

# NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC Y DIÓXIDO DE TITANIO PARA LA INHIBICIÓN O ERRADICACIÓN DE AGENTES BIODETERIOGENOS EN PATRIMONIO HISTÓRICO

## NANOPARTICLES OF ZINC OXIDE AND TITANIUM DIOXIDE FOR THE INHIBITION OR ERADICATION OF BIODETERIOGENS IN HISTORICAL PATRIMONY

Alejandro Robles Ruiz<sup>1</sup>, Atzin Elizabeth Alcaraz Domínguez<sup>1</sup>, César Aarón Villalobos Díaz<sup>1</sup>, Evelyn Abril Natera Maldonado<sup>1</sup>, Macrina Beatriz Silvia Cazares<sup>2</sup>, Cynthia Lizeth González Trevizo<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Tecnológico de Monterrey, Escuela de Ingeniería y Ciencias, Departamento de Biotecnología, Av. Heroico Colegio Militar No. 4700, Col. Nombre de Dios, C.P. 31300, Chihuahua, Chih., México.

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Coordinación Académica Región Altiplano. Carr a Cedral km 5+600. Ejido San José de las Trojes, C. P. 78760, Matehuala, S.L.P., México.

cynthial.gonzalez@itesm.mx

### Resumen

El biodeterioro es un problema que afecta al patrimonio histórico; la erosión, coloración y colonización biológica del material de construcción ocasionan problemas estructurales y estéticos. El objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar a los agentes biodeteriogenos responsables del daño en el templo de San Juan Bautista en Chihuahua, Chih., México. Se evaluó la capacidad de inhibición o erradicación de una solución con nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) y dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>). La caracterización permitió identificar cinco biodeteriogenos: *Acarospora* cf. *socialis*, *Acarospora impressula*, *Acarospora cervina*, *Squamulea subsoluta* y *Cladosporium* cf. *cladosporioides*. Las nanopartículas de ZnO inhibieron todos los microorganismos de interés. Hubo una disminución del 53.22 al 73.21% con respecto al crecimiento habitual en *Acarospora* spp. e inhibición completa para las demás especies, concluyendo que la solución acuosa de nanopartículas de ZnO resulta eficaz en la inhibición o erradicación de los microorganismos responsables del biodeterioro.

**Palabras clave:** biodeterioro, biodeteriogenos, patrimonio histórico, fungicida, óxido de zinc, dióxido de titanio.

### Abstract

Biodeterioration affects cultural heritage worldwide; erosion, coloration, and biological colonization of construction materials can cause structural and aesthetic problems. The objective was to isolate and characterize microorganisms responsible for damage present in the temple of San Juan Bautista in Chihuahua, Chih., México. The biocidal activity of a solution with zinc oxide (ZnO) and titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles was evaluated. Five biodeteriogens were identified: *Acarospora* cf. *socialis*, *Acarospora impressula*, *Acarospora cervina*, *Squamulea subsoluta*, and *Cladosporium* cf. *cladosporioides*. ZnO np inhibited all target organisms. *Acarospora* spp. presented a 53.22-73.21% reduction in comparison to untreated organisms. Complete inhibition was possible with the other two species. Therefore, an aqueous solution of ZnO nanoparticles is suggested for the inhibition or eradication of biodeteriogens.

**Keywords:** biodeterioration, biodeteriogens, cultural heritage, fungicide, zinc oxide, titanium dioxide.

### 1. Introducción

La Parroquia San Juan Bautista de Nombre de Dios se encuentra en la ciudad de Chihuahua y es un ejemplo de una de las misiones franciscanas más antiguas en la cual se presenta un gran deterioro. A finales del siglo XVII, los

daños estructurales del templo condujeron a su demolición y eventual reconstrucción. Hoy en día se ve amenazado de nuevo, pues sufre de un deterioro causado por microorganismos epiliticos y endolíticos. El templo está construido de ladrillo, cantera, mortero y piedra; todos estos materiales se ven afectados por la colonización

microbiana. En sus paredes exteriores presenta crecimientos fúngicos y en el ladrillo del campanario crecen especies de líquenes mixtas (y en ocasiones superpuestas). Estos son claros ejemplos de deterioro en patrimonio histórico (Sterflinger y Piñar, 2013). El daño causado por agentes biológicos se determina “biodeterioro”, un término que Hueck (1965) definió como “cualquier cambio indeseable en las propiedades de un material causado por las actividades vitales de organismos”. En especial, se ha documentado en materiales porosos con los cuales se erigieron los monumentos e inmuebles encontrados en sitios arqueológicos (Dupont *et al.*, 2007; Ortega-Calvo *et al.*, 1991; Saarela *et al.*, 2004; Urzi, 2004). Los microorganismos en estos materiales se benefician de los minerales que provee la roca para llevar a cabo funciones vitales y esto a su vez impacta negativamente la integridad estructural de la obra. Por sus características metabólicas, los hongos y los líquenes se encuentran entre los 5 principales agentes causantes de biodeterioro; los otros son insectos, bacterias y arqueas (Sterflinger y Piñar, 2013). Más específicamente, los hongos crecen en superficies propensas a humedad. Estos organismos son estrictamente heterótrofos; se alimentan por absorción y poseen paredes celulares compuestas de quitina; en la piedra, obtienen sus nutrientes de las fuentes de alimento orgánicas disponibles: otros microbios, insectos o excremento de aves (Sharma *et al.*, 1985). Por otro lado, se encuentran los líquenes, los cuales son una relación simbiótica entre un organismo fotótrofo unicelular con un hongo (denominados fotobionte y micobionte respectivamente). Los ácidos liquénicos son compuestos generados por el micobionte que promueven la disolución y quelación de nutrientes de la superficie a la que se adhiere para beneficio del fotobionte, pero dañando el material (Madigan *et al.*, 2014), en el caso de patrimonio histórico esto representa una amenaza evidente. Los líquenes costrosos, aparte, son principalmente endolíticos y su remoción mecánica debilita la piedra y esparcir las esporas (Lisci *et al.*, 2003). El objetivo de este estudio fue investigar las características de los organismos encontrados en la Parroquia de San Juan Bautista para discriminar entre los posibles culpables del deterioro y formular una solución efectiva a base de nanopartículas antimicrobianas contra los organismos dañinos. Al conocer el efecto cualitativo y cuantitativo de la solución biocida se podrá llevar a cabo una intervención adecuada, sin efectos nocivos para la apariencia o integridad del templo, y que permita disminuir el proceso de biodeterioro microbiano.

## 2. Métodos

Para probar la capacidad inhibitoria de las nanopartículas, fue necesario seleccionar los organismos representativos

de la comunidad microbiana en San Juan Bautista, y discriminar los organismos que no sean causantes del biodeterioro.

### 2.1 Recolección y aislamiento

Se tomaron muestra de las lesiones presentadas por el templo; se almacenaron en un buffer de fosfatos para su transporte y posterior inoculación. Se transportaron en una hielera portátil.

Las lesiones identificadas como hongos se recolectaron con hisopo estéril y se inocularon en agar papa dextrosa (PDA); se incubaron estas muestras a 15 grados Centígrados. Las que se sospechaba podrían ser bacterias se inocularon en solución salina al 85% y se inocularon en agar soya tripticaseina (TSA) que se almacenó a 30 °C .

Por último, los líquenes costrosos se removieron con bisturí estéril, colocando las bolsas de papel estraza estériles bajo el bisturí para que la muestra cayera ahí. Posteriormente, se colocaron las muestras de los líquenes en un vaso con agua destilada por 12 horas continuas. Esta muestra se pasó por una malla metálica de 1 cm de grosor, después se pasó por papel filtro. La muestra que quedó sobre el papel filtro se colocó directamente sobre agar Murashige & Skoog (MS). Se incubaron junto con los hongos.

Para el aislamiento de cada uno, se realizaron resiembra continuas de cada microorganismo en TSA (para bacterias) y SDA (para hongos), de las que se hacía tinción después de cada siembra (tinción Gram o azul de algodón, dependiendo del microorganismo). Los hongos que aparecieron donde se inocularon los líquenes se pasaron a agar Sabouraud con dextrosa (SDA) y MS (el medio que mejor crecimiento proporcionará para cada especie).

Cuando se probó que los organismos estaban aislados, se pasó a su caracterización.

### 2.2 Caracterización de las muestras

Los hongos de vida libre aislados de las lesiones no liquénicas (14 especies) se identificaron observando su morfología microscópica. Uno se identificó como el causante del biodeterioro; el resto eran inocuas.

Las muestras de liquen costroso se sometieron a los *spot tests* K (colocando una gota de KOH al 10%) y C (colocando una gota de hipoclorito de sodio al 5.25%). También se observaron bajo luz UV. Una vez identificada cada especie de esta manera, se relacionó con el hongo (de los posibles micobiontes) que tuviera morfología correspondiente al género del hongo liquenizado.

Al final, se encontraron 5 biodeteriogenos (1 hongo y 4 líquenes). El exterior del templo estaba cubierto de un hongo del género *Cladosporium* (posibles especies

*cladosporioides* o *sphaerospermum*); la mayoría de las lesiones inoculadas presentaron este hongo. En la parte superior se encontraron cuatro líquenes. Tres del genero *Acarospora*: *impressula*, *cerivna* y uno último que podría ser *socialis* o *chrysops*. El otro es *Squamulea subsoluta*.

Aparte, se presentaba erosión en la parte superior del campanario del templo, pero dado a que no se obtuvieron organismos dañinos de esta muestra, se cree que no es biodeterioro.

### 2.3 Pruebas de Toxicidad

Se realizaron cinco diseños experimentales aleatorizados, y cada diseño consideró tres factores: la concentración de nanopartículas de ZnO, concentración de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> y valor de pH. Cada factor se evaluó con un nivel alto y bajo. Se prepararon agares para cada experimento (MS y Sabouraud, dependiendo del organismo en el que se haría la prueba)

Así mismo se prepararon controles positivos con cada nivel de pH para asegurarse que la inhibición del crecimiento no fuera causada únicamente por el pH del medio de cultivo. Después de preparar los medios con nanopartículas se procedió a inocular los hongos por medio de la técnica de piquete, los cuales dejaron entre 5 y 10 días de incubación a temperatura ambiente bajo luz constante en un anaquel con focos integrados.

Para los experimentos complementarios fue necesario inocular con una semana de anticipación a la experimentación las cajas petri con los hongos a evaluar. Luego se prepararon 16 matraces con soluciones distintas las cuales contenían una mezcla de los diferentes factores y niveles. Por último se depositaron 1.5 mL de la solución correspondiente sobre el hongo con una semana de crecimiento.

El diámetro de crecimiento de cada organismo se midió con ayuda de un calibre Vernier, En los casos donde no hubo crecimiento después de 10 días de inoculación en las cajas petri con nanopartículas, pero sí se observó en controles positivos, se registró que tal concentración lograba inhibirlos por completo y se prosiguió a buscar la menor concentración que inhibiera el crecimiento.

Para los experimentos complementarios se registraron los hongos que mostraron una diferencia significativa en tamaño, forma o coloración en comparación al control positivo.

Se ingresaron los datos obtenidos de la experimentación a un software de análisis estadístico (Minitab 18). Los resultados del software se interpretaron para obtener los factores significativos de cada organismo. Posteriormente se observaron las gráficas generadas para verificar que

cada experimento presentara normalidad en sus datos y errores, así como una varianza constante. Por último se generaron los intervalos de confianza entre los cuales debería estar el diámetro de crecimiento en las pruebas confirmatorias.

Después del análisis estadístico se seleccionó el tratamiento más eficiente. Posteriormente se realizaron las pruebas confirmatorias en los micobiontes *Acarospora* cf. *socialis*, *Acarospora cervina* y *Acarospora impressula*.

Para *Acarospora* cf. *socialis* se preparó medio SDA con nanopartículas de óxido de zinc a una concentración de 600 ppm. Por otro lado, para *Acarospora cervina* se elaboró agar MS con nanopartículas de óxido de Zinc a 600 ppm y un valor de 6 para el pH. Estos valores también fueron utilizados para *Acarospora impressula*, sin embargo el medio utilizado fue SDA.

Después se realizó la inoculación de los diferentes hongos en sus respectivos agares y se incubaron bajo las mismas condiciones descritas en la experimentación. Al transcurrir el tiempo que pasó entre la inoculación original y su medición, se realizó el registro del diámetro de crecimiento de la prueba confirmatoria y se comparó con el intervalo de confianza previamente calculado.

Para cada uno de los hongos que fueron inhibidos por completo (*Cladosporium* cf. *cladosporioides* y *Squamulea subsoluta*) se prepararon 4 agares con nanopartículas de TiO<sub>2</sub> y 4 con ZnO. Para ambas nanopartículas, los agares contenían 300, 200, 100 y 50 ppm. Se realizó una resiembra con asa de disección en estos, con la intención de encontrar la cantidad mínima necesaria para inhibir el crecimiento. Se registraron los resultados de inhibición cuando los controles positivos presentaban crecimiento evidente.

## 3. Resultados y discusión

Se encontraron múltiples lesiones causadas por diversos microorganismos en diferentes materiales como cantera, mortero, piedra y ladrillo. De las 22 muestras recabadas se aislaron y caracterizaron 5 hongos y 4 líquenes.

### 3.1 Identificación taxonómica

Los hongos analizados fueron: *Zygosaccharomyces rouxii*, *Exophiala dermatitidis* *Cladosporium* cf. *cladosporioides*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus terreus*. De los cuales se identificó como agentes biodeteriogenos únicamente a dos de ellos: *Cladosporium* cf. *cladosporioides* y *A. flavus*.

El cultivo de *A. flavus* presentó una coloración frontal verde y amarilla y al reverso blanca. Después de 7 días de incubación presentó un diámetro de crecimiento entre 3 y 5 cm y microscópicamente hifas septadas y conidias

radiales. Este es uno de los hongos ambientales más comunes (Samson, Hoeksta, Frisvad & Filtenborg, 2000) y causó la aparición de una mancha verde sobre la cantera. Anteriormente ya se habían reportado casos ocasionó un deterioro similar. (Clair & Seaward, 2004).

*Cladosporium* cf. *cladosporioides* presentó una coloración frontal café o verde, y reversa blanca, gris o negra, además, un diámetro entre 3 y 4 cm después de 10 días de incubación. Esta es una característica representativa de *C. cladosporioides*, sin embargo la especie *sphaerospermum* posee características muy similares, con la única diferencia de que cuenta con conidias más cortas (Samson, Hoeksta, Frisvad & Filtenborg, 2000). Microscópicamente estas especies presentan conidias ramificadas laterales o terminales. (Samson, Hoeksta, Frisvad & Filtenborg, 2000). Cabe mencionar que para tener una clasificación certera de la especie a la cual pertenece este hongo se debe realizar pruebas de biología molecular. Es importante mencionar que *Cladosporium* se encuentra comúnmente en esporas ambientales y se ha reportado como uno de los principales géneros causantes de deterioro en materiales construidos de piedra (Sterflinger & Piñar, 2013). Principalmente se presenta como una mancha negra y vellosa. Otro aspecto relevante es que produce alergias y respuestas asmáticas (Kantarcioglu, Yücel, & Hoog, 2002).

Por otra parte los 4 líquenes fueron identificados como: *Acarospora* cf. *socialis*, *A. impressula*, *A. cervina* y *Squamulea subsoluta*. Todos presentaban una apariencia costrosa, sin embargo, una coloración diferente.

*Acarospora* cf. *socialis* tenía un color verde, y resultó negativo a las pruebas de potasio(K) e hipoclorito de sodio (C). Este líquen se ha reportado en el centro del país, y el desierto de Sonora y Texas (Nash *et al.*, 2007). Por otro lado *A. impressula* y *A. cervina* presentaban una coloración negra y gris respectivamente, y negativos para las pruebas de K y C. Ambos se han reportado en la región norte de México sin embargo *A. impressula* anteriormente solo se había registrado en regiones cercanas al mar. (Nash *et al.*, 2007; G erault, 2014).

Después de identificar cada líquen se realizó una investigación bibliográfica para encontrar cual de los hongos aislados de la muestra inicial correspondía a su micobionte. Ninguno de los líquenes propuestos contaba con el micobionte registrado (McDonald, Gaya, & Lutzoni, 2013); únicamente se encontró que el hongo no liquenizado pertenece al phylum ascomycota, esto ayudó en su identificación ya que la principal característica de este phylum es que presenta ascosporas. Basados en las características microscópicas de los hongos aislados se identificó como posibles micobiontes a los únicos que presentan esta estructura reproductiva.

### 3.2 Inhibición o erradicación de microorganismos dañinos

Se evaluó la eficiencia de nanop rticulas de óxido de Zinc, nanop rticulas de óxido de titanio y el efecto del pH sobre cinco microorganismos biodeteri genos: *Cladosporium* cf. *cladosporioides*, y los micobiontes de *Squamulea subsoluta*, *Acarospora* cf. *socialis*, *A. impressula* y *A. cervina*.

Para *Cladosporium* cf. *cladosporioides* y *Squamulea subsoluta* no se observó crecimiento en los agares inoculados, los cuales previamente se habían adicionado con nanop rticulas y ajustados al valor del pH requerido. Debido a esto no fue factible realizar un análisis estadístico detallado. Los controles positivos (con diferente pH de 5.6, 6 y 8) presentaron crecimiento por lo que se concluyó que la concentración utilizada era muy alta y logró inhibir por completo a dichos microorganismos. Después se determinó la concentración mínima inhibitoria mediante la técnica de crecimiento radial para la cual se utilizaron cuatro diversas concentraciones de nanop rticulas de TiO<sub>2</sub> y ZnO; los valores fueron: 300 ppm, 200 ppm, 100 ppm y 50 ppm.

La concentración mínima inhibitoria de las nanop rticulas de ZnO para *Cladosporium* fue menor a 100 ppm y mayor a 50 ppm. En el caso del TiO<sub>2</sub> hubo crecimiento en todas las concentraciones por lo cual no fue un factor significativo.

Así mismo la prueba de *Squamulea subsoluta* mostró que la concentración mínima inhibitoria de nanop rticulas de ZnO fue entre 100 y 200 ppm; y la concentración de nanop rticulas de TiO<sub>2</sub> fue mayor a 200 ppm y menor a 300 ppm.

Por el contrario en los tres microorganismo restantes se produjo un inhibición parcial del crecimiento. Mediante un análisis de varianza se identificaron los factores representativos. Para *Acarospora* cf. *socialis* el único factor que produjo una variación significativa en la inhibición del crecimiento fue la concentración de óxido de Zinc. La ecuación de predicción obtenida arrojó un diámetro de 2.828 al utilizar el nivel alto (600ppm) de ZnO y uno de 5.82 para el bajo (300ppm), lo cual indicó que el nivel con que producía una mayor inhibición en el crecimiento fue el alto (una concentración de 600 ppm).

Por otro lado para *A. cervina* y *A. impressula* los factores que produjeron una variación significativa en la inhibición del crecimiento fueron la concentración de nanop rticulas de Zn y el valor del pH.

El análisis de residuos para cada microorganismo demostró que los 5 diferentes diseños experimentales presentaban normalidad en sus errores (residuos). Esto significa que los valores resultado del experimento provienen de una distribución de probabilidad normal con media  $\mu$  y desviación  $\sigma^2$ . Así mismo tuvieron una varianza constante

y presentaban independencia entre las observaciones (Medina & López, 2011).

Las pruebas confirmatorias realizadas para cada diseño experimental fueron satisfactorias.

### 3.2 Mecanismo de acción de las nanopartículas seleccionadas

No hay un consenso sobre el mecanismo de nanotoxicidad del óxido de zinc, pero se ha notado que su efecto es distinto entre hongos de varios géneros. Por ejemplo, en *Botrytis*, las nanopartículas interfieren con funciones celulares, ocasionando deformación de las hifas. En *Penicillium* detiene la formación de conidios, y causa, eventualmente, la muerte de la hifa (He *et al.*, 2011). En bacterias, son capaces de desnaturalizar proteínas y ácidos nucleicos, inhibiendo la replicación (George, Raj, Solomon & Roselin, 2014).

Se sabe que la toxicidad tiene que ver con el tamaño y concentración de nanopartículas y se estipula que quizá sea porque al reaccionar con el agua o Hidrogeno en el organismo, se generan especies reactivas de oxígeno en la superficie de la partícula, causando necrosis y apoptosis (Arciniegas-Grijalba *et al.*, 2017). También se considera que la actividad semiconductor de las nanopartículas de ZnO podría causar disrupciones en la cadena de transporte de electrones (Xia *et al.*, 2008).

Por otro lado, las capacidades antifúngicas del dióxido de titanio han sido probadas en *Candida albicans* y tienen resultados variados (Roudbar, Haghghi, & Mohammadi, 2011). Gao *et al.* (2013) han concluido que su toxicidad en eucariotas se debe a una disrupción en la expresión génica. Se ha concluido que aunque poseen actividad antifúngica, es menor la que exhiben las nanopartículas de óxido de zinc (George *et al.*, 2014).

## 4. Conclusión

Se logró identificar a *Cladosporium* cf. *cladosporioides* como el causante de las abundantes manchas negras en el templo dado que todos sus características microscópicas y macroscópicas coinciden con las reportadas por Samson, Hoeksta, Frisvad & Filtenborg (2000). Además, *Cladosporium* es conocido por causar deterioro en materiales de construcción y tiene capacidad de producir compuestos alergénicos, causar reacciones asmáticas e incluso infecciones en distintos sistemas (Kantarcioğlu, Yücel, & Hoog, 2002).

Los líquenes que se encuentran en el templo son *Squamulea subsoluta*, *Acarospora* cf. *socialis*, *A. impressula* y *A. cervina*. Todos estos son biodeteriogenos, pues son organismos endolíticos que generan ácidos, fueron identificados a partir de las pruebas K, C y UV. Como son líquenes costrosos, su remoción no puede ser

mecánica, para evitar mayor deterioro. La solución que se propone actúa en el organismo sin esparcir sus esporas.

Se evaluó dicha solución en los cinco agentes causantes de biodeterioro en el templo, y la experimentación realizada llevó a concluir que para ninguno de los organismos evaluados tiene efecto la concentración de nanopartículas de dióxido de titanio a excepción de *S. subsoluta*; a todos les afecta negativamente la aplicación de nanopartículas de óxido de zinc (donde causó un retraso en el crecimiento en *Acarospora* spp. e inhibición total en los otros dos géneros); a *Acarospora impressula* y *Acarospora cervina* los impactan los valores de pH más bajos.

Finalmente, se propone realizar experimentación en campo, para conocer la efectividad *in situ* y las contradicciones de la solución.

## Referencias

- Dupont, J., Jacquet, C., Dennetière, B., Lacoste, S., Bousta, F., Oriol, G., ... Roquebert, M.-F. (2007). Invasion of the French Paleolithic painted cave of Lascaux by members of the *Fusarium solani* species complex. *Mycologia*, 99(4), 526–533. <https://doi.org/10.1080/15572536.2007.11832546>
- Kantarcioğlu, A. S., Yücel, A., & Hoog, G. S. (2002). Case report. Isolation of *Cladosporium cladosporioides* from cerebrospinal fluid. *Mycoses*, 45(11–12), 500–503. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2002.00811.x>
- Lisci, M., Monte, M., & Pacini, E. (2003). Lichens and higher plants on stone: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(1), 1–17. [https://doi.org/10.1016/s0964-8305\(02\)00071-9](https://doi.org/10.1016/s0964-8305(02)00071-9)
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., & Stahl, D.A. (2015). *Brock, Biología de los Microorganismos*. Pearson.
- Ortega-Calvo, J. J., Hernandez-Marine, M., & Saiz-Jimenez, C. (1991). Biodeterioration of building materials by cyanobacteria and algae. *International Biodeterioration*, 28(1–4), 165–185. [https://doi.org/10.1016/0265-3036\(91\)90041-o](https://doi.org/10.1016/0265-3036(91)90041-o)
- Saarela M., Alakomi H.L., Suihko M.L., Maunuksela L., Raaska L., Mattila-Sandholm T. (2004) Heterotrophic microorganisms in air and biofilm samples from Roman catacombs, with special emphasis on actinobacteria and fungi. *Int Biodeterior Biodegrad* 54:27–37
- Samson, R., Hoekstra, E., Frisvad, J., & Filtenborg, O. (2000). *Introduction to food- and airborne fungi*. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures.

- Sharma, B., Chatuverdi, K., Samadiha, N., & Tailor, P. (1985) Biological growth removal and comparative effectiveness of fungicides from central India temples for a decade in-situ. in Proceedings of the Vth International Congress on Deterioration and the Conservation of Stone. Presses Polytechniques Romanes, Lausana, pp. 675-683
- Sterflinger, K., & Piñar, G. (2013). Microbial deterioration of cultural heritage and works of art — tilting at windmills? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(22), 9637-9646. doi:10.1007/s00253-013-5283-1
- Urzi, C. (2004) Microbial deterioration of rocks and marble monuments in the Mediterranean basin: a review. *Corros Rev* 22: 441