosaccharolyticus</i>	
	<i>B. pulvifaciens</i>	
	<i>B. thiaminolyticus</i>	
	<i>B. validus</i>	

Tab 9: continuação

ISOLADOS	GRUPO	ESPÉCIES PERTENCENTES AO GRUPO
B3	Grupo II	<i>B. alcalophilus</i>
B4		<i>B. amyloliquefaciens</i>
B5		<i>B. anthracis</i>
B7		<i>B. carotarum</i>
B11		<i>B. firmus</i>
B13		<i>B. flexus</i>
		<i>B. laterosporus</i>
		<i>B. lentus</i>
		<i>B. licheniformis</i>
		<i>B. megaterium</i>
		<i>B. mycoides</i>
		<i>B. niacini</i>
		<i>B. pantothenicus</i>
		<i>B. pumilus</i>
	<i>B. simplex</i>	
	<i>B. subtilis</i>	
	<i>B. thuringiensis</i>	
B10	Grupo III	<i>B. alginolyticus</i>
		<i>B. anaurinolyticus</i>
		<i>B. azotoformans</i>
		<i>B. badius</i>
		<i>B. brevis</i>
		<i>B. chondroitinus</i>
		<i>B. freudenreichii</i>
		<i>B. gordonae</i>
B8	Grupo IV	<i>B. aminovarans</i>
		<i>B. fusiformis</i>
		<i>B. globisporus</i>
		<i>B. ansioliticus</i>
		<i>B. marinus</i>
		<i>B. pasteuril</i>
		<i>B. psychrophilus</i>
	<i>B. sphaericus</i>	

A tabela 10 apresenta as características mais relevantes dos isolados do gênero *Bacillus* e mostra que não há correlação entre sobrevivência em pintura (verniz) e resistência dos endósporos, o que poderia ser anteriormente esperado, uma vez que a temperatura da parede do prédio não atingirá os 100°C.

No entanto, pode-se afirmar que sendo todos os isolados pertencentes ao gênero *Bacillus*, todos possuem capacidade de produção de endósporos, portanto a capacidade de maior sobrevivência em condições ambientais adversas.

Tabela 10: Resumo das características relevantes dos isolados do gênero *Bacillus*

Isolado	Grupo Priest	Endosporos resistentes	Produção ácidos/alcalis (MKM)	Produção de emulsificantes	Resistência a sal (10%)	Sobrevivência em pintura	Local do isolamento
B1	I	+	A*	+	-	+	P1
B2	I	+	A	+	-	-	P2
B3	II	-	A	+	-	-	P3
B4	II	-	A	+	-	+++	P3
B5	II	+	A*	+	-	-	P1
B6	I	-	A	+	-	+	P3
B7	II	+	A	-	+	+	P1
B8	IV	-	B	+	+	+	P2
B9	I	-	B	+	+	++	P2
B10	III	+	A	+	+	+++	P2
B11	II	-	B	+	+	+	P3
B12	I	+	B	+	-	+	P3
B13	II	-	A	+	-	-	P4

P1 – Igreja Nossa Senhora das Dores

P2 - Gabinete do Vice Governador

P3 – Igreja São Geraldo

P4 – Igreja Santo Antônio

* Pouca variação de pH

Quanto à resistência ao sal, esta não demonstra ter grande relação com a sobrevivência em pinturas, uma vez que tal gênero possui outras formas de resistência, como a produção de endósporos.

Os isolados, para terem uma capacidade maior de biodeterioração das paredes, devem apresentar características de sobrevivência, produção de ácidos e surfactantes, com habilidade de autoemulsificação.

Acredita-se que em função disso, os isolados B4, B6 e B10 são os de maior destaque quanto a ação em paredes. Os isolados B4 e B6 foram

isolados da parede da Igreja São Geraldo, enquanto o isolado B10 foi isolado da parede do Gabinete do Vice Governador. Estes pontos de coleta, também apresentaram dentre os isolados, o maior número dos do gênero *Bacillus*.

Uma característica importante é que os dois pontos de coleta encontram-se localizados em ruas de intenso tráfego e com grande emissão de poluentes por veículos automotores, o que pode estar de alguma forma, aumentando a concentração de nutrientes que agem no desenvolvimento destes (Ciferri, 1999). Ambos são revestidos com tinta, que também pode estar servindo como suporte de nutrientes para o crescimento de microrganismos.

5-CONCLUSÕES

Foram obtidos 71 isolados de bactérias de cinco edifícios históricos em Porto Alegre. Não houve diferença aparente entre os meses de coleta em geral. A Igreja Nossa Senhora das Dores foi o ponto que apresentou maior diversidade, fato que pode ser relacionado com a umidade do local, que é elevada.

Houve um maior número de Gram negativas em relação as Gram positivas. Dentre as Gram positivas a maioria apresentou morfologia celular de bacilos.

Dos isolados de *Bacillus*, todos se mostraram resistentes a concentração de 5% de cloreto de sódio no meio, enquanto menos da metade foram resistentes a concentração salina de 10%. Acredita-se que os que apresentaram desenvolvimento em meios contendo 10% de sal tenham maior resistência e desenvolvimento em paredes.

Alguns isolados foram capazes de acidificar o meio, enquanto outros foram capazes de alcalinizar o meio. A maioria dos isolados foi capaz de produzir emulsificantes, o que pode estar ligado diretamente a ação deteriorativa.

Baseado em todos os resultados anteriores pode-se considerar que os isolados B4, B6 e B10, os quais pertencem aos grupos II, I e III do Priest (1993) respectivamente tendem a apresentar maior atividade deteriorativa de superfícies de prédios, sendo que foram isolados do Gabinete do Vice

Governador e da Igreja São Geraldo, locais de tráfego intenso e portanto maior liberação de poluentes.

6- PERSPECTIVAS FUTURAS

Desenvolvimento de um teste com bactérias Gram positivas isoladas, verificando sua capacidade de deterioração diretamente em pedra, simulando de forma muito mais próxima a realidade ambiental, poderia gerar resultados mais significativos e exatos quanto sua ação.

Técnicas moleculares que permitissem a montagem de um dendoGramma poderia estar auxiliando na classificação desses microrganismos quanto a espécies e possibilitando a tentativa de uma análise classificação x poder deteriorante.

Testar a sobrevivência em diferentes tipos de tintas com e sem biocidas em sua composição.

Fazer testes de biodeterioração acelerada em câmara úmida para avaliar a capacidade deteriorante dos isolados separadamente e em consórcio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, O. P.; DRAWAN, S. (Ed.). International Conference of Biodeterioration of Cultural Property. 1989, Lucknow, Índia, **Proceedings...** Lucknow; National Research Laboratory from Conservation of Cultural Property, ICCROM, 1989.

ALLSOPP, D., O intercâmbio entre restauradores/bibliotecários e biólogos. In Curso de treinamento em biodeterioração e conservação em museus, bibliotecas e patrimônio cultural. **Artigos...** Porto Alegre: UNESCO/MIRCEN/UNEP/ICRO/FEP AGRO/UFRGS, 2001.

ALLSOPP, D.; SEAL, K. J. **Introduction to Biodeterioration**. Londres: Edward Arnold, p. 5-36. 1986.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Standard Practice for Developing Accelerated Tests to Aid Prediction of the Service Life of Building Components and Materials**. E 632-82 (Reapproved 1996). Annual Book of ASTM Standard section 14, v.1402, Philadelphia, 1998.

ANDRADE, J. J. O. **Durabilidade das estruturas de concreto armado: análise das manifestações patológicas nas estruturas no Estado de Pernambuco**. 148f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997

ARNOLD, A., Composition-mechanical properties – porosity and humidity – diagnosis of stone material – pollution effect. In: Congrès International sur la Conservation de la Pierre et autres Matériaux. UNESCO, Paris, p.23-29, 1993.

ATLAS, R.M., **Microbiology: Fundamentals and Applications**, 2ed, New York: Macmillan Publishing Company, 807p., 1988.

BECKER, T.W., KRUMBEIN, W.E., WARSCHEID, T., RESENDE, M.A. Investigations into Microbiology. In: IDEAS- Investigations into Devices against Environmental Attack on stones. GKSS-Forschungszentrum Geesthacht, Geesthacht, Alemanha, p. 147-190. 1994

BERNER, M. WANNER, G. LUBITZ, W. A comparative study of the fungal flora present in medieval wall paintings in the chapel of the Castle Herberstein and in the Parish church of St. Georgen in Styria, Austria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Londres, v. 40, p. 53-61, 1997.

BROWN, R. **Handbook of Polymer Testing**, Londres, Marcel Dekker Inc., 1999.

BROCK, T.D. et al., **Biology of Microorganisms**. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N. J. 1994

CALDWELL, D. E. et al., Germ theory vs. community theory in understanding and controlling the proliferation of biofilms. **Adv. Dent. Res.** Princeton, USA. v.11, p. 4-13, 1997.

CAVENA, G. et al., Pitting of marble Roman monuments and the related microflora. In Rodrigues, J.D., Henriques, F., Jeremias, F.T. (Eds.), **Proceedings of the Seventh International Congress on Deterioration and Conservation of Stone. Laboratório Nacional de Engenharia Civil**, Lisboa, v.15-18.06, p.521-526, 1992.

CHARACKLIS, W. G.; MARSHALL, K.C. Biofilms: a basic for an interdisciplinary approach. En: Biofilms (Eds. W. G. Characklis, K. C. Marshall), John Wiley & Sons Inc., New York, p.3-15, 1990.

CHAROLA, A.E. General report on prevention and treatment. Cleaning, biocides and mortars. In ACTES OF THE CONGRÉS INTERNATIONAL SUR LA CONSERVATION DE LA PIERRE ET AUTRES MATÉRIAUX, Paris, UNESCO, 29,06-1.07, p.65-68, 1993

CIFERRI, O. Microbial Degradation of Paintings **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, p.879-885, 1999

COOPER, D.G. & GOLDENBERG, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**., Washington, v.53, p.224-229, 1987.

COSTERTON, J. W. et al., Microbial Biofilms. **Annual Review Microbiology**. Palo Alto, USA. v.49, p.711-745, 1995.

COSTERTON, J. W. et al., Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v.41, p.453-464, 1987.

CRISPIM C.A, GAYLARDE C.C & GAYLARDE P.M; Biofilms on church walls in Porto Alegre, RS, Brazil, with special attention to cyanobacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v.54, p.121-124, 2004

DANIN, A., CANEVA, G. Deterioration of limestone walls in Jerusalem and marble monuments in Rome caused by cyanobacteria and cyanophilous lichens, **International Biodeterioration**, London, v.26, p.397-417, 1990.

DARLINGTON, A. **Ecology of Walls**. Heinemann, London, 1981.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. **Microbiology Molecular Biology Review**, Washington, v.64, p.87-867, 2000.

DESAI, J.D. & BANAT, I.M. 1997 Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Palo Alto, USA, v.61.n.1, p:47-64.

DRÖUGE, W.; Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiology Review**, v.82, p.47-95, 2002

ECKHARDT, F. E. W., Influence of culture media employed in studying microbial weathering of building stones and monuments by heterotrophic bacteria and fungi. **VIth International congress of Deterioration and Conservation of Stone**, v.supplement, p.71-71, 1988

ECKHARDT, F. E. W., Solubilization transport and deposition of mineral cations by microorganisms _ Efficient rock weathering agents. **The Chemistry of Weathering**, Denver, v.2, p.161-173, 1985

ECKHARDT, F. E. W., Microorganisms and weathering of a sandstone monument. **Environmental Biogeochemistry and Geomicrobiology**, Michigan, v.2, p.675-686, 1978

EGGINS, H.O.W. & OXLEY, T.A. Biodeterioration and Biodegradation **International Biodeterioration & Biodegradation**, Londres, v.16, p.12-15, 1980

FEILDEN, B. M. **Conservation of historic buildings: technical studies in the arts, archaeology and architecture**. England: Butterworth, p.472, 1982.

FLORES, M., LORENZO, J., GÓMEZ-ALACÓN, G.; Algae and Bacteria on Historic Monuments at Alcalá de Henares, Spain **International Biodeterioration & Biodegradation**, Londres, v.40, p.241-246, 1997

GARCIA VALLES, M., VENDRELL SAZ, M., KRUMBEIN, W.E., URZI, C., Coloured mineral coating on monument surfaces as a result of biomineralization: the case of the Tarragona cathedral (Catalonia), **Applied Geochemistry**, Washington, v.12, p.255-266, 1997

GAYLARDE, C. C., MORTON, L.H.G. Deteriogenic Biofilms on Buildings and their Control: a Review. **Biofouling**, Londres, v. 14, p. 59-74, 1999.

GAYLARDE, C. C. Os fungos como organismos deteriogênicos em prédios históricos construídos de pedra, In Biodeterioro de Monumentos de Iberoamerica, p. 33-43, 2002.

GAYLARDE, C. C. Biodeterioração do patrimônio cultural. In: Curso de treinamento em biodeterioração e conservação em museus, bibliotecas e patrimônio cultural, 2000, Porto Alegre. **Artigos...** Porto Alegre: UNESCO/MIRCEN/UNEP/ICRO/FEPAGRO/UFRGS, 2000.

GEESEY, G.G., Microbial exopolymers: ecological and economic considerations. **American Society Microbiology News**, Washington, v. 48, p. 9-14, 1982.

GIÚDICE, C.A., Pinturas acuosas a base de silicatos inorgânicos, modificadas con dispersions poliméricas, para la protección del patrimonio cultural . In Biodeterioro de Monumentos de Iberoamerica., 2002, **Artigos...** p.19-31, 2002.

GOLUBIC, S., FRIEDMAN, E., SCHNEIDER, J. The lithobiotic ecological niche, with special reference to microorganisms. **J. Sediment. Petrol.**, Albuquerque, v.51, p.475-478, 1981.

GONZÁLEZ, I., LAIZ, L., HERMOSIN, B., CABALLERO, B., INCERTI, C., SAIZ-JIMENEZ, C.; Bacteria isolated from rock art paintings: the case of Atlanterra shelter (South Spain), **Journal Microbiological Methods**, Amsterdam, 36 p.123-127, 1999.

GOVAN, J. R. W. Mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa*: The influence of culture medium on the stability of mucus production **Journal of Medical Microbiology**, Londres, v.8, p.913-922, 1975.

GRIFFIN, P. S., INDICTOR, N., KOESTLER, R.J., The biodeterioration of stone: a review of deterioration mechanisms, conservation case histories and treatment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London. v.28, p.187-208, 1991.

GROTH, I. et al., Actinomycetes in karstic caves of northern Spain (Altamia and Tito Bustillo) **Journal Microbiological Methods.**, Amsterdam, 36 p. 115-122, 1999.

GUIAMET, P. S. et al., Biodeteriorating microorganisms of two archeological buildings at the site of Uxmal, México. **LATINCORR'98 Proceedings. Paper S-11-01, NACE International**, Houston, Texas, 1998.

GURTNER, C., MACA, S., RÖLLEKE, S., NIGL, K., LUKAS, J., HIRSCHT, A., LUBITZ, W., BARISANI-ASENBAUER, T.; 16S rDNA- Based identification of bacteria from conjunctival swabs by PCR and DGGE fingerprinting. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, Rockville, v.42, p.1164-1171, 2001.

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 **International Biodeterioration & Biodegradation**, Londres, v.46, p.229-239, 2000

HAMILTON, W.A. & CHARACKLIS, W.G., Structure and Function of Biofilms. Eds. W.G. Characklis & P.A. Wilderer, John Wiley, New York, 1989

HOLT, J. G., KRIEG, N. R., SNEATH, P. H., STALEY, J. T., WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Baltimore: William & Wilkins, 1994, 787p.

HUECK, H.J. The Biodeterioration of Materials – an appraisal **International Biodeterioration & Biodegradation**, Londres, v.48, p.5-11, 2001

JATON, C., ORIAL, G., BRUNET, A. Actions des vegetaux sur les materiaux pierrieux. In FELIX, G. (ED.), **Proceeding of the Fifth International Congress on Detrioration and Conservation of Stone**, Presses Polytechniques Romandes, Lausanne, v.2, p.577-582, 1985.

JIMÉNEZ, F. J. Tecnología previa a la restauración de edificios históricos. **Informes de la Construcción**, Madri, v.50, p.5-16, 1999.

JOHN, W.M. **Avaliação da durabilidade de materiais componentes e edificações: emprego do Índice de Degradação**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1987

JONES, D., WILSON, M.J., MCHARDY, W.J. Effects of lichens on mineral surfaces. In Houghton, D.R., Smith, R.N., Eggins, H.O.W. (Eds.), **Biodeterioration**, v.7, Elsevier Applied Science, London, New York, p.129-164, 1988.

JOUVE, M.A, Crystallization and crystal packing of Proteus mirabilis PR catalase, **Journal Molecular Biology**, Washington, v.221, p.1075-1077, 1991

KRUMBEIN, W. E., Microbial Interactions with mineral materials. Em: Houghton, R., Smith, R., Eggins, H. (eds.), **Biodeterioration 7**. Elsevier, New York, p.78, 1988.

LAIZ, L. et al., Bacteria isolated from the rocks supporting prehistoric paintings in two shelters from Sierra de Cazorla, Jaen, **Spain. Aerobiologia**, Madri , v.16, p.119-124, 2000.

LEWIS, F. J. et al., Metabolic activities of bacteria isolated from building stone and their relationship to stone decay. **Biodeterioration** 7, ed. Houghton, D. R. Smith. R. N. & Egghins, h. O. W., London, v.7, p.107-112, 1988

LEWIS, F. J. et al., The role of heterotrophic bacteria in the decay of sandstone from ancient monuments, **The Biodeterioration of Constructional Materials**, Preston, v.3, p.45-53, 1987.

MADIGAN, M.T., et al., In Brock, T. D., **Biology of Microorganisms**, 8th ed., p.532-605, Prentice Hall, Inc., Upper Saddle River, N.J., 1997.

MAY, E., et al. Microbial deterioration of building stone - a review. **Biodeterioration Abstract.**, London, v.7, p.109-123, 1993.

MEIRA, A. L. G. **O Passado no Futuro da Cidade – Políticas Públicas e Participação dos Cidadãos na Preservação do Patrimônio Cultural de Porto Alegre.** 271f. Dissertação (Mestrado Urbanismo) – Programa de Pós-Graduação em Planejamento urbano e Regional, Faculdade de Arquitetura, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

MONTE, M., Multivariate analysis applied to the conservation of monuments: lichens on the Roman aqueduct Anio Vetus in S. Gregorio, **International Biodeterioration**, v.28, p.133-150, 1991.

MORTON L. H. G. & SURMAN, S.B., Biofilms in Biodeterioration – a Review, **International Biodeterioration & Biodegradation**, Londres, v.94, p.203-221, 1994

MORTON, L.H.G., GREENWAY, C.C., GAYLARDE, C.C., SURMAN, S.B., Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides, **International Biodeterioration & Biodegradation**, Londres, v.41, p.247-259, 1998

MULLIGAN, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v.133; p.183-198, 2005.

MURDOCH, D.A., Gram Positive Anaerobic Cocci. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.11, p.81-120, 1998.

NEU, T.R. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. **Microbial Rev.**, Washington, v.60; p.151-166, 1996.

NICA, D., DAVIS, J.L., KIRBY, L., ZUO, G., ROBERTS, D.J.; Isolation and characterization of microorganisms involved in the biodeterioration of concrete in sewers **International Biodeterioration & Biodegradation**, Londres, v. 46, p.61-68, 2000

NITSCHKE,M.; PASTORE,G. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações **Química Nova**, São Paulo, v.25; p.772-776, 2002.

ORTEGA-CALVO, J.J.et al.,. Cyanobacterial sulfate accumulation from black crusts of a historic building. **J. Geomicrobiol.**, Londres, v.12, p.15-22, 1994.

ORTEGA-MORALES, O., GUEZENEC, J., HERNANDEZ-DUQUE, G., GAYLARDE, C.C., GAYLARDE, P.M.; Phototrophic biofilms on ancient Mayan buildings in Yucatan, Mexico, **Current Microbiology**, Springer New York., v.40, p.81-85, 2000.

PACE, N. R., A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**. New York. V.276, p.734-740, 1997.

PAINE, S. G. et al.,The relationship of microorganisms to the decay of stone. **Phil. Trans. R. Soc.**, v.222, p.97-127, 1993.

PIÑAR, G. et al..., Identification of Archaea in objects of art by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis and shotgun cloning. **Methods Enzymology**, . 336, p.356-366, 2001.

PRICE, C. A. **Stone Conservation. An Overview of Current Research**. The J. Paul Getty Trust, Santa Monica, 1996.

PRIEST, F.G., **Systematics and ecology of *Bacillus***. In: A. L. Sonenshein, J.A. Hoch and R. Losick, Editors, *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics, **American Society for Microbiology**, Washington, DC, p.3-16, 1993

RESENDE, M.A. Biodeterioração de monumentos históricos. Cap. 15. In Melo, I. S. & Azevedo, J.L. editores, **Microbiologia Ambiental**, Hamburg Gráfica Editora, São Paulo, p. 335-356, 438 p., 1997.

RESENDE, M.A. Fungos biodeteriogênicos em prédios históricos de pedra. In: Videla, H. A. & Giudice, C. A. editores. **Jornadas Científico Tecnológicas sobre Prevencion y Proteccion del Patrimonio Cultural Iberoamericano de los Efectos del Biodeterioro Ambiental. Memorias**. Buro Grafik S.R.L., La Plata, Argentina, p. 79-103, 2002.

RÖLLEKE, S., WITTE, A., WANNER, G., LUBITZ, W.; Medieval wall painting – a habitat for Archaea: Identification of Archaea by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR- amplified gene fragments coding 16S rRNA in a medieval wall painting, **International Biodeterioration & Biodegradation.**, Londres, 41, p.85-92, 1998.

ROSENBERG,E.; RON,E.Z. High and low-molecular mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.52; p.154-162, 1999.

ROSS, P. et al., Cellulose biosynthesis and function in bacteria. **Microbiology Review.**, Palo Alto. V.55, p.35-58, 1991.

SAIZ-JIMENEZ, C. & LAIZ, L., Occurrence of halotolerant/halophilic bacterial communities in deteriorated monuments, **International Biodeterioration & Biodegradation**, Londres, v.46, p.319-326, 2000

SAIZ-JIMÉNEZ, C., Biodeterioration of stone in historic buildings and monuments, In: Llewellyn, G.C., Dashek, W.W., O'Read, C.E. (eds.), *Biodeterioration Research 4: Mycotoxins, Wood Decay, Plant Stress, Biocorrosion, and General Biodeterioration*. Plenum, New York, p.587-603, 1994.

SHIRAKAWA, M.A., GAYLARDE, C.C., GAYLARDE, P.M., JOHN, V., GAMBALE, V. Fungal colonization and succession on newly painted buildings and the effect of biocide. **FEMS Microbiol. Ecol.**, Heidelberg, v. 39, p. 165-173, 2002.

SHIRAKAWA, M. A. et al..., Padronização de teste acelerado para avaliação da resistência de argamassas de revestimentos interiores ao crescimento de fungos. In Simpósio Brasileiro de Tecnologia das Argamassas, 3., 1999, Vitória,. **Anais...** Vitória: PPGEC/ANTAC. P. 568-578, 1999.

SINGH, J. **Building Mycology**, Londres: E & FN Spon, 326 p. 1994.

TÄUBEL, M. et al., *Bacillus barbaricus* sp.nov., isolated from an experimental wall painting **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.53, p.725-730, 2003

TAYLER, S. & MAY, E., Investigations of the localisation of bacterial activity on sandstone from ancient monuments, **International Biodeterioration & Biodegradation**, Londres, v.46, p.327-333, 2000

TAYLER, S. & MAY, E., Detection of Specific Bacteria on Stone using an Enzyme-linked Immunosorbent Assay. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Londres, v.95, p.155-167, 1994

TAYLER, S. & MAY, E., The seasonality of hetetrophic bacteria on sandstone from ancient monuments. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Londres, v.28 p.49-64, 1991.

TIANO, P., Biodeterioration of stone monuments: a critical review. Em: Garg, K.L., Garg, N., Mukerji, K.G. (ds.), **Recent Advances in Bideterioration and Biodegradation**, Naya Prokash, Calcurra, v.1, p.173-203, 1993.

URZI, C.E., KRUMBEIN, W.E., WARSCHEID, T. 1992. On the question of biogenic colour changes of mediterranean monuments (coating-crust-microstromatolite-patina-scialbatura-skin-rock varnish). In: **D. Decrouez; J. Chamay; F. Zezza (eds): Proceedings of the 2nd International Symposium on the Conservation of monuments in Mediterranean Basins**. Geneve, p.397-420, 1992.

URZI, C., KRUMBEIN, W.E., PERNICE, A.; microbiological investigations on the biodeterioration and decomposition of marbles. In: **7th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone**, eds J. Delgado, F. Henriques & F. TELMO, LNNA, Lisboa, p.429-435, 1992

VALINSKY, L., DELLA VEDOVA, G.D., SCUPHAM, A.J., ALVEY, S., FIGUEROA, A., YIN, B., HARTIN, R.J., CHROBAK, M., CROWLWY, D.E., HIANG, T., BORNEMAN, J.; Analysis of bacterial community composition by oligonucleotide fingerprint of rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68 p.3243-3250, 2002.

VIDELA, H. A. Biodeterioro de monumentos históricos de la zona Maya. Em: Memorias de las Jornadas sobre Prevención y Protección del Patrimonio Cultural Iberoamericano de los Efecto del Biodeterioro Ambiental (Ed. H. A. Videla), RT XV- E CYTED, 2002.

VIDELA, H. A. An overview of mechanisms by which sulphate-reducing bacteria influence corrosion of steel in marine environments. **Biofouling**, Londres, v.15, p.37-47, 2000.

VIDELA, H. A.; CHARACKLIS, W.G., Biofouling and microbiologically influenced corrosion, **International Biodeterioration & Biodegradation**, Londres v.29, p.195-212, 1992.

VUORINEN, A. et al., Bacterial weathering of Papakivi granite, **Geomicrobiology Journal**, , v.4, p.317-325, 1981

WAINWRIGHT, M. et al., A review of the role of oligotrophic micro-organisms in biodeterioration. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Londres, v.31, p.1-13, 1993

WALKER, J. T.; KEEVIL, C. W., Study of microbial biofilms using light microscope techniques. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Londres. v.34, p.223-236, 1995.

WALSH, J.H., Ecological Considerations of Biodeterioration. **International Biodeterioration & Biodegradaton**, Londres. v.48, p.16-25, 2001.

WARSCHEID, Th., BRAAMS, J. Biodeterioration of stone: a review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Londres, v. 46, p. 343-368, 2000.

WARSCHEID, Th.; KRUMBEIN, W. E. General aspects and selected cases. Em: Microbially Influenced Corrosion of Materials (E. Heitz, H.C. Flemming, W. Sand, eds.), Springer-Verlag, Berlin, p.273-295, 1996.

WARSCHEID, Th. et al., Studies on the temporal development of microbial infection of different types of sedimentary rocks and its effects on the alteration of the physico-chemical properties in building materials In THIEL, M.J. (ED.), **Conservation of Stone and Other Materials**, London, v.1-E, p.303-310, 1993.

WARSCHEID, J., OELTING, M., KRUMBEIN, W.E.; Physico-chemical aspects of deterioration process on rocks with special regard to organic pollution, **International Biodeterioration & Biodegradation**, Londres, v.28, p.37-48, 1991

WARSCHEID, Th. et al., Physiological characterisation of chemoorganotrophic bacteria isolated from sandstone. Vth **International Congress on Deterioration and Conservation of Stone**. Supplement, p.26-32, 1988

WEBLEY, D. M. et al., The microbiology of rocks and weathered stones. **Journal Soil Science**. v.1, p.102-112, 1963

WILLUMSEN, P.A. ; KARLSON,U. 1997. Screening of bacteria, isolated from PAH- contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation 7**: p. 415-423. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

WOLLENZIEN, U. et al. On the isolation of microcolonial fungi occurring on and in marble and other calcareous rocks. **Science of the Total Environment**, v. 167, p. 287-294, 1995.

WOOD, P. A. & MACRAE, L.C., Microbial activity in sandstone deterioration. **International Biodeterioration Bulletin**, Londres, v.1 p.25-27, 1972

ZANARDINI, E., ABBRUSCATO, P., GHEDINI, N., REALINI, M., SORLINI, C.; Influence of atmospheric pollutants on the biodeterioration of stone **International Biodeterioration & Biodegradation**, Londres, v.45, p.35-42, 2000

ZYSKA, B., A short history of investigations of microbial biodeterioration in Poland, 1878-2002 **International Biodeterioration & Biodegradation**, Londres, v.53, p.456-150, 2004

Apêndice 1**Meio Ágar Nutriente**

(g/L)	
Extrato de carne	1
Extrato de levedura	2
Peptona	5
Cloreto de sódio	5
Agar	15

pH= 7,6

Apêndice 2**Meio Thornton**

	g/L
Fosfato diácido de potássio (K ₂ HPO ₄)	1,0
Sulfato de magnésio heptahidratado	0,2
Cloreto de cálcio (CaCl ₂)	0,1
Cloreto de sódio (NaCl)	0,1
Cloreto de ferro (FeCl ₃)	traços
Nitrato de potássio (KNO ₃)	0,5
Aspargina	0,5
Manitol	1,0
Ágar (1,5%)	

** Ajustar o pH para 7,4 ±0,2

Apêndice 3

Meio de Knop Modificado

	g/L
Nitrato de potássio (KNO ₃)	1,25
Fosfato diácido de potássio (KH ₂ PO ₄)	1,25
Sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO ₄ .7H ₂ O)	2,50
Sulfato férrico (Fe ₂ (SO ₄) ₃)	0,004
Citrato de sódio	0,3
Cloreto de cálcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0,036
Micronutrientes	1mL
Ágar	1,7%

** Ajustar o pH para 7,4 ±0,2

Micronutrientes:

	g/L
Ácido bórico (H ₃ BO ₃)	2,86
Cloreto de magnésio tetrahidratado (MnCl ₂ .4H ₂ O)	1,81
Sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO ₄ .7H ₂ O)	0,222
Molibdanato de sódio (Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O)	0,39
Sulfato de cobre hexahidratado (CuCl ₂ .6H ₂ O)	0,045

Apêndice 4

Reagentes para Coloração de Gram

Solução de Violeta de Genciana (100 mL):

Solução A:

Violeta de genciana	2g
Álcool etílico 95%	20mL

Solução B:

Oxalato de amônio	0,8g
Água destilada	80mL

Misturar as soluções A e B, deixar em repouso por 24 horas e filtrar

Solução de Lugol (100 mL):

Iodo	1g
Iodeto de potássio	2g
Água destilada	100 mL

Solução de Álcool-Acetona (100 mL):

Álcool 95%	80 mL
Acetona	20 mL

Solução de Safranina (100 mL):

Safranina	0,25g
Álcool 95%	10 mL
Água destilada	90 mL

Apêndice 5

Reagentes para Coloração de Endósporo

Solução de Verde de Malaquita (100 mL):

Verde de malaquita	5g
Água destilada	100 mL

Solução de Safranina (100 mL):

Safranina	0,25g
Álcool 95%	10 mL
Água destilada	90 mL