

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objectivos	4
2. MATERIAIS E MÉTODOS	4
2.1 Material pétreo seleccionado	4
2.1.1 Breve descrição petrográfica	5
2.2 Caracterização física	6
2.2.1 Absorção de água por capilaridade.....	7
2.2.2 Porosidade aberta acessível à água	7
2.2.3 Caracterização colorimétrica.....	7
2.3 Material biológico seleccionado para a inoculação das amostras pétreas	8
2.3.1 Determinação da concentração da clorofila <i>a</i> da cultura líquida e nos substratos pétreos	9
2.3.2 Inoculação e incubação das amostras pétreas	9
2.4 Monitorização do desenvolvimento dos microrganismos fotossintéticos por análise de imagem	10
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
3.1 Absorção de água por capilaridade.....	13
3.2 Porosidade aberta acessível à água.....	14
3.3 Caracterização colorimétrica	14
3.4 Observação macroscópica do biofilme fotossintético.....	15
3.5 Determinação da concentração da clorofila <i>a</i> da cultura líquida e nos substratos pétreos	17
3.6 Monitorização do crescimento dos microrganismos fotossintéticos por análise de imagem	17
4. CONCLUSÃO	24
5. BIBLIOGRAFIA	26
6. ANEXOS.....	29

1. INTRODUÇÃO

A degradação da pedra dos monumentos e edifícios históricos é um processo natural onde agentes físicos, químicos e biológicos estão envolvidos. As comunidades microbianas desenvolvem-se sobre a pedra e são de extrema importância na deterioração biológica ou biodeterioração. Estas comunidades incluem bactérias, cianobactérias, algas, fungos e líquenes [1,2]. De entre a comunidade microbiana destacam-se as algas e as cianobactérias por serem os primeiros colonizadores da pedra, pois devido à sua natureza fotoautotrófica apenas dependem da luz, dióxido de carbono e necessitam de poucos nutrientes para o seu desenvolvimento. O crescimento microbiano em cornijas, em orifícios e fendas ou debaixo de crostas, onde a água é retida, leva frequentemente à formação de biofilmes [2]. Os biofilmes têm uma espessura que varia entre poucos micrómetros e milímetros, e consistem numa comunidade microbiana, geralmente retida numa gelatinosa ou pegajosa matriz de polímeros extracelulares (*extracellular polymeric substances* - EPS) [1]. Os vários pigmentos existentes nas células são responsáveis pela coloração verde, vermelha, laranja ou amarela dos biofilmes [3,4]. Estes biofilmes são higroscópicos e conseguem absorver e reter a humidade da atmosfera, permitindo a sua manutenção mesmo em períodos mais secos.

Os microrganismos que habitam as rochas podem ser encontrados à superfície ou mais interiormente em poros ou fendas. Estes organismos designam-se por epilíticos, se viverem na superfície da rocha, ou endolíticos, se viverem no seu interior [1,5,6]. O microhabitat endolítico protege o biofilme da radiação solar intensa e da dissecação [7]. Dependendo das características físicas e químicas do substrato, o crescimento endolítico pode levar a problemas de degradação pétreo. Segundo Wakefield [4], um dos efeitos das algas e das cianobactérias na pedra é a formação de ácido carbónico que resulta da reacção entre o dióxido de carbono e a água, o que leva à degradação do substrato pétreo. Em adição, a produção de ácidos orgânicos como o ácido láctico, o ácido oxálico, o ácido succínico, o ácido acético, o ácido glicólico e o ácido pirúvico, têm sido encontrados e associados à dissolução da calcite em pedras calcárias.

Hoje em dia existem variados métodos para a quantificação do crescimento de biofilmes em substratos pétreos. Segundo vários autores [8,9,10], a quantificação da clorofila *a* por espectrofotometria tem sido usada para estimar biomassa fotossintética em amostras de água, no solo e em substratos pétreos [9]. No entanto, este método é destrutivo, na medida em que não permite quantificar o crescimento de um biofilme de uma mesma amostra ao longo do tempo. A espectrofluorimetria com adaptador de fibra óptica é um outro método que também já foi usado para o estudo do crescimento de biofilmes e este é

não destrutivo, mas possui a desvantagem da fluorescência dos materiais pétreos poderem mascarar a fluorescência da clorofila *a* [11]. A análise de imagem surge então como um método não destrutivo que permite seguir o crescimento de biofilmes à superfície dos materiais pétreos [12].

O desenvolvimento dos meios informatizados permitiu que também na área do Património Cultural, se verificassem mudanças e avanços substanciais no campo da documentação e análises. As técnicas utilizadas no passado (principalmente as fotográficas) foram superadas e actualmente a aquisição e tratamento digital das imagens, incorporam metodologias sistemáticas de aquisição de dados que permitem a gestão da informação, inatingível com os métodos tradicionais. A capacidade de adquirir imagens multiespectrais de superfícies possibilita o diagnóstico empregando métodos não invasivos, essenciais em projectos de conservação de bens culturais [13]. A técnica de análise de imagem apresenta grande utilidade na quantificação de biofilmes, no que respeita à avaliação da sua dimensão espacial e temporal [14, 12] e permite monitorizar o desenvolvimento de fenómenos de biodeterioração.

As operações de análise de imagem são usadas para extrair a informação codificada nas imagens digitais utilizando filtros para a detecção de detalhes, descorrelacionando os dados numéricos das diferentes bandas e efectuando medições para obter informação de carácter espacial. Estas possibilidades devem-se à sua estrutura matricial, pois contém mais informação que uma imagem analógica, em que a única informação explorável é do tipo colorimétrico e espacial. Uma das possibilidades que as operações de análise de imagem oferecem é perceber uma imagem por quantificação dos seus elementos, permitindo medir a dimensão dos objectos. No processamento de imagem digital, as operações de análise de imagem possuem um importante papel na interpretação de aplicações da imagem, elas convertem a imagem de forma visual numa forma descritiva, reconhecem e identificam o objecto [15].

Uma imagem pode ser definida por um conjunto de coordenadas (x,y,z) , onde (x,y) são coordenadas espaciais (plano), e (z) que descreve numericamente o nível digital [16]. A coordena (z) dá uma medida da reflectância que é o mesmo que a quantidade de radiação reflectida para um determinado comprimento de onda, que se codifica em diferentes tons de cinzentos. Uma imagem multibanda (Fig.1), ou multiespectral, é aquela que contém mais de um valor numérico de (z) associado às mesmas coordenadas (x,y) . Cada conjunto de coordenadas (x,y,z) constitui uma banda. Uma imagem multiespectral é composta por n bandas tal que $n \neq 1$ [17]. Assim, o carácter matricial das imagens digitais comporta dados não só de tipo quantitativo (percentagem de radiação medida ou reflectância), mas também

do tipo espacial, correspondendo às coordenadas (x,y) . Estas coordenadas serão assim as mesmas para um determinado pixel, variando apenas a coordenada (z) (reflectância) [17].

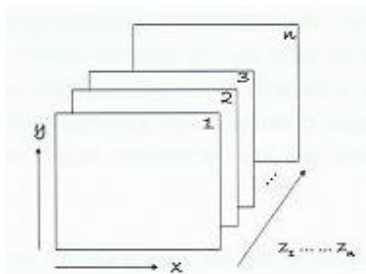


Fig.1 – Esquema de imagem multibanda, com n planos definidos por coordenadas cartesianas e o seu valor de reflectância medido em diferentes intervalos de comprimento de onda [17].

Os sensores remotos são aparelhos que permitem obter dados numéricos de uma superfície sem estar em contacto com ela. As câmaras fotográficas digitais podem assim entender-se como um sensor remoto que capta dados de reflectância no intervalo de comprimentos de onda visíveis pelo olho humano. O produto destes sensores é uma imagem digital composta pela combinação de três bandas RGB (Red Green Blue), que reproduzem a reflectância em três intervalos de diferente comprimento de onda: o intervalo entre 400 e 500 nm (banda azul), o compreendido entre 500 e 600 nm (banda verde) e o intervalo entre 600 e 700 nm (banda vermelha). A reflectância medida codifica-se em 256 valores que correspondem a tons de cinzentos, onde o 0 corresponde ao preto e o 255 ao branco [17].

Em muitos casos, as imagens digitais apresentam valores altamente correlacionados entre si nas diferentes bandas que a compõem. Isto traduz-se numa dificuldade para a visibilidade dos distintos elementos relevantes da imagem. Para evitar estes problemas, desenvolveram-se métodos de decorrelação [18,19]. Entre estes, a Análise de Componentes Principais (PCA) mostrou ser uma ferramenta muito útil, que pode ser utilizada para a discriminação de elementos aparentemente ocultos nas imagens [20,21,22], em especial as Componentes Principais minoritárias [23]. O objectivo da PCA é simplificar as imagens reduzindo um conjunto de dados nas diferentes bandas da imagem, decorrelacionando-os e eliminando a informação redundante [23]. Esta abordagem foi utilizada para melhorar a visualização de motivos artísticos em rochas, em imagens altamente correlacionadas [17], e registar elementos separadamente diferentes (de diferente natureza e composição) presentes em pinturas murais [23].

Recentemente foram publicados alguns estudos onde utilizaram o sistema de análise de imagem [20,21,22,23,24,25,26,27], um deles correlaciona os resultados obtidos por análise de imagem e as medições da densidade óptica na determinação da biomassa de bactérias

[24]. Hauer e Jirka [25] estudaram o crescimento de uma cultura de algas em placas de Petri, através de análise de imagem, usando o programa ImageJ. Também Solé *et al.* [26] usou este programa para determinar a biomassa de cianobactérias em sedimentos bênticos estratificados através de CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy).

1.1 Objectivos

Os principais objectivos deste trabalho são:

1. Caracterização petrofísica de três rochas sedimentares: calcário Ançã (Portugal), *pedra de San Cristóbal* (Espanha) e *pietra di Lecce* (Itália), presentes em património cultural de países da Bacia do Mediterrâneo. Nesta caracterização apenas foram seleccionadas propriedades relacionadas com a cor e a circulação de água nos substratos pétreos.
2. Levantamento do estado actual do conhecimento relativo à técnica de análise de imagem aplicada ao crescimento de biofilmes.
3. Monitorização através de análise de imagem, do crescimento de um biofilme sobre os três substratos líticos anteriormente referidos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo apresenta os materiais utilizados e a metodologia adoptada para o estudo das propriedades dos substratos pétreos e do crescimento do biofilme fotossintético. O trabalho experimental foi realizado no Departamento de Conservação e Restauro da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa e no *Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla - Consejo Superior de Investigaciones Científicas* (IRNAS-CSIC).

2.1 Material pétreo seleccionado

Os litótipos seleccionados para estudo correspondem a 3 variedades calcárias originárias de 3 países da Bacia Mediterrânica. Trata-se de materiais que possuem características petrofísicas distintas. Estes materiais pétreos são representativos do património cultural construído de onde afloram: o calcário Ançã (Portugal), a *pedra de San Cristóbal* (Espanha) e a *pietra di Lecce* (Itália).

Os ensaios de caracterização petrofísica foram efectuados em 27 provetes cilíndricos ($\varnothing=4,4$ cm e $L=2$ cm) de cada litótipo. Foi levada em conta a estratificação natural da rocha e os provetes encontram-se orientados perpendicularmente à estratificação na sua dimensão longitudinal.

2.1.1 Breve descrição petrográfica

Calcário Ançã (CA): variedade com presença significativa em monumentos da região centro de Portugal, podendo dar-se como exemplo da aplicação a Igreja de Santa Cruz e a Porta Especiosa da Sé-Velha de Coimbra [28]. Desde o século XIV, tem vindo a ser preferida por escultores devido à sua cor clara, sem veios e a ser muito macia, logo fácil de trabalhar. As obras realizadas encontram-se por todo o Portugal, em grande parte de Espanha e chegaram a toda a Europa. Este calcário da idade Bajociana-Batoniana, possui um amplo afloramento localizado na Beira Litoral, distrito de Coimbra, nas proximidades das localidades de Cordinhã, Zambujeiro e Ançã [29].

O calcário Ançã caracteriza-se por ser uma rocha carbonatada estratificada. Segundo Dionísio [29], a análise química permite caracterizar o calcário de Ançã como um calcário puro, tendo um teor em CaCO_3 superior a 96,5%. A sua cor varia entre o branco, branco-amarelado e o cinzento. É uma rocha homogénea, de grão muito fino, de tendência oolítica. Composta por uma matriz micrítica, são frequentes bioclastos de reduzida espessura (inferior a 500 μm), contém cimento micrítico muito pouco espatizado. A sua reduzida resistência mecânica e dureza (rocha riscável à unha) apresentam-se como sendo as características mais marcantes desta rocha. O calcário Ançã estudado neste trabalho foi extraído da Pedreira d'El Rei - Portunhos, concelho de Cantanhede (Coimbra).

Piedra de San Cristóbal (SC): faz parte de um afloramento do Miocénico Superior no sul de Espanha. Está presente na *Iglesia del Salvador* de Sevilha e na Catedral de Sevilha. O litótipo utilizado neste estudo foi extraído de uma pedreira do *Puerto de Santa María* em *Cádiz*, de onde se retirou bastante material para a edificação da catedral, desde o seu início em 1403, e durante as seguintes etapas de construção (séculos XVI a XVIII). Este calcário está presente nas *Portadas del Bautismo y del Nacimiento*, na *Capilla Real*, e na maior parte da catedral [30].

Caracteriza-se por ser uma rocha calcarenítica esparítica mais ou menos bioclástica, de textura heterogénea inequigranular, com escassa matriz esparítica e baixo grau de cimentação, o que ocasiona porosidade intergranular muito desenvolvida, com poros médios

a grandes, irregulares, interligados ou não, assim como poros móldicos [31]. Possui granulometria média (de 1 a 2 mm) e descreve-se como sendo branda e frágil, desagregando-se facilmente os seus grãos [32]. Um estudo de caracterização petrográfica levado a cabo pelo Departamento de Geologia da Universidade de Oviedo, caracteriza a *pedra de San Cristóbal* como um calcário fossilífero (biocalcarenítico). Possui uma cor amarelada ao corte na pedreira, e acinzentada em superfícies expostas às condições atmosféricas. A sua textura é granular, ressaltando a presença de abundantes restos fósseis [30].

Pietra di Lecce (PL): Proveniente da cidade mais importante da região de Salento, no sudeste da Itália. Este calcário datado do período Miocénico, foi muito utilizado no período Barroco Tardio entre os séculos XV e XVII. Está presente na maioria dos monumentos, mansões e casas particulares no centro histórico da cidade de Lecce.

A *pietra di Lecce* é um biocalcarenito que apresenta grande variabilidade petrográfica, dependente da cota a que é feita a sua extracção [33]. Do ponto de vista petrográfico é no geral um calcarenito organogénico, de grão fino e homogéneo, de cor bege, composto essencialmente por micro-fósseis (foraminífera), numa matriz micritica. Esta rocha é caracterizada pela presença de minerais argilosos (varia entre 3% a 12%). É quase exclusivamente composta por bioclastos, em geral inferiores a 100 µm, incluindo numa matriz micritica muito perfeita. A escassa cimentação faz com que exista elevada porosidade, com dimensão das cavidades compreendida essencialmente entre 1 a 10 µm, possui baixa durabilidade, devido às suas características intrínsecas. A *pietra di Lecce* utilizada neste trabalho foi extraída da pedreira de *Cursi* em Lecce.

2.2 Caracterização física

Neste ponto foram seleccionados ensaios relacionados com a circulação da água, pois o seu estudo nos materiais pétreos é fundamental aquando da elaboração do diagnóstico e da intervenção no património cultural. Os ensaios hídricos ajudam a compreender o comportamento em obra dos materiais pétreos em presença de água. Na maior parte dos casos, os processos de alteração dependem da circulação de água ou soluções salinas no meio poroso, pelo que estes ensaios são importantes para conhecer a alterabilidade e durabilidade das rochas. Acresce que a água é também um dos principais factores que influenciam o crescimento de microrganismos em substratos pétreos. A colonização da

pedra por microrganismos fotossintéticos, tais como, as algas e cianobactérias, está numa larga extensão associada à disponibilidade de água na superfície da pedra.

Neste estudo foram realizados os ensaios para determinação da absorção de água por capilaridade e da porosidade aberta acessível à água.

2.2.1 Absorção de água por capilaridade

O ensaio da absorção de água por capilaridade tem como objectivo seguir a cinética de embebição capilar respeitante ao volume de água absorvido pelo provete ao longo do tempo [26]. Esta absorção de água é fortemente condicionada pelas características intrínsecas das rochas, dependendo do tipo e da distribuição dos seus vazios. O procedimento experimental efectuado seguiu a metodologia descrita na pré-Norma Europeia (CEN) prEN 1925 [34] e encontra-se descrito no Anexo I.

Ao coeficiente de proporcionalidade existente entre \sqrt{t} (sendo t , o tempo) e a quantidade de água absorvida, dá-se o nome de coeficiente de absorção de água por capilaridade ($\text{g/m}^2 \cdot \text{s}^{-1/2}$). Este coeficiente é a medida de capacidade de sucção de um material [26] e traduz-se pelo declive da recta obtida.

2.2.2 Porosidade aberta acessível à água

A porosidade aberta refere-se aos vazios intercomunicantes de uma rocha e é designada por N_0 . No estudo da alterabilidade de rochas a porosidade aberta tem importância de relevo, pois refere-se aos vazios que facilitam a circulação dos fluidos (ar e água) [28]. O procedimento experimental efectuado seguiu a metodologia recomendada pela prEN 1936 [35] e encontra-se descrito no Anexo II.

2.2.3 Caracterização colorimétrica

A cor de um objecto distingue-se pela forma, tamanho, posição, ou brilho que depende da composição espectral da luz incidente, da intensidade com que reflecte ou da transmitância do objecto, dos tipos de observador, do iluminante e da geometria óptica de visualização.

A cor pode ser medida por comparação de cores padrão através de um instrumento designado espectrofotómetro. Este aparelho quantifica a emissão da radiação, transformando os valores em coordenadas, através de um sistema normalizado.

No trabalho realizado foi utilizado o sistema CIELAB, que quantifica a cor a partir de três parâmetros L^* , a^* e b^* . Neste sistema a cor é determinada num espaço tridimensional representado por três eixos. O eixo do z é representativo da coordenada L^* , que mede a luminosidade (100 = claro, 0 = escuro). O plano XY representa a coordenada a^* , que mede a posição no eixo verde – vermelho. Por fim a coordenada b^* mede as variações no eixo azul – amarelo.

Efectuaram-se 3 medições aleatórias em cada provete. O equipamento utilizado foi um *Minolta Spectrophotometer* de modelo CM - 508i. As condições de medição foram efectuadas segundo o iluminante D65, tipo de observador de 2°, e com área de medição de 8 mm de diâmetro. Cada valor registado por este equipamento correspondeu à média de 8 medições.

2.3 Material biológico seleccionado para a inoculação das amostras pétreas

O material biológico utilizado para a inoculação das amostras pétreas consiste numa cultura de um biofilme fotossintético, recolhido da fachada Norte do Mosteiro de Santa Clara-a-Velha (Coimbra). Este biofilme foi previamente caracterizado (Tabela 1) por técnicas de biologia molecular no IRNAS-CSIC no âmbito de outro trabalho [36] e posteriormente cultivado em laboratório em meio de cultura BG11 comercial (NORMAL 9/88 [37]) e com circulação de ar, através de uma bomba de ar.

Tabela 1 – Espécies fotossintéticas identificadas por biologia molecular presentes no biofilme coligido no Mosteiro de Santa-Clara-a-Velha.

Algas	Cianobactérias
<i>Chlorella</i> sp.	<i>Leptolyngbya</i> sp.
<i>Stichococcus</i> sp.	<i>Pleurocapsa</i> sp.
<i>Trebouxia</i> sp.	
<i>Myrmecia</i> sp.	

2.3.1 Determinação da concentração da clorofila *a* da cultura líquida e nos substratos pétreos

A quantificação da clorofila *a* foi efectuada na cultura líquida a inocular. Este método foi utilizado para estimar a biomassa presente e foi efectuado seguindo o procedimento descrito por Shoaf e Lium [38] e Burnison [39], cujo protocolo é apresentado no Anexo III. Com o objectivo de quantificar a biomassa presente do biofilme fotossintético nas amostras pétreas, mediu-se a concentração da clorofila *a* no final de cada mês, através do método espectrofotométrico em 3 amostras de cada litótipo. Seguiu-se o procedimento descrito por Vollenweider [40] e as equações de Lorenzen [41] que se encontram descritos no Anexo IV. Nas leituras espectrofotométricas utilizou-se o aparelho *Perkin Elmer, Lambda 35 UV/Vis Spectrometer*.

2.3.2 Inoculação e incubação das amostras pétreas

Dez amostras de cada litótipo foram esterilizadas em autoclave (à temperatura de 120°C durante 15 min), secas em estufa (à temperatura de 55°C durante 2 dias) e arrefecidas em exsiccador. Cada provete foi inoculado com 750 µL de cultura do biofilme. Durante o processo de inoculação a cultura líquida encontrava-se sobre agitação mecânica para a sua homogeneização.

Depois de inoculadas as amostras pétreas foram colocadas numa câmara de incubação (Fig.2) a 21°C e 1200 lux. A câmara foi elaborada em vidro acrílico, revestida a papel opaco e equipada com 3 lâmpadas fluorescentes na tampa adequadas à realização de fotossíntese (Fluora L30 W/77, Osram), e ligadas a um temporizador com ciclos de 12 h. Os litótipos foram colocados sobre estrados de plástico que cobrem o fundo da câmara, e adicionaram-se 20 L de água esterilizada, até perfazer aproximadamente um terço da altura das amostras. A câmara possui ainda uma bomba de água que faz com que haja agitação do fluxo de água e mantém o ambiente húmido no seu interior.

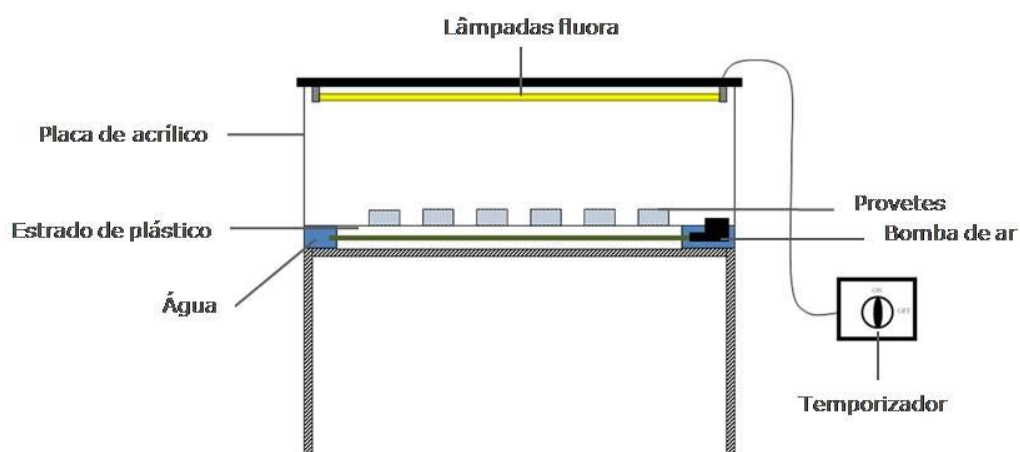


Fig.2 – Câmara de incubação em material acrílico.

2.4 Monitorização do desenvolvimento dos microrganismos fotossintéticos por análise de imagem

As superfícies das amostras foram fotografadas semanalmente durante 3 meses, no final dos quais uma amostra do calcário SC foi cortada transversalmente.

Após 6 meses de incubação efectuou-se um corte transversal numa amostra de cada um dos calcários. Estas amostras foram examinadas ao microscópio binocular (Zeiss Discover V8 com fototubo) e fotografadas (Canon Powershot A630). Utilizou-se a análise de imagem por meio da Análise de Componentes Principais (PCA) para verificar a existência do crescimento do biofilme fotossintético no interior dos calcários. As imagens dos litótipos em corte transversal foram submetidas à correcção do cromatismo, através da função *auto contrast* no programa Adobe® Photoshop® CS2. Depois foram classificadas a partir do cubo de imagem gerado com as três bandas obtidas mediante PCA (PC1, PC2, PC3). A classificação consiste na atribuição a um conjunto de pixéis, a que se chama classe, o valor de um determinado pixel [17]. A PCA foi efectuada utilizando o software HyperCube 9.5 (US Army Topographic Engineering Centre, Alexandria, Virginia, USA). A imagem original foi convertida numa imagem multibanda em falsa cor, composta por três bandas RGB às quais corresponde uma Componente Principal. O estudo da PCA baseia-se na possibilidade de reduzir dados redundantes em imagens altamente correlacionadas e permite a composição de imagens em falsa cor com as bandas obtidas por este tratamento estatístico [23]. Esta metodologia teve como base os estudos de Rogerio-Candelera [17,23].

O desenvolvimento dos microrganismos à superfície do CA foi realizado utilizando amostras de um outro ensaio semelhante. Nesse ensaio foi utilizada a mesma cultura de microrganismos fotossintéticos, porém variaram as condições de incubação: as amostras foram colocadas dentro de caixas de Petri com água esterilizada no fundo, e estiveram em condições de luz contínua, numa câmara de incubação à temperatura de 20°C. Estes provetes de CA foram fotografados periodicamente com uma câmara fotográfica digital (Nikon Coolpix 4300). O presente estudo, efectuado por meio de análise de imagem, seguiu o protocolo de um estudo do crescimento microbiano numa gruta romana, realizado anteriormente por Rogerio-Candelera [12]. Para efectuar o estudo do crescimento seleccionou-se um ponto único em cada provete, que fosse significativo de determinadas acumulações de células, que se destacavam a olho nú (ver Anexo V). A primeira medição iniciou-se após o momento da inoculação e periodicamente, uma vez por semana, recolhendo os valores durante 3 meses, resultando numa sequência de imagens relativamente semelhantes. Apesar disso, as imagens originais estão sujeitas a uma certa variabilidade devido à alteração ocasional das relações geométricas entre o objecto real e a câmara fotográfica, e certas diferenças na iluminação. Deste modo, para poder efectivar a análise de modo fiável, foi necessário efectuar um certo grau de homogeneização das imagens, de maneira a que sejam comparáveis entre si, tanto do ponto de vista da geometria interna como do leque espectral das mesmas [23]. Estas são operações que afectam apenas a componente espacial da imagem, ou seja as coordenadas x e y, não alterando o valor da coordenada z. A correcção geométrica das fotografias foi levada a cabo utilizando o software informático Adobe® Photoshop® CS2. A possibilidade deste software permitir reconstruir a geometria e elaborar assim ortofotografias a partir de imagens não calibradas, foi destacada por Mark e Billo [42]. O resultado destas transformações é um arquivo multilayer em formato *.psd*, no qual cada *layer* corresponde a cada um dos estados de tempo (Fig.3).

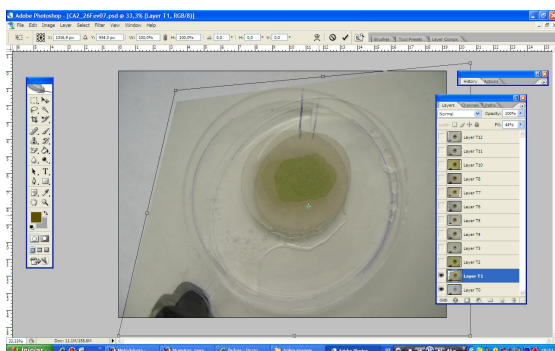


Fig.3 – Utilização do programa Adobe Photoshop CS2 na função *Transform – Distort* para efectuar a correcção geométrica das imagens.

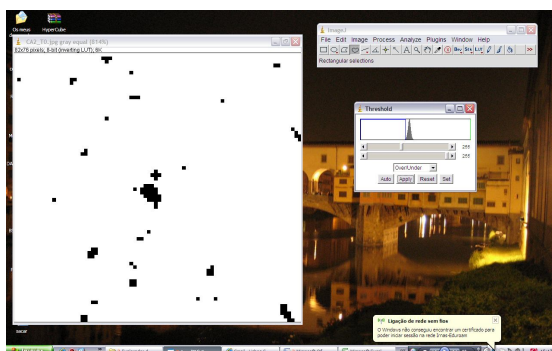


Fig.4 - Conversão da imagem de 8 bits em binária para efectuar a medição da área do biofilme em mm², CA1 após 3 meses.

A segunda etapa define-se em correcções radiométricas (ou homogeneização) as quais dizem respeito à modificação dos valores originais da coordenada z, alterando os valores da reflectância codificados no pixel. As imagens são convertidas em escala de cinzentos, os diferentes tons de cinzentos são directamente comparados entre si, pois estão relacionados com a densidade relativa da cor presente nas fotografias originais [16]. Nesta conversão utilizou-se o programa HyperCube v 8.5 (US Army Topographic Engineering Centre).

Para a quantificação da área colonizada procedeu-se à medição de formas (Fig.4). Estas são medições de dimensão física que caracterizam a aparência do objecto que pode ser um tanto abstracta. Neste contexto, a área significa a área dos pixels do interior do objecto. Esta é computorizada como o total do número de pixels e inclui os limites do objecto, o resultado é a medida do seu tamanho [15].

No protocolo utilizado neste trabalho, as imagens de 8 bit são em primeiro lugar escaladas e convertidas em imagens binárias por meio da definição de um limiar (*threshold*). As áreas colonizadas foram medidas e comparadas utilizando o programa *software* ImageJ (National Institutes of Health, Rockville, Maryland, USA). Aplicando a função *Analyse particles*, a área de interesse é individualizada e quantificada, obtendo-se o valor numérico em milímetros quadrados. ImageJ é um processador de imagem em Java que consegue calcular o valor da área e do pixel seleccionado pelo utilizador e é capaz de medir distâncias, ângulos e criar gráficos estatísticos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Absorção de água por capilaridade

Os resultados obtidos pelo coeficiente de absorção de água por capilaridade (ver Anexo VI) mostram que o calcário SC é o que possui maior predisposição para absorver água, com o valor médio de $199,30 \text{ g/m}^2 \cdot \text{s}^{-1/2}$, efectuando assim uma cinética mais rápida. As irregularidades, os poros e toda a sua heterogeneidade fazem com que o desvio padrão seja elevado ($31,05 \text{ g/m}^2 \cdot \text{s}^{-1/2}$). De seguida observa-se a PL e o CA com um coeficiente de capilaridade de $128,76 \text{ g/m}^2 \cdot \text{s}^{-1/2}$, e $57,26 \text{ g/m}^2 \cdot \text{s}^{-1/2}$, respectivamente.

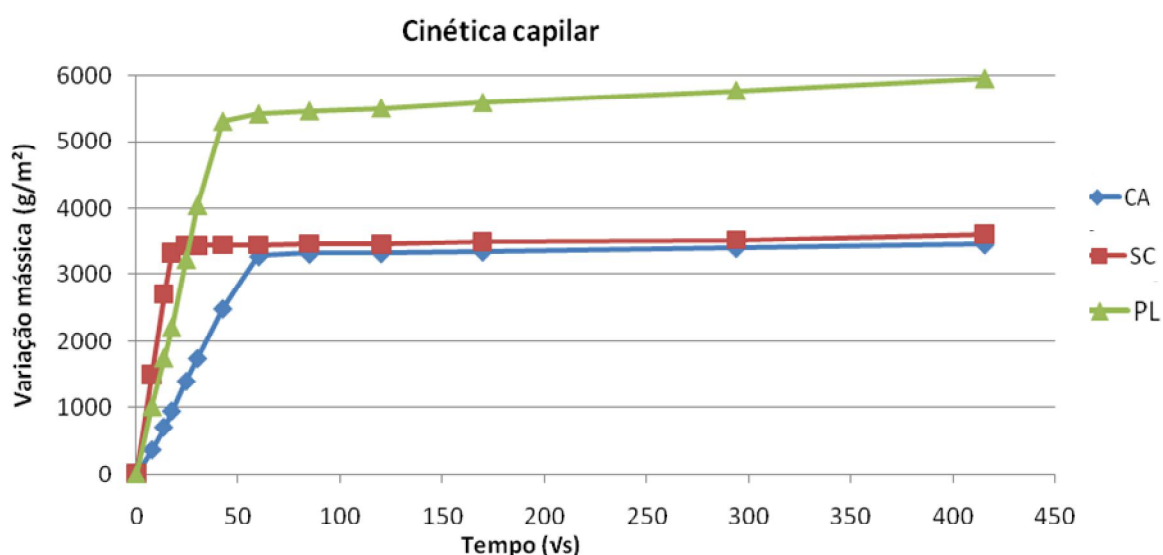


Fig.5 - Curvas típicas representativas da cinética capilar dos 3 litótipos.

Observando o gráfico da figura 5, podemos ver a semelhança da cinética de sucção capilar dos materiais pétreos em análise. Verifica-se que o calcário SC e o CA apresentam valores próximos de variação mássica, contudo apresentam diferentes cinéticas. O SC apresenta uma cinética muito mais rápida do que o CA e que o PL. Observa-se que o calcário PL absorve maior quantidade de água, obtendo valores mais elevados de variação mássica. A capacidade de absorção de água nos materiais pétreos está directamente ligada com a porosidade e a permeabilidade de cada litótipo.

3.2 Porosidade aberta acessível à água

Pela análise da tabela 3 observa-se que a PL possui o valor mais elevado de porosidade aberta (43,24%) seguida do calcário SC e do CA, com 28,07% e 18,95% respectivamente.

Tabela 3 - Valores da média, desvio padrão, mínimo e máximo, resultantes do ensaio de porosidade aberta acessível à água.

Porosidade aberta acessível à água (%)			
	Calcário Ançã	<i>Piedra de San Cristóbal</i>	<i>Pietra di Lecce</i>
Média	18,95	28,07	43,24
Desvio Padrão	0,27	1,88	0,68
Mínimo	18,28	23,21	41,84
Máximo	19,44	30,75	44,70

Nem sempre os valores de capilaridade são análogos aos da porosidade, este facto pode ser explicado se tivermos em conta a morfologia do meio poroso, em especial a tortuosidade e a conexão dos seus poros. Neste caso, verificamos que a morfologia do calcário SC favorece a cinética de absorção de água, em relação aos outros calcários. Porém, a sua porosidade é inferior à PL, que por sua vez absorve uma maior quantidade de água, conforme se verificou no ensaio anterior.

3.3 Caracterização colorimétrica

As rochas calcárias estão normalmente associadas a cores claras, no entanto existem pequenas variações de tonalidade que assumem um significado relevante no conteúdo estético da obra, e que faz com que cada edifício atinja uma singularidade única. No ensaio de colorimetria obtiveram-se os resultados observados na tabela 4.

Tabela 4 - Valores da média, desvio padrão, mínimo e máximo, resultantes da análise colorimétrica dos parâmetros L*, a* e b*.

	Colorimetria								
	Calcário Ançã			<i>Piedra de San Cristóbal</i>			<i>Pietra di Lecce</i>		
	L*	a*	b*	L*	a*	b*	L*	a*	b*
Média	82,90	1,09	10,28	80,96	1,49	13,79	81,25	1,06	16,15
Desvio Padrão	0,31	0,11	0,56	1,06	0,23	1,02	0,61	0,35	0,71
Mínimo	82,04	0,76	9,07	78,17	1,10	11,85	78,74	0,48	14,94
Máximo	83,60	1,37	11,84	83,33	2,03	16,55	82,39	2,15	17,98

Estes calcários possuem valores muito semelhantes nos parâmetros em análise principalmente no L* e no a*. No parâmetro b* que mede as variações no eixo amarelo-azul, observa-se que a PL é mais amarelada das três pedras, seguido do calcário SC e por fim o CA.

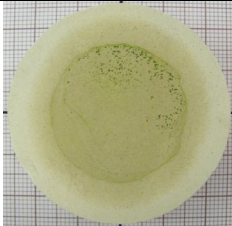
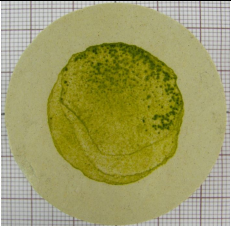
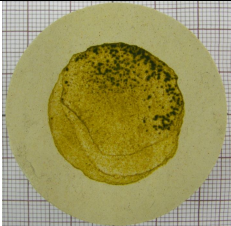
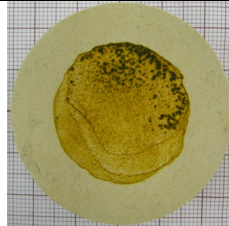




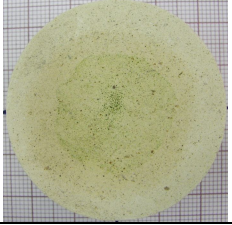
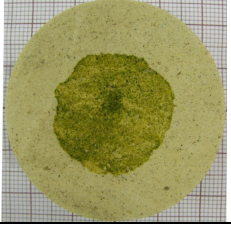
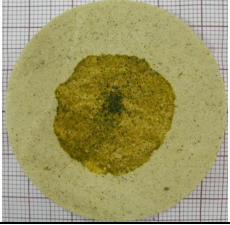
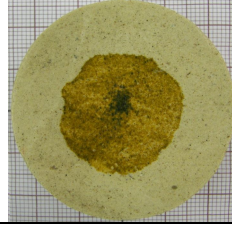
3.4 Observação macroscópica do biofilme fotossintético

As imagens da tabela 5 mostram o comportamento do biofilme no momento da inoculação, depois de um, dois e três meses de incubação na câmara em laboratório. No momento da inoculação, a forma de absorção da cultura líquida influencia a distribuição do biofilme na superfície da pedra. Isto ocorre de diferentes formas nos 3 litótipos e está directamente ligado com as propriedades físicas de cada um. Quando a cultura líquida foi inoculada no calcário SC a presença de poros grandes fez com que a absorção decorresse muito rapidamente. A elevada absorção capilar ($199,30 \text{ g/m}^2 \cdot \text{s}^{-1/2}$) e porosidade do SC (28,07%) está relacionada com o tempo de penetração do inoculo nesta pedra. Nas superfícies dos calcários CA e PL, após a inoculação, observa-se a presença de uma mancha verde na superfície indicando que o biofilme não foi totalmente absorvido como parece ter acontecido no calcário SC.

Nos calcários CA e PL observa-se a existência de crescimento durante o primeiro mês, onde se observou o aumento da coloração verde do biofilme nas superfícies. O rápido crescimento da biomassa fotossintética nas superfícies do CA e do PL, durante o primeiro mês, parece ter sido devida à presença de meio de cultura, que continha nutrientes

necessários para o desenvolvimento de microrganismos. Pois nos restantes meses nota-se a alteração de cor da clorofila *a* passando de verde para um tom acastanhado o que indica a degradação da clorofila *a*, ou seja, ausência de crescimento do biofilme. O desaparecimento da coloração verde pode ser atribuído à falta de nutrientes da cultura líquida e a uma adaptação negativa ao novo tipo de nutrientes fornecidos pelos materiais de rocha. As condições de exposição têm também influência no desenvolvimento de comunidades fototróficas. Após dois meses de incubação todas as superfícies adquiriram uma cor acastanhada, este facto pode estar relacionado com a intensidade da luz dentro da câmara, que poderá ter funcionado como um agente fotoinibidor do crescimento do biofilme à superfície dos calcários. Esta alteração de cor pode também ser atribuída à adaptação cromática dos processos fotossintéticos como consequência de novas condições de exposição.

Tabela 5 – Fotografias da superfície dos litótipos durante os 3 meses de incubação.

Litótipo	Inoculação	Após 1 mês de incubação	Após 2 meses de incubação	Após 3 meses de incubação
CA				
SC				
PL				

3.5 Determinação da concentração da clorofila *a* da cultura líquida e nos substratos pétreos

O resultado da concentração da clorofila *a* da cultura líquida antes da inoculação foi de 2,9 mg Chl*a*/L (Anexo VII). A quantificação da clorofila *a* dos substratos pétreos (Anexo VII) foi realizada no final de cada mês (Fig.6). A biomassa fotossintética determinada pelo método espectrofotométrico mostra diferenças nos três litótipos. Nos calcários CA e PL observou-se uma redução da biomassa no segundo e terceiro mês de incubação. No calcário SC o valor da concentração da clorofila *a* baixou um pouco no segundo mês mas aumentou bastante no terceiro, atingindo o valor de 2,43 µg/cm², o que indica a existência de um aumento de biomassa neste substrato lítico. No entanto, não se observou aumento da biomassa à superfície ao final de 3 meses, como se pode ver pelas fotografias da tabela 5. Este facto chamou a atenção para a possibilidade de existência de crescimento endolítico neste substrato.

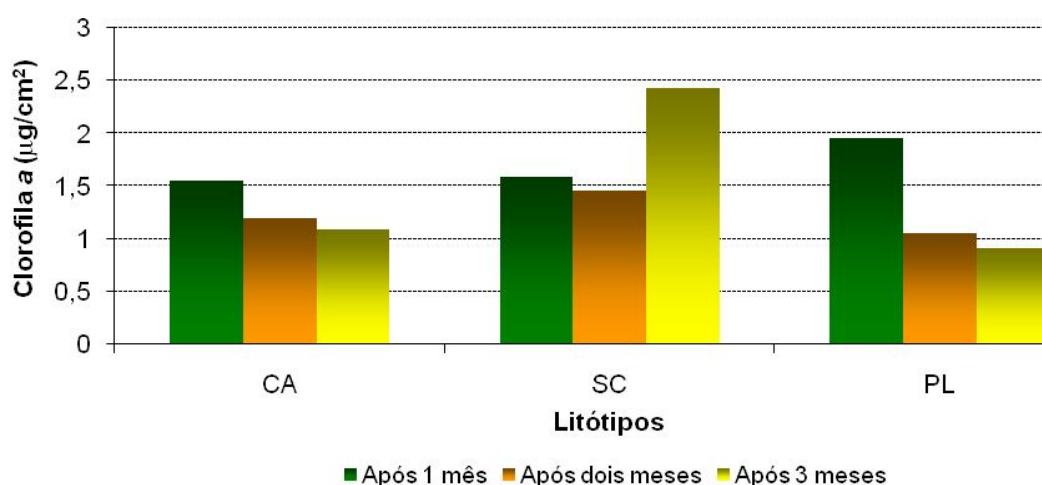


Fig.6 - Concentração da clorofila *a* dos substratos pétreos determinada no final do 1º, 2º e 3º mês de incubação.

4.6 Monitorização do crescimento dos microrganismos fotossintéticos por análise de imagem

O crescimento endolítico, após 3 meses de incubação, no calcário SC foi confirmado através da análise de imagem de um corte transversal de um provete (Fig. 7). Na fotografia original (Fig.7A) observa-se a presença de uma fina e ténue banda verde, enquanto que na imagem em falsa cor (Fig.7B), obtida pela PCA (PC1, PC3, PC3), evidencia-se a azul, o crescimento

endolítico. Esta análise permitiu ainda determinar a profundidade de penetração dos microrganismos no interior da pedra (3 mm).

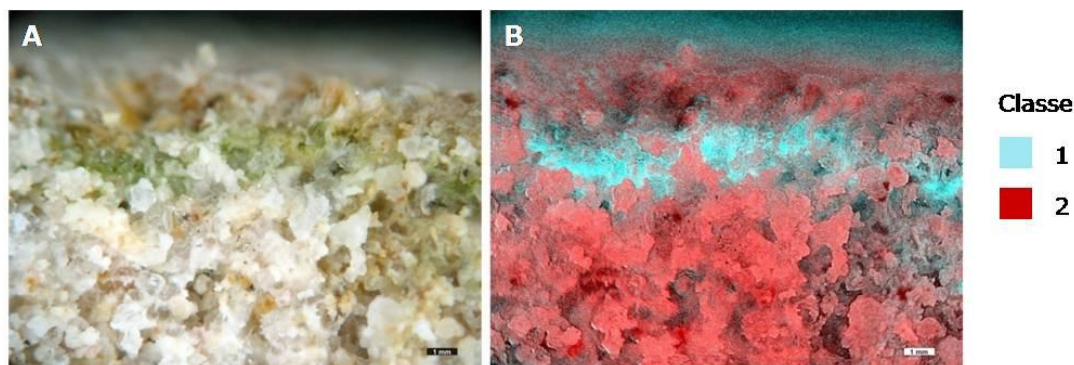


Fig.7 - Corte transversal da *pedra de San Cristóbal* após 3 meses de incubação. **A.** Imagem original. **B.** Imagem em falsa cor obtida pela Análise de Componentes Principais (PC1, PC3, PC3) de modo a evidenciar a o crescimento endolítico do biofilme fotossintético. Classes: (1) biofilme fotossintético, (2) substrato pétreo. Escala = 1 mm. (Imagens de Rogerio-Candeleria [27])

Após 6 meses de incubação efectuaram-se cortes transversais nos três calcários para estudar através de análise de imagem. No calcário de SC a aplicação da PCA resulta em 3 bandas (Fig.8) as quais foram usadas na elaboração da imagem em RGB (Fig.9). Cada componente possui uma determinada quantidade de informação que se vai reduzindo da primeira até à terceira componente (Fig.8). Assim a primeira Componente Principal (PC1) é a que reúne mais e informação (97,70%) e é chamada de componente maioritária, enquanto que a segunda e a terceira são as componentes minoritárias uma vez que a percentagem de informação retida é muito pequena.

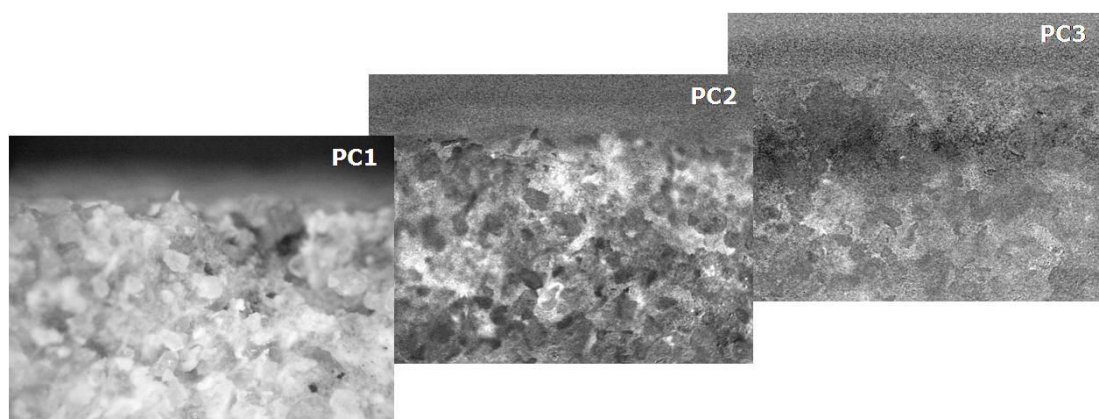


Fig.8 – Corte transversal da *pedra de San Cristóbal*. Bandas resultantes da Análise de Componentes Principais, cada uma corresponde a uma Componente Principal.

A figura 9B mostra uma imagem em falsa cor do calcário SC utilizando as 3 Componentes Principais (PC1,PC2,PC3), pertencendo cada uma às bandas RGB. Para a detecção do biofilme fotossintético utilizaram-se apenas as componentes minoritárias (PC3, PC2, PC2): a PC3 com 0,39% de informação (na banda vermelha) e duas vezes a PC2 com 1,90% de informação (nas bandas verde e azul). No resultado final (Fig.9C), o biofilme fotossintético apresenta-se a cor azul claro, no interior do substrato pétreo que é representado a cor vermelha. Através da análise desta imagem verificou-se um ligeiro aumento na profundidade de penetração endolítica em determinadas zonas do calcário SC, atingindo cerca de 5 mm.

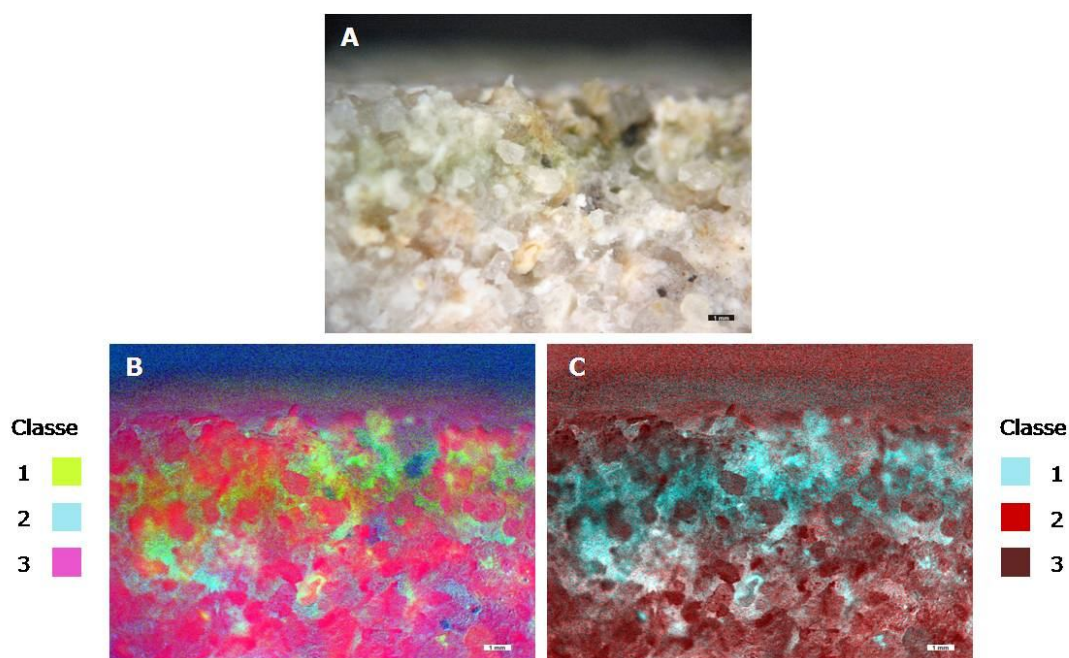


Fig.9 – Corte transversal da *pedra de San Cristóbal* após 6 meses de incubação. **A.** Imagem original. **B.** Imagem em falsa cor (PC1, PC2, PC3). Classes: (1) biofilme fotossintético, (2) poros vazios, (3) substrato pétreo. **C.** Imagem em falsa cor (PC3, PC2, PC2). Classes: (1) biofilme fotossintético, (2) substrato pétreo, (3) pormenores de grãos. Escala = 1 mm.

Através da PCA também se detectou crescimento endolítico no calcário PL (Fig.10). Utilizou-se a PC2 com 1,60% de informação (na banda vermelha) e duas vezes a PC3 com 0,61%, (nas bandas verde e azul) (PC2, PC3, PC3) (Fig.11C). Assim, a vermelho está representado o biofilme com a profundidade de penetração 3 mm, e a azul claro o substrato pétreo (Fig.11C). Neste calcário, os valores da concentração clorofila *a* decresceram durante os 3 primeiros meses, contudo a elevada porosidade desta pedra (43,24% de porosidade aberta)

permitiu que algumas células penetrassem no substrato dando origem a um crescimento endolítico ao final de 6 meses.

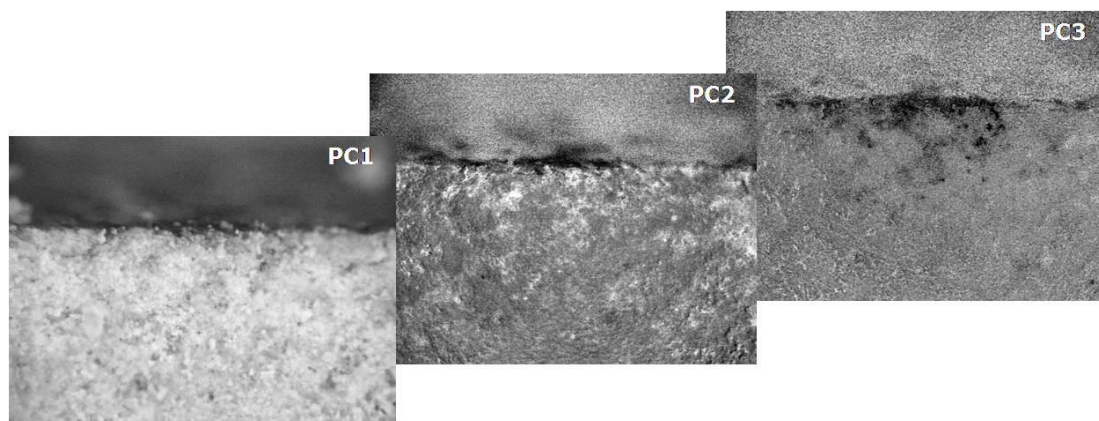


Fig.10 – Corte transversal da *pietra di Lecce*. Bandas resultantes da Análise de Componentes Principais, cada uma corresponde a uma Componente Principal.

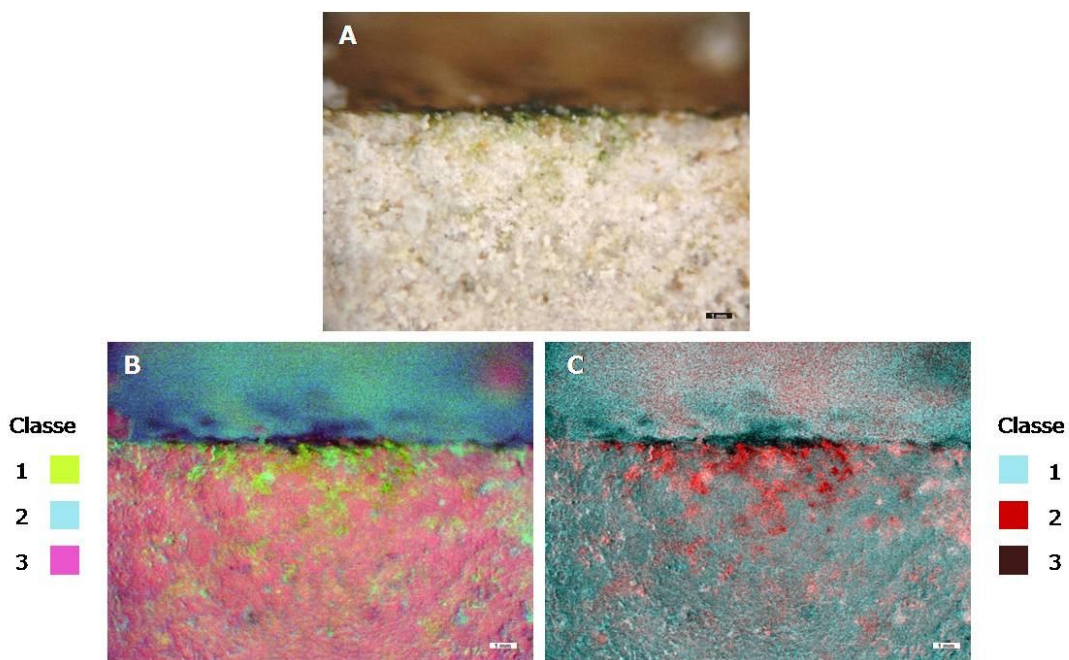


Fig.11 – Corte transversal da *pietra di Lecce* após 6 meses de incubação. **A.** Imagem original. **B.** Imagem em falsa cor (PC1, PC2, PC3). Classes: (1) biofilme fotossintético, (2) poros vazios, (3) substrato pétreo. **C.** Imagem em falsa cor (PC2, PC3, PC3). Classes: (1) substrato pétreo, (2) biofilme fotossintético (3) biofilme fotossintético à superfície. Escala = 1 mm.

No calcário CA não existindo crescimento endolítico, o biofilme ficou retido na superfície, como se pode ver na PC2 e PC3 (Fig. 12). O biofilme encontra-se à superfície, representado horizontalmente a azul (Fig.13B) e a vermelho (Fig.13C) sobre o substrato. As manchas vermelhas que se observam espalhadas pelo substrato na figura 13C foram provocadas pela elaboração do corte transversal que arrastou o biofilme. A baixa porosidade desta pedra (18,95% de porosidade aberta) pode explicar a inexistência de crescimento endolítico, pois o biofilme não consegue penetrar no interior, ao contrário do que aconteceu com o calcário PL. Também não se observou crescimento do biofilme na superfície da pedra.

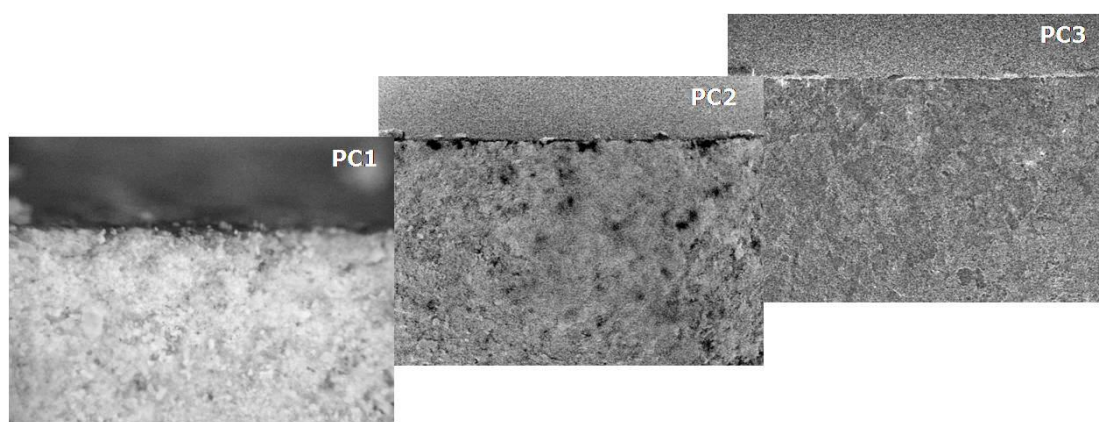
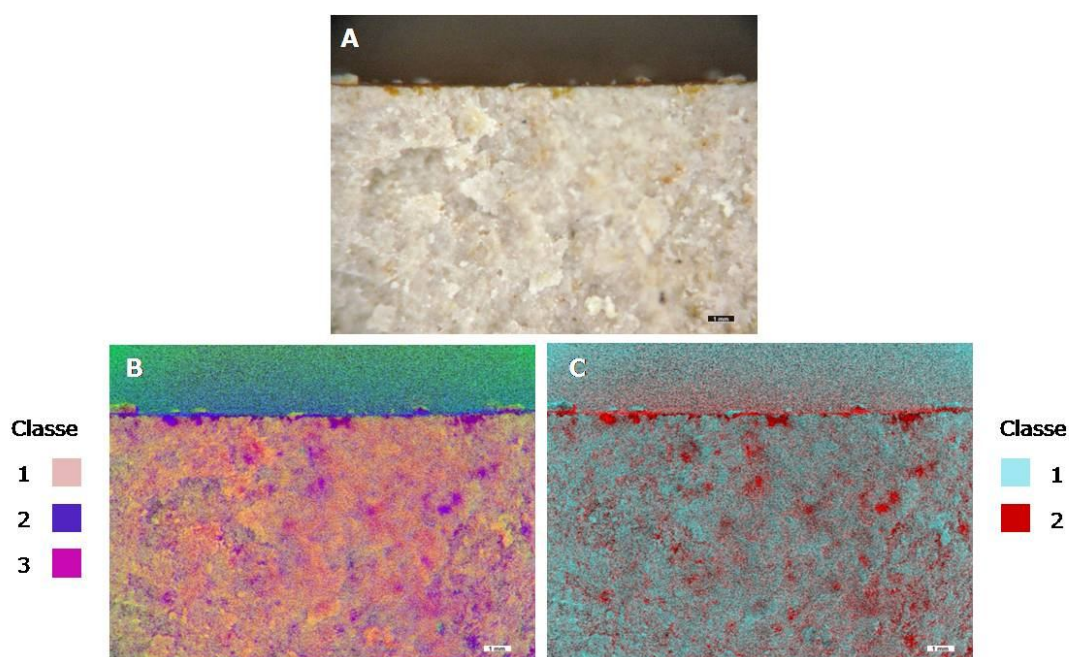




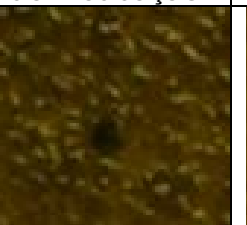
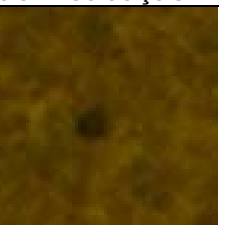

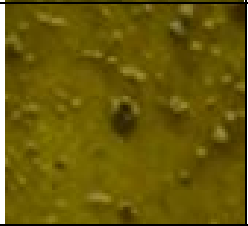
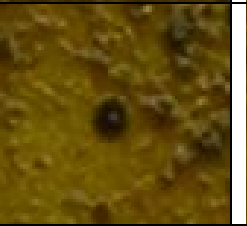
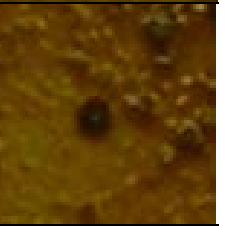

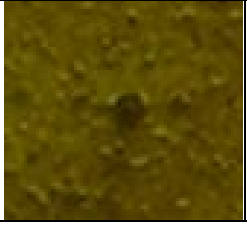
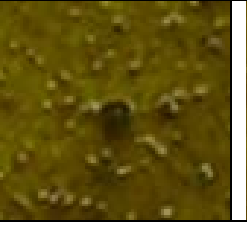
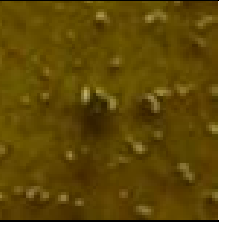
Fig.12 – Corte transversal do calcário Ançã. Bandas resultantes da Análise de Componentes Principais, cada uma corresponde a uma Componente Principal. PC1 com 97,64% da informação, PC2 com 1,70%, PC3 com 0,65%.



Figs. 13 – Corte transversal do calcário Ançã após 6 meses de incubação. **A.** Imagem original. **B.** Imagem em falsa cor (PC1, PC2, PC3). Classes: (1) substrato pétreo, (2) biofilme fotossintético, (3) biofilme arrastado pelo corte. **C.** Imagem em falsa cor (PC3, PC2, PC2). Classes: (1) substrato pétreo, (2) biofilme fotossintético. Escala = 1 mm.

Geralmente, as pedras com elevada porosidade tendem a serem colonizadas com mais facilidade do que as pedras pouco porosas. Isto acontece devido à capacidade de retenção de água nos poros. Nos ensaios hídricos, apresentados anteriormente, verificou-se que a PL com 43,14% de porosidade aberta e o calcário SC com 28,07% são as pedras mais porosas. Foi também nestes litótipos que se verificou o crescimento endolítico. Rochas porosas têm tendência a formar fissuras nos limites de grão, por acção da colonização biológica. Os microrganismos fotossintéticos podem penetrar em pequenas fissuras existentes, muitas vezes através da remoção biogénica (excreção de ácidos orgânicos) da matriz intersticial, favorecendo a colonização endolítica [43]. Além disto, o crescimento endolítico pode também estar relacionado com outros factores, entre eles, o excesso de intensidade luminosa à superfície, a disponibilidade de nutrientes ou uma combinação destes factores. A tabela 6 apresenta as fotografias resultantes do ensaio realizado só com calcário Ançã, em que se observou crescimento do biofilme à superfície da pedra, durante 3 meses. Neste ensaio as condições de incubação diferiram do ensaio anterior realizado com os 3 litótipos. Utilizou-se luz contínua, o que poderia ter sido prejudicial ao crescimento, enquanto que no ensaio com os 3 litótipos utilizaram-se ciclos de luz de 12 horas, para simular o dia e a noite.

Tabela 6 - Fotografias da superfície com o biofilme no calcário Ançã ao longo de 3 meses.

Amostras	Inoculação	Após 1 mês de incubação	Após 2 meses de incubação	Após 3 meses de incubação
CA1				
CA2				
CA3				

As fotografias recolhidas semanalmente permitiram quantificar a área de crescimento do biofilme fotossintético sem danificar a superfície das amostras. Na figura 14 observa-se o crescimento gradual em todos os litótipos. A amostra CA1 tinha inicialmente 13 mm² de área e atingiu no final do ensaio 123 mm². A amostra CA2 com a área inicial de 23 mm² alcançou os 138 mm² ao fim de 3 meses. Por fim, a amostra CA3 com o valor inicial de 38mm² atingiu uma área de 150 mm².

O método de análise de imagem aqui aplicado revelou ser uma importante técnica analítica para determinar o crescimento de microrganismos à superfície nos substratos pétreos.

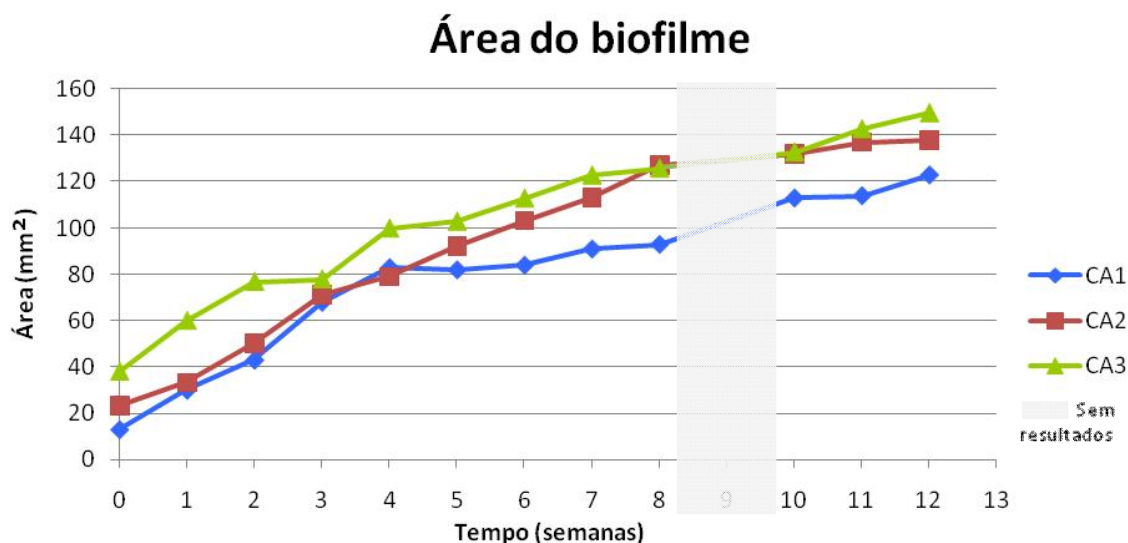


Fig. 14 – Área do biofilme (em mm²) ao longo de 12 semanas em amostras de calcário Ançã.

4. CONCLUSÃO

A quantificação da clorofila *a* no substrato pétreo, através do método espectrofotométrico, permitiu detectar um aumento da biomassa no calcário SC, ao final de três meses, chamando assim à atenção para a existência de crescimento endolítico nesta pedra, uma vez que à superfície não se observava aumento da área do biofilme.

A PCA permitiu detectar a existência e extensão do crescimento endolítico que não era possível observar na fotografia original. Verificou-se que as Componentes Principais minoritárias (PC2 e PC3) são as mais úteis para o estudo de detecção de elementos, pois elas revelam a informação ocultada pela PC maioritária. A análise de imagem permitiu também verificar que o calcário SC é o mais bioreceptível das três pedras, pois a profundidade de penetração e o crescimento endolítico foi superior neste litótipo.

Pela análise dos resultados observou-se que o crescimento microbiano varia com as propriedades intrínsecas dos diferentes litótipos. A elevada porosidade e absorção capilar do calcário SC e PL favoreceu o crescimento endolítico do biofilme fotossintético. Os resultados obtidos, indicam que a colonização endolítica do SC está relacionada com o tamanho do poro e com a permeabilidade.

Quando ocorre crescimento de biofilme na superfície da pedra, o método de análise de imagem mostrou-se mais vantajoso do que o método espectrofotométrico pois este último é

destrutivo, não permitindo estudar a mesma amostra ao longo do tempo. A possibilidade de efectuar por meio de métodos não evasivos, a monitorização do fenómeno de biodeterioração, em estudos de superfície, é essencial em projectos de conservação de bens culturais. Os métodos de análise de imagem utilizados possuem também a vantagem de não importarem custos elevados decorrentes de metodologias analíticas, consumir pouco tempo e necessitarem de poucos meios para a sua realização.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] Ortega-Calvo, J.J., Hernabdez-Marine, M., Saiz-Jimenez, C., 'Cyanobacteria and algae on historic buildings and monuments', in *Recent advances in biodeterioration and biodegradation*, ed. K.L. Garg and K.G. Mukerji, *Biodeterioration of Cultural Heritage*, Naya Prokash, Calcutta, Vol. I (1993) 173-203.
- [2] Ortega-Calvo, J.J., Sanchez-Castillo, P.M., Hernandez-Marine, M., Saiz-Jimenez, C., 'Isolation and characterizatio of elilithic chlorophytes and cyanobacteria from two Spanish cathedrals (Salamanca and Toledo)', *Nova Hedwigia* 57 (1993) 239-253.
- [3] Cameron, S., Urquhart, D., Wakefield, R., Young, M., *Biological Growths on Sandstone Building, Control and Treatment*, Historic Scotland, Edinburgh (1997) 2-24.
- [4] Wakefield, R.D., Jones, M.S., 'An introduction to stone colonizing micro-organisms and biodeterioration of building stone', *Quarterly Journal of Engineering Geology* 31 (1998) 301-313.
- [5] Golubic, S., Friedmann, I., Schneider, J., 'The lithobiontic ecological niche, with special reference to microorganisms', *Journal of Sedimentary Petrology* 51 (1981) 475-478.
- [6] Ortega-Calvo, J.J., Ariño, X., Hernandez-Marine, M., Saiz-Jimenez, C., 'Factors affecting the weathering and colonization of monuments by phototrophic microorganisms', *The Science of the Total Environment* 167 (1995) 329-341.
- [7] Walker, J.J., Spear, J.R., Pace, N.R., 'Geobiology of a microbial endolithic community in the Yellowstone geothermal environment', *Nature* 434 (2005) 1011-1014.
- [8] Ortega-Calvo, J.J., Hernandez-Marine, M., Saiz-Jimenez, C., 'Biodeterioration of building materials by cyanobacteria and algae', *International Biodeterioration* 28 (1991) 165-185.
- [9] Prieto, B., Silva, B., Lantes, O., 'Biofilm quantification on stone surfaces: comparison of various methods', *The Science of the Total Environment* 333 (2004) 1-7.
- [10] Prieto, B., Silva, B., 'Estimation of the potencial bioreceptivity of granitic rocks from their intrinsic properties', *International Biodeterioration & Biodegradation* 56 (2005) 197-252.
- [11] Miller, A., Dionísio, A., Macedo, M. F., 'Primary bioreceptivity: a comparative study of different portuguese lithotypes', *International Biodeterioration & Biodegradation* 57 (2006) 136-142.
- [12] Rogerio-Candelera, M.A., Laiz, L., González, J.M., Sáiz-Jiménez, C., 'Monitorización del crecimiento microbiano en una tumba romana mediante técnicas de teledetección', in *Actas del VII Congreso Ibérico de Arqueometría*, M. Garcia Vuelta, I, ed. Montero Ruiz e S. Rovira (2008) (in press).
- [13] Castellano, A., Martini, M., Sibilía, E., *Elementi di archeometria: metodi fisici per i Beni Culturali*, Copyright (2002).
- [14] Margalef, R., *Ecología*, Omega, Barcelona (1982).
- [15] Baxes, G.A., *Digital Image Processing: principles and applications*, Copyring, New York (1994).
- [16] Chuvieco, E., *Teledetección ambiental. La observación de la Tierra desde el Espacio*, Ariel, Barcelona (2002).
- [17] Rogerio-Candelera, M.A., *Una propuesta no invasiva para la documentación integral del arte rupestre*, CSIC, Sevilla (2008).

- [18] Gillespie, A.R., Kahle, A.B., Walker, R.E., 'Color enhancement of highly correlated images. I. Decorrelation and HSI contrast stretches', *Remote Sensing of Environment* 20 (1986) 209-235.
- [19] Gillespie, A.R., Kahle, A.B., Walker, R.E., 'Color enhancement of highly correlated images. II. Channel ratio and "chromaticity" transformation techniques', *Remote Sensing of Environment* 22 (1987) 343-365.
- [20] Bacci, M., Chiari, R., Porcinai, S., Radicati, B., 'Principal Component Analysis of near-infrared spectra of alteration products in calcareous samples: An application to works of art', *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 39 (1997) 115-121.
- [21] Mansfield, J.R., Attas, M., Majzels, C., Cloutis, E., Collins, C., Mantsch, H.H., 'Near infrared spectroscopic reflectance imaging: a new tool in art conservation', *Vibrational Spectroscopy* 28 (2002) 59-66.
- [22] Attas, M., Cloutis, E., Collins, C., Goltz, D., Majzels, C., Mansfield, J.R., Mantsch, H.H., 'Near-infrared spectroscopic imaging in art conservation: investigation of drawing constituents', *Journal of Cultural Heritage* 4 (2003) 127-136.
- [23] Rogerio-Candelera, M.A., Jurado, V., Laiz, L., Saiz-Jimenez, C., 'Image analysis of biodeterioration-affected rock and mural paintings', in *La Ciencia de Materiales y su impacto en la Arqueología*, ed. J.L. Ruvalcaba Sil, J. Reyes T. and A. Velázquez, Sociedad Mexicana de Ciencia de Materiales A.C., México, Vol. V (2008) (in press).
- [24] Carvalho, C.C.C.R. de, Marques, M.P.C., Fernandes, P., Fonseca, M.M.R. da, 'A simple imaging method for biomass determination', *Journal of Microbiological Methods* 60 (2005) 135-140.
- [25] Hauer, T., Jirka, L., 'Image analysis – a simple method of algal culture growth assessment', *Journal of Applied Phycology* 19 (2007) 599-601.
- [26] Solé, A., Mas, J., Esteve, I., 'A new method on image analysis for determining cyanobacterial biomass by CLMS in stratified benthic sediments', *Ultramicroscopy* 107 (2007) 669-673.
- [27] Rogerio-Candelera, M.A., Miller, A.Z., Dionísio, A., Macedo, M.F., Saiz-Jimenez, C., 'Detection of endolithic growth extent of cyanobacteria and algae in a porous limestone by image analysis', *Newsletter Stone* (2009) (in press).
- [28] Aires-Barros, L., *As rochas dos monumentos portugueses tipologias e patologias*, Instituto Português do Património Arquitectónico, Lisboa, Vol. I (2001).
- [29] Dionísio, A., *A pedra Ançã: Características mineroquímicas e petrofísicas*, Tese de Mestrado, IST - Universidade Técnica de Lisboa (1997).
- [30] Esbert, R.M., Ordaz, J., Alonso, F.J., Ruiz de Argandoña, V.G., 'Caracterización petrofísica y alterabilidad de las piedras de la Catedral de Sevilla', *Materiales de Construcción* 38 (210) (1988) 5-23.
- [31] Bello, M.A., Martín, A., 'Estudio sobre los procesos de corrosión (alteración química) de los materiales pétreos de la Catedral de Sevilla (España)', *Materiales de Construcción* 40 (217) (1990) 17-37.
- [32] Alcalde, M., Martín, A., 'Morfología macroscópica de alteración acelerada de algunos materiales pétreos de monumentos de Andalucía/España', *Materiales de Construcción* 40 (218) (1990) 5-27.

- [33] Calia, A., Lettieri, M., Quarta, G., 'Document and assessment of the most important conservation treatments carried out on Lecce stone monuments in the last two decades', in *10th International Congress on Deterioration and Conservation of Stone*, Stockholm, June (2004) 431-438.
- [34] prEN 1925, *Détermination du coefficient d'absorption d'eau par capillarité* (1996).
- [35] prEN 1936, *Détermination des masses volumiques réelle et apparente et des porosités ouverte et totale* (1995).
- [36] Miller, A., Laiz, L., Gonzalez, J.M., Dionísio, A., Macedo, M.F., Saiz-Jimenez, C., 'Reproducing stone monument photosynthetic-based colonization under laboratory conditions', *Science of the Total Environment* 405 (1-3) (2008) 278-285.
- [37] NORMAL 9/88, *Microflora autotrofa ed eterotrofa: tecniche di isolamento in coltura*. Instituto Centrale del Restauro-Commissione Normal (ICRCNR), Doc. Normal 9/88, ICR-CNR, Rome (1998).
- [38] Shoaf, W.T., Lium, B.W., 'Improved extraction of chlorophyll *a* and *b* from algae using dimethyl sulfoxide', *Limnology and Oceanography* 21 (1976) 926-928.
- [39] Burnison, B.K., 'Modified Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Extraction for Chlorophyll Analysis of Phytoplankton', *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37 (1980) 729-733.
- [40] Vollenweider, R.A., *A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments*, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1974).
- [41] Lorenzen, C.J., 'Determination of chlorophyll and phaeo-pigments: spectrophotometric equations', *Limnology and Oceanography* 12 (1967) 343-346.
- [42] Mark, R., Billo, E., 'A stitch in time: Digital panoramas and mosaics', in *American Indian Rock Art*, ed. S.M. Freers, American Rock Art Research Association, Ridgecrest (CA), 25 (1999) 155-168.
- [43] Hoppert, M., Flies, C., Pohl, W., Günzl, B., Schneider, J., 'Colonization strategies of lithobiontic microorganisms on carbonate rocks', *Environmental Geology* 46 (2004) 421-428.

6. ANEXOS

ANEXO I

Ensaio de capilaridade

- Procedimento experimental

O ensaio realizado seguiu os procedimentos descritos na pré-Norma Europeia (CEN) prEN 1925 (1996).

Assim, os 81 provetes foram previamente secos numa estufa, à temperatura de $70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas, arrefecidos a temperatura ambiente e pesados.

Posteriormente, foram colocados em recipientes acrílicos, sobre papel de filtro (45 ± 5 filtros por provete) e que continha um determinado volume de água destilada.

Em intervalos de tempo crescente (1, 3, 5, 10, 15, 30, 60, 480 e 1440 min), efectuaram-se as pesagens dos provetes. Cada um foi retirado do recipiente, ligeiramente enxuto numa camurça húmida, pesado e recolocado no mesmo local.

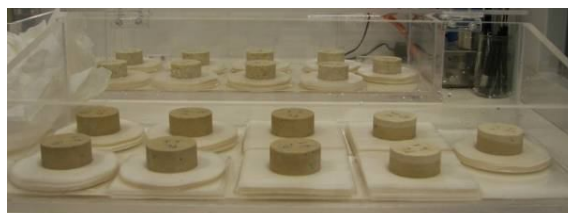


Fig.15 – Ensaio de absorção de água por capilaridade.

Registaram-se os tempos (t_i) e as massas correspondentes (m_i) a cada provete, traçando assim, o gráfico respectivo que permite determinar o valor do coeficiente de absorção de água por capilaridade (dado pelo coeficiente angular da parte inicial do traçado rectilíneo do gráfico). Este coeficiente pode ser calculado em qualquer ponto, através do quociente entre a ordenada e a abcissa desse ponto (Dionísio, 1997):

$$C = \frac{m_i - m_d}{A \times \sqrt{t_i}}$$

Sendo:

A - Área da base do provete.

m_d – Massa seca, determinada por pesagem após secagem dos provetes em estufa e arrefecimento num excicador (em g).

ANEXO II

Ensaio de porosidade aberta

- Procedimento experimental

Seguiu-se o procedimento recomendado pela prEN 1936.

Os 81 provetes foram secos em estufa ($70 \pm 5^\circ\text{C}$) e colocados num excicador para obter a temperatura ambiente.

Posteriormente ligou-se o vácuo e manteve-se a uma pressão de $2,0 \pm 0,7$ KPa.

Após 24 horas introduziu-se água destilada no sistema até os provetes ficarem cobertos, mantendo-se a pressão pré-estabelecida.

Passado o intervalo de 24 horas, desligou-se o vácuo e restabeleceu-se a pressão atmosférica. Após 24 horas, efectuaram-se as pesagens hidrostáticas.

A determinação da porosidade aberta acessível à água ($N_{0 \text{ água}}$) é feita recorrendo à expressão:

$$N_{0 \text{ água}} = \frac{m_s - m_d}{m_s - m_h} \times 100(\%)$$

Sendo:

m_s – Massa saturada, determinada por pesagem após saturação dos provetes e remoção do excesso de água à superfície com um pano húmido (em g).

m_d – Massa seca, determinada por pesagem após secagem dos provetes em estufa e arrefecimento num excicador (em g).

m_h – Massa submersa, determinada por pesagem hidrostática (em g).



Fig.16 - Ensaio de porosidade aberta.

ANEXO III

Protocolo de quantificação da clorofila *a* e feopigmentos por espectrofotometria de uma cultura líquida

Material:

- kitasatu,
- funil de filtração 47 mm,
- disco de filtração (suporte para o filtro),
- filtros Supelco (Nylon 66 membranes, 0,45 μ m x 47 mm),
- mola de fixação do funil,
- borracha de fixação do funil,
- pinça,
- papel de alumínio,
- tubos de centrifuga (10 mL)
- DMSO 100%
- acetona 90%
- 1 N HCl
- pipeta 10 ml (para acetona 90%)
- pipeta 5 ml (para 4 ml DMSO)
- células de quartzo de 1 cm para espectrofotometria
- conta gotas
- etiquetas pequenas

Comunidade de microrganismos fotossintéticos em cultura líquida

A quantificação da clorofila *a* presente na cultura líquida foi efectuada utilizando dimetil-sulfóxido (DMSO) devido ao seu poder extractante. Shoaf e Lium (1976) e Burnison (1980) comprovaram que o DMSO foi superior à acetona 90% na extracção de clorofila *a* e *b* presente nas algas verdes e cianobactérias.

Procedimento (Burnison, 1980):

1. Filtrar 10 e 20 ml da cultura líquida de microrganismos fotossintéticos (3 replicados para cada volume) através de um filtro de membrana, com sistema de baixa pressão (não exceder 2/3 atmosfera), para concentrar as algas e cianobactérias no filtro.
2. Enrolar o filtro sem apertar, colocar no tubo da centrifuga e adicionar 4 ml de DMSO (dimetil sulfóxido).
3. Efectuar o mesmo procedimento sem cultura de microrganismos (Branco)
4. Incubar em banho de água a 65°C durante 15 min.
5. Após 10 min de arrefecimento à temperatura ambiente, adicionar 6 ml de acetona 90% (até perfazer 10 mL).
6. Centrifugar os tubos a 5000 g durante 10 min.
7. Medir o branco no espectrofotómetro a 750 e 664 nm;

8. Medir o supernadante no espectrofotómetro a 750 e 664 nm (pico de absorvância vermelho para a clorofila *a*).
9. Acidificação do extracto através da adição de 2 gotas de 1 N HCl à célula espectrofotométrica e medir as absorvâncias a 750 e 664 nm, após 4 ou 5 min. Este ácido é adicionado para remover Mg^{2+} da clorofila *a* (Burnison, 1980), degradando a molécula de clorofila (converte esta molécula em feofitina *a*).

Cálculo de concentração de clorofila *a* e feopigmentos

A concentração de clorofila *a* e feopigmentos é determinada com base nas equações de Lorenzen (1967), usando o coeficiente de extinção de Jeffrey e Humphrey (1975). O coeficiente de extinção da clorofila *a* (ϵ – quantidade de luz absorvida por unidade de peso) em acetona 90% pode ser usado para o solvente DMSO/acetona 90% (4:6) (Burnison, 1980).

$$\begin{aligned} \text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g/L}) &= \frac{A \times K \times [(664 - 750)_a - (664 - 750)_d] \times v}{V \times L} = \\ &= \frac{26.73 \times [(664 - 750)_a - (664 - 750)_d] \times 10}{V \times 1} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Feofitina } a \text{ } (\mu\text{g/L}) &= \frac{A \times K [R (664 - 750)_d - (664 - 750)_a] \times v}{V \times L} = \\ &= \frac{26.73 \times [1.7 (664 - 750)_d - (664 - 750)_a] \times 10}{V \times 1} \end{aligned}$$

em que:

A - inverso do coeficiente de extinção da clorofila *a* em acetona 90% a 664 nm, $87.67 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 11.0 \text{ L}^{-1} \text{ g cm}$

K – factor de correcção da concentração inicial da clorofila *a* a partir da redução da absorvância (acidificação) = **2.43**

(664 - 750)¹_a - Diferença entre os dois valores de densidade óptica do extracto antes da acidificação

(664 - 750)_d – Diferença entre os dois valores de densidade óptica do extracto após acidificação

v - Volume de solvente usado para a extracção (ml)

V - Volume da amostra filtrado (L)

¹ A diferença entre a densidade óptica a 750nm e a 664 nm é efectuada para corrigir a turbidez da amostra.

L - Passo óptico da célula espectrofotométrica (cm) = **1**

R - taxa máxima de $664_a : 664_d$ na ausência de feopigmentos = **1.7**

ANEXO IV

Protocolo de quantificação da clorofila *a* e feopigmentos por espectrofotometria em substratos pétreos

Material:

- martelo,
- lona plástica,
- frasco Schot
- kitasatu,
- funil de filtração 47 mm,
- disco de filtração (suporte para o filtro),
- filtros Supelco (Nylon 66 membranes, 0,45 μm x 47mm),
- mola de fixação do funil,
- borracha de fixação do funil (4 conjuntos),
- pinça,
- papel de alumínio,
- tubos de centrífuga (10 mL)
- DMSO (dimetil sulfóxido)
- 1 N HCl

Quantificação da clorofila *a* em substratos pétreos

A determinação da concentração da clorofila *a* de substratos pétreos de perífiton (comunidades de microrganismos que crescem em rochas, macrófitas e outras superfícies sub-aquáticas) apresenta mais dificuldade que em amostras líquidas uma vez que existe uma grande quantidade de células de algas mortas, o que pode contribuir na interferência dos produtos de degradação da clorofila. O total de pigmento por unidade de área ou percentagem de biomassa aumenta com o tempo à medida que sucessivas algas colonizam e morrem. Como tal, são necessárias correcções para os produtos de degradação, ou separar as células vivas das mortas (Vollenweider, 1974). Com conversões apropriadas de volume-área, as fórmulas de Lorenzen (1967) podem ser utilizadas.

Procedimento (Vollenweider, 1974):

1. Triturar a pedra com um martelo envolvida numa lona plástica até obter fragmentos de 0,20-0,50 cm^3 ;

2. Colocar os fragmentos num frasco schot e adicionar 50 ml ou 10 ml de DMSO (aproximadamente 1 ml de DMSO para cada g de substrato); lavar o plástico com DMSO para o interior do frasco;
3. Adicionar o mesmo volume de DMSO num frasco schot (Branco)
4. Incubar os frascos a 65°C durante 1 hora para eluir os pigmentos (deverão ser efectuadas repetidas extracções);
5. Filtrar a solução contendo os fragmentos com filtro de membrana Supelco;
6. Centrifugar o volume filtrado durante 10 min a 5000 g;
7. Efectuar as leituras de espectrofotometria a 750 e 664 nm antes e após acidificação com 1 N HCl; a acidificação pode ser efectuada através da adição de uma ou duas gotas de HCl na célula espectrofotométrica e agitando durante alguns minutos.

O procedimento deve ser efectuado na ausência de luz.

Cálculo de concentração de clorofila *a* e feopigmentos

A concentração de clorofila *a* nos substratos líticos é determinada com base nas equações de Lorenzen (1967), usando o coeficiente de extinção de Talling and Driver (1963) ($\epsilon = 84 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), devido à presença de clorofilas *b* e *c* e dos seus produtos de degradação:

$$\begin{aligned} \text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) &= \frac{A \times K \times [(664 - 750)_a - (664 - 750)_d] \times v}{a \times L} = \\ &= \frac{28.917 \times [(664 - 750)_a - (664 - 750)_d] \times v}{a \times L} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Feofitina } a \text{ } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) &= \frac{A \times K [R (664 - 750)_d - (664 - 750)_a] \times v}{a \times L} = \\ &= \frac{28.917 \times [1.7 (664 - 750)_d - (664 - 750)_a] \times v}{a \times L} \end{aligned}$$

em que:

A - inverso do coeficiente de extinção da clorofila *a* em acetona 90% a 665 nm, $84 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 11.9 \text{ L}^{-1} \text{ g cm}$

K – factor de correcção da concentração inicial da clorofila *a* a partir da redução da absorvância (acidificação) = **2.43**

(664 - 750²)_a - Diferença entre os dois valores de densidade óptica do extracto antes da acidificação

(664 - 750)_d - Diferença entre os dois valores de densidade óptica do extracto após acidificação

v - Volume de solvente usado para a extracção (ml)

a - Área do substrato lítico (cm²) = **15.2** cm²

L - Passo óptico da célula espectrofotométrica (cm)

R - taxa máxima de 664^a : 664_d na ausência de feopigmentos = **1.7**

² A diferença entre a densidade óptica a 750nm e a 664 nm é efectuada para corrigir a turbidez da amostra.

ANEXO V

Amostras escolhidas para análise do crescimento em áreas de acumulações de células.



Fig.17 – Área a analisar, CA2_T0.



Fig.18 – Área a analisar, CA_T12.



Fig.19 – Área a analisar, CA3_T0.



Fig.20 - Área a analisar, CA3_T12.



Fig.21 - Área a analisar, CA4_T0.



Fig.22 - Área a analisar, CA4_T12.

ANEXO VI

Tabela 7 - Valores da média, desvio padrão, mínimo e máximo, resultantes do ensaio de capilaridade.

Coeficiente de absorção por capilaridade (g/m ² x s ^{-1/2})			
	Calcário Ançã	Piedra de San Cristóbal	Pietra di Lecce
Média	57,26	199,30	128,76
Desvio Padrão	1,17	31,05	3,04
Mínimo	54,18	120,60	124,80
Máximo	59,33	242,20	136,30

ANEXO VII

Tabela 8 - Absorção da cultura líquida antes e após acidificação e correcção da turbidez

Amostra	Antes da acidificação		Após acidificação		Correcção da turbidez antes da acidificação	Correcção da turbidez após acidificação
	Abs 664nm	Abs 750nm	Abs 664nm	Abs 750nm	(664-750) _a	(664-750) _d
Branco	0,001	0,001	-0,001	-0,001	0,001	-0,001
10mla	0,145	0,008	0,088	0,008	0,137	0,080
10mlb	0,265	-0,001	0,165	0,007	0,266	0,158
10mlc	0,254	0,006	0,167	0,011	0,248	0,156
20mla	0,630	0,003	0,350	0,007	0,627	0,343
20mlb	0,579	0,002	0,372	0,022	0,577	0,350
20mlc	0,410	-0,002	0,234	-0,001	0,412	0,235

$$\text{Clorofila } a \text{ } (\mu\text{g/L}) = \frac{26.73 \times [(664 - 750)_a - (664 - 750)_d] \times 10}{V \times 1}$$

A	11
K	2,43
A*K	26,73
v	10
V (L)	0,01 ou 0,02
L	1
R	1,7

Volume	Concentração (µg/L)
10mla	1531,629
10mlb	2892,186
10mlc	2440,449
20mla	3801,006
20mlb	3023,163
20mlc	2357,586

Média 2902,878 µg/L = 2,9 mg Chla/L

Tabela 9 - Absorção da cultura sobre os substratos pétreos antes e após acidificação e correcção da turbidez

Amostra	Antes da acidificação		Após acidificação		Correcção da turbidez antes da acidificação	Correcção da turbidez após acidificação
	Abs 664nm	Abs 750nm	Abs 664nm	Abs 750nm	(664-750)a	(664-750)d
Branco	0,001	0,001	0,002	0,002	-0,0002	-1E-04
CA3a	0,317	0,050	0,169	0,017	0,267	0,153
CA3b	0,402	0,156	0,241	0,089	0,246	0,152
CA3c	0,292	0,030	0,162	0,011	0,262	0,151
SC3a	0,064	0,008	0,041	0,007	0,056	0,033
SC3b	0,208	0,105	0,113	0,052	0,103	0,061
SC3c	0,091	0,016	0,047	0,006	0,075	0,041
PL3a	0,386	0,152	0,221	0,082	0,235	0,139
PL3b	0,362	0,157	0,206	0,082	0,205	0,124
PL3c	0,342	0,176	0,203	0,099	0,166	0,104

$$\text{Clorofila } a \text{ (}\mu\text{g/cm}^2\text{)} = \frac{28.917 \times [(664 - 750)_a - (664 - 750)_d]}{a \times L} \times v =$$

A	11,9
K	2,43
A*K	28,917
v (ml)	5 e 30
a (cm²)	15,2
L	1
R	1,7

Concentração da clorofila a ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)					
Após 1 mês		Após 2 meses		Após 3 meses	
CA1a	0,862	CA2a	0,169	CA3a	1,085
CA1b	0,927	CA2b	1,197	CA3b	0,888
CA1c	1,551	CA2c	0,985	CA3c	1,060
SC1a	1,522	SC2a	1,455	SC3a	1,301
SC1b	1,589	SC2b	1,065	SC3b	2,426
SC1c	1,037	SC2c	0,837	SC3c	1,935
PL1a	1,952	PL2a	0,979	PL3a	0,914
PL1b	1,693	PL2b	0,941	PL3b	0,767
PL1c	1,557	PL2c	1,054	PL3c	0,588

Valores máximos de concentração ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)			
Amostra	Após 1 mês	Após 2 meses	Após 3 meses
CA	1,551	1,197	1,085
SC	1,589	1,455	2,426
PL	1,952	1,054	0,914

ANEXO VIII

Resumo do trabalho publicado no livro de resumos *Avances Recientes en la Investigación sobre Patrimonio* da 9ª reunião da *Red Temática de Patrimonio Histórico y Cultural - Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, Consejo Superior de Investigaciones Científicas* - realizada em Sevilha, 4 e 5 de Março de 2008.

Análisis de imagen para la evaluación de la bioreceptividad de materiales utilizados en el Patrimonio Cultural

M.I. Gomes*, M.A. Rogerio-Candeleria**, A.Z. Miller*, M.F. Macedo*, A. Dionísio***, L. Laiz** y C. Saiz-Jimenez**

**Departamento de Conservação e Restauro, Faculdade de Ciências y Tecnología, Universidade Nova de Lisboa. Monte de Caparica, 2829-516 Caparica, Portugal*

***Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC. Apartado 1052, 41080 Sevilla*

****Centro de Petrologia e Geoquímica, Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1049-001, Lisboa, Portugal*

En los últimos años, muchos autores conceden gran importancia al deterioro biológico, o biodeterioro de materiales de construcción, considerando que la colonización biológica es uno de los principales problemas para la conservación del Patrimonio Cultural en piedra. Por ello, la comprensión de las causas del biodeterioro de monumentos y edificios históricos tiene importancia fundamental en la adquisición de nuevos tratamientos de restauración y prevención.

La colonización y crecimiento de comunidades microbianas en la piedra puede causar daños estéticos, químicos y mecánicos. A medida que avanza la colonización, la superficie de los materiales pétreos se modifica: mediante descomposición de algunos minerales, creación de una barrera que retiene humedad, alteración de la permeabilidad de las rocas para gases y líquidos, y formación de capas de alteración, entre otros efectos indeseados. Este proceso de colonización se relaciona con la bioreceptividad de las superficies pétreas, definida como el conjunto de propiedades de los materiales que contribuyen al establecimiento, anclaje y desarrollo de la fauna y/o flora (Guillitte 1995). Los factores ambientales combinados con las propiedades intrínsecas de la piedra crean condiciones favorables para el desarrollo de microorganismos. Los microorganismos fotosintéticos son muy importantes en estos

procesos desde el punto de vista ecológico ya que, debido a su carácter autótrofo, suelen ser los pioneros en la colonización de superficies pétreas. Por ello se ha propuesto, como método experimental para evaluar la bioreceptividad de materiales pétreos, la medida de la cantidad de clorofila *a* presente en las muestras como indicador de la biomasa total (Ariño 1996, Prieto y Silva 2005). Otros trabajos han aplicado el método a la detección *in vivo* de la presencia de clorofila *a* mediante espectrofluorimetría y la cuantificación del área colonizada como porcentaje del área total de las muestras (Guillitte y Dreesen 1995, Miller *et al.* 2006).

Las técnicas de análisis de imagen presentan gran utilidad en la cuantificación de los biofilms, dado que los efectos de la acción de los microorganismos tienen una importante dimensión espacial, poco estudiada. Precisamente, los métodos de análisis de imagen permiten monitorizar el desarrollo de fenómenos de biodeterioro atendiendo a sus componentes espacial y temporal (Rogerio-Candelera *et al.* 2008). Las imágenes originales están sujetas a una cierta variabilidad en su reflejo de las relaciones geométricas del objeto real y a ciertas diferencias en la iluminación. Debido a ello, para poder aplicar análisis de imagen de manera fiable, es necesario un cierto grado de homogeneización de las imágenes, de manera que sean comparables entre sí tanto desde el punto de vista de la geometría interna como del abanico espectral cubierto por las mismas.

En este trabajo se utilizan herramientas de análisis de imagen para evaluar el crecimiento de biopelículas fotosintéticas en caliza de Ançã, un tipo de piedra ampliamente utilizado en edificios históricos de Portugal. La monitorización del área colonizada por los microorganismos se ha realizado aplicando una metodología que incluye la restitución de la geometría de las imágenes, su homogeneización radiométrica, la creación de series temporales y la aplicación de filtros para la detección del biofilm (Rogerio-Candelera *et al.* 2008). Los resultados obtenidos permiten tener una visión cuantitativa del crecimiento microbiano, que hace posible la comparación en términos de bioreceptividad entre distintos materiales.

Agradecimientos: El presente estudio se ha llevado a cabo en el marco de los proyectos "Aplicación de técnicas de teledetección a la monitorización del biodeterioro y documentación de bienes culturales en ambientes hipogeos", PIE 200440E327 (CSIC), "Comunidades microbianas asociadas al desarrollo de eflorescencias en monumentos andaluces: determinación de su actividad metabólica mediante técnicas moleculares y papel en el biodeterioro", P06-RNM-02318 (Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta

de Andalucía) y “Monitorización de la bioreceptividad de materiales empleados en el Patrimonio Cultural”, 2007PT0041 (CSIC-FCT). LL agradece al CSIC el proyecto 200740I011. Se agradece a la Fundação para a Ciência e Tecnologia – MCIES la beca predoctoral de AZM.

Referencias

- Ariño, X. 1996. *Estudio de la colonización, distribución e interacción de líquenes, algas y cianobacterias con los materiales pétreos de los conjuntos arqueológicos de Baelo Claudia y Carmona*. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona.
- Guillitte, O. 1995. Bioreceptivity: a new concept for building ecology studies. *The Science of the Total Environment* 167: 215-220.
- Guillitte, O. y Dreesen, R. Laboratory chamber studies and petrographical analysis as bioreceptivity assessment tools of building materials. *The Science of the Total Environment* 167: 365-374.
- Miller, A., Dionisio, A. y Macedo, M.F. 2006. Primary bioreceptivity: A comparative study of different Portuguese lithotypes. *International Biodeterioration and Biodegradation* 57: 136-142.
- Prieto, B. y Silva, B. 2005. Estimation of the potential bioreceptivity of granitic rocks from their intrinsic properties. *International Biodeterioration and Biodegradation* 56: 206-215.
- Rogério-Candelera, M.A., Laiz, L., González, J.M. y Sáiz-Jiménez, C. 2008. Monitorización del crecimiento microbiano en una tumba romana mediante técnicas de teledetección. En M. García Vuelta, I. Montero Ruiz y S. Rovira Llorens (eds.) *Actas del VII Congreso Ibérico de Arqueometría* (en prensa).

ANEXO IX

Poster apresentado na 9ª reunião da *Red Temática do Património Histórico y Cultural* – IRNAS-CSIC realizada em Sevilha, 4 e 5 de Março de 2008.



Análisis de imagen para la evaluación de la bioreceptividad de materiales utilizados en el Patrimonio Cultural

M.I. Gomes*, M.A. Rogerio-Candelera**, A.Z. Miller*, M.F. Macedo*, A. Dionísio***, L. Laiz** y C. Saiz-Jimenez**

*Departamento de Conservação e Restauro, Faculdade de Ciências y Tecnología, Universidade Nova de Lisboa, Monte de Caparica, 2829-516 Caparica, Portugal ** Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC. Apartado 1052, 41080 Sevilla *** Centro de Petrología e Geoquímica, Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1049-001, Lisboa, Portugal.

Introducción

Los métodos de análisis de imagen permiten monitorizar el desarrollo de fenómenos de biodeterioro atendiendo a sus componentes espacial y temporal.

En este trabajo se utilizan herramientas de análisis de imagen con el objetivo de evaluar el crecimiento de biopelículas fotosintéticas en muestras de caliza de Ançã, un tipo de piedra ampliamente utilizado en edificios históricos de Portugal.

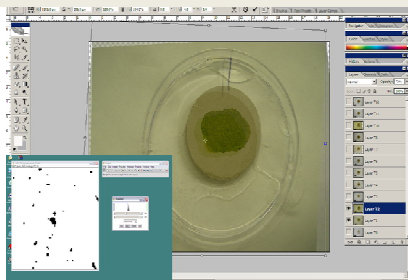


Figura 1. Estudio del crecimiento del biofilm a través de los programas Adobe Photoshop y ImageJ.

Metodología

Las muestras de caliza de Ançã han sido inoculadas en laboratorio con un cultivo de microorganismos fotosintéticos y incubadas durante 12 semanas en condiciones de temperatura, luz y humedad relativa óptimas para el crecimiento de los microorganismos. A intervalos regulares de una semana las distintas probetas de caliza de Ançã se fotografiaron para la monitorización de los biofilms fotosintéticos mediante análisis de imagen. La metodología de análisis de imagen utilizada es presentada en la Figura 2.

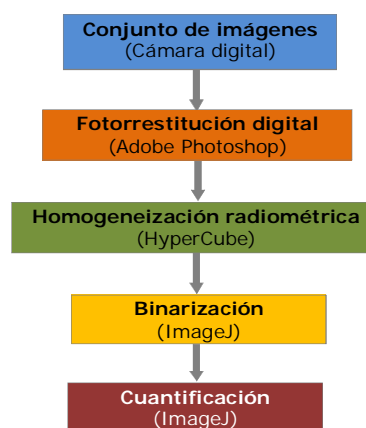
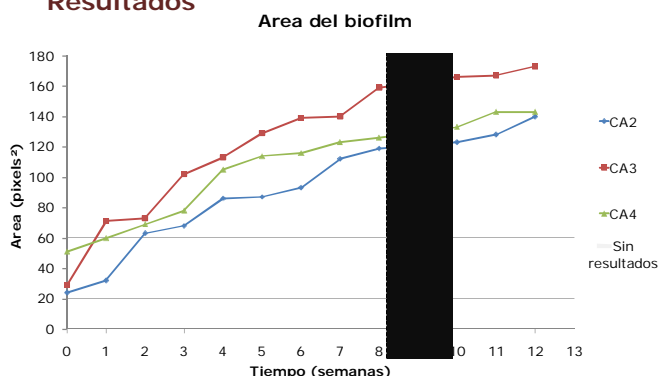


Figura 2. Protocolo utilizado para la cuantificación de superficies colonizadas por microorganismos fotosintéticos.

Resultados



Conclusiones

Las técnicas de análisis de imagen presentan gran utilidad en la cuantificación de los biofilms fotosintéticos, dado que los efectos de la acción de los microorganismos tienen una importante dimensión espacial. Se verifica un gradual crecimiento del biofilm sobre las muestras de caliza de Ançã durante las 12 semanas de incubación.

Agradecimientos

A los proyectos: "Aplicación de técnicas de teledetección a la monitorización del biodeterioro y documentación de bienes culturales en ambientes hipogeos", PIE 200440E327 (CSIC); "Comunidades microbianas asociadas al desarrollo de eflorescencias en monumentos andaluces: determinación de su actividad metabólica mediante técnicas moleculares y papel en el biodeterioro", P06-RNM_02318; "Monitorización de la bioreceptividad de materiales empleados en el Patrimonio Cultural", 2007PT0041 (CSIC-FCT). LL agradece al CSIC el proyecto 200740J011. Se agradece a la Fundação para a Ciência e Tecnologia - MCIES la beca predoctoral de AZM.

ANEXO X

Resumo submetido à conferência RecPad 2008, 14^a Conferência de Reconhecimento de Padrões a realizar em Coimbra a 31 de Outubro de 2008.

Image analysis as a tool for monitoring a biofilm growth on stone materials used in Cultural Heritage

M.I. Gomes*, M.A. Rogerio-Candelera** , A.Z. Miller*, M.F. Macedo*, A. Dionísio***

** Departamento de Conservação e Restauro, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. Monte de Caparica, 2829-516 Caparica, Portugal*

*** Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC. Apartado 1052,41080 Sevilla, Spain*

**** Centro de Petrologia e Geoquímica, Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1049-001, Lisboa, Portugal*

Abstract

Development of computer systems allowed substantial changes and advances regarding documentation and diagnosis of the preservation state in the field of Cultural Heritage. The techniques used in the past (namely photographic techniques) have been surpassed, and actually the acquisition and digital treatment of images incorporates systematic methodologies, which allows the management of information at a level not reached by the traditional methods. The capability for acquiring multispectral images of surfaces, permits to realize a diagnosis using non invasive methods, which are essential in projects for preservation of Cultural Heritage [1].

In the last years, several authors recognized the great importance of biodeterioration of building materials phenomena, considering this as the major problem to the preservation of the stone built Cultural Heritage. The comprehension of the biodeterioration causes through the interpretation of digital images, will originate new ways of intervention, active, as well as passive, on Cultural Heritage.

Environmental factors combined with intrinsic properties of stone create favorable conditions for the microorganisms' development, favoring chemical and mechanical deterioration, which in turn influences the aesthetics. Photosynthetic microorganisms have a competitive advantage, due to their autotrophy, being pioneers in the colonization of stone

surfaces. Organized in biofilms, their thickness ranges from a few micrometers to millimeters, and they consist in layers of algae and cyanobacteria. Stone inhabiting microorganisms can be found on the surface or internally as endolithic organisms. When surface environmental conditions are adverse, endolithic colonization occurs as a survival strategy. The proliferation of microorganisms under the stone's surface favors the stone biodeterioration.

Stone samples of two lithotypes, *piedra de San Cristóbal* (Spain) and *pietra di Lecce* (Italy), have been inoculated with a culture of algae and cyanobacteria. Endolithic growth was studied, after 3 and 6 months of incubation, using image analysis by Principal Component Analysis (PCA) methodology, which has demonstrated to be a useful tool for discriminating elements apparently hidden on images [2,3,4] with special emphasis to minority Principal Components [5]. PCA allows the simplification of graphic analysis, reducing the complexity of elements corresponding to different bands of images. False-colour images were digitally built through minority Principal Components (PC), which reflects the information hidden by major PC. This methodology was developed on a study by Rogerio-Candelera et al. [6]. The capability for PCA to reduce redundant data, and to filter visual information, permits the detached analysis, classification and representation of the study motifs – endolithic growth. Therefore, the minority elements of an image were diagnosed with a better resolution and contrast capacity, and it was also identified and quantified the depth of microorganisms' penetration within the stone, which were less evident on object under study. Optical microscopy and image analysis of transversal samples confirmed the presence of a thin green band parallel to the rock surface, which was attributed to the endolithic development of the phototrophic biofilm (Fig. 1). After 3 months of incubation, the green band ranges from 1 to 3 mm in thickness, with a maximum penetration depth of 3 mm. The resulting false-colour image shows the phototrophic biofilm in light blue and the stone samples in red.



Figure 1 - Original image of *piedra de San Cristóbal*, after 6 months of incubation.

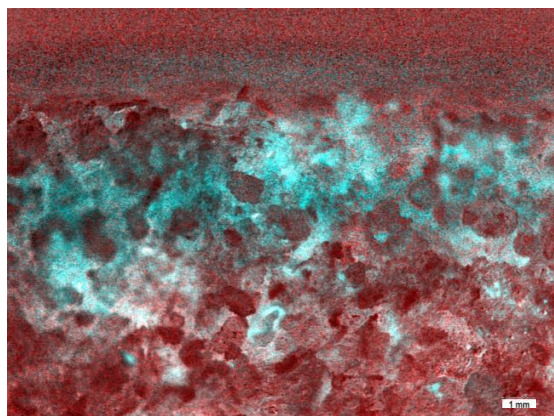


Figure 2 – False-colour image of *piedra de San Cristóbal* obtained through Principal Components Analysis (PC3, PC2, PC2), with endolithic growth of a photosynthetic biofilm, after 6 months of incubation. Scale = 1 mm.

After 6 months of incubation, the endolithic growth of the biofilm in *piedra de San Cristóbal* reached the penetration depth of 5 mm . For the same incubation time, the biofilm maximum penetration in *pietra di Lecce* was only 3mm.

Image analysis was performed by using Adobe Photoshop CS2 ® and HyperCube 9.5 (*US Army Topographic Engineering Centre, Alexandria, Virginia, USA*) software. This method has the advantage of being less expensive and less time consuming than the other analytical methodologies. It has also the advantage of using fewer means. Therefore, PCA methodologies emerge as a low-cost finest option for the screening and diagnosis of biodeterioration processes on Cultural Heritage.

References

- [1] A. Castellano, M. Martini, and E. Sibilia, *Elementi di archeometria: metodi fisici per i Beni Culturali*. Milano: Egea, 2002.
- [2] M. Bacci, R. Chiari, , S. Porcinai, and B. Radicati, Principal Component Analysis of near-infrared spectra of alteration products in calcareous samples: An application to works of art, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 1997, 39: 115-121.
- [3] J.R. Mansfield, M. Attas, C. Majzels, E. Cloutis, C. Collins, and H.H. Mantsch, Near infrared spectroscopic reflectance imaging: a new tool in art conservation, *Vibrational Spectroscopy*, 2002, 28: 59-66.
- [4] M. Attas, E. Cloutis, C. Collins, D. Goltz, C. Majzels, J.R. Mansfield, and H.H. Mantsch, Near-infrared spectroscopic imaging in art conservation: investigation of drawing constituents, *Journal of Cultural Heritage*, 2003, 4: 127-136.

[5] M.A. Rogerio-Candelera, L. Laiz, J.M. González, and C. Sáiz-Jiménez, Monitorización del crecimiento microbiano en una tumba romana mediante técnicas de teledetección, In M. García Vuelta, I. Montero Ruiz y S. Rovira Llorens (eds.) *Actas del VII Congreso Ibérico de Arqueometría*, 2008.

[6] M.A. Rogerio-Candelera, V. Jurado, L. Laiz, and C. Sáiz-Jiménez, Image analysis of biodeterioration-affected rock and mural paintings. In J.L. Ruvalcaba Sil, J. Reyes T. e A. Velázquez (eds.) *La Ciencia de Materiales y su impacto en la Arqueología* vol. V. México: Sociedad Mexicana de Ciencia de Materiales A.C., 2008 (in press).

ANEXO XI

Poster apresentado na conferência RecPad 2008, 14^a Conferência de Reconhecimento de Padrões realizada em Coimbra, a 31 de Outubro de 2008.



Image analysis as a tool for monitoring a biofilm growth on stone materials used in Cultural Heritage

M.I. Gomes*, M.A. Rogerio-Candelera**, A.Z. Miller*, M.F. Macedo*, A. Dionísio***

*Departamento de Conservação e Restauro, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Monte de Caparica, 2829-516 Caparica, Portugal **Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, CSIC. Apartado 1052, 41080 Sevilla ***Centro de Petrologia e Geoquímica, Instituto Superior Técnico, Av. Rovisco Pais, 1049-001, Lisboa, Portugal.

Introduction

Development of computer systems allowed substantial changes and advances regarding documentation and diagnosis of the preservation state in the field of Cultural Heritage. The techniques used in the past (namely analogical photographic techniques) have been surpassed, and actually the acquisition and digital treatment of images incorporates systematic methodologies, which allows the management of information at a level not reached by the traditional methods.

In the last years, several authors recognized the great importance of biodeterioration of building materials phenomena, considering this as the major problem to the preservation of the stone built Cultural Heritage. The comprehension of the biodeterioration causes through the interpretation of digital images, will originate new ways of intervention, active, as well as passive, on Cultural Heritage.

Results

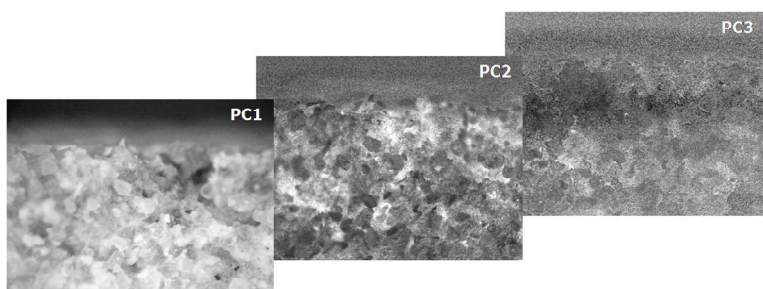


Figure 1 – Image of cross section of the *piedra de San Cristóbal*. Bands from the PCA, each is a Principal Component.



Figure 2 - Original image of *piedra de San Cristóbal*, after 6 months of incubation.

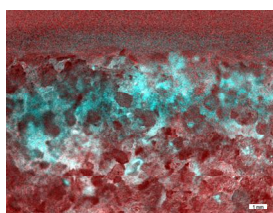


Figure 3 – False-colour image of *piedra de San Cristóbal* obtained through Principal Components Analysis (PC3, PC2, PC2), with endolithic growth of a photosynthetic biofilm, after 6 months of incubation. Scale = 1 mm.

After 3 months of incubation, the resulting false-colour image of *piedra de San Cristóbal* showed the phototrophic biofilm in light blue and the stone samples in red. The blue band ranges from 1 to 3 mm in thickness, with a maximum penetration depth of 3 mm.

After 6 months of incubation, the endolithic growth of the biofilm in *piedra de San Cristóbal* reached the penetration depth of 5 mm. For the same incubation time, the biofilm maximum penetration in *pietra di Lecce* was only 3mm.

References

M.A. Rogerio-Candelera, V. Jurado, L. Laiz, and C. Sáiz-Jiménez, Image analysis of biodeterioration-affected rock and mural paintings. In J.L. Ruvalcaba SII, J. Reyes T. e A. Velázquez (eds.) *La Ciencia de Materiales y su Impacto en la Arqueología* vol. V. México: Sociedad Mexicana de Ciencia de Materiales A.C., 2008 (in press).

Acknowledgements

This work has been performed in the framework of the project 2007PT0041 (CSIC-FCT).

Methodology

Stone samples of two lithotypes, *piedra de San Cristóbal* (Spain) and *pietra di Lecce* (Italy), presents in Cultural Heritage, have been inoculated with a culture of algae and cyanobacteria. Endolithic growth was studied, after 3 and 6 months of incubation, using image analysis by Principal Component Analysis (PCA) methodology, which has demonstrated to be a useful tool for discriminating elements apparently hidden on images with special emphasis to minority Principal Components. PCA allows the simplification of graphic analysis, reducing the complexity of elements corresponding to different bands of images (Fig.1). False-colour images were digitally built through minority Principal Components (PC), which reflects the information hidden by major PC (Fig.3). This methodology was developed on a study by Rogerio-Candelera et al. (2008).

For detection of photosynthetic biofilm (Fig.3) only the minority components were used: the PC3 with 0.39% of information and twice the PC2 with 1.90% of information. Image analysis was performed by using Adobe Photoshop CS2® and HyperCube 9.5 (US Army Topographic Engineering Centre, Alexandria, Virginia, USA) software.

Conclusions

The ability for PCA to reduce redundant data, and to filter visual information, allowed the detached analysis, classification and representation of the study motifs - endolithic growth - that was not possible to see in the original photo. It was also found that the *piedra de San Cristóbal* presents the higher bioreceptivity because endolithic growth was superior in this lithotype. In this study PCA methodologies appeared as a low-cost finest option for the screening and diagnosis of biofilm growth on stone materials used in Cultural Heritage.

