

# Diversidade microbiana no ambiente e em partes do trono imperial de D. Pedro II – caracterização por microbiologia clássica e biologia molecular antes e após intervenções de conservação e restauro

## Microbial diversity in the surroundings and selected parts of the imperial throne of D. Pedro II – characterization by classical microbiology and molecular biology, before and after restoration interventions

ANTONIO CARLOS  
AUGUSTO DA COSTA<sup>1,\*</sup>  
ELIANE MARCHESINI  
ZANATTA<sup>2</sup>  
FERNANDA DO  
NASCIMENTO CORRÊA<sup>3</sup>  
RENATA NASCIMENTO  
CARDOSO<sup>1</sup>  
ANA LUCIA CHAVES DE  
OLIVEIRA<sup>4</sup>  
MÁRCIA TERESA SOARES  
LUTTERBACH<sup>4</sup>

1. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, PPG-EQ, Rio de Janeiro, Brasil

2. Museu Imperial, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brasil

3. Museu de Astronomia e Ciências Afins, Rio de Janeiro, Brasil

4. Instituto Nacional de Tecnologia, LABIO, Rio de Janeiro, Brasil

\* [acosta@uerj.br](mailto:acosta@uerj.br)

### Resumo

O Museu Imperial tem uma importante coleção histórica da Família Real Portuguesa no Brasil. O trono representa o poder imperial, e é considerado uma das peças mais importantes do Museu. Entretanto, vinha enfrentando há décadas uma deterioração gradual, principalmente devido aos seus componentes em tecido. Devido ao interesse em preservar o objeto, processos de conservação e restauro foram executados em todas as partes do trono. Como parte deste tratamento, uma inspeção microbiológica foi executada em partes selecionadas do objeto, bem como no seu ambiente de guarda. Este estudo de biodeterioração, controle e detecção de espécies microbianas indicou uma clara resposta em relação ao local de guarda, e então o processo de restauro pode ser executado visando solucionar os danos mais pronunciados objetivando restaurar as características originais do artefacto. O estudo indicou uma alta diversidade de fungos e bactérias. Foi observada uma redução de espécies fúngicas detectadas no trono antes e após o restauro, observando-se a recorrência dos gêneros *Absidia*, *Cladosporium* e *Epicoccum*. Essa redução não foi muito pronunciada para as bactérias, observando-se, também, recorrência bacteriana após o restauro (*Microbacterium*, *Staphylococcus* e *Kocuria*). No ar, observou-se o aparecimento de novas espécies fúngicas após o restauro, indicando recontaminação natural na área expositiva.

### Abstract

The *Museu Imperial* has an important historical collection from the Portuguese Royal Family in Brazil. The throne represents the imperial power and is considered one of the most important objects in the museum; however, the piece has been facing for decades a gradual deterioration, mainly in its fabrics. With the growing motivation to preserve this property, conservation and restoration processes were conducted in all parts of the throne. As a part of this treatment, a microbiological survey was conducted in selected parts of the object and the surrounding environment where it was placed. This biodeterioration study, control and detection of microbial species indicated a very pertinent answer in relation to the place it was exposed, and the restoration process was performed in order to solve the most pronounced damages aiming to restore the original characteristics of the artefact. The study indicated a high diversity of fungi and bacteria. It was observed a marked decrease, before and after restoration, being observed the recurrence of the genera *Absidia*, *Cladosporium* and *Epicoccum*. This reduction was not so pronounced for bacteria, being also observed the recurrence of some bacterial groups after restoration (*Microbacterium*, *Staphylococcus* and *Kocuria*). In the atmosphere new fungal species were found after restoration, indicating a natural recontamination of the exhibition area.

### PALAVRAS-CHAVE

Trono de D. Pedro II  
Bactérias  
Fungos  
Biologia Molecular  
Diversidade Microbiana

### KEYWORDS

D. Pedro's II Throne  
Bacteria  
Fungi  
Molecular Biology  
Microbial Diversity

## Introdução

O Trono que pertenceu ao Imperador D. Pedro II é considerado uma das peças mais emblemáticas do acervo do Museu Imperial, unidade autônoma do Instituto Brasileiro de Museus – IBRAM, autarquia federal vinculada à Secretaria Especial da Cultura do Ministério da Cidadania do Brasil, localizado na cidade de Petrópolis no Estado do Rio de Janeiro (Figura 1a,b), por representar o poder imperial, pelo seu caráter simbólico e evocativo, e tem um significado ímpar para a instituição que é dedicada à preservação da memória do império [1]. Com 1,75 metros de altura, o Trono Imperial foi manufaturado em talha dourada com estofamento em veludo verde no encosto, assento e braços, com bordados a fios de ouro.

O encosto em medalhão oval, tem ao centro, a sigla P.II.I (Pedro II Imperador) entre duas palmas atadas por um laço, todos bordados a fios de ouro. Os pés dianteiros são representados por duas esfinges cujas asas formam os braços do assento. As esfinges repousam sobre dois pedestais unidos por um travessão.

Considerando-se objetos do patrimônio cultural, o risco biológico é iminente em função das suas composições estruturais. O primeiro passo para prevenir tais danos é conhecer as estruturas biológicas e os fatores que podem afetar sua circulação, sobrevivência e crescimento no ambiente, como base para qualquer outra estratégia preventiva. O monitoramento da contaminação microbiana na superfície dos objetos e no ar que os rodeiam, tanto numa perspectiva quantitativa como qualitativa, juntamente com uma avaliação das condições climáticas, é essencial para o estudo da qualidade ambiental de áreas de guarda e exposição [2].

As bactérias e fungos, quando em ambientes favoráveis, são os principais responsáveis pela deterioração de objetos do patrimônio cultural. A sobrevivência e o desenvolvimento de micro-organismos no ar e nas superfícies dependem de características estruturais e metabólicas bem como da presença de condições favoráveis, como condições nutricionais e microclimáticas. Cabe ressaltar as elevadas

umidades relativas do ar reportadas na cidade de Petrópolis (onde o Museu Imperial está localizado), associadas, entretanto, a temperaturas amenas, por tratar-se de uma cidade serrana.

## Descrição do problema

No mês de dezembro de 2013, percebeu-se que o Trono Imperial estava há décadas sofrendo um processo gradual de deterioração, sobretudo em relação à sua parte mais susceptível a ataques microbianos, como os componentes têxteis, necessitando de um tratamento de conservação e restauro para reverter uma possível perda irreparável para o patrimônio cultural brasileiro. Assim, neste mesmo mês, tal objeto foi encaminhado ao Laboratório de Conservação e Restauro do Museu Imperial para um amplo tratamento com vista à sua preservação para as futuras gerações [1]. No Laboratório de Conservação e Restauro do Museu Imperial, a peça passou por um procedimento de remoção física de sujidades, e algumas partes foram tratadas com detergente neutro para uma limpeza mais profunda. O tratamento de remoção física de sujidades foi feito em toda a peça museológica, e o tratamento com detergente, somente nas partes que foram reintegradas à peça após restauro. O Trono, no seu estado geral, encontrava-se em bom estado de conservação. Sobretudo as peças em madeira estavam em melhor situação do que as peças que recebem revestimento têxtil, apesar de ambas serem à base de celulose, nutriente muito requerido por muitas classes de fungos. No entanto, as partes manufaturadas em madeira, com muitas perfurações provocadas em outras épocas por insetos xilófagos, atingiram principalmente a base central da estrutura do trono, que une as laterais, deixando-a altamente fragilizada. Rachaduras superficiais eram visíveis em muitas áreas, a exemplo da moldura do encosto na forma oval, do lado direito. Dessa forma, o caminho estava aberto para ataques microbianos. Todas essas não conformidades foram devidamente sanadas no processo de restauro do objeto.



Figura 1. Trono de D. Pedro II: a) antes e b) depois do processo de restauro.

Assim sendo definiu-se como objetivo principal da presente investigação, avaliar as populações microbianas presentes no Trono e no seu ambiente de guarda antes e após o processo de restauro. Dessa forma, poderia se ter um amplo conhecimento dos micro-organismos (fungos e bactérias) presentes no ambiente e no Trono, conhecendo-se a diversidade de populações microbianas, servindo de alerta para um monitoramento climático e procedimentos mais sistemáticos de conservação preventiva a fim de evitar ou minimizar novos processos de deterioração.

## Metodologia

### Monitoramento e identificação microbiológica por biologia clássica e molecular

Foram coletadas amostras para a avaliação da presença de micro-organismos no Trono do Imperador por equipe do Instituto Nacional de Tecnologia (INT/MCTIC) e do Museu de Astronomia e Ciências Afins (MAST/MCTIC), parceiros do Museu Imperial no que tange às pesquisas direcionadas para o estudo da biodeterioração. O objetivo foi detectar espécies microbianas em áreas selecionadas da peça, bem como do ambiente no qual ela está exposta. Essa coleta foi realizada em dois momentos, antes e após o processo de limpeza e restauro das peças que compunham o trono.

A caracterização da microbiota do entorno do trono foi feita com auxílio do amostrador de ar MAS-100 Eco (Merck, Brasil) que é utilizado para avaliação da qualidade do ar, bem como por sedimentação espontânea e por contato através de zaragatoas em áreas aproximadas de 5 cm<sup>2</sup>. Foram inspecionados o veludo verde, o veludo do assento e a madeira dos braços direito e esquerdo; além disso, foi feita a coleta dos micro-organismos presentes no ar do ambiente por sedimentação espontânea e por emprego do amostrador de ar. O meio de cultura utilizado para o crescimento das espécies fúngicas foi o Agar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol e para o cultivo das bactérias foi utilizado o meio PCA (*Plate Count Agar* ou *Ágar Padrão para Contagem*).

No caso da utilização de zaragatoas, após usadas, as mesmas foram colocadas dentro de 9 mL de água salina, seguido de diluições decimais, inoculando 0,1 mL das diluições em placas de Petri contendo Agar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol, previamente esterilizado a 120 °C por 20 minutos em autoclave vertical. Quando realizada a sedimentação direta e a coleta com o amostrador de ar, as amostras foram coletadas a cada metro cúbico do espaço, aguardando-se a sedimentação. Após estes procedimentos, as placas de Petri foram então colocadas dentro de uma câmara de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) por até 21 dias para o crescimento fúngico e numa câmara com temperatura controlada a 30 °C por 48 h para o crescimento bacteriano.

Os fungos crescidos sobre as placas foram então isolados com o auxílio de cotonetes estéreis em tubos de vidro

contendo o meio de cultura Agar Sabouraud Dextrose e armazenados em óleo mineral. Em seguida, os fungos foram repicados para placas contendo Agar Extrato de Malte. Após crescimento do fungo na placa, foi realizado microcultivo para observação em microscópio ótico e garantir que o fungo não estaria contaminado. A partir desta etapa os fungos foram sequenciados, preservados em óleo mineral e congelados. Nas espécies bacterianas encontradas foi realizado o método da coloração de Gram de acordo com metodologia convencional. Após o isolamento dos micro-organismos, as técnicas de microcultivo foram feitas, seguido de incubação de 7 a 21 dias, dependendo do gênero específico. Após o crescimento dos fungos e bactérias, as espécies foram identificadas, inicialmente com base em protocolos de microbiologia clássica e posteriormente, por sequenciamento do DNA.

### Identificação filogenética das bactérias

#### Extração de DNA

As extrações de DNA foram realizadas usando como método para obtenção de DNA genômico o Choque Térmico/Lise Térmica, a partir de uma cultura pura, obtida através do processo de isolamento e cultivo, conforme anteriormente descrito. O procedimento consiste, após a obtenção da cultura pura, com o auxílio de uma alça descartável de capacidade de 0,1 µL, pegar uma pequena quantidade da colônia isolada. A colônia isolada é dissolvida em um tubo de fundo cônico de 200 µL (tubo de PCR), contendo 50 µL de água Milli-Q. A alça é então agitada até que a amostra esteja totalmente dissolvida na água Milli-Q, tornando-se esta ligeiramente turva. Após essa etapa inicial, os frascos são submetidos à variação de temperatura em banho seco, por 10 minutos a 96 °C e 15 minutos a 4 °C. Em seguida, a amostra é centrifugada a 10.000 rpm por 1 minuto e o sobrenadante é transferido para um novo tubo de PCR e congelado.

#### Amplificação da região 16S rRNA por PCR

Após a obtenção do DNA genômico, é realizado um PCR para a amplificação da região alvo correspondente ao gene 16S rRNA bacteriano que será usado na reação de sequenciamento. Para amplificação é utilizado o par de iniciadores Sadir (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAGA-3') / S17 (5'-GTTACCTTGTTACGACTT-3').

A reação é submetida à amplificação em termociclador com desnaturação por 15 minutos a 95 °C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 60 segundos e extensão a 72 °C por 90 segundos. Por último, procede-se à extensão final a 72 °C por 10 minutos. Após verificação da amplificação por eletroforese em agarose, o produto amplificado é purificado utilizando o kit comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

#### Sequenciamento

O sequenciamento das amostras foi realizado utilizando

o sequenciador automático AB 3500 Genetic Analyzer, equipado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems). Os DNA-molde (30 ng) foram marcados utilizando-se 2,5 pmol ou do iniciador Sadir ou do iniciador S17 e 0,5 µL do reagente Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Standart (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador LGC XP Cyler com uma etapa de desnaturação inicial a 96 °C por 3 minutos seguida de 25 ciclos de 96 °C por 10 segundos, 55 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75 % (v/v) e lavagem com etanol a 60 % (v/v). Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95 °C por 5 minutos, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa Data Collection 2 (Applied Biosystems) com os parâmetros DyeSet "Z"; Mobility File "KB\_3500\_POP7\_BDTv3.mob"; BioLIMS Project "3500\_Project1"; Run Module 1 "FastSeq50\_POP7\_50cm\_cfv\_100"; e, Analysis Module 1 "BC-3500SR\_Seq\_FASTA.saz".

### Identificação filogenética dos fungos

#### Extração de DNA

Após crescimento em meio específico, os fungos foram retirados por meio de raspagem da placa de Petri e transferidos para um tubo Falcon de 15 mL. O tubo foi colocado em um cilindro contendo nitrogênio líquido por 5 min, aquecido em banho maria a 60 °C por 10 min e macerados com auxílio de um pistilo. Este procedimento foi repetido por três vezes. Posteriormente, a extração do DNA foi realizada com Kit Ultra Clean Soil Isolation (MO BIO Laboratories) de acordo com as instruções fornecidas pelo fornecedor. O DNA foi eluído em 30 mL da solução fornecida no kit e quantificado através da leitura em espectrofotômetro Nano Drop ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, EUA).

#### Amplificação da região ITS por PCR

Um fragmento de 600 pares de base correspondentes ao gene ITS foi amplificado a partir do DNA genômico utilizando os iniciadores ITS5 (senso, 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (anti-senso, 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') no termociclador PCR System 9700 (Applied Biosystems, EUA). Cada reação incluiu 25 µL de Top Ta qMaster Mix Kit (PCR Master Mix, Qiagen, Holanda), 0,5 µM de cada iniciador e 5 µL do DNA extraído adicionado à água, num volume total de 50 µL. Uma primeira desnaturação foi realizada a 94 °C durante 4 min seguidos de 30 ciclos nas seguintes condições: 94 °C durante 30 s, 50 °C durante 30 s e 72 °C durante 30 s. O experimento foi encerrado a 72 °C por 10 min. Os fragmentos amplificados foram purificados utilizando o kit Wizard SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega, EUA), para a retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados, seguido de

sequenciamento adequado. O produto da amplificação foi visualizado através de uma corrida eletroforética em gel de agarose a 1 % em tampão TE 1X.

#### Sequenciamento

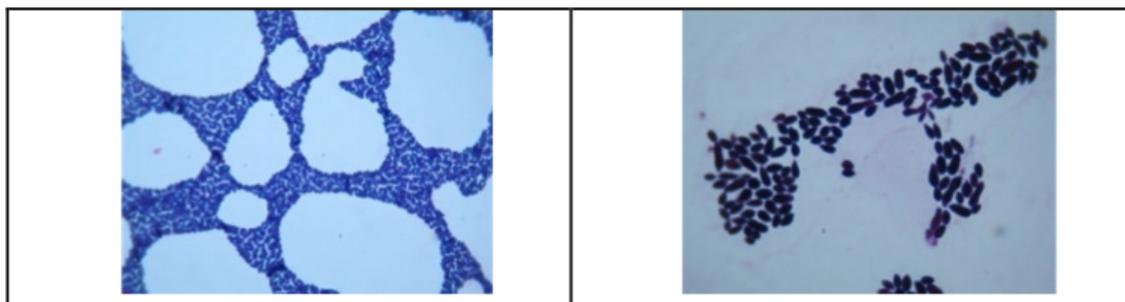
Os fragmentos de DNA dos fungos isolados foram submetidos a sequenciamento utilizando o kit Big Dye Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems, EUA) em um sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems, EUA) com 4 capilares de 50 cm. Os iniciadores ITS-5 (senso) e ITS-4 (anti-senso) foram utilizados para sequenciar a região ± 600 pb e os iniciadores Sadir (senso) e S17 (anti-senso) foram utilizados para sequenciar a região 1500 pb. A concentração dos iniciadores utilizados foi de 3,2 pmol.

Os cromatogramas obtidos do sequenciamento foram submetidos aos programas Chromas Lite, versão 2.01 e Bioedit para análise da qualidade das sequências. As sequências validadas pelos programas foram pareadas às depositadas no banco de dados de DNA do Genbank (National Center for Biotechnology Information). Para validar as sequências a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) foi realizada. Apenas os fragmentos com similaridade acima de 98 % foram considerados "confiáveis" e devidamente anotados. Não foi possível correr as sequências em bases mais específicas para fungos, uma vez que somente temos acesso autorizado a esta base. "FastSeq50\_POP7\_50cm\_cfv\_100"; e, Analysis Module 1 "BC-3500SR\_Seq\_FASTA.saz".

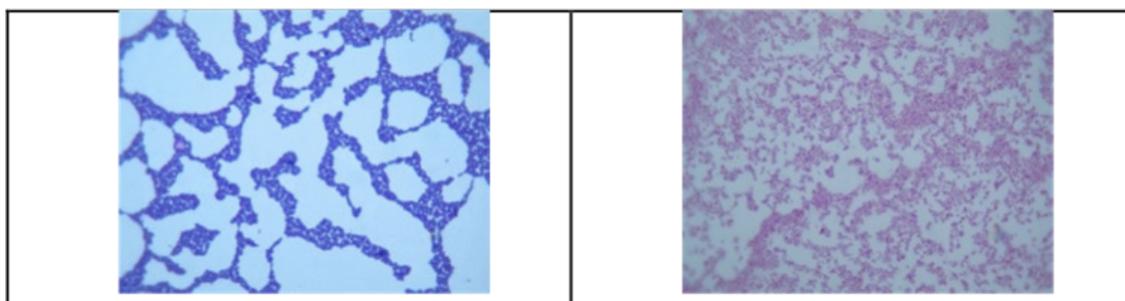
## Resultados e Discussão

Como resultado dos estudos de biodeterioração relacionada ao Trono Imperial, algumas espécies de bactérias e fungos foram encontradas tanto no objeto como no ar, antes e após o processo de restauro e conservação. No entanto, após o restauro, foram encontradas espécies diferentes de bactérias e fungos nas regiões de coleta. No caso das bactérias, apenas o gênero *Kocuria* se repetiu e, em relação aos fungos, as espécies *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium* sp. e *Absidia* sp. permaneceram após a limpeza, apesar de novas espécies terem surgido, indicando que a ocorrência de espécies em áreas de guarda é parcialmente cíclica, requerendo procedimentos de conservação preventiva permanentes. Porém, os micro-organismos identificados no Trono do Imperador apresentaram uma relação muito coerente com o tipo de ambiente em que o trono fora exposto até. Todas as imagens microscópicas dos micro-organismos estão apresentadas nas Figuras 2 a 5. Especificando, as Figuras 2 e 3 apresentam as imagens das bactérias e leveduras encontradas no ambiente de guarda do trono e na peça museológica, antes e após o restauro, respectivamente. As Figuras 4 e 5 indicam as ocorrências fúngicas no ar do ambiente de guarda do trono, antes e após o restauro, respectivamente.

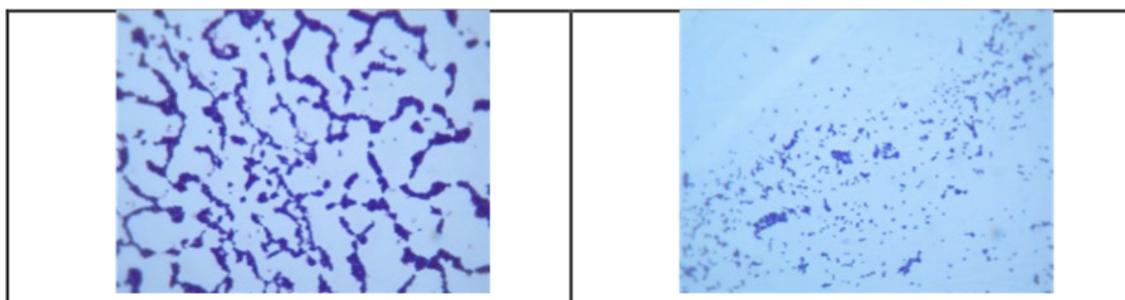
**Veludo verde da cortina lateral - *Kocuria* sp. e *Aureobasidium* sp.**



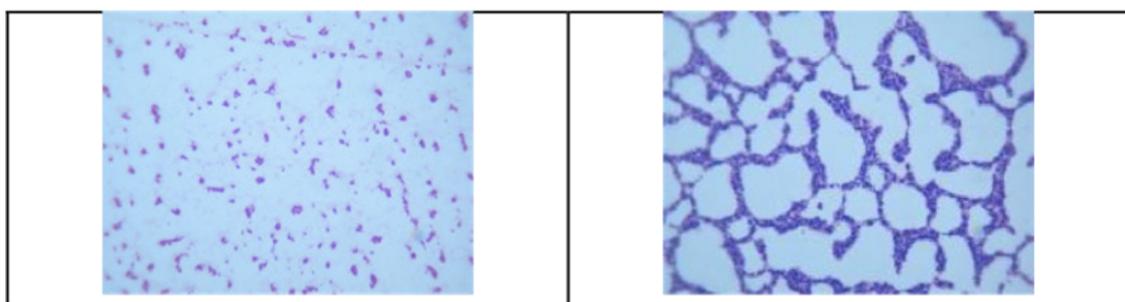
**Veludo do assento do trono - *Sinomonas* sp. e Ambiente - *Pseudomonas* sp.**



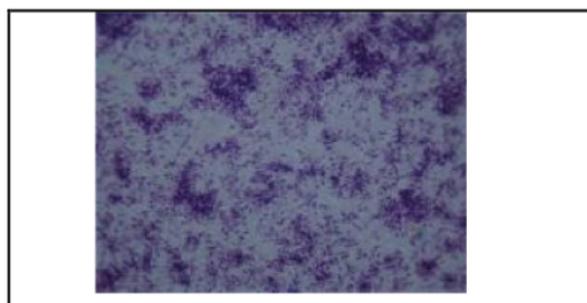
**Ambiente - *Arthrobacter* sp. e *Staphylococcus* sp.**



**Ambiente - *Microbacterium* sp. e *Curtobacterium* sp.**

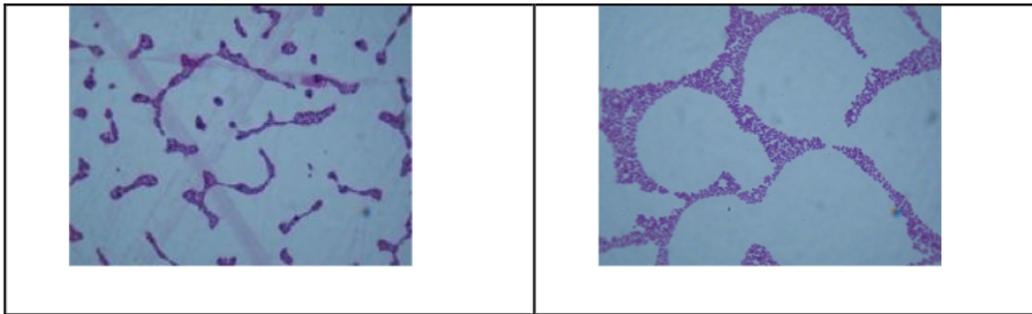


**Ambiente - *Bacillus* sp.**

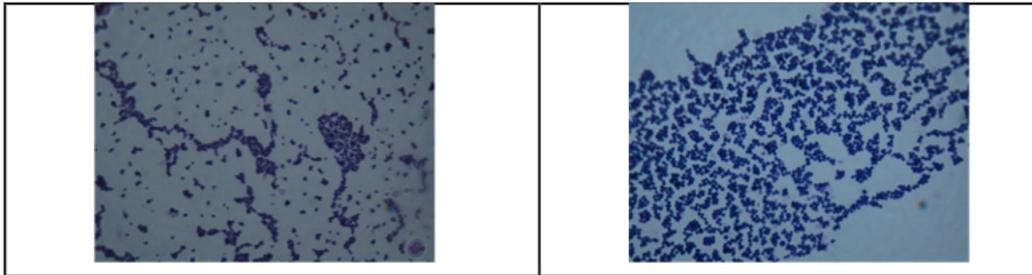


**Figura 2.** Bactérias e leveduras sequenciadas coletados no Trono Imperial antes do restauro – ambiente expositivo e partes selecionadas do Trono Imperial.

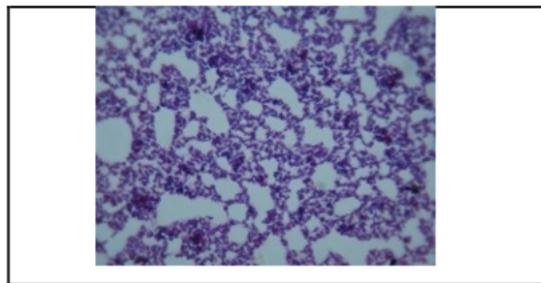
**Ambiente – *Microbacterium* sp. e Lateral direita do Trono - *Roseomonas* sp.**



**Lateral esquerda do Trono - *Quadrishphaera* sp. e *Deinococcus* sp.**



**Frente do Trono - *Dermacoccus* sp.**



**Figura 3.** Bactérias e leveduras sequenciadas coletados no Museu Imperial após o restauro – ambiente expositivo e partes selecionadas do Trono Imperial.

Wenzel *et al.* [3] comprovaram a ocorrência de bactérias celulolíticas dos gêneros *Kocuria*, *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Microbacterium* em térmitas. Esses quatro gêneros bacterianos, todos encontrados no Trono Imperial, constituem-se, portanto, em potenciais degradadores do Trono, particularmente associados à presença de térmitas.

Di Carlo *et al.* [4] utilizando-se de zangarões encontraram na superfície de obras de natureza celulósica, consórcios microbianos que incluem bactérias dos gêneros *Arthrobacter* e *Bacillus*, conforme identificado no presente trabalho.

Já Sterflinger e Piñar [5], trabalhando com pergaminhos e outros documentos de base celulósica, encontraram *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*, entre outros gêneros bacterianos.

A produção de celulases extracelulares por células de *Roseomonas* foi estudada por Akinyale [6], a partir de serragem de madeira como substrato, o mesmo material da estrutura do Trono Imperial.

Finalizando, Gerber *et al.* [7] trabalhando com bactérias do gênero *Deinococcus* comprovaram sua habilidade em degradar materiais de natureza lignocelulósicos, típicos materiais componentes da peça museológica. Já bactérias

do gênero *Curtobacterium* foram encontradas no Trono, sendo estas normalmente associadas a patrimônio cultural inorgânico, não se encontrando facilmente uma explicação para sua presença junto ao Trono [8].

Sobre os gêneros *Sinomonas*, *Quadrishphaera* e *Dermacoccus*, todos também encontrados no Trono ou na sua área expositiva, não foram encontradas informações acerca de sua atividade sobre a peça. Todas são de ocorrência incomum.

A avaliação da potencial ação destas bactérias sobre partes estruturais (celulose de tecidos, madeira, tintas, pigmentos) do Trono Imperial requer uma investigação mais profunda, uma vez que testes de susceptibilidade aos componentes devem ser efetuados em ausência de outras fontes de carbono.

Uma avaliação um pouco mais aprofundada sobre alguns dos gêneros encontrados está descrita nos parágrafos a seguir, não se levando em consideração somente questões relacionadas à suas estruturas superficiais (testes de Gram) ou ocorrência no ambiente. O gênero *Arthrobacter* é um gênero de bactérias comumente encontrado em solos e sedimentos marinhos [9]. Este gênero apresenta grande diversidade

metabólica e ecológica, além de capacidade característica de crescer em condições ambientais adversas [10].

A caracterização de bactérias aeróbias cultiváveis, isoladas da janela de vidro histórica "Natività" na Catedral de Florença, projetada por Paolo Uccello e construída por Angelo Lippi entre 1443 e 1444 foi realizada por Marvasi *et al.* [11]. Cepas microbianas de quatro dos 25 painéis da "Natività" foram isoladas em ocasião de um recente tratamento de conservação, devido à presença de vários tipos de crostas. Uma variedade de micro-organismos, incluindo líquens (*Diploica*, *Pertusaris*, *Lepraria* sp.), fungos (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.) e bactérias (*Flexibacter* sp., *Nitrosospira* sp., *Arthrobacter* sp., *Streptomyces* sp., *Micrococcus* sp., *Frankia* sp., *Geodermatophilus* sp.) foram identificados como organismos de fácil crescimento em superfícies de vidro. As bactérias presentes na janela histórica foram caracterizadas através de técnicas microbiológicas clássicas e moleculares. As técnicas clássicas como microscopia e investigações fisiológicas mostrou que bactérias Gram positivas e bacilos foram dominantes, em concordância com o observado no presente trabalho. Com relação à técnica molecular em diferentes painéis do vidro, para vinte estirpes, o gene 16S rRNA foi amplificado e sequenciado. A análise da sequência apresentou os gêneros *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Arthrobacter* como os mais representativos. As relações filogenéticas entre os gêneros isolados foram determinadas e a análise química do vidro e crostas completou o estudo.

Suihko *et al.* [12] retiraram vinte amostras de superfícies interiores e exteriores de monumentos de pedra de seis edifícios históricos escoceses em ruínas. Os biofilmes em desenvolvimento nos substratos minerais foram analisados por microscopia eletrônica de varredura *in situ* e cultivados por técnicas tradicionais e de biologia molecular. Vários métodos foram utilizados para caracterizar os isolados incluindo ribotipagem automatizada, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e sequenciamento do gene 16S rRNA para as bactérias, e estereomicroscopia e sequenciamento dos espaçadores internos transcritos (ITS) para os fungos. As espécies Actinobacteria pertencente ao gênero *Streptomyces* ou *Arthrobacter* e *Pseudomonas* foram as mais detectadas. Espécies de bactérias pigmentadas pertencentes aos gêneros *Arthrobacter*, *Brevundimonas*, *Cryseobacterium*, *Deinococcus* e *Dyadobacter* foram típicas para as amostras ao ar livre, enquanto que espécies de *Pseudomonas* foram comuns nas amostras de interiores. Espécies fúngicas hialinas de *Acremonium* ocorreram principalmente em amostras de interior, enquanto as espécies pigmentadas do fungo demáceo *Cladosporium* e os hialinos *Penicillium* e *Phialophora* foram encontrados ao ar livre. Os fungos filamentosos são conhecidos por suas habilidades decompositoras; em particular, o *Cladosporium* é um dos responsáveis pela decomposição de materiais à base de madeira. O fungo *Cladosporium cladosporioides* é difundido na natureza e os seus esporos são comuns em ar, especialmente no Outono, quando eles podem

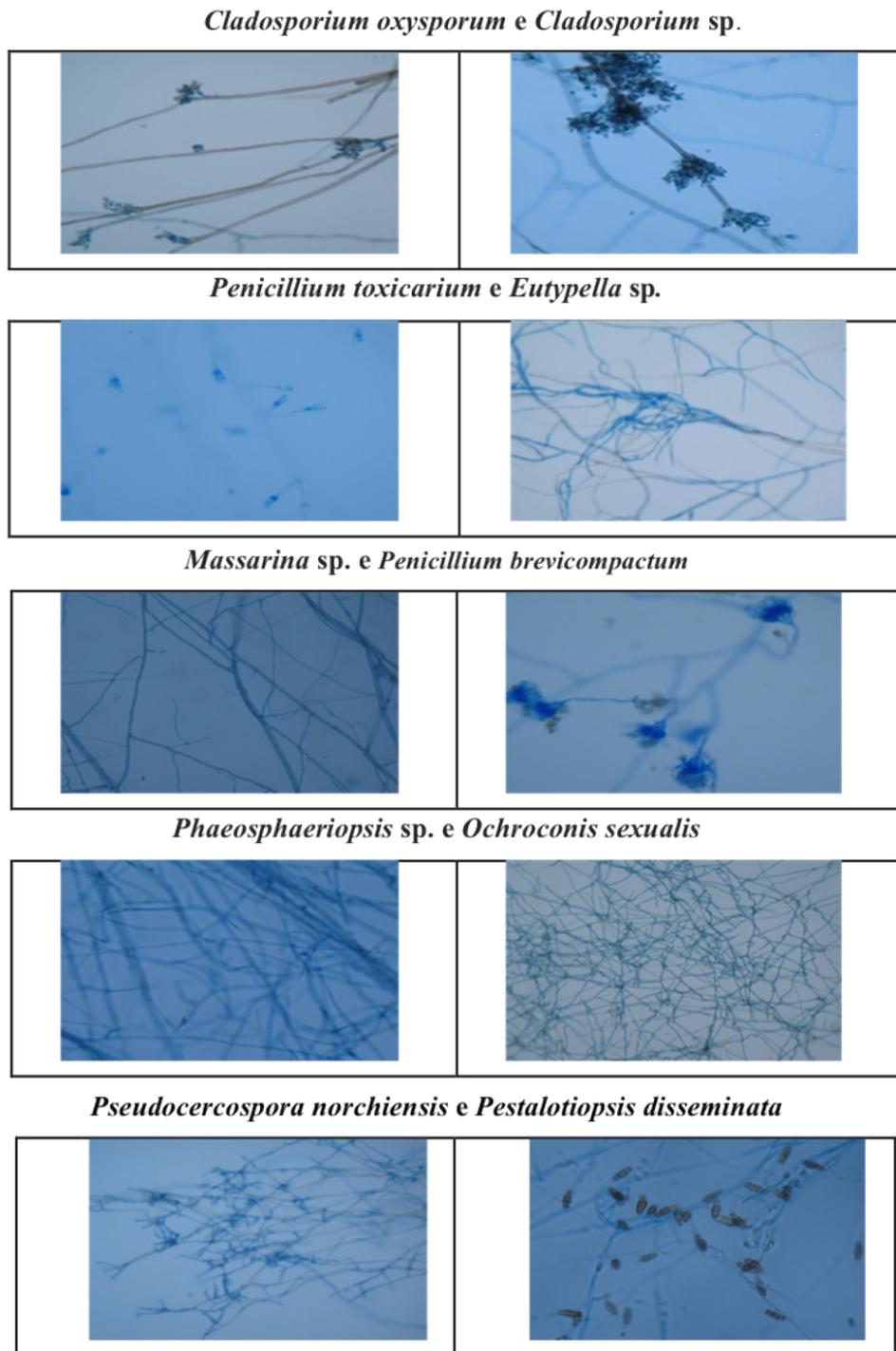
provocar reações alérgicas em seres humanos. Além desse, *Trichothecium*, *Acremonium* e *Penicillium* representam gêneros isolados comuns do solo e do ar.

Apesar de não termos ainda discutido os resultados obtidos do isolamento fúngico antes e depois do restauro do trono, já se pode verificar, a partir da literatura publicada que a ocorrência bacteriana e fúngica simultânea é comum em obras e espaços de guarda do patrimônio cultural. No entanto, há uma tendência quase mundial de que se dê maior relevância à presença de fungos, uma vez que características celulolíticas são bastante comuns para esse grupo microbiano. Consequentemente, há uma preocupação crescente em arquivos, bibliotecas, áreas de guarda e de exposição em museu para a biodeterioração associada à presença de fungos.

Estudos sobre a otimização das condições de desinfecção utilizando nanopartículas de prata em objetos museológicos foram realizados por Gutarowska *et al.* [13]. As análises da contaminação microbiana de ar e superfícies em seis museus e arquivos diferentes foram realizadas na Polônia. Os resultados mostraram que os fungos mais comuns, que contaminam museus e arquivos foram *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Paecilomyces*, *Aureobasidium*, *Botrytis* e *Chrysonila*; e a bactéria *Bacillus*. Algumas espécies potencialmente alergênicas e tóxicas foram diagnosticadas: *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. versicolor*, *Staphylococcus aureus*.

*Bacillus*, *Microbacterium*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Dermacoccus* foram algumas das bactérias encontradas por sequenciamento do gene 16S rRNA no trabalho realizado por Saarela *et al.* [14] na caracterização da microbiota heterotrófica em amostras superficiais e no ar das catacumbas romanas de São Calisto e Santa Domitilla. Foram estudados grupos microbianos incluindo micro-organismos aeróbios, anaeróbios facultativos e bactérias anaeróbicas, micro-organismos proteolíticos, actinobactérias, leveduras e bolores que habitam ambientes e substratos diferentes, incluindo gesso, mármore e tufo calcário. Estas informações vão de encontro ao que se encontrou no presente trabalho, em relação a uma elevada diversidade de espécies bacterianas e fúngicas.

Wang *et al.* [15] estudaram a diversidade e dinâmica sazonal de bactérias no ar, nas Grutas Mogao (Dunhuang, China). O objetivo foi analisar a composição filogenética da comunidade bacteriana no ar utilizando uma abordagem molecular dependente da cultura. Os genes 16S rRNA foram amplificados diretamente dos micro-organismos isolados. Um total de 19 gêneros de bactérias foi identificado entre os 49 tipos de sequências bacterianas. As bactérias predominantes foram *Janthinobacterium* (14,91 %), *Pseudomonas* (13,40 %), *Bacillus* (11,25 %), *Sphingomonas* (11,21 %), *Micrococcus* (10,31 %), *Microbacterium* (6,92 %), *Caulobacter* (6,31 %), e *Roseomonas* (5,85 %). A distribuição de várias bactérias foi afetada principalmente por parâmetros climáticas e atividades humanas. Essas descobertas



**Figura 4.** Fungos identificados no Museu Imperial antes do restauro – ar no entorno do Trono.

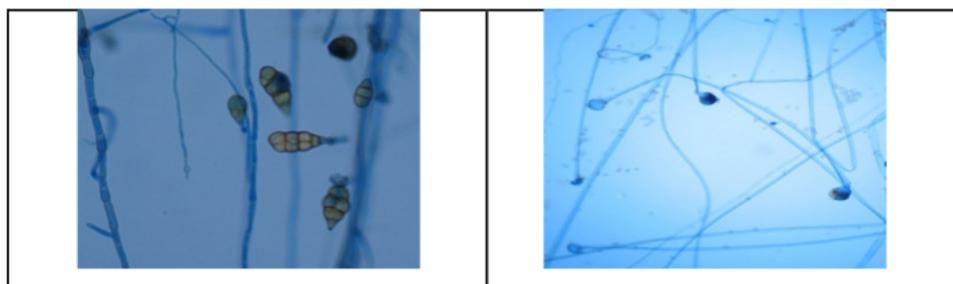
sugerem que a abertura deste patrimônio cultural para os visitantes deve ser controlada e que a manutenção de condições climáticas naturais ajudaria na conservação.

As bactérias *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Kocuria* e *Roseomonas*, dentre outras espécies, foram isoladas de pinturas de murais danificados do túmulo de Servília (necrópole de Carmona, Sevilha, Espanha), esculpido em rocha de calcarenito, no estudo realizado por Heyrman e Swings [16]. As cepas selecionadas, representativas de diferentes grupos de isolados, foram analisadas por sequência de 16S rDNA.

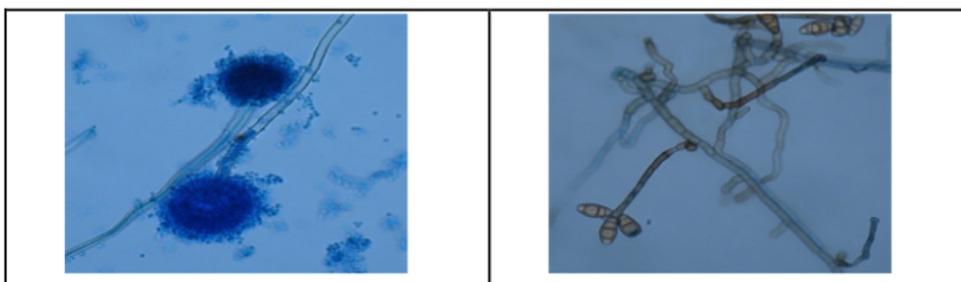
Em se tratando das espécies fúngicas identificadas neste trabalho, existem diversos estudos na literatura que relacionam a presença desses micro-organismos aos danos verificados em patrimônios culturais [17, 18]. Os fungos encontrados antes e após o restauro estão apresentados na Tabela 1.

Para evitar danos por fungos em objetos de madeira, Kim *et al.* [19] investigaram a diversidade de fungos existentes nesses bens de relevância histórica. Os fungos no ar foram isolados duas vezes na primavera (março) e no verão (agosto), utilizando o método de sedimentação espontânea

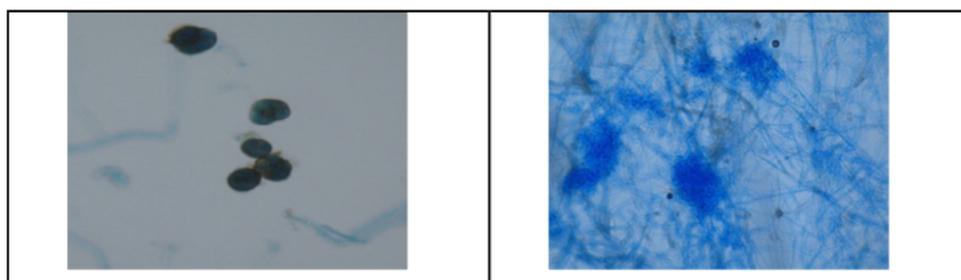
*Alternaria brassicicola e Absidia*



*Aspergillus sp. e Curvularia sp.*



*Epicoccum nigrum e Periconia abyssoides*



**Figura 5.** Fungos identificados no Museu Imperial após o restauro – ar no entorno do Trono.

ou por amostragem do ar e foram identificados utilizando técnicas morfológicas e moleculares. Houve diferenças na diversidade de fungos, dependendo da localização geográfica, das condições climáticas e do estado aberto ou fechado de um edifício. O número de fungos isolados foi maior no edifício aberto do que nos fechados, mas esses edifícios tinham diversidade de fungos similar. A diversidade fúngica era mais rica na primavera do que no verão. Dentro do total de 671 fungos isolados, as espécies *Arthrinium phaeospermum*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Eutypella* sp., *Penicillium* sp. e *Phaeosphaeriopsis triseptata* estavam presentes, alguns dos quais também encontrados no Trono Imperial ou no seu ambiente expositivo.

Coutinho *et al.* [20] relataram a ocorrência dos fungos *Arthrinium* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp. e *Pestalotiopsis* sp. em sua grande maioria em tijolos e cerâmicas esmaltadas.

Ruga *et al.* [21] investigaram a qualidade do ar na cripta da Basílica de São Pedro, em Perugia (Itália) através de diferentes metodologias, como indicativo do nível de contaminação do meio ambiente. Os gêneros *Aureobasidium*, *Arthrinium*, *Cladosporium* e *Penicillium* estavam presentes nas amostras de ar coletadas. A análise qualitativa do

**Tabela 1.** Fungos presentes no trono e no ambiente expositivo no Museu Imperial, coletados e identificados antes e após o processo de restauro.

1ª. Coleta (Ano 1 – Antes do Restauro)	2ª. Coleta (Ano 2 – Após o Restauro)
<i>Absidia</i> sp.	<i>Absidia</i> sp.
<i>Arthrinium arundinis</i>	<i>Alternaria brassicicola</i>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
<i>Cladosporium oxysporum</i>	<i>Cladosporium</i> → <i>cladosporioides</i>
<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Cladosporium</i> sp.
<i>Eutypella</i> sp.	<i>Curvularia</i> sp.
<i>Massarina</i> sp.	<i>Epicoccum nigrum</i>
<i>Ochroconis sexualis</i>	<i>Periconia byssoides</i>
<i>Penicillium brevicompactum</i>	
<i>Penicillium toxicarium</i>	
<i>Pestalotiopsis disseminata</i>	
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	
<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.	
<i>Porostereum crassum</i>	
<i>Pseudocercospora norchiensis</i>	

componente fúngico no ar permitiu a determinação de diferentes gêneros de fungos existentes, tanto no interior da cripta quanto no ambiente externo. A análise quantitativa demonstrou distribuições heterogêneas de esporos e diferentes concentrações de pico nas áreas estudadas.

Do Campo *et al.* [22] estudaram o teor de esporos da atmosfera da Caverna de Nerja, uma cavidade que se constitui numa importante atração turística situada na costa oriental de Málaga (sul da Espanha), durante um período ininterrupto de quatro anos (2002-2005). Na atmosfera da caverna foram detectados 72 tipos de esporos diferentes durante o período estudado e a concentração média diária de até 282.195 esporos/m<sup>3</sup> foi alcançada. *Aspergillus/ Penicillium* foram os tipos de esporo mais abundante com uma percentagem média anual de 50 % do total, seguido por *Cladosporium*. Outros gêneros presentes no trabalho atual foram identificados na obra de Do Campo *et al.* [22], tais como *Arthrimum* e *Massarina*. A origem dos esporos dos fungos encontrados dentro da caverna foi discutida com base nas concentrações do interior/externo e no comportamento sazonal observado.

Em um estudo aerobiológico realizado por Porca *et al.* [23], sobre salas selecionadas de diversas cavernas espanholas e francesas com pinturas rupestres, *Arthrimum* sp., *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., *Aureobasidium pullulans* e *Ochroconis* sp. foram, novamente, alguns dos diversos fungos identificados.

Outro trabalho sobre pinturas rupestres, na caverna de Lascaux, na França, foi desenvolvido para detectar e quantificar a espécie *Ochroconis lascauxensis*. Martin-Sanchez *et al.* [24] verificaram que este fungo é o agente causal principal das manchas negras que ameaçam as pinturas paleolíticas deste Patrimônio Mundial da UNESCO. O ensaio de PCR em tempo real específico e sensível foi útil para quantificar a presença de *O. lascauxensis* nas manchas sobre as paredes, sedimentos e ar da cavidade. Os resultados confirmaram a associação desse fungo com as manchas pretas e sua ampla disseminação em todos os compartimentos da caverna. Outras 13 espécies de fungos frequentemente isoladas de cavernas foram detectadas, dentre elas, as espécies *Cladosporium* sp. e *Penicillium comune*.

Em suma, qualquer peça museológica ou documento arquivístico ou bibliográfico, nos apresentará uma grande diversidade de fungos e bactérias, potencialmente nocivos às peças. Micro-organismos ambientais tendem a ficar dormentes por vários meses ou anos, aguardando condições climatológicas adequadas e disponibilidade nutricional para sua multiplicação e princípio de biodeterioração. O que se conclui do presente trabalho é que há informações bem sistematizadas sobre ocorrência fúngica em peças do patrimônio cultural, tais como o Trono Imperial. No entanto, o que se observou foi uma diversidade bacteriana muito mais representativa que a diversidade fúngica, esta última amplamente documentada na literatura. Cabe, em investigações futuras, direcionar esforços para a pesquisa

sistematizada dessa ocorrência bacteriana. Se elas estão presentes nestes ambientes e suportes, é porque encontraram condições ambientais adequadas e disponibilidade de fontes nutricionais. Dessa forma, antes de nos reportarmos à biodeterioração do patrimônio cultural, devemos direcionar esforços para uma conservação preventiva que efetivamente impeça a multiplicidade de espécies bacterianas e fúngicas que aguardam silenciosamente o momento de iniciar sua atividade destrutiva.

## Conclusões

Espécies de bactérias e fungos foram encontradas tanto no trono, como no ar, antes e após o processo de conservação e restauro. Os fungos *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium* sp. e *Absidia* sp. permaneceram mesmo após a limpeza.

Os micro-organismos identificados no Trono apresentaram bastante coerência com aqueles presentes nos ambientes onde o mesmo encontrava-se exposto até o presente momento, na sua maioria. Isso indica que parece não ter ocorrido contaminação cruzada com os micro-organismos existentes no meio externo ao seu ambiente de guarda e exposição.

## REFERÊNCIAS

- Zanatta, E. M., 'Subjetividade e objetividade: as decisões nos processos de conservação e restauração dos bens culturais', Tese de Doutorado, Universidade do Federal do Estado do Rio de Janeiro/UNIRIO e Museu de Astronomia e Ciências Afins/MAST, Rio de Janeiro (2017).
- Pasquarella, C.; Balocco, C.; Pasquariello, G.; Petrone, G.; Sacconi, E.; Manotti, P.; Ugolotti, M.; Palla, F.; Maggi, O.; Albertini, R., 'A multidisciplinary approach to the study of cultural heritage environments: Experience at the Palatina Library in Parma', *Science of the Total Environment* **536** (2015) 557-567, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.07.105>.
- Wenzel, M.; Schönig, I.; Berchtold, M.; Kämpfer, P.; König, H., 'Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*', *Journal of Applied Microbiology* **92**(1) (2002) 32-40, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01502.x>.
- Di Carlo, E.; Chisesi, R.; Barresi, G.; Barbaro, S.; Lombardo, G.; Rotolo, V.; Sebastianelli, M.; Travaagliato, G.; Palla, F., 'Fungi and bacteria in indoor cultural heritage environments: microbial-related risks for artworks and human health', *Environment and Ecology Research* **4**(5) (2016) 257-264, <https://doi.org/10.13189/eer.2016.040504>.
- Sterflinger, K.; Piñar, G., 'Microbial deterioration of cultural heritage and works of art – tilting at windmills?', *Applied Microbiology and Biotechnology* **97** (2013) 9637-9646, <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5283-1>.
- Akinyale, H. A., 'Isolation of bacteria with potential for production of thermostable extracellular cellulase from sawdust', Tese (Doutorado), Faculty of Science, University of

- Ibadan (2014).
7. Gerber, E.; Bernard, R.; Castang, S.; Chabot, N.; Coze, F.; Dreux-Zigha, A.; Hauser, E.; Hivin, P.; Joseph, P.; Lazarelli, C.; Letellier, G.; Olive, J.; Leonetti, J. P., 'Deinococcus as new chassis for industrial biotechnology: biology, physiology and tools', *Journal of Applied Microbiology* **119**(1) (2015) 1-10, <https://doi.org/10.1111/jam.12808>.
  8. Li, Q.; Zhang, B.; Yang, X.; Ge, Q., 'Deterioration-associated microbiome of stone monuments: structure, variation, and assembly', *Applied Environmental Microbiology* **84**(7) (2018) 2680-2687, <https://doi.org/10.1128/AEM.02680-17>.
  9. Johnson, T. A.; Sims, G. K.; Ellsworth, T. R.; Ballance, A. R., 'Effects of moisture and sorption on bioavailability of p-hydroxybenzoic acid to *Arthrobacter* sp. in soil', *Microbiological Research* **153**(4) (1999) 349-353, [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(99\)80049-4](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(99)80049-4).
  10. Mongodin, E. F.; Shapir, N.; Daugherty, S. C.; Deboy, R. T.; Emerson, J. B.; Shvartzbeyn, A.; Radune, D.; Vamathevan, J.; Riggs, F.; Grinberg, V.; Khouri, H.; Wackett, L. P.; Nelson, K. E.; Sadowsky, M. J., 'Secrets of soil survival revealed by the genome sequence of *Arthrobacter aurescens* TC1', *PLoS Genetics* **2**(12) (2006) 2094-2106, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020214>.
  11. Marvasi, M.; Vedovato, E.; Balsamo, C.; Macherelli, A.; Dei, L.; Mastromei, G.; Perito, B., 'Bacterial community analysis on the Mediaeval stained glass window "Natività" in the Florence Cathedral', *Journal of Cultural Heritage* **10**(1) (2009) 124-133, <https://doi.org/10.1016/j.culher.2008.08.010>.
  12. Suihko, M. L.; Alakomi, H. L.; Gorbushina, A.; Fortune, I.; Marquardt, J.; Saarela, M., 'Characterization of aerobic bacterial and fungal microbiota on surfaces of historic Scottish monuments', *Systematic and Applied Microbiology* **30**(6) (2007) 494-508, <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2007.05.001>.
  13. Gutarowska, B.; Skora, J.; Zduniak, K.; Rembisz, D., 'Analysis of the sensitivity of microorganisms contaminating museums and archives to silver nanoparticles', *International Biodeterioration & Biodegradation* **68** (2012) 7-17, <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.12.002>.
  14. Saarela, M.; Alakomi, H. L.; Suihko, M. L.; Maunuksela, L.; Raaska, L.; Mattila-Sandholm, T., 'Heterotrophic microorganisms in air and biofilm samples from Roman catacombs, with special emphasis on actinobacteria and fungi', *International Biodeterioration & Biodegradation* **54**(1) (2004) 27-37, <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2003.12.003>.
  15. Wang, W.; Ma, Y.; Ma, X.; Wu, F.; Ma, X.; An, L.; Feng, H., 'Diversity and seasonal dynamics of airborne bacteria in the Mogao Grottoes, Dunhuang, China', *Aerobiologia* **28**(1) (2012) 27-38, <https://doi.org/10.1007/s10453-011-9208-0>.
  16. Heyrman, J.; Swings, J., '16S rDNA Sequence analysis of bacterial isolates from biodeteriorated mural paintings in the Servilia Tomb (Necropolis of Carmona, Seville, Spain)', *Systematic and Applied Microbiology* **24**(3) (2001) 417-422, <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00048>.
  17. Lutterbach, M. T. S.; Oliveira, A.L.C.; Zanatta, E.; da Costa, A. C. A., 'A berlinda de aparato do imperador D. Pedro II: identificação de fungos em partes selecionadas e sua relação com biodeterioração e aerobiologia', *Conservar Patrimônio* **17** (2013) 59-72, <https://doi.org/10.14568/cp2013003>.
  18. da Costa, A. C. A.; Corrêa, F. N.; Lino, L. A. S.; Almeida, E. H. P.; Oliveira, A. L. C.; Lutterbach, M. T. S., 'Microbiological characterization of contaminating cells on scientific collections in a specialized library', *Annual Research & Review in Biology* **4** (2014) 3915-3931, <https://doi.org/10.9734/ARRB/2014/11395>.
  19. Kim, M. J.; Shin, H. K.; Choi, Y. S.; Kim, G. C.; Kim, G. H., 'An aeromycological study of various wooden cultural heritages in Korea', *Journal of Cultural Heritage* **17** (2016) 123-130, <https://doi.org/10.1016/j.culher.2015.05.001>.
  20. Coutinho, M. L.; Miller, A. Z.; Macedo, M. F., 'Biological colonization and biodeterioration of architectural ceramic materials: An overview', *Journal of Cultural Heritage* **16** (2015) 759-777, <https://doi.org/10.1016/j.culher.2015.01.006>.
  21. Ruga, L.; Orlandi, F.; Romano, B.; Fornaciari, M., 'The assessment of fungal bioaerosols in the crypt of St. Peter in Perugia (Italy)', *International Biodeterioration & Biodegradation* **98** (2015) 121-130, <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.12.010>.
  22. Do Campo, S.; Trigo, M. M.; Recio, M.; Melgar, M.; García-Sánchez, J.; Cabezudo, B., 'Fungal spore content of the atmosphere of the Cave of Nerja (southern Spain): diversity and origin', *Science of the Total Environment* **409** (2011) 835-843, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.10.048>.
  23. Porca, E.; Jurado, V.; Martín-Sánchez, P. M.; Hermosín, B.; Bastian, F.; Alabouvette, C.; Sáiz-Jiménez, C., 'Aerobiology: an ecological indicator for early detection and control of fungal outbreaks in caves', *Ecological Indicators* **11**(6) (2011) 1594-1598, <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2011.04.003>.
  24. Martín-Sánchez, P. M.; Bastian, F.; Alabouvette, C.; Saiz-Jimenez, C., 'Real-time PCR detection of *Ochroconis lascauxensis* involved in the formation of black stains in the Lascaux Cave, France', *Science of the Total Environment* **443** (2013) 478-484, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.026>.

RECEBIDO: 2019.7.16

REVISTO: 2020.8.03

ACEITE: 2020.9.24

ONLINE: 2020.11.4



Licenciado sob uma Licença Creative Commons

Atribuição-NãoComercial-SemDerivações 4.0 Internacional.

Para ver uma cópia desta licença, visite

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.pt>.