



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) para
identificação de células microbianas: aplicação
ao património cultural**

Ricardo Nuno Oliveira Vieira

Orientação: Professora Doutora Ana Teresa Caldeira

Professor Doutor António Pereira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2014



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) para
identificação de células microbianas: aplicação ao
património cultural**

Ricardo Nuno Oliveira Vieira

Orientação: Professora Doutora Ana Teresa Caldeira

Professor Doutor António Pereira

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2014

Agradecimentos

Este trabalho experimental não teria tido sucesso sem a intervenção de várias pessoas.

Em primeiro lugar queria agradecer à minha orientadora Prof. Dra. Ana Teresa Caldeira pelo apoio ao longo de todos os anos de trabalho, pela disponibilidade em esclarecer alguma dúvida mas também o afeto demonstrado para comigo. Queria também agradecer ao Prof. Dr. António Pereira pela coorientação, ajuda ao longo do trabalho e pelas palavras de ânimo ditas na altura certa.

Aos meus colegas e professores do Laboratório Hercules pela simpatia e por tornarem o trabalho mais divertido, bem como às funcionárias da fase III do Colégio Luís António Verney.

Não podia ainda deixar de agradecer às minhas colegas de laboratório (Cátia, Ana Carolina, Mara e Ana Branco) pela boa disposição, companheirismo e ajuda no laboratório; à Tânia e Patrícia por todo o auxílio e apoio prestados na execução do trabalho experimental; à Marina, pela paciência que teve para comigo e por toda a ajuda que me deu de modo a tornar este trabalho possível.

Queria agradecer à Joana pelo companheirismo, amizade e paciência ao longo de todos estes anos.

Por último não podia deixar de agradecer à minha estupenda família, por todo o apoio que sempre me deram.

MUITO OBRIGADO

Resumo

Este trabalho teve como objetivo investigar a possibilidade de aplicar a técnica FISH na detecção da comunidade microbiana em amostras de argamassas de pinturas murais. Para isso, selecionaram-se oito fungos filamentosos e duas leveduras. Os microrganismos foram isolados a partir de pinturas murais de edifícios históricos (Alentejo). Estes fungos foram hibridados com uma sonda (EUK516-Cy3) marcada com um corante fluorescente (Cy3). Diferentes fixantes foram utilizados em diversas condições de fixação para o desenvolvimento de um protocolo que possibilite a detecção dos microrganismos em amostras reais.

Com este trabalho, foi possível aplicar com sucesso o protocolo desenvolvido para a técnica FISH em amostras de pinturas murais, tendo-se obtido elevadas intensidades de fluorescência. Para a validação da técnica foram executados estudos de proliferação microbiana, tendo-se efetuado ensaios de microscopia eletrónica e ensaios enzimáticos de determinação de viabilidade celular. A confirmação da presença de fungos nas argamassas efetuou-se através de técnicas moleculares.

Abstract

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for identification of microbial cells: application to cultural heritage.

The aim of this study was investigate the possibility of applying the FISH technique in the detection of microbial community in samples of mortars murals. To accomplish this goal, we selected eight filamentous fungi and two yeasts. Microorganisms were isolated from mural paintings of historic buildings (Alentejo). These fungi were hybridized with a probe (EUK516-Cy3) labeled with a fluorescent dye (Cy3). Different fixatives (paraformaldehyde and ethanol) were used in various fixation conditions for the development a protocol that enables the detection of microorganisms in real samples.

With this work, it was possible apply with successfully the protocol developed for the FISH technique on samples of mural paintings, yielding high fluorescence intensities. To validate the technique were executed studies of microbial proliferation, having been made tests of electronic microscopy and enzyme assays for determination of cell viability. Confirmation of the presence of fungi in the mortar was effected through molecular techniques.

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract.....	v
Índice Geral	vii
Índice de Figuras	ix
Índice de Tabelas	xi
Índice de Abreviaturas e Unidades	xiii
Problemática	1
Objetivos do trabalho	3
Gerais	3
Específicos	3
1. Introdução.....	5
1.1. Biodeterioração	7
1.2. Identificação de microrganismos	11
1.3. Hibridação <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	13
1.3.1. Desenvolvimento da técnica.....	13
1.3.2. Sonda FISH	14
1.3.3. Procedimento de aplicação da técnica FISH	17
1.3.4. Problemas associados à técnica FISH	20
1.3.5. Aplicação das sondas FISH	21
2. Metodologia	23
2.1. Estratégia	25
2.2. Diagrama do trabalho.....	27
2.3. Procedimento experimental	28
2.3.1. Modelo biológico.....	28
2.3.2. Visualização das estruturas reprodutoras dos microrganismos	28
2.3.3. Preparação da suspensão microbiana	28
2.3.4. Crescimento de leveduras em meio líquido.....	28
2.3.5. FISH em amostras em suspensão	29
2.3.6. FISH em argamassas	29

2.3.7.	Avaliação da proliferação microbiana em argamassas reais	30
2.3.8.	Confirmação molecular de fungos.....	32
2.3.9.	Alinhamento das várias sequências selecionadas.....	32
2.3.10.	Relações filogenéticas das estirpes selecionadas.....	32
3.	Resultados e discussão	33
3.1.	Seleção de agentes biodeteriogênicos alvo	35
3.2.	FISH aplicada a células em suspensão.....	40
3.2.1.	Otimização de condições de fixação celular para fungos filamentosos	40
3.2.2.	Otimização das condições de fixação das células de leveduras	44
3.3.	FISH em argamassas sintéticas ou reais	45
3.4.	FISH em amostras reais	48
3.5.	Avaliação da proliferação microbiana	49
3.6.	Confirmação molecular de fungos	50
4.	Conclusões	51
5.	Perspetivas Futuras.....	55
6.	Referências bibliográficas	59
7.	Anexos.....	67

Índice de Figuras

Figura 1: Principais danos causados por ação microbiológica.	8
Figura 2: Imagens de MEV de microfragmentos de argamassa. As setas indicam a presença de fungos filamentosos e proliferação de hifas na superfície da argamassa (A, B) e a penetração desses microrganismos em profundidade (C, D)	10
Figura 3: Cultivo de microrganismos em meio sólido (a) e meio líquido (b).	11
Figura 4: Representação esquemática de uma sonda FISH.	14
Figura 5: Estrutura química do fluorocromo Cy3	16
Figura 6: Representação esquemática do procedimento da técnica FISH.	17
Figura 7: Microscópio eletrônico de varrimento com detetor de EDS.	31
Figura 8: Efeitos deteriogênicos provocados pelos microrganismos estudados.	36
Figura 9: Árvore filogenética das sequências parciais do 18S rRNA.	39
Figura 10: Representação esquemática das condições de fixação do <i>Aspergillus niger</i> e do <i>Penicillium</i> sp. em suspensão.	40
Figura 11: Microfotografias de fluorescência correspondentes a ensaios de FISH obtidos para o <i>Aspergillus niger</i> e o <i>Penicillium</i> sp. nas condições de fixação estudadas	41
Figura 12: Representação esquemática das condições de fixação para os restantes fungos filamentosos em suspensão.	42
Figura 13: Microfotografias de fluorescência correspondentes a ensaios de FISH dos oito fungos filamentosos em suspensão nas quatro condições de fixação estudadas.	43
Figura 14: Microfotografias de fluorescência correspondentes a ensaios de FISH em <i>Rhodotorula</i> sp. (a) e SC396 (b).	44
Figura 15: Microfotografias de fluorescência correspondentes a ensaios de FISH de fungos filamentosos em argamassas sintéticas nas quatro condições de fixação estudadas.	46

Figura 16: Microfotografias de fluorescência correspondentes a ensaios de FISH do fungo <i>Nectria</i> sp. em argamassas reais fixado com paraformaldeído (a-c) e com etanol (d-f). Na mesma área é mostrada as amostras com luz visível (a, d), uma combinação de luz visível e luz UV (b, e) e com luz UV (c, f).	47
Figura 17: Microfotografia de fluorescência correspondente ao ensaio de FISH em amostra real	48
Figura 18: Visualização dos microfragmentos por MEV (a, c) e análise por EDS (b, d).	49
Figura 19: Resposta relativa ao MTT do fungo <i>Nectria</i> sp. e da levedura SC396.....	50
Figura 20: Gel de electroforese dos produtos de amplificação de PCR a partir do DNA extraído de argamassas inoculadas com SC396 e <i>Nectria</i> sp. (poços 1 e 2, respetivamente). O poço M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb do DNA e o poço C ao controlo.....	50

Índice de Tabelas

Tabela 1: Fluorocromos mais utilizados nas sondas FISH.....	16
Tabela 2: Imagens fotográficas e de microscopia ótica dos microrganismos em estudo.....	37
Tabela 3: Número de acesso do GenBank.....	38

Índice de Abreviaturas e Unidades

Abreviaturas

- AMCA: Ácido 6-((7-amino-4-metilcoumarin-3-acetil) amino) hexanóico
- Au - Ouro
- C - Citosina
- CO₂ - Dióxido de Carbono
- Cy3 - *Indocarbocyanine*
- Cy5 - *Indodicarbocyanine*
- DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- dNTPs - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
- EDS - *Energy Dispersive Spectroscopy*
- EUK516 - Sonda universal para eucariotas
- FISH - *Fluorescence In Situ Hybridization* / Hibrição *in situ* Fluorescente
- FITC - *Fluorescein Isothiocyanate*
- G - Guanina
- HCl - Ácido clorídrico
- KCl - Cloreto de potássio
- KH₂PO₄ - Fosfato monopotássico
- MEV - EDS: Microscopia Eletrónica de Varrimento acoplada a um detetor de energias dispersiva de raios-x
- MgCl₂ - Cloreto de magnésio
- MTT - Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
- Na₂HPO₄ - Fosfato dissódico
- NaCl - Cloreto de sódio
- PBS - Tampão fosfato-salino
- PCR - Reação em cadeia da polimerase
- rDNA - Ácido desoxirribonucleico ribossômico
- RNA - Ácido ribonucleico

- rRNA - Ácido ribonucleico ribossômico
- SC396 - *Saccharomyces cerevisiae* CCM1 396
- SDS - Dodecil sulfato de sódio
- TRITC - *Tetramethylrhodamine*
- UV - Ultravioleta
- YPD - *Yeast Peptone Dextrose*

Unidades

- mL - mililitro
- min. - minuto
- g - grama
- v/v - volume/volume
- h - hora
- mM - milimolar
- μ L - micromolar
- ng - nanograma
- mg - miligrama
- nm - nanometro
- Pa - Pascal
- Kv - kilovolts
- pb - pares de bases
- V - Volt
- L -litro
- atm - atmosfera

Problemática

O património cultural está continuamente exposto à degradação física, química e biológica. De todos os agentes biológicos que provocam deterioração, os microrganismos são os mais relevantes, devido à sua enorme versatilidade e flexibilidade metabólica, aliadas à sua capacidade para tolerar condições desfavoráveis de desenvolvimento. Os microrganismos podem causar danos no património cultural através de uma variedade de mecanismos, entre eles: a formação de biofilmes, a ocorrência de reações químicas, danos causados por penetração física no substrato e também por produção de pigmentos (Berner *et al.*, 1997, Zucconi *et al.*, 2012). O desenvolvimento de novas formas para a deteção de contaminações microbianas é imprescindível, para promover estratégias de remediação eficazes (Amann *et al.*, 2001). A técnica hibridação *in situ* fluorescente (FISH) têm demonstrado ser uma ferramenta poderosa na análise *in situ*. No entanto, o seu real potencial para a pesquisa de agentes biodeteriogénicos de bens culturais ainda não foi investigado em profundidade.

Objetivos do trabalho

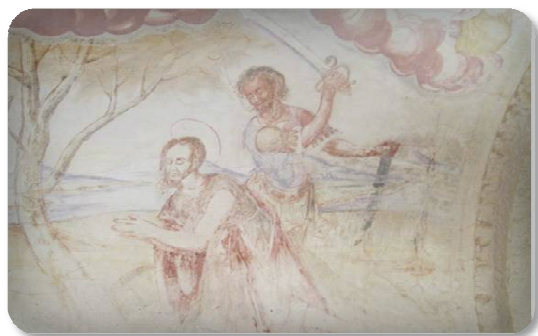
Gerais

Este trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento de novas metodologias de hibridação *in situ* fluorescente, para uma rápida e direta identificação de células microbianas, de modo a possibilitar o diagnóstico e tratamento da biodegradação do patrimônio cultural. Com este objetivo desenvolveu-se um protocolo FISH para aplicação em amostras de argamassas reais, tendo-se testado diversos tipos de fixantes com diferentes concentrações, tempos de incubação e temperaturas, tanto em suspensões microbianas como em argamassas inoculadas com microrganismos.

Específicos

- Observar as estruturas dos microrganismos biodeteriorogênicos de bens patrimoniais por técnicas de microscopia;
- Testar várias condições de fixação para as células microbianas;
- Realizar ensaios FISH em suspensões celulares;
- Observar os sinais de fluorescência das sondas FISH no microscópio de fluorescência;
- Desenvolver metodologias de aplicação de sondas FISH em amostras reais;
- Validar os resultados das sondas FISH, por comparação com outras metodologias já estabelecidas.

1. Introdução



1.1. Biodeterioração

Embora a história da biodeterioração em edifícios históricos e obras de arte seja longa, a sua importância tem sido negligenciada por muito tempo, acreditando-se que os processos químicos e físicos eram os fatores dominantes da degradação do patrimônio cultural. No entanto, nas últimas décadas o dogma mudou, sendo agora reconhecido que os microrganismos não só causam sérios danos estéticos em pinturas murais, cerâmicas, livros, manuscritos, entre muitos outros, como podem habitar e penetrar nos materiais, resultando assim em perda material devido à corrosão ácida, degradação enzimática e ao ataque mecânico (Sterflinger & Piñar, 2013, Griffin *et al.*, 1991, Ciferri, 1999, Gaylarde & Morton, 1999).

Sendo assim, a biodeterioração pode ser definida como qualquer mudança indesejável num material, provocada pelas atividades vitais de organismos (Sterflinger & Piñar, 2013, Ettenauer *et al.*, 2012, Rojas *et al.*, 2009).

O tipo de suporte e as diferenças climáticas, entre elas, exposição à luz e humidade, e o fornecimento de nutrientes para o crescimento dos microrganismos, têm um grande impacto sobre os processos de biodeterioração e seus resultados. Os metabolitos resultantes da atividade microbiana, como são os casos dos ácidos orgânicos e inorgânicos, agentes quelantes, enzimas e substâncias poliméricas extracelulares causam biocorrosão e biomineralização (Suihko *et al.*, 2007, Warscheid & Braams, 2000).

As superfícies de edifícios podem ser colonizadas por fungos, algas, cianobactérias, líquens, musgos, bactérias quimiolitotróficas, bactérias heterotróficas, protozoários e uma variedade de pequenos animais (Warscheid & Braams, 2000, Gorbushina & Petersen, 2000, Pepe *et al.*, 2010). A formação de biofilmes em superfícies limpas de edifícios novos, geralmente começa com organismos fototróficos (algas, cianobactérias), que usam o CO₂ da atmosfera como fonte de carbono e a luz solar como fonte de energia. As bactérias quimiolitotróficas obtêm a energia pela oxidação de compostos inorgânicos e pela fixação do CO₂ da atmosfera. Já os organismos heterotróficos (a maioria das bactérias e todos os fungos) precisam de alguma fonte de carbono orgânico para o seu crescimento, que é fornecido por metabolitos de organismos fototróficos ou por deposição atmosférica (Suihko *et al.*, 2007).

Tem sido demonstrado que alguns dos organismos heterotróficos que habitam a rocha (por exemplo, *Actinobactéria*), têm requisitos muito baixos de nutrientes que podem

ser satisfeitos com produtos orgânicos resultantes de ar poluído e de chuva, ou de restos de animais e excreções (Suihko *et al.*, 2007, Gorbushina & Petersen, 2000).

De entre os microrganismos, os fungos são os que apresentam efeitos mais nocivos, associados à biodeterioração de materiais orgânicos e inorgânicos (De Leo *et al.*, 2013, Wiktor *et al.*, 2009). A sua presença nos monumentos históricos é relatada como estando associada, não só à deterioração estética dos monumentos, mas também às mudanças de cor como é o caso dos pontos negros. Para além disso, há fortes evidências de que estes organismos são capazes de colonizar as rachaduras mais profundas, causar lesões com formato de crateras e lascas a superfície dos monumentos (Figura 1) (Gorbushina & Petersen, 2000, De Leo *et al.*, 2013, Wei *et al.*, 2013).



Figura 1: Principais danos causados por ação microbiana.

A exposição ao vento e à chuva, a carência de composto orgânicos e o *stress* ambiental, são fatores que atrasam o crescimento dos microrganismos. Para conseguirem superar essas limitações, alguns grupos de fungos abandonam o seu estado de hifas (o que é mais apropriado para a penetração e utilização de substratos) e adotam o estado de esporos. Os esporos são termodinamicamente mais eficazes, especialmente em termos de proteção contra o calor e contra a dessecação (Gorbushina & Petersen, 2000, Wiktor *et al.*, 2009).

Em geral, são isolados dois principais grupos de fungos a partir de superfícies rochosas: (i) um grupo que inclui espécies dos géneros de *Hyphomycetes* e *Coelomycetes*, entre os quais estão incluídos aqueles que não produzem melanina, como *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, e aqueles que a produzem como *Alternaria*, *Ulocladium*, *Cladosporium*. (ii) o segundo grupo inclui as leveduras negras e os fungos meristemáticos, entre eles, *Hortaea*, *Sarcinomyces*, *Coniosporium*, *Capnobotryella*, *Exophiala* e *Trimmatostroma* (Sterflinger & Piñar, 2013, Wiktor *et al.*, 2009).

A microbiota nas superfícies de monumentos varia muito em diferentes zonas geográficas, bem como as mudanças das condições atmosféricas e do microclima (Suihko *et al.*, 2007).

Mesmo que nos últimos anos o estudo dos microrganismos que colonizam o património tenha incrementado notoriamente, tendo em conta a complexidade do estudo (numerosas espécies de microrganismos que crescem em materiais muito diversos e em condições climáticas díspares), ainda há muito a fazer nesta área. Por exemplo, mesmo que já existam estudos dos processos de biodeterioração nas superfícies dos monumentos e na pintura mural, tendo-se descoberto, em parte, o papel dos microrganismos nestas superfícies, é necessário continuar a investigação neste campo para que se consiga adquirir um maior conhecimento da comunidade microbiana, que normalmente habita neste tipo de obras de arte, bem como caracterizá-la e estudar quais as melhores estratégias para a preservação do património cultural.

Rosado *et al.* (2013) demonstrou a atividade biodeteriogénica dos microrganismos em pintura mural, tendo como objetivo caracterizar e identificar os agentes que causam biodeterioração, bem como diagnosticar e compreender a presença de oxalatos nas pinturas murais do século XVII, pinturas essas localizadas no Convento da Nossa Senhora da Saudação em Montemor-o-Novo (Alentejo, Portugal). Através de técnicas moleculares, foi detetada a presença de *Cladosporium*, *Penicillium*, *Nectria* e *Rhodotorula* nas pinturas. Além disso, foi possível constatar que a comunidade bacteriana isolada era composta principalmente por bacilos Gram-positivos. Este estudo veio corroborar a ideia de que a proliferação de fungos filamentosos na superfície da pintura e a propagação de estruturas micelares em profundidade promovem rachaduras e destacamentos de algumas áreas das argamassas (Figura 2). Para além disso pôde concluir-se, que o desenvolvimento bacteriano parece ser responsável pela formação de biofilmes na superfície pintada, levando a que ocorram alterações cromáticas. Nestas pinturas, foram ainda, detetados oxalatos de cálcio, resultantes da atividade metabólica dos microrganismos que as colonizam (Rosado *et al.*, 2013).

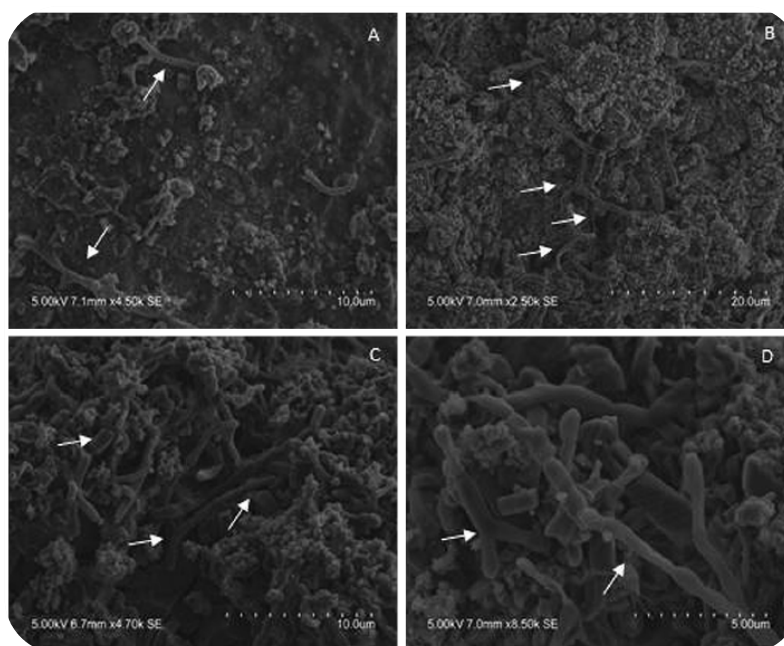


Figura 2: Imagens de MEV de microfragmentos de argamassa. As setas indicam a presença de fungos filamentosos e proliferação de hifas na superfície da argamassa (A, B) e a penetração desses microrganismos em profundidade (C, D). (adaptado de Rosado *et al.*, 2013)

De entre os materiais de construção, as argamassas são as mais utilizadas no que respeita ao património (Fonseca *et al.*, 2010). Posto isto, a biodeterioração de argamassas apresenta-se como um problema sério, visto que cerca de 30% das alterações visíveis nos materiais de construção é devido ao impacto microbiano (Fonseca *et al.*, 2010).

As técnicas utilizadas até agora, têm permitido aumentar consideravelmente o conhecimento dos processos de biodeterioração nas argamassas de edifícios históricos e nas pinturas murais. Contudo, é preciso continuar a implementar técnicas inovadoras que permitam, para além da identificação e caracterização dos microrganismos *ex situ*, a possibilidade de executar estudos *in situ* que possibilitem conhecer profundamente a estrutura 3D da comunidade microbológica. Poder-se-ia assim, obter novas informações do modo como os microrganismos habitam as superfícies dos monumentos e das pinturas murais, facilitando, entre outros aspetos, o desenvolvimento de estratégias apropriadas para a preservação do património.

Na conservação e restauro de edifícios históricos têm sido aplicados, habitualmente, biocidas para combater o crescimento e proliferação de microrganismos. Os biocidas usados para impedir o crescimento de microrganismos são substâncias químicas tóxicas, podendo também afetar organismos superiores, incluindo os seres humanos, devendo apenas ser utilizados em circunstâncias excecionais. Aliás, muitas vezes, o uso de estratégias de

remediação tem conseguido eliminar a comunidade microbiológica que estava presente numa superfície, contudo com o passar do tempo tem-se detetado o aparecimento de novos biofilmes, provocando, em alguns casos, danos ainda maiores dos que os causados pelos primeiros colonizadores (Gaylarde & Morton, 1999, Suihko *et al.*, 2007, Shirakawa *et al.*, 2011).

É por isso que, de forma a desenvolver estratégias corretas de conservação e restauro e de prevenção da recolonização das obras de arte e monumentos históricos é fundamental a execução de pesquisas que permitam a identificação das comunidades microbiológicas presentes no património (Bottari *et al.*, 2006).

1.2. Identificação de microrganismos

Para a identificação da comunidade microbiana presente no património cultural é usual combinar técnicas tradicionais com as técnicas moleculares (Moter & Göbel, 2000).

As técnicas tradicionais (Figura 3) baseiam-se na cultura e isolamento dos microrganismos a partir de amostras ambientais, no entanto estes métodos são altamente trabalhosos e demorados (Villa *et al.*, 2009).

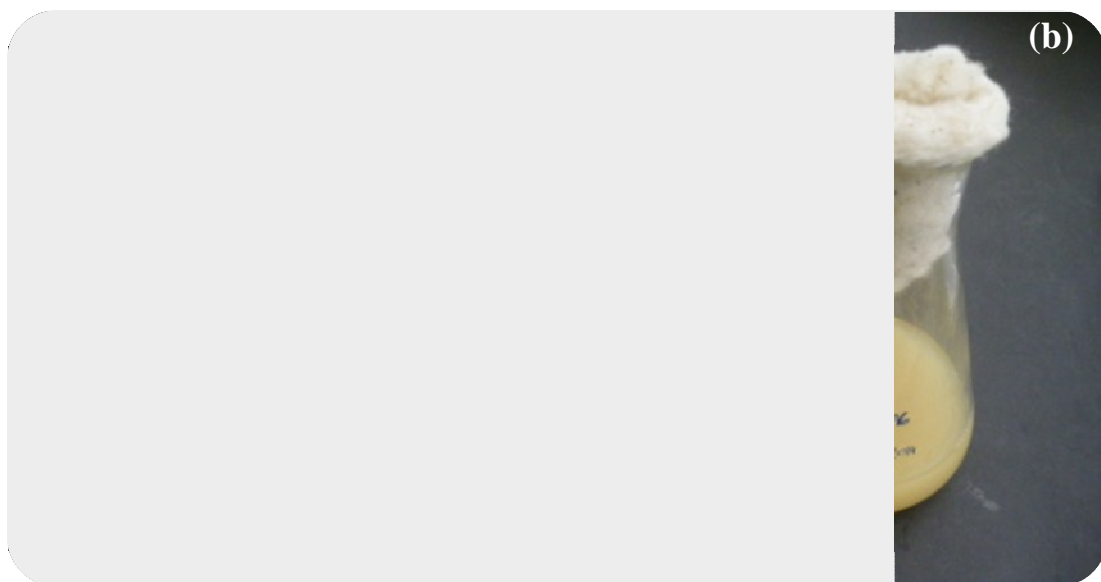


Figura 3: Cultivo de microrganismos em meio sólido (a) e meio líquido (b).

De acordo com a microbiologia clássica, quando se pretende estudar um microrganismo, é necessário isolá-lo a partir da matriz original, isolamento esse que pode

apenas ser feito no meio apropriado (Wei *et al.*, 2013, Urzì *et al.*, 2004). Além disso, está demonstrado que qualquer modificação ambiental durante o cultivo pode afetar a estrutura das comunidades microbianas, impedindo assim uma visão completa do ecossistema considerado (Bottari *et al.*, 2006). Por isso, o isolamento e cultivo permitem caracterizar apenas os microrganismos capazes de crescer, multiplicar e formar colónias no meio e condições de crescimento selecionados. Reside aqui uma das principais desvantagens destas técnicas: o facto de a maioria dos microrganismos não crescer nestes meios de cultura (95%), fazendo com que haja perda de informação da componente microbiana. A principal vantagem dos métodos tradicionais é que permitem a obtenção de células de microrganismos que podem posteriormente ser utilizadas noutros estudos (Moter & Göbel, 2000, Urzì *et al.*, 2004, Andorra *et al.*, 2011).

Com o fim de colmatar as limitações das técnicas tradicionais baseadas no cultivo dos microrganismos, introduziram-se as técnicas da biologia molecular na área da microbiologia aplicada ao património.

Estas técnicas permitem recolher informação sobre a distribuição espacial, identidade e morfologia dos microrganismos. Além disso, estas técnicas são mais específicas, mais sensíveis e mais rápidas do que os métodos tradicionais (Andorra *et al.*, 2011).

As técnicas moleculares mais utilizadas são baseadas na amplificação de DNA que embora muito eficazes na deteção de microrganismos não dão qualquer informação sobre a relação entre microrganismo e a própria superfície (Amann *et al.*, 2001, Moter & Göbel, 2000, Bärlocher, 2007).

Mesmo tendo-se incluído e desenvolvido muitas técnicas para aplicação na análise das comunidades microbiológicas que habitam as obras de arte e os monumentos, faltam ainda desenvolver técnicas moleculares que permitam a sua aplicação *in situ*. Existe uma técnica que oferece as vantagens das técnicas moleculares e microscópicas e ainda possibilita a sua aplicação *in situ*. Até ao momento, tem sido aplicada amplamente em diversas áreas, particularmente em medicina, sendo esta técnica designada por hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Trata-se de uma técnica rápida, independente de cultura e a sua principal vantagem é que permite a identificação específica de células microbianas individuais *in situ* (Andorra *et al.*, 2011, Gérard *et al.*, 2005). Mesmo sendo uma técnica prometedora e robusta na deteção de microrganismos, não tem sido aplicada amplamente no estudo da biodeterioração do património. É neste contexto que a aplicação desta técnica vai ser abordada ao longo deste trabalho, mais propriamente na identificação de células microbianas no património cultural, particularmente nas argamassas que integram as

superfícies dos edifícios históricos e, que compõem o material sobre o qual se encontram as pinturas murais.

1.3. Hibridação *in situ* fluorescente (FISH)

A técnica FISH permite a observação da morfologia dos microrganismos, bem como a sua quantificação e avaliação da disposição espacial destes nos substratos colonizados (Bottari *et al.*, 2006, Gérard *et al.*, 2005).

Com esta técnica, é possível identificar sequências específicas de DNA ou RNA em vários genomas, pois as sondas FISH são hibridadas às cadeias alvo (Moter & Göbel, 2000). Esta ferramenta torna-se útil, pois assim, é possível demarcar quais os microrganismos que têm uma sequência nucleotídica específica daqueles que não a detêm (Amann *et al.*, 2001, Bottari *et al.*, 2006).

1.3.1. Desenvolvimento da técnica

A técnica de hibridação *in situ* foi desenvolvida nos finais dos anos 60, de forma independente, por dois grupos de investigação. Esta técnica permitiu o estudo de sequências de ácidos nucleicos no interior de células de mamíferos, sem provocar alterações a nível morfológico ou em termos de integridade celular. Desde o seu desenvolvimento inicial, foi sofrendo modificações até que, em 1988, Giovannoni *et al.* finalmente a introduziu em estudos bacteriológicos (Giovannoni *et al.*, 1988). Tendo este investigador sido o primeiro a utilizar sondas de oligonucleótidos marcados radioativamente dirigidos a rRNA na deteção microscópica de bactérias. Com o desenvolvimento de marcadores fluorescentes, os marcadores radioativos foram progressivamente substituídos por corantes não - isotópicos (Jiang & Gill, 2006).

Em 1989, DeLong usou pela primeira vez oligonucleótidos marcados com sondas fluorescentes para deteção de células microbianas individuais. Com este passo de marcação surgiu assim a técnica “Fluorescence *In Situ* Hybridization” (DeLong *et al.*, 1989). Ao compararmos as sondas fluorescentes com as radioativas, constatamos que as primeiras são mais seguras, oferecem melhor resolução e necessitam de menos passos para a deteção. Para além disso, as sondas fluorescentes podem possuir diferentes comprimentos de onda de emissão, o que possibilita a deteção de várias sequências alvo num único passo de

hibridação (Bottari *et al.*, 2006, Moter & Göbel, 2000, Jiang & Gill, 2006, Amann *et al.*, 1990).

1.3.2. Sonda FISH

Uma sonda FISH (Figura 4) é composta por um oligonucleótido, complementar de determinada região específica do DNA ou do RNA, ao qual se encontra ligado um ou mais marcadores fluorescentes. Estas sondas têm a capacidade de se manterem estáveis durante vários meses, ou até anos, sem que haja perda de atividade assinalável, desde que sejam conservadas a -20°C e resguardadas da luz (Moter & Göbel, 2000).

Durante a hibridação as sondas penetram nas células e ligam-se à sua sequência alvo (caso esta esteja presente), tornando a célula detetável por microscopia de epifluorescência devido à presença do marcador fluorescente (Amann *et al.*, 2001).

A técnica FISH ocorre essencialmente em quatro passos:

1. Fixação e permeabilização da amostra;
2. Hibridação das sondas com o microrganismo para deteção das respetivas sequências alvo;
3. Lavagem das sondas não ligadas;
4. Montagem, deteção e documentação de resultados (Amann *et al.*, 2001).

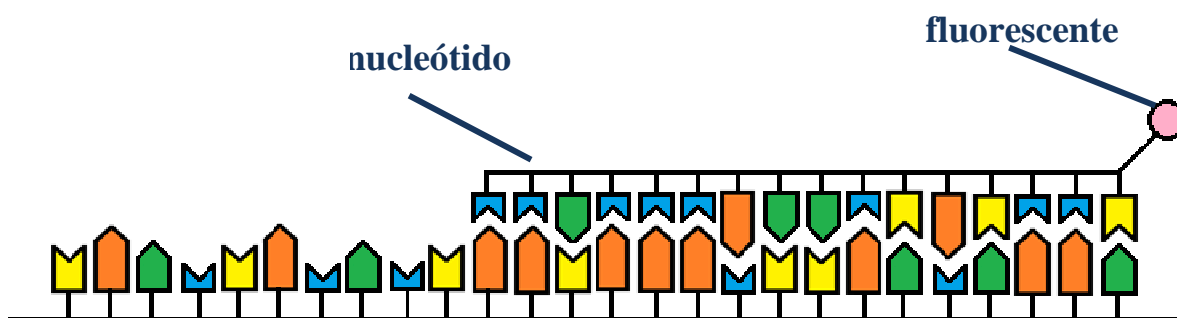


Figura 4: Representação esquemática de uma sonda FISH.

1.3.2.1. Escolha dos oligonucleótidos para a sonda

No desenvolvimento de sondas de DNA ou RNA para hibridação *in situ* está envolvida a investigação de segmentos específicos com cerca de 15 a 30 bases nucleotídicas (Amann *et al.*, 2001, Bottari *et al.*, 2006). As moléculas de RNA ribossomal (18S para

fungos e 16S para bactérias) são os alvos preferenciais da técnica FISH por diversas razões, entre elas:

- Podem ser encontradas em todos os organismos vivos;
- São relativamente estáveis;
- Existem em grande número nas células;
- Incluem tanto domínios variáveis como domínios altamente conservados (Amann *et al.*, 2001).

O desenvolvimento da sonda, cuja sequência irá ser complementar à sequência nucleotídica do segmento específico, deverá ter ainda em conta alguns fatores, tais como:

- A temperatura de desnaturação deverá estar compreendida entre os 48 e os 60°C;
- O conteúdo molar em G + C preferencialmente entre 40 e 60%, não devendo originar estruturas secundárias internas;
- A localização da sequência-alvo na molécula de rRNA deve estar acessível à sonda de modo a se conseguirem obter bons sinais de hibridação (Fuchs *et al.*, 2000).

1.3.2.2. Fluorocromos

Para além de um oligonucleótido, a sonda também é constituída por uma ou mais moléculas de fluorocromo que se ligam covalentemente à extremidade 5' do oligonucleótido. Outra hipótese é a ligação de bases marcadas com fluorocromos à extremidade 3' ou ligações múltiplas (Bottari *et al.*, 2006).

Os fluorocromos são substâncias com capacidade para emitir um fóton de uma determinada comprimento de onda quando excitados por um fóton de um comprimento de onda característico. Estes conseguem fluorescer em qualquer cor na gama da luz visível, desde o vermelho até ao azul, podendo ainda ser detetados na gama dos infravermelhos, requerendo, neste último caso, um microscópio com equipamento adequado para este tipo de deteção (Bottari *et al.*, 2006).

O uso de fluorocromos em microscopia de fluorescência pode acarretar alguns problemas, entre eles a perda de fluorescência devido às grandes intensidades de luz empregues. As amostras analisadas com recurso a esta técnica não podem ser estudadas durante períodos de tempo longos devido ao desaparecimento da fluorescência (Bottari *et al.*, 2006).

1. Introdução

São vários os tipos de fluorocromos existentes, entre eles os derivados da fluoresceína, da rodamina e, mais recentemente, da cianina (Tabela 1). Estes últimos têm demonstrado ser bastante eficazes e estáveis, uma vez que têm conferido sinais de hibridação mais intensos. Como resultado da sua relativa fotoestabilidade, o fluorocromo Cy3 (Figura 5) tem-se vindo a tornar o marcador mais habitual, aprimorando as gamas de deteção FISH em amostras ambientais (Amann *et al.*, 2001, Moter & Göbel, 2000, Levitus & Ranjit, 2011).

Tabela 1: Fluorocromos mais utilizados nas sondas FISH (adaptado de Amann & Ludwig, 2000 e de Moter & Göbel, 2000)

Fluorocromo	Excitação (nm)	Emissão (nm)	Cor
Derivados da Fluoresceína			
AMCA	351	450	Azul
FITC	492	528	Verde
FluoX	488	520	Verde
Derivados da Rodamina			
TRITC	557	576	Vermelho
Texas Red	578	600	Vermelho
Derivados da Cianina			
Cy3	550	570	Laranja/Vermelho
Cy5	651	674	Infravermelho

A sonda utilizada neste trabalho foi a EUK516. Esta sonda tem como marcador fluorescente o fluorocromo Cy3 (Figura 5), o qual se encontra ligado à extremidade 5' do oligonucleótido (5'-ACCAGACTTGCCCTCC-3'). A sonda EUK516 tem como alvo a subunidade ribossomal 18S da molécula de rRNA da *Saccharomyces cerevisiae*, sequência esta que é idêntica em todos os organismos eucariotas.

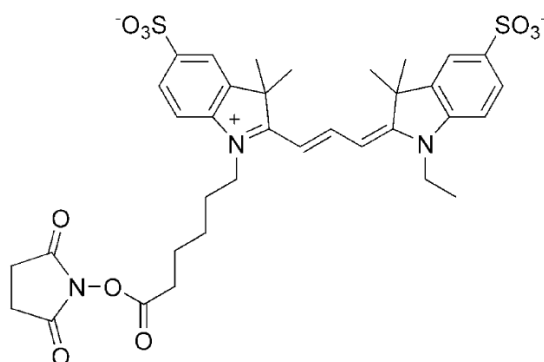


Figura 5: Estrutura química do fluorocromo Cy3 (adaptado de Harvey & Levitus, 2009).

1.3.3. Procedimento de aplicação da técnica FISH

Como já foi indicado anteriormente, a técnica FISH é constituída por quatro passos (Figura 6), os quais vão ser analisados em profundidade em seguida:

1. Fixação e permeabilização as células da amostra;
2. Hibridação das sondas com o microrganismo para deteção das respetivas sequências alvo;
3. Lavagem das sondas não ligadas;
4. Montagem, deteção e documentação de resultados (Amann *et al.*, 2001).

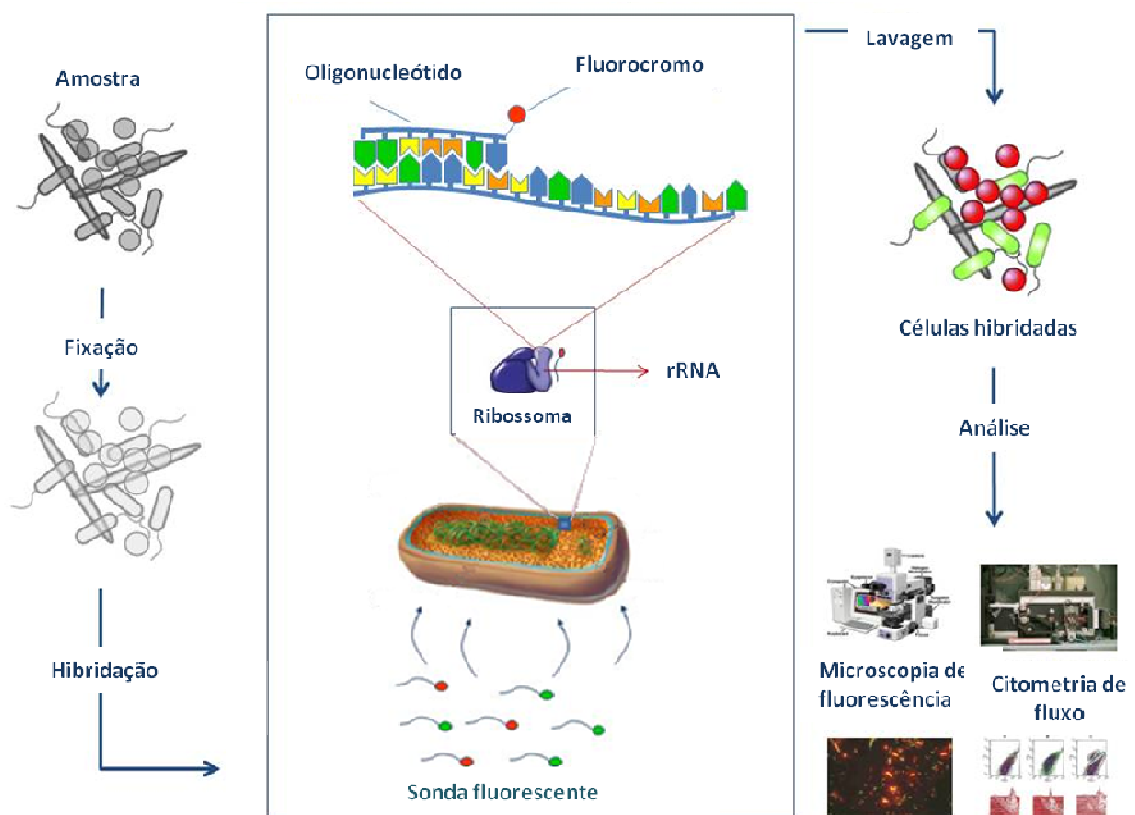


Figura 6: Representação esquemática do procedimento da técnica FISH.

1.3.3.1. Fixação e permeabilização

As células dos microrganismos presentes na amostra têm de ser fixadas e permeabilizadas para que a estrutura celular fique estabilizada e ocorra penetração da sonda fluorescente para o interior da célula, mas também, para que o RNA fique protegido da degradação provocada pelas RNAses endógenas (Moter & Göbel, 2000).

Na etapa de fixação é frequente o uso de agentes de precipitação, como é o caso do etanol ou do metanol, ou de agentes polimerizantes, como é o caso dos aldeídos (p.e. paraformaldeído). O etanol tem a vantagem de proporcionar uma utilização mais rápida e simples, contudo como se trata de um agente precipitante o seu uso pode provocar a lise das células e a perda do conteúdo celular. No caso do paraformaldeído tem a vantagem de evitar a degradação celular uma vez que encapsula as células numa matriz, mas a fixação é mais demorada. Este processo permite que as células fixadas sejam guardadas a -20°C durante meses (Moter & Göbel, 2000).

As condições de fixação variam dependendo do organismo alvo e do tipo de sonda usada. Para que os sinais de fluorescência sejam máximos é essencial haver uma fixação eficaz dos microrganismos, todavia é difícil otimizar estas condições. Uma boa fixação dos microrganismos deverá resultar numa boa penetração da sonda, numa boa retenção ao nível do RNA e ainda na manutenção da integridade celular (Moter & Göbel, 2000, Villa *et al.*, 2009).

Também a seleção do agente fixante a utilizar, poderá ter influência nos resultados em termos de autofluorescência dos microrganismos ou nos componentes da amostra onde se encontram (Bottari *et al.*, 2006, Moter & Göbel, 2000).

1.3.3.2. Hibridação

Nesta etapa o tampão de hibridação pré-aquecido é aplicado à amostra contendo sondas marcadas complementares ao DNA/RNA alvo. Após estarem fixadas, as células contactam com a sonda de DNA/RNA, o que faz com que algumas sondas FISH penetrem no interior celular e hibridem especificamente com a sua sequência alvo. Esta hibridação pode ser executada em microtubos, ocorrendo a incubação numa câmara húmida com temperatura controlada, ou em lâminas de microscópio apropriadas (Bottari *et al.*, 2006).

Para cada sonda, têm de ser otimizadas as condições de restringência, nas quais ocorre a reação de hibridação entre a sonda e o seu alvo complementar (geralmente localizado no rRNA). A restringência da reação é ajustada variando a temperatura de incubação ou a concentração de formamida no tampão de hibridação. Se houver um incremento destes parâmetros, as ligações de hidrogénio que se formam entre as sondas e as moléculas de rRNA ficam enfraquecidas, complicando a formação de ligações não específicas. Também modificações ao nível dos tempos de incubação e de lavagem podem influenciar as intensidades dos sinais FISH obtidos (Moter & Göbel, 2000).

A luminosidade, a temperatura e o tempo de duração são condições importantes na hibridação, sendo então necessário que esta ocorra ao abrigo da luz, que a temperatura varie entre os 37°C e os 50°C, e com uma duração que pode oscilar entre os 30 minutos a várias horas (Bottari *et al.*, 2006).

1.3.3.3. Lavagem

Esta etapa tem como objetivo remover a sonda em excesso ou ligações inespecíficas que esta possa ter formado durante a hibridação. Neste passo é utilizada uma restringência igual ou ligeiramente superior à que é usada na incubação anterior (Moter & Göbel, 2000).

1.3.3.4. Deteção

A deteção dos microrganismos fluorescentes pode ser efetuada através de microscopia de fluorescência ou através de citometria de fluxo.

- Microscopia de fluorescência

Na microscopia ótica convencional, quer seja de campo claro ou de campo escuro, o objeto é iluminado como um todo de modo a permitir que visualizá-lo. No entanto, por vezes, é necessário observar de forma destacada unicamente uma região ou estrutura de determinado espécime. Quando se trata de aplicações biológicas, por exemplo, pode pretender-se observar apenas um gene específico, o núcleo ou a matriz extracelular.

Utiliza-se a técnica de microscopia de fluorescência por esta permitir obter informações específicas de materiais orgânicos e estruturas celulares vivas. Comparando esta técnica com outras formas de microscopia, há certas vantagens desta que se destacam, tais como, a identificação de células e componentes celulares com elevado grau de especificidade entre moléculas de interesse (SLAVIK, 1993).

- Citometria de fluxo

Por outro lado, se se pretender detetar sinais de hibridação pode-se recorrer a outra técnica: a citometria de fluxo. Embora esta técnica não permita a recolha de informações sobre a morfologia e distribuição espacial na amostra dos microrganismos a utilizar, é muito vantajosa na quantificação automática de suspensões de microrganismos (Wallner *et al.*, 1997)

1.3.4. Problemas associados à técnica FISH

Ao aplicar-se a técnica FISH podem ocorrer problemas na detecção dos microrganismos, nomeadamente a ocorrência de falsos positivos ou falsos negativos.

1.3.4.1. Falsos positivos

1.3.4.1.1. Autofluorescência

A detecção de alguns grupos de microrganismos com hibridação *in situ* acarreta algumas limitações em que, a mais significativa é a autofluorescência que os próprios poderão manifestar e que pode ser confundida com os sinais de hibridação. Para além da autofluorescência emitida pelos próprios microrganismos há outro fator a ter em conta, a autofluorescência do material envolvente (células vegetais, glóbulos vermelhos, etc.), que pode acarretar dificuldades na detecção (Wagner *et al.*, 2003, Tsui *et al.*, 2011).

Para a resolução deste problema há várias alternativas possíveis, entre elas a utilização de fluorocromos que emitam fluorescência a um comprimento de onda distinto da autofluorescência. Outra alternativa possível reside na utilização de fluorocromos que detenham mais energia, que permitam sinais de hibridação fortes e que sejam difíceis de confundir (Wagner *et al.*, 2003).

É raro analisar-se de forma meticulosa o fenómeno da autofluorescência ou de como evitar interferências com as sondas FISH, contudo, fatores como os meios de crescimento e métodos de fixação parecem influenciar bastante as intensidades de sinais (Sørensen *et al.*, 1997, Graf *et al.*, 1998).

1.3.4.1.2. Especificidade das sondas

Uma sonda é específica para um determinado microrganismo quando nenhum outro possui um alvo idêntico no seu rRNA. O desenho de novas sondas deve basear-se na análise comparativa do maior número possível de sequências disponíveis, e sondas já desenvolvidas devem ser regularmente testadas de modo a garantir que continuam específicas. No entanto, há que ter em conta que muitas das sequências depositadas em bases de dados públicas poderão conter erros de sequência e/ou corresponder a organismos incorretamente identificados (Tsui *et al.*, 2011).

1.3.4.2. Falsos negativos

1.3.4.2.1. Inacessibilidade das regiões-alvo das sondas

A permeabilização insuficiente da parede celular pode, conseqüentemente fazer com que os sinais de hibridação se apresentem mais fracos. A utilização de condições de hibridação não otimizadas, de sondas com uma sequência incorreta ou a marcação ineficaz destas também pode contribuir para uma diminuição do sinal de hibridação. Contudo, mesmo sem a presença de nenhuma das causas anteriores, as sondas podem, eventualmente, exibir sinais de fluorescência muito fracos. Em casos como estes, uma causa provável é a inacessibilidade dos alvos situados no rRNA, estando estes envolvidos em estruturas secundárias e/ou interações com proteínas. Estas referidas interações não são, forçosamente, as que existem nos ribossomas nativos já que as condições de hibridação poderão também modificar a sua estrutura (Wagner *et al.*, 2003, Tsui *et al.*, 2011).

1.3.4.2.2. Conteúdo celular em rRNA

Nos seus meios naturais, as células podem encontrar-se num estado de latência ou com um crescimento limitado pela escassez de nutrientes apresentando, conseqüentemente, um conteúdo celular em ribossomas e rRNA mais baixos. Ao haver um número reduzido de alvos para a hibridação com sondas de DNA, os sinais fluorescentes obtidos, mais fracos, podem ser difíceis de detetar e ficarem, até, camuflados pela própria autofluorescência natural das amostras. São algumas as soluções para ultrapassar estas dificuldades, entre elas, a utilização de fluorocromos mais energéticos ou a marcação múltipla das sondas (Tsui *et al.*, 2011).

1.3.5. Aplicação das sondas FISH

As sondas FISH têm sido uma ferramenta amplamente utilizada em medicina, no tratamento de águas residuais e também na área de microbiologia alimentar. Exemplo disso é a análise da diversidade da população de leveduras durante a fermentação do vinho, em que foram construídas nove sondas específicas de oligonucleótidos marcados com fluoresceína voltadas para o D1 / D2 da região 26S do rRNA. Com estas sondas, Xufre (2006) conseguiu detetar uma grande diversidade de espécies de leveduras como o caso de

Candida stellata, *Hanseniaspora uvarum*, *H. guilliermondii*, *K. marxianus*, *K. thermotolerans* e *Torulaspora delbrueckii* (Xufre *et al.*, 2006).

- A técnica FISH aplicada ao património

A técnica FISH tem vindo, timidamente, a ser aplicada na área da conservação e restauro para estudar os microrganismos envolvidos na biodeterioração de superfícies.

La Cono e Urzì (2003) desenvolveram um novo método para a identificação de microrganismos em obras de arte sem a destruição da superfície de valor. Estes autores aplicaram as sondas FISH diretamente em amostras recolhidas com fitas adesivas de catacumbas romanas. Para este estudo utilizaram cinco tipos de oligonucleótidos ligados a três diferentes fluorocromos. Com este trabalho, Cono e Urzì demonstraram que os objetos e superfícies de valor cultural podem ser estudados para resolver problemas relacionados com a biodeterioração sem ser danificados (La Cono & Urzì, 2003).

Um outro estudo, realizado por Villa *et al.* (2009), demonstrou o potencial do fluorocromo DAPI na deteção de conídios em superfícies. Para esse efeito, foram executados estudos de permeabilidade do oligonucleótido EUK516 ligado ao DAPI, tendo-se comparado diferentes estratégias de permeabilização, baseadas em desidratação com álcool, com surfatantes (Tween-80 e Triton X-100) e por choque osmótico (glicerol), utilizando conídios de *Aspergillus niger*. O método de permeabilização mais eficaz foi o ensaio em que foi utilizado o surfatante Triton X-100, afirmando os autores que o método por eles utilizado é reprodutível, simples e barato para a identificação de conídios (Villa *et al.*, 2009).

A técnica FISH também pode ser utilizada como um complemento a outras técnicas, exemplo disso é o estudo feito por Santos (2009) e o seu grupo de investigação. Neste, os autores utilizaram três técnicas (DGGE, MEV e FISH) para descrever a microestrutura e as comunidades microbiológicas de obras de arte do século XVI. Com este estudo, pode-se concluir que as populações microbiológicas foram altamente influenciadas pela composição química das camadas de pintura, uma vez que as comunidades microbianas eram inferiores nas camadas pictóricas compostas por pigmentos com metais, tais como o chumbo, mercúrio e cobre comparativamente às camadas sem tais compostos. A técnica FISH permitiu observar a distribuição espacial não aleatória dos microrganismos nessas camadas (Santos *et al.*, 2009).

2. Metodologia



2.1. Estratégia

A concretização dos objetivos traçados para este trabalho obedeceu ao plano descrito neste capítulo.

Local de realização

- Laboratório de Biotecnologia, Fase III, Colégio Luís António Verney
- Laboratório HERCULES, Palácio do Vimioso

Duração:

- 1 ano letivo (2013/2014).

Modelo Biológico:

- Oito fungos filamentosos: *Aspergillus niger*, *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., Micelio m1, *Nectria* sp., *Penicillium* sp., *Sporothrix* sp. e *Stereum* sp.
- Duas leveduras: *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396 (SC396) e *Rhodotorula* sp.

Agentes fixantes:

- Paraformaldeído e etanol

Argamassas utilizadas:

- Argamassas sintéticas: argamassas produzidas em laboratório e inoculadas com microrganismos;
- Argamassas reais: argamassas reais inoculadas com microrganismos;
- Amostras reais: argamassas recolhidas de pinturas murais da ermida de Santo Aleixo (Évora, Portugal).

Ensaio:

- Crescimento microbiano;
- Estudo de diferentes condições de fixação:
 - Tempo de incubação;
 - Temperatura de incubação;

2. Metodologia

- Concentração de fixante.

-Hibridação dos microrganismos com uma sonda fluorescente (EUK516 ligado ao Cy3).

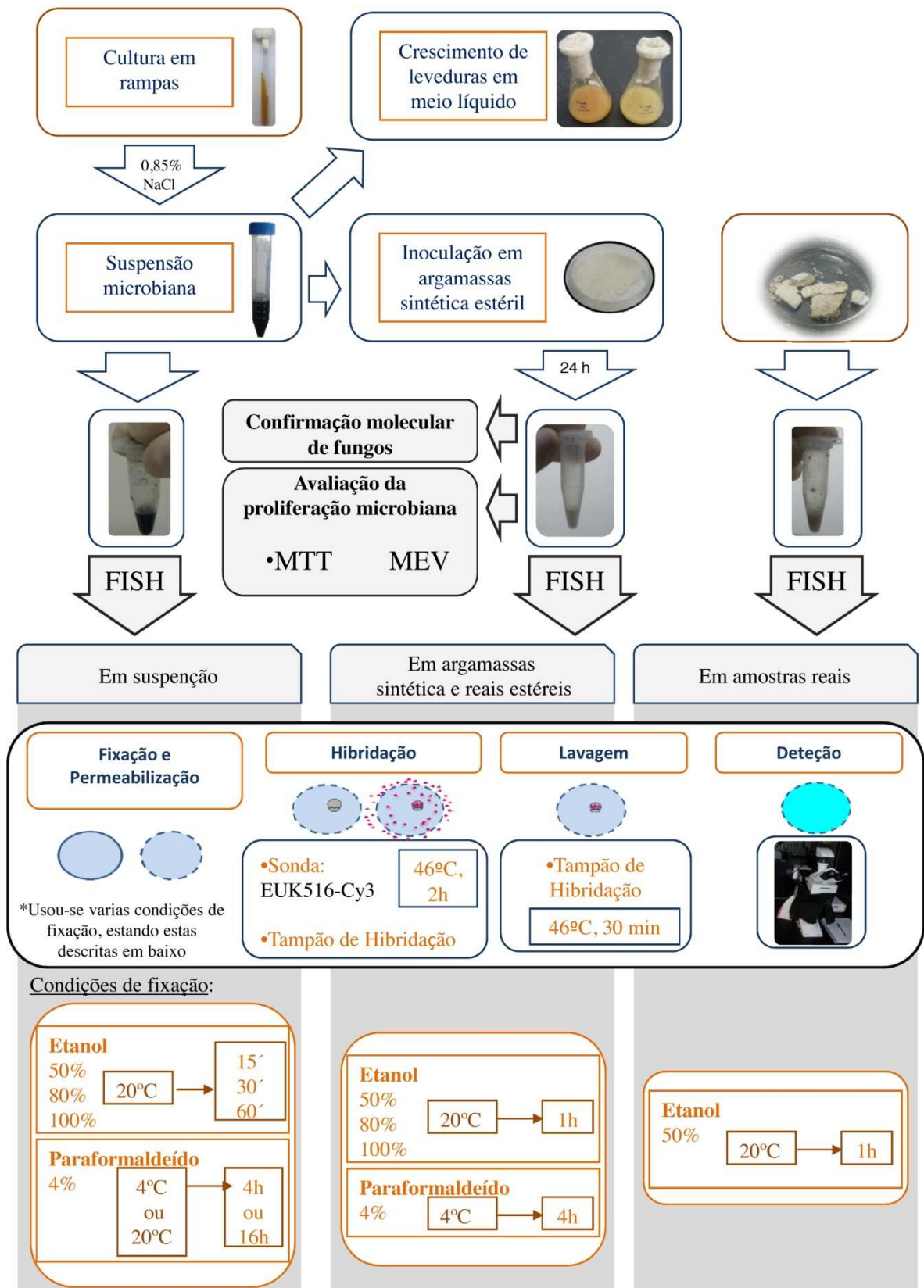
Técnicas utilizadas

Para a visualização da fluorescência de cada microrganismo, após hibridação com uma sonda fluorescente, foi utilizado um microscópio de fluorescência com uma câmara fotográfica acoplada para documentação destes microrganismos.

Também se utilizou a técnica de espectrometria de absorção molecular para seguir o crescimento microbiano das leveduras.

Para a validação da aplicação da técnica FISH em argamassas reais foram utilizadas técnicas moleculares (PCR e electroforese), espectrometria de absorção molecular (atividade metabólica) e MEV-EDS.

2.2. Diagrama do trabalho



2.3. Procedimento experimental

2.3.1. Modelo biológico

Foram usados como modelo biológico oito fungos filamentosos (*Aspergillus niger*, *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., Micelio m1, *Nectria* sp., *Penicillium* sp., *Sporothrix* sp. e *Stereum* sp.) e duas leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396 e *Rhodotorula* sp.). Todos os fungos utilizados, com a exceção da *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396, foram isolados de pinturas murais e todos estes provocam biodeterioração (Rosado *et al.*, 2013). Todos os microrganismos pertencem a coleção HERCULES-Biotech Lab, Universidade de Évora.

2.3.2. Visualização das estruturas reprodutoras dos microrganismos

A visualização dos fungos estudados neste trabalho foi feita por observação macroscópica e microscópica. Para a visualização das estruturas reprodutoras foram feitas preparações a fresco utilizando o corante azul de metileno, sendo em seguida observadas ao microscópio ótico Leica DM2500P.

2.3.3. Preparação da suspensão microbiana

As células foram colhidas a partir da superfície do agar de rampas da coleção HERCULES-Biotech Lab da Universidade de Évora e suspensas em 0,85% de NaCl (v / v). Teve-se o cuidado de remover apenas as células microbianas e nenhum meio de cultura.

2.3.4. Crescimento de leveduras em meio líquido

A um erlenmeyer contendo 100 mL de meio líquido YPD, foi adicionado 2 mL de suspensão microbiana (*Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396 ou *Rhodotorula* sp.). A cultura cresceu com agitação orbital constante de 120 rpm a 28°C.

O crescimento da cultura foi acompanhado por espetofotometria de absorção molecular a 600 nm.

2.3.5. FISH em amostras em suspensão

2.3.5.1. Fixação celular

Foi adicionado a um microtubo 1 mL de suspensão microbiana e em seguida centrifugou-se por 5 min a 4500 g. As células foram lavadas com PBS e voltou-se a centrifugar a 4500 g durante 5 min. Posteriormente as células foram ressuspensas com 1 mL de um dos seguintes fixantes: 50, 80 e 100% de etanol ou 4% (v / v) de paraformaldeído em PBS. Os fixantes foram adicionados gota a gota sob agitação para evitar a agregação celular. Foram testadas várias combinações de temperatura/tempo de fixação. As células foram incubadas em etanol durante 3 min, 15 min ou 1 h a 20°C, enquanto que a incubação em paraformaldeído foi durante 4 h ou 16 h a 4°C ou 20°C. As células fixadas com etanol foram lavadas uma vez com PBS e as células fixadas com paraformaldeído foram lavadas três vezes com o mesmo tampão. Todas as centrifugações entre as lavagens foram realizadas a 4500 g durante 5 min.

2.3.5.2. Hibridação em suspensão

As células fixadas foram hibridadas a 46°C durante 2 h em 80 µl de tampão de hibridação e com 1,0 µl (120 ng / uL) da sonda EUK516 (5'-ACCAGACTTGCCCTCC-3 ') marcada com o fluorocromo Cy3. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4500 g durante 5 min. Após uma lavagem com 100 mL de tampão de hibridação pré-aquecido durante 30 min a 46°C, as células foram centrifugadas a 4500 g durante 5 min e ressuspensas com 200 µl de PBS. As amostras, montadas em lâminas de microscópio, foram observadas com um microscópio de campo escuro Leica DM 2500M e as imagens foram obtidas com uma câmara Leica DFC290HD.

2.3.6. FISH em argamassas

As argamassas sintéticas foram utilizadas a fim de se investigar a aplicabilidade da técnica FISH, na detecção de microrganismos em argamassas que simulam superfícies de monumentos. Após a confirmação da detecção de microrganismos em argamassas sintéticas, investigou-se a possibilidade da detecção de microrganismos com a técnica FISH em argamassas reais.

2. Metodologia

Para cada 0,3 g de argamassas estéreis foram adicionados 0,2 mL de suspensão microbiana. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 24 h, sob agitação contínua.

Recolheram-se ainda amostras reais de pintura mural da ermida de Santo Aleixo (Évora, Portugal), nas quais foram aplicadas as sondas FISH.

2.3.6.1. Fixação celular

A um microtubo adicionou-se 0,1 g de amostras de argamassas (sintéticas ou reais) inoculadas com a suspensão microbiana, ou de amostras reais, tendo-se em seguida efetuado uma lavagem com 0,5 mL de PBS. Após a lavagem, as amostras de argamassas sintéticas foram fixadas com 1,0 ml de 50, 80 e 100% (v / v) de etanol em PBS durante 1 h a 20°C, ou com 1,0 mL de 4% (v / v) de paraformaldeído em PBS durante 4 h a 4°C. As argamassas reais foram fixadas com 1 mL de 4% de paraformaldeído durante 4 h a 4°C ou com 1 mL de 50% de etanol durante 1 h a 20°C. As amostras reais foram fixadas com 1 mL de 50% de etanol durante 1 h a 20°C. De modo a evitar a agregação celular, os fixadores foram adicionados gota a gota sob agitação. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4500 g durante 5 min. As amostras fixadas com paraformaldeído foram lavadas três vezes, enquanto que as amostras fixadas com etanol foram lavadas uma vez com PBS. Todas as centrifugações entre as lavagens foram realizadas a 4500 g durante 5 min.

2.3.6.2. Hibridação em argamassas

A hibridação das células fixadas foi executada como descrito no ponto 2.3.5.2, exceto no que respeita à ressuspensão final em PBS que neste caso não foi efetuada. As amostras foram montadas em lâminas de microscópio e posteriormente visualizadas com um microscópio de campo escuro Leica DM 2500M e as imagens obtidas através da câmara Leica DFC290HD.

2.3.7. Avaliação da proliferação microbiana em argamassas reais

De modo a avaliar as contaminações biológicas nos microfragmentos das argamassas reais, foram executadas análises por MEV e ensaios de viabilidade celular (MTT).

2.3.7.1. Ensaio de viabilidade celular

Para o estudo de viabilidade celular em argamassas reais efetuou-se o ensaio de MTT. Neste ensaio é avaliada a atividade metabólica das células, quantificando-se a redução metabólica do MTT por desidrogenases, resultando na produção de cristais de formazano, intensamente coloridos, no interior das células. Estes cristais podem ser dissolvidos com solventes orgânicos, como por exemplo o DMSO, permitindo a sua quantificação através da espectrofotometria.

Para este ensaio utilizou-se uma levedura (*Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396) e um fungo filamentosos (*Nectria* sp.) inoculados em argamassas reais. As amostras de argamassas (0,1 g) foram incubadas no escuro com 0,5 mL de solução de MTT durante 4 h à temperatura ambiente. Posteriormente, a mistura foi centrifugada durante 10 min a 8000 g e o sobrenadante resultante foi descartado. Os cristais púrpura de formazano foram dissolvidos em 1 mL de DMSO / etanol (1:1). Por último, quantificou-se a intensidade da absorvência a 570 nm com um espectrómetro de absorção molecular. As respostas de *Nectria* sp. e de SC396 foram calculadas em relação à absorvência de 10^7 células de uma cultura de SC396 crescida durante 48 h.

2.3.7.1. Microscopia eletrónica de varrimento

O princípio do MEV consiste num feixe de eletrões que “varre” a área da amostra que se pretende analisar, formando a imagem. A interação entre o feixe de eletrões e a amostra produz vários tipos de sinais como os eletrões secundários (ES), os eletrões retrodifundidos (ER) e os raios X.

As microanálises dos fragmentos de argamassas foram realizadas utilizando um microscópio eletrónico de varrimento HITACHI S-3700N com um espectrómetro de raios X por dispersão em energia Brüker Xflash 5010 acoplado (Figura 7). As análises foram realizadas com uma pressão de ar na câmara de 20 Pa, evitando revestir as amostras com material condutor como o Au ou a grafite. As análises de EDS foram realizadas com uma aceleração de 18-20 kV.



Figura 7: Microscópio eletrónico de varrimento com detetor de EDS.

2.3.8. Confirmação molecular de fungos

Para a confirmação molecular foi necessário extrair e amplificar o DNA dos fungos. O DNA metagenômico foi diretamente extraído de microfragmentos de argamassas (0,1 g), com auxílio do kit NucleoSpin 740945 (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). O DNA extraído foi utilizado como molde para a amplificação por PCR.

Os *primers* NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') e GCfung (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCCCGCCCCATTCCCCGTTACCCGTTG-3') foram escolhidos para fazerem a amplificação de uma sequência parcial do gene 18S.

As reações de PCR foram realizadas num termociclador. A mistura de PCR (25 µl) continha tampão de reação 10x suplementado com MgCl₂ (25 mM), dNTPs (2 mM), 0,4 µM de *primers*, Taq polimerase 5 U e 1 µL de DNA extraído.

O programa de PCR foi composto por várias etapas: desnaturação inicial durante 1 min a 95°C, de seguida 40 ciclos com um passo desnaturação a 94°C durante 1 min, posteriormente um passo de hibridação a 50°C durante 1 min, um passo de extensão a 72°C durante 2 min e por fim um ciclo de alongamento a 72°C durante 6 min. Os produtos de PCR, o marcador de tamanho de peso molecular Generuler 100 pb e uma amostra de controlo, foram corridos num gel de agarose a 1,2% contendo brometo de etídio a 10 mg / mL, a 90 V e à temperatura ambiente. Os produtos de amplificação foram visualizados sob luz UV (sistema Bio-Rad).

2.3.9. Alinhamento das várias sequências selecionadas

O alinhamento das sequências selecionadas na base de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) com a sonda utilizada foi realizado no programa Bio Edit 7.2.2. Sequence Alignment Editor.

2.3.10. Relações filogenéticas das estirpes selecionadas

A pesquisa das relações filogenéticas para as sequências do 18S rRNA de cada uma das estirpes efetuou-se recorrendo ao programa Mega versão 5.0.

3. Resultados e discussão



3.1. Seleção de agentes biodeteriogénicos alvo

A atividade microbiana desempenha um papel importante na deterioração do património cultural. Embora a influência dos microrganismos nos processos de biodeterioração seja indiscutível, o papel individual de cada espécie microbiana, que forma as comunidades presentes nas obras de arte, ainda não está totalmente compreendida. Consequentemente, a melhoria da nossa compreensão das comunidades microbianas, que prosperam sobre o património cultural, é crucial para o desenvolvimento de estratégias na conservação destas. Novas abordagens têm vindo a ser continuamente aplicadas para avaliar a biodeterioração nos bens patrimoniais, bem como para detetar e identificar os agentes envolvidos.

Neste trabalho, foi estudada a possibilidade de aplicar a técnica FISH na deteção de comunidades microbianas em argamassas reais. Para esse efeito, usou-se uma sonda universal (EUK516) para eucariotas, marcada com um marcador fluorescente (Cy3). A obtenção de bons sinais FISH depende, entre outros fatores, da escolha de um passo eficaz de fixação. Como é sabido, as condições de fixação das células, variam consideravelmente segundo o tipo de sonda utilizada mas também consoante o tipo de microrganismo, os quais têm diferentes conteúdos ribossomais e permeabilidades celulares distintas. Em amostras de matrizes complexas como são as argamassas, a otimização desta metodologia é um processo fundamental para que as sondas FISH possam vir a ser aplicadas num futuro próximo em amostras do património.

A fim de dar os primeiros passos no desenvolvimento de um procedimento de hibridação *in situ* para a deteção de eucariotas em argamassas reais, foram escolhidos dez fungos de diferentes géneros, de modo a testar várias condições de fixação celular. Selecionaram-se os fungos filamentosos: *Aspergillus niger*, *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., Micelio m1, *Nectria* sp., *Penicillium* sp., *Sporothrix* sp. e *Stereum* sp. e uma levedura, *Rhodotorula* sp.. A *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396 utilizou-se como microrganismo controlo. Com exceção da *S. cerevisiae*, todos eles foram isolados a partir de pinturas murais de edifícios históricos da região do Alentejo (Évora, Portugal), tendo sido demonstrado por Rosado *et al.* o seu envolvimento na deterioração destes edifícios (Rosado *et al.*, 2013). Na Figura 8 estão apresentados, resumidamente, os efeitos deteriogénicos provocados por estes microrganismos.

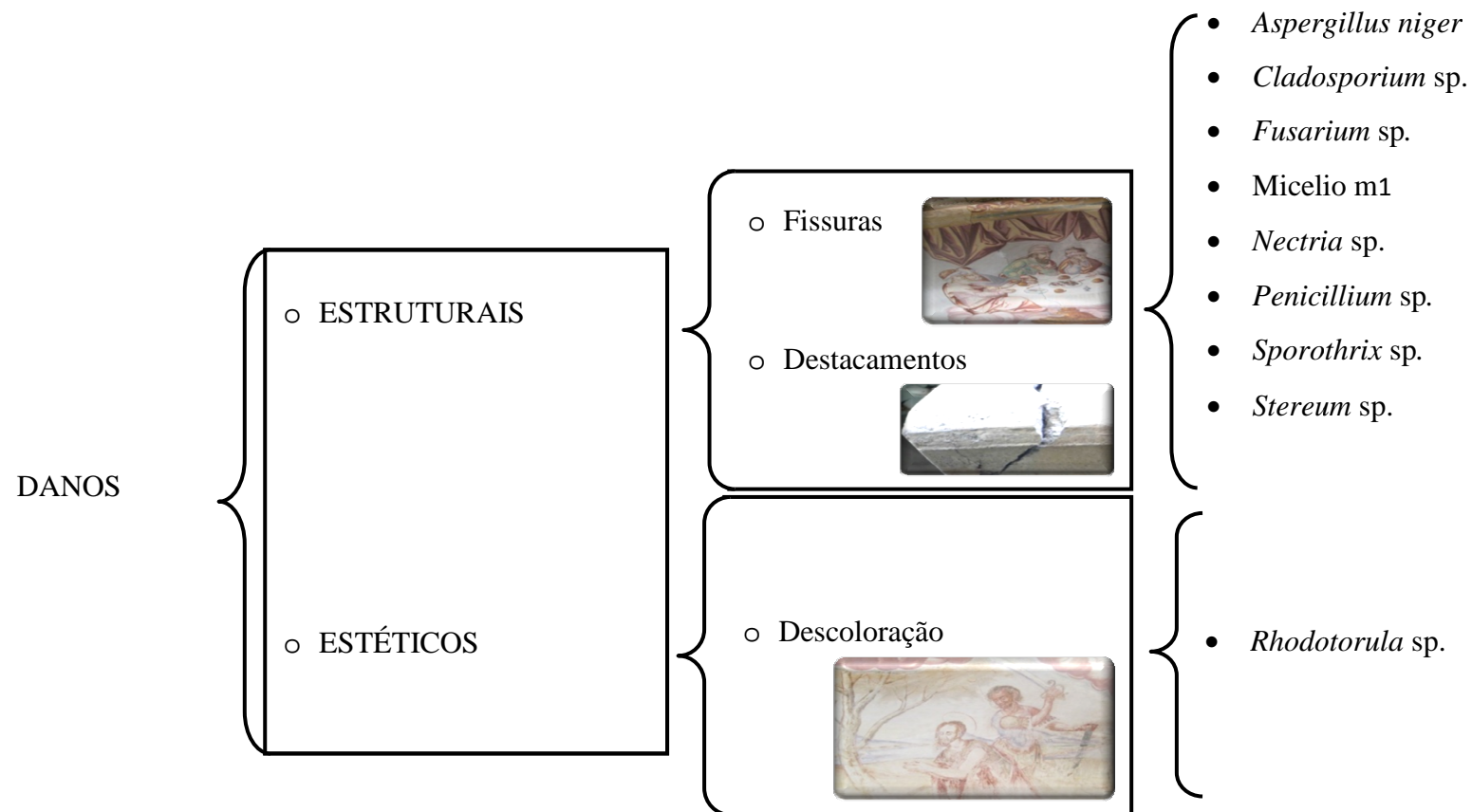


Figura 8: Efeitos deteriorogénicos provocados pelos microrganismos estudados.

Na Tabela 2 são apresentados os resultados relativos ao crescimento fúngico em meio sólido e as respectivas estruturas reprodutoras (imagens de microscopia ótica).

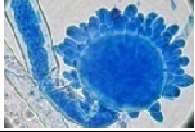
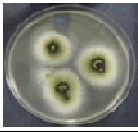

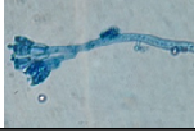


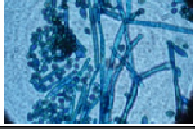




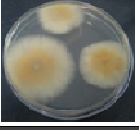
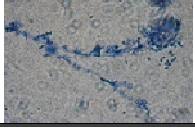

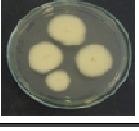
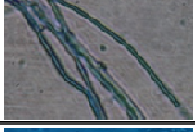

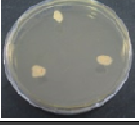





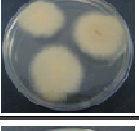
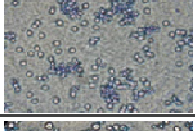


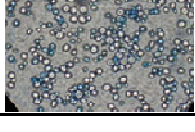

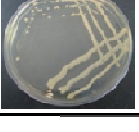
Microorganismo	Aspetto microscópico	Aspetto das colónias em placa	
		Frente	Verso
<i>Aspergillus Niger</i>			
<i>Penicillium sp.</i>			
<i>Cladosporium sp.</i>			
<i>Fusarium sp.</i>			
Micelio m1			
<i>Nectria sp.</i>			
<i>Sporothrix sp.</i>			
<i>Stereum sp.</i>			
<i>Rhodotorulla sp.</i>			
<i>S. Cerevisae 396</i>			

Tabela 2: Imagens fotográficas e de microscopia ótica dos microrganismos em estudo.

3. Resultados e discussão

Todos os fungos filamentosos selecionados apresentaram um efeito biodeteriorogênico demonstrando uma elevada penetração das hifas fúngicas na microestrutura porosa das argamassas o que se traduziu por fissuras e destacamentos nas pinturas murais dos edifícios onde foram isolados. O efeito biodeteriorogênico de *Rhodotorula* sp. deveu-se fundamentalmente ao aparecimento de manchas laranja/rosa devido à formação de carotenos (Rosado *et al.*, 2014).

A Figura 9 mostra uma árvore filogenética construída com base nas sequências 18S do rDNA dos microrganismos selecionados (Tabela 3).

Tabela 3: Número de acesso do GenBank

Identificação	Nº acesso GenBank	Autor
<i>Aspergillus</i> sp.	EU853156.1	(Zhao <i>et al.</i> , 2009)
<i>Aspergillus terreus</i>	DQ489561.1	(Wu <i>et al.</i> , 2006)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	KF322139.1	(Ghazala <i>et al.</i> , 2013)
<i>Aspergillus flavus</i>	KF018474.1	(Demirel, 2013)
<i>Aspergillus niger</i>	EU884135.1	(Huang <i>et al.</i> , 2008)
<i>Cladosporium psychrotolerans</i>	DQ780933.1	(Zalar <i>et al.</i> , 2007)
<i>Cladosporium oxysporum</i>	DQ780941.1	(Zalar <i>et al.</i> , 2007)
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	DQ780940.1	(Zalar <i>et al.</i> , 2007)
<i>Cladosporium bruhnei</i>	DQ780938.1	(Zalar <i>et al.</i> , 2007)
<i>Cladosporium spinulosum</i>	DQ780936.1	(Zalar <i>et al.</i> , 2007)
<i>Fusarium avenaceum</i>	AF141946.1	(Leeflang <i>et al.</i> , 2002)
<i>Fusarium solani</i>	AF141952.1	(Leeflang <i>et al.</i> , 2002)
<i>Fusarium oxysporum</i>	AF141951.1	(Leeflang <i>et al.</i> , 2002)
<i>Fusarium merismoides</i>	AF141950.1	(Leeflang <i>et al.</i> , 2002)
<i>Fusarium equiseti</i>	AF141949.1	(Leeflang <i>et al.</i> , 2002)
<i>Nectria pseudotrichia</i>	JN939687.1	(Schoch <i>et al.</i> , 2012)
<i>Nectria asiatica</i>	JN939686.1	(Chaverri <i>et al.</i> , 2011)
<i>Nectria asiatica</i>	JN939685.1	(Schoch <i>et al.</i> , 2012)
<i>Nectria dematiosa</i>	JN939677.1	(Schoch <i>et al.</i> , 2012)
<i>Nectria cinnabarina</i>	JN939674.1	(Schoch <i>et al.</i> , 2012)
<i>Penicillium</i> sp.	AF545633.1	(Yang <i>et al.</i> , 2002)
<i>Penicillium decumbens</i>	FJ458446.1	(Liu <i>et al.</i> , 2011)
<i>Penicillium</i> sp.	JF950269.1	(Zhu <i>et al.</i> , 2012)
<i>Penicillium glabrum</i>	AF548090.1	(Wu <i>et al.</i> , 2003)
<i>Penicillium</i> sp.	KF776918.1	(Li <i>et al.</i> , 2013)
<i>Stereum annosum</i>	AF026587.1	(Hibbett <i>et al.</i> , 1997)
<i>Stereum annosum</i>	U59094.1	(Hibbett, 1996)
<i>Stereum hirsutum</i>	U59095.1	(Hibbett, 1996)
<i>Stereum hirsutum</i>	AF026588.1	(Hibbett <i>et al.</i> , 1997)
<i>Sporothrix schenckii</i>	M85053.1	(Berbee & Taylor, 1992)
<i>Rhodotorula minuta</i>	D45367.1	(Suh <i>et al.</i> , 1996)
<i>Rhodotorula lactosa</i>	D45366.1	(Suh <i>et al.</i> , 1996)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	EU563926.1	(Xin <i>et al.</i> , 2009)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	AB016293.1	(Hamada, 1998)
<i>Rhodotorula</i> sp.	HQ231228.1	(Fang <i>et al.</i> , 2010)

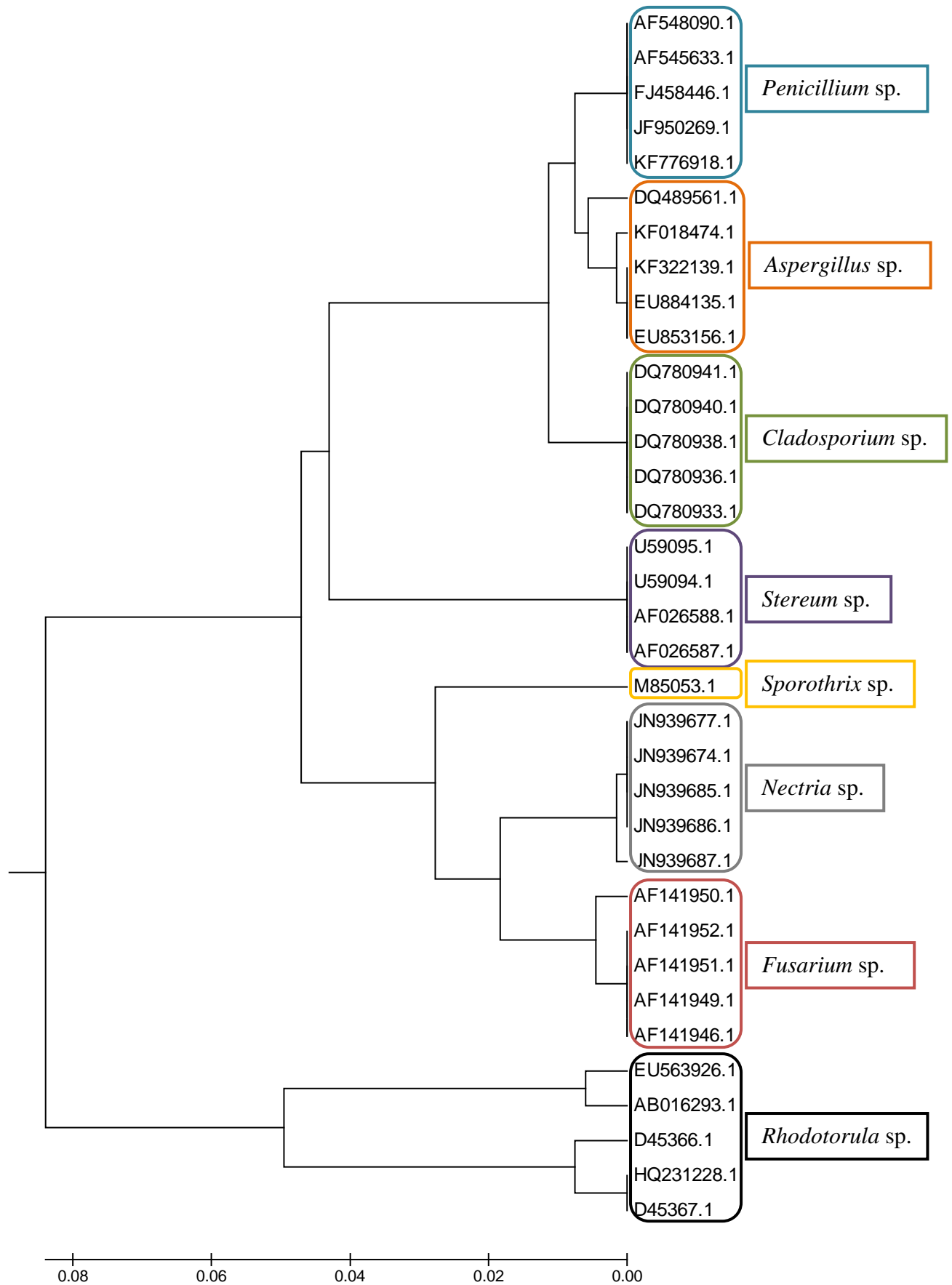


Figura 9: Árvore filogenética das sequências parciais do 18S rRNA.

3. Resultados e discussão

Filogeneticamente *Aspergillus* sp. está mais próximo de *Penicillium* sp. do que *Cladosporium* sp. e de *Stereum* sp.

Nectria sp., *Sporothrix* sp. e *Fusarium* sp. formam um segundo agrupamento. As estirpes de *Rhodotorula* sp. formam outro *cluster* mais afastado filogeneticamente dos restantes microrganismos.

O anexo B mostra o alinhamento múltiplo correspondente aos nucleótidos da zona 18S rDNA relativa a estes microrganismos selecionados, estando destacado no alinhamento a sonda (5'-ACCAGACTTGCCCTCC-3'), selecionada para a utilizar neste trabalho.

3.2. FISH aplicada a células em suspensão

3.2.1. Otimização de condições de fixação celular para fungos filamentosos

Numa primeira fase, foram selecionados dois fungos (*Aspergillus niger*, *Penicillium* sp.) para realizar testes em suspensão às diferentes condições de fixação (Figura 10). As referidas condições de fixação testadas resultam da combinação de diferentes temperaturas, tempos de incubação e concentrações de fixante (paraformaldeído e etanol). Na fixação com paraformaldeído, a concentração utilizada foi de 4% em PBS durante 4 h ou 16 h a 4°C ou 20°C. Na fixação com o etanol, a concentração utilizada foi de 50, 80 ou 100% em PBS, durante 3, 15 ou 60 min a 20°C.

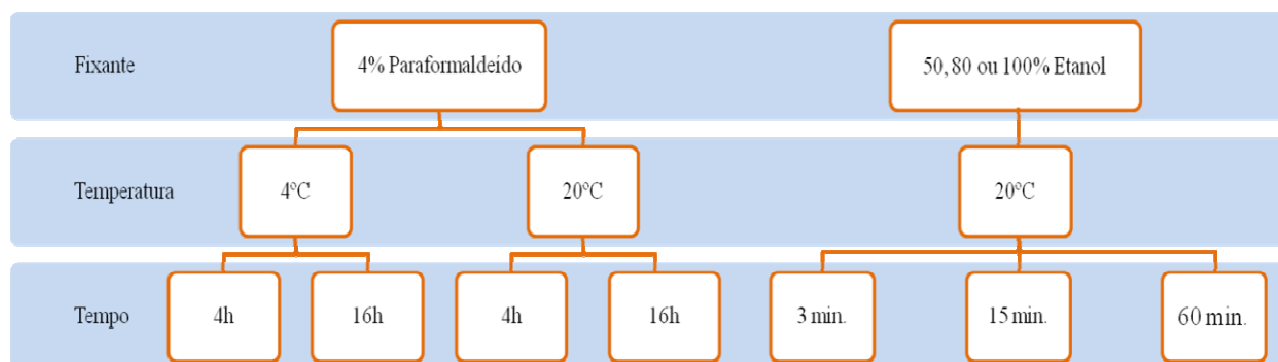


Figura 10: Representação esquemática das condições de fixação do *Aspergillus niger* e do *Penicillium* sp. em suspensão.

Foram obtidos sinais de elevada intensidade fluorescente (Figura 11) na detecção de *Aspergillus niger* e de *Penicillium* sp. em suspensão em todas as condições de fixação testadas. É interessante realçar que os sinais de fluorescência permanecem detetáveis após um mês, o que pode ser interessante para futuras aplicações.

	% Fixante	Temp. (°C)	Tempo	<i>Penicillium</i> sp.			<i>Aspergillus niger</i>		
				a	b	c	a	b	c
Paraformaldeído	4	4	4						
			16						
		20	4						
			16						
Etanol	50	20	3						
			15						
			60						
	80		3						
			15						
			60						
	100		3						
			15						
			60						

Figura 11: Microfotografias de fluorescência correspondentes a ensaios de FISH obtidos para o *Aspergillus niger* e o *Penicillium* sp. nas condições de fixação estudadas (a- luz visível, b- combinação de luz visível e luz UV e c- luz UV).

Para ambos os fungos filamentosos, foram obtidos bons sinais de fluorescência, independentemente das condições de fixação utilizadas. No entanto, ao contrário do que

3. Resultados e discussão

ocorre usando etanol como agente de fixação, quando se usa paraformaldeído permanecem resíduos detetáveis mesmo depois de três passos de lavagem, o que poderia ser uma desvantagem deste procedimento de fixação. Embora haja a possibilidade de introdução de etapas de lavagem adicionais, elas não são desejáveis, uma vez que podem causar diminuição do número de células em cada lavagem. Não foram observadas diferenças significativas nos sinais FISH no que respeita ao tempo de fixação utilizado para cada uma das quatro concentrações de fixante, para ambos os fungos filamentosos, *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp..

Sendo assim, utilizou-se apenas um tempo de incubação para cada fixador nos ensaios de fixação para os restantes microrganismos. Na fixação com paraformaldeído, a concentração utilizada foi de 4% em PBS durante 4 h a 4°C. Quanto à fixação com o etanol, a concentração utilizada foi de 50, 80 ou 100% em PBS, durante 1 h a 20°C. A Figura 12 resume estas condições de fixação.

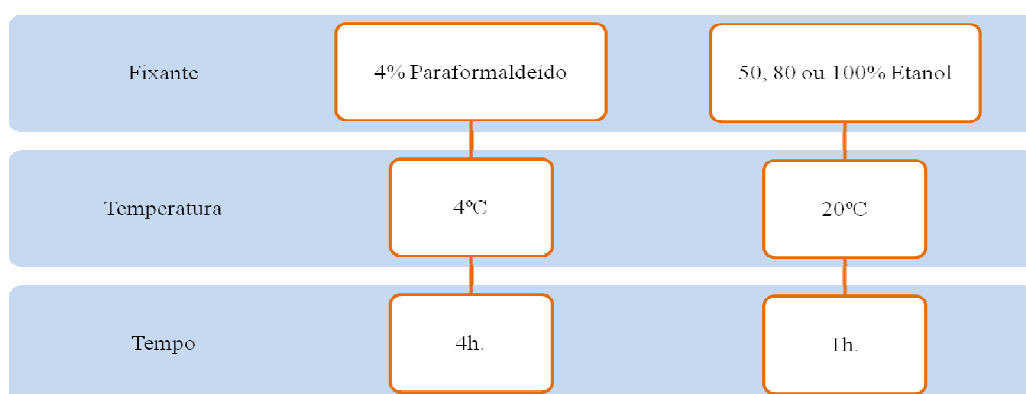


Figura 12: Representação esquemática das condições de fixação para os restantes fungos filamentosos em suspensão.

Na Figura 13 estão apresentados os sinais FISH obtidos para cada fungo nas quatro condições de fixação estudadas. Estes resultados evidenciam a detecção de todos os microrganismos estudados para as condições de fixação estabelecidas.

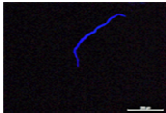
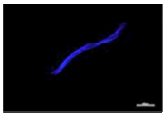

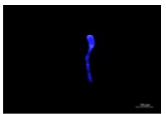
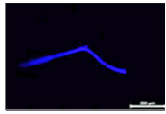
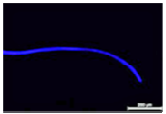
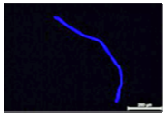
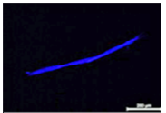
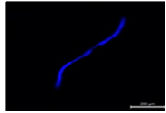
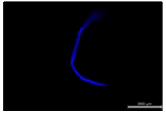
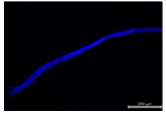
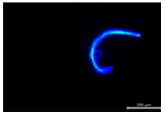

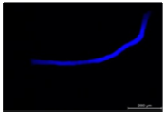
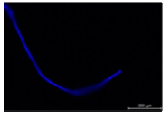
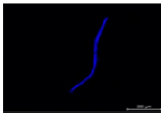
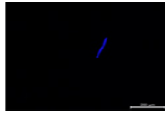
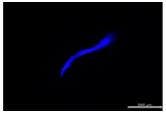
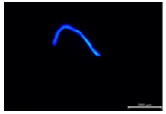
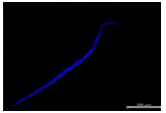

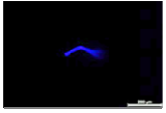
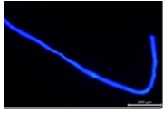
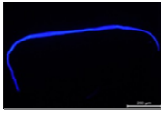
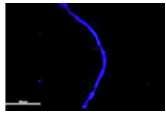

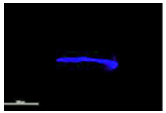
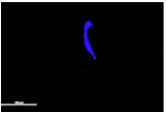
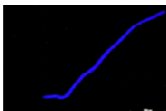
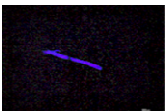

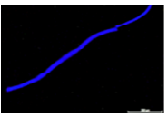
	Suspensão			
	Paraf.	Etanol		
Temperatura (°C)	4	20		
Tempo (h)	4	1		
% Fixante	4	50	80	100
<i>Penicillium</i> sp.				
<i>Sporothrix</i> sp.				
Micelio m1				
<i>Fusarium</i> sp.				
<i>Nectria</i> sp.				
<i>Stereum</i> sp.				
<i>Aspergillus niger</i>				
<i>Cladosporium</i> sp.				

Figura 13: Microfotografias de fluorescência correspondentes a ensaios de FISH dos oitos fungos filamentosos em suspensão nas quatro condições de fixação estudadas.

3.2.2. Otimização das condições de fixação das células de leveduras

Numa primeira fase realizaram-se ensaios de hibridação para células de leveduras crescidas em meio YPD sólido durante 48 h a 28°C. Testaram-se concentrações celulares entre 10^4 a 10^8 células, contadas em câmara Neubauer e as condições de fixação foram as referidas no ponto 3.2.1 (Figura 12). Estes ensaios não permitiram obter bons sinais de fluorescência. Para otimizar as condições de fixação das leveduras efetuaram-se posteriormente culturas e testaram-se células em diferentes fases de crescimento. As amostras recolhidas em diferentes tempos de crescimento foram utilizadas nos ensaios de fixação. As curvas de crescimento das leveduras são apresentadas no anexo C. Com esta metodologia foi possível observar sinais de fluorescência para células recolhidas entre três e oito horas de cultura, correspondendo a células em fase de crescimento exponencial (Figura 14). Quando as culturas atingem a fase estacionada os sinais de fluorescência tornam-se menos intensos. Contudo, esses sinais são menos intensos que os sinais obtidos pelos fungos filamentosos.

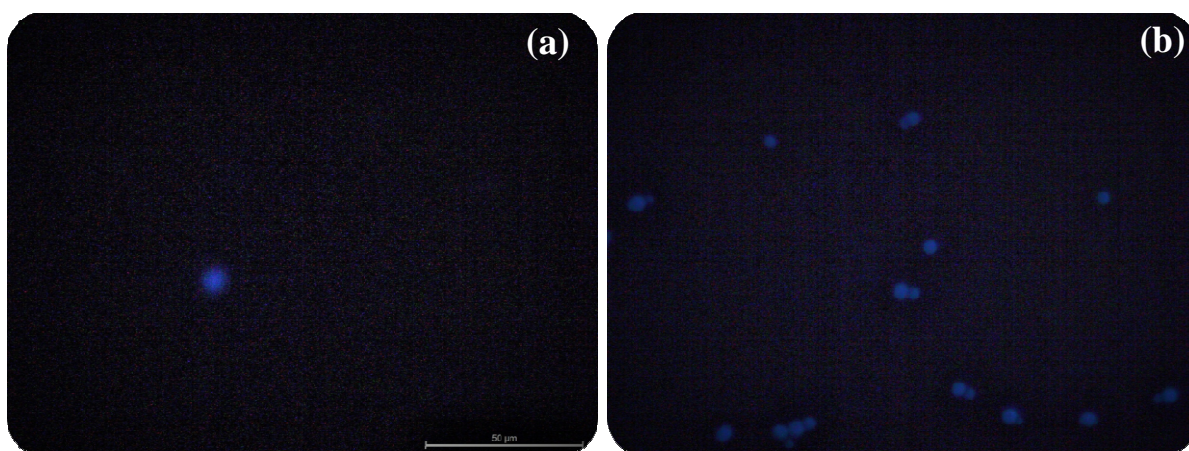


Figura 14: Microfotografias de fluorescência correspondentes a ensaios de FISH em *Rhodotorula* sp. (a) e SC396 (b).

3.3. FISH em argamassas sintéticas ou reais

Após a otimização das condições de fixação e detecção dos fungos biodeteriogénicos selecionados preparam-se argamassas sintéticas que foram inoculadas com os diferentes microrganismos em estudo.

Não foi possível obter sinais claros de fluorescência nas amostras inoculadas com leveduras. A técnica de FISH na detecção de leveduras parece estar condicionada à fase de crescimento das células, que por sua vez condiciona a permeabilidade das membranas e o conteúdo de rRNA, o que pode estar na origem de falsos negativos (baixa intensidade de sinal e decaimento da fluorescência com o tempo).

Obtiveram-se resultados bastante promissores relativamente aos fungos filamentosos, principais agentes biodeteriogénicos de pinturas murais. De facto foi possível otimizar um protocolo de detecção em argamassas para todos os fungos filamentosos selecionados. A Figura 15 mostra os resultados de microscopia de fluorescência correspondentes a ensaios de FISH de fungos filamentosos em argamassas sintéticas nas quatro condições de fixação estudadas. Estes resultados demonstram a detecção de todos os microrganismos estudados para as condições de fixação estabelecidas, evidenciando que as condições de fixação podem influenciar a visualização através de microscopia dos sinais de fluorescência, daí que em matizes complexas, como é o caso das argamassas, é útil a utilização de mais do que uma condição de fixação com vista a uma clara interpretação dos resultados.

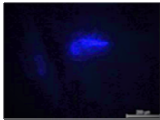
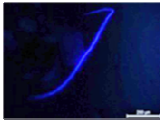
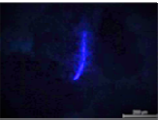
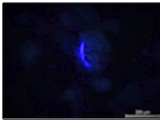
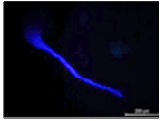
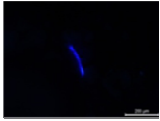
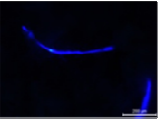
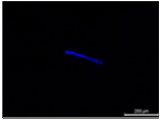

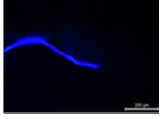
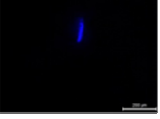
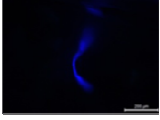
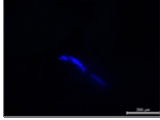

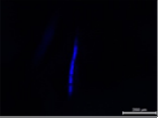
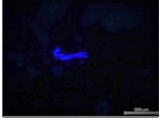
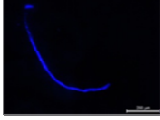


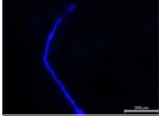
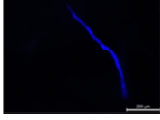

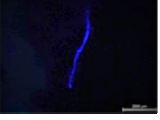
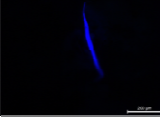
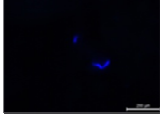
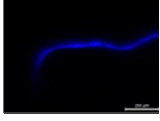
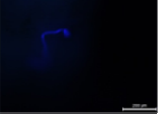
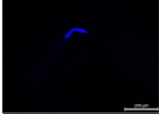
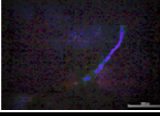

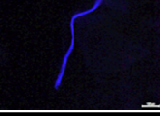
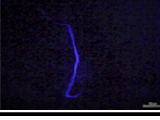
	Argamassa			
	Paraf.	Etanol		
Temperatura (°C)	4	20		
Tempo (h)	4	1		
% Fixante	4	50	80	100
<i>Penicillium</i> sp.				
<i>Sporothrix</i> sp.				
Micelio m1				
<i>Fusarium</i> sp.				
<i>Nectria</i> sp.				
<i>Stereum</i> sp.				
<i>Aspergillus niger</i>				
<i>Cladosporium</i> sp.				

Figura 15: Microfotografias de fluorescência correspondentes a ensaios de FISH de fungos filamentosos em argamassas sintéticas nas quatro condições de fixação estudadas.

Posteriormente foi aplicada a técnica FISH em argamassas reais. Neste caso os fungos inoculados nas argamassas reais foram *Nectria* sp. e SC396, tendo as condições de fixação sido de 4% de paraformaldeído durante 4 h a 4°C e 50% de etanol durante 1 h a 20°C. O procedimento executado foi o mesmo que para as argamassas sintéticas, modificando apenas o tipo de argamassa.

Como é possível ver na Figura 16, obtiveram-se bons sinais de fluorescência para *Nectria* sp., não tendo acontecido o mesmo para a SC396.

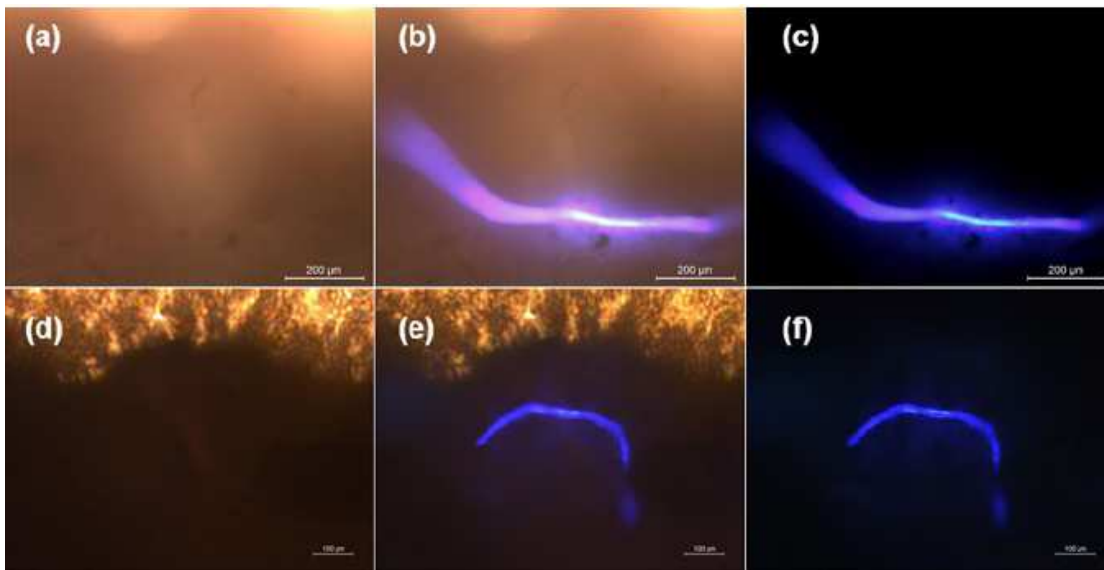


Figura 16: Microfotografias de fluorescência correspondentes a ensaios de FISH do fungo *Nectria* sp. em argamassas reais fixado com paraformaldeído (a-c) e com etanol (d-f). Na mesma área é mostrada as amostras com luz visível (a, d), uma combinação de luz visível e luz UV (b, e) e com luz UV (c, f).

3.4. FISH em amostras reais

Após a confirmação da detecção de microrganismos em argamassas reais inoculadas com microrganismos, investigou-se a possibilidade da detecção destes com a técnica FISH em amostras reais. As amostras reais foram recolhidas de pinturas murais da ermida de Santo Aleixo (Évora, Portugal) e fixadas com 1 mL de 50% de etanol em PBS, durante 1 h a 20°C.

Na Figura 17 é possível observar bons sinais de fluorescência.

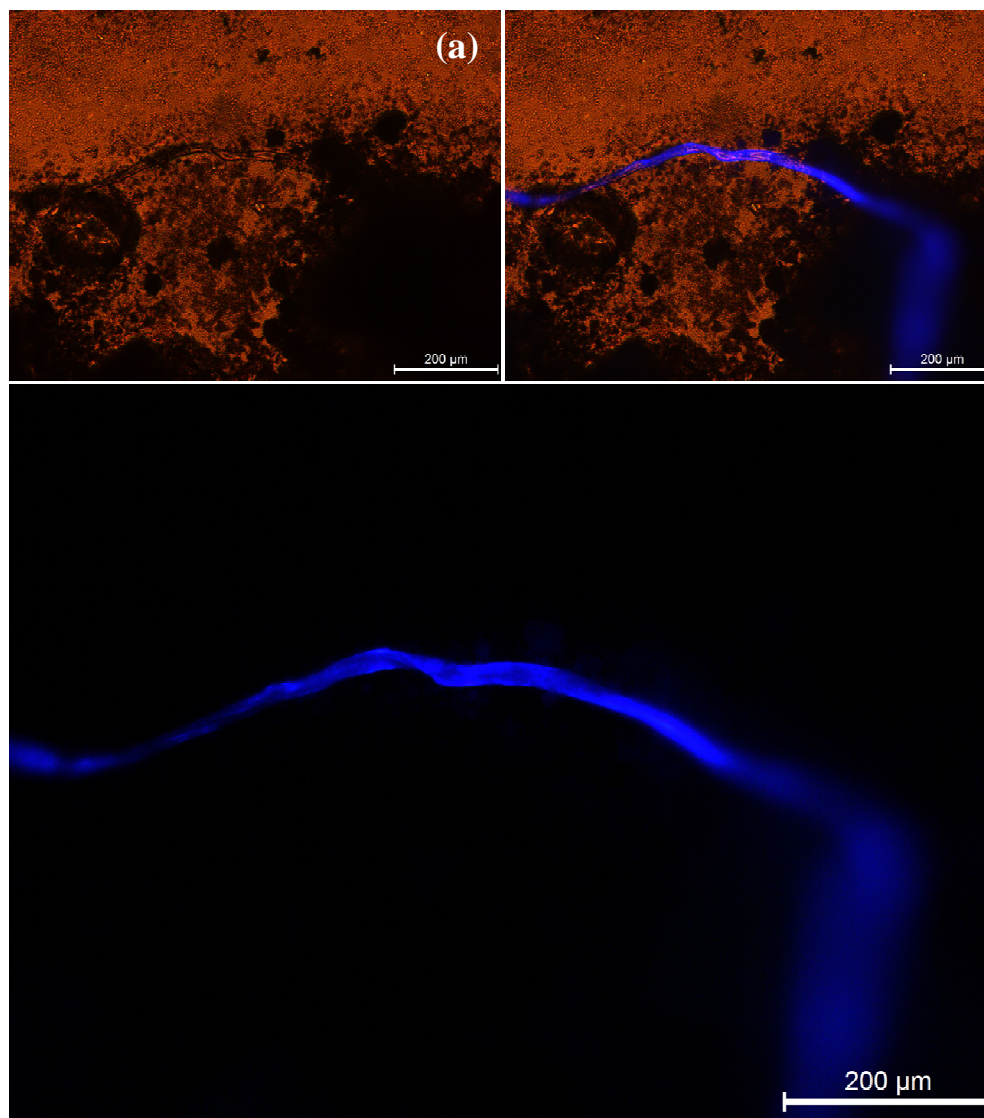


Figura 17: Microfotografia de fluorescência correspondente ao ensaio de FISH em amostra real (a – luz visível, b - combinação de luz visível e luz UV, c – luz UV).

Paralelamente a este estudo foram utilizadas técnicas complementares com o objetivo de confirmar a contaminação microbiana nestas amostras e validar o uso da técnica FISH na detecção de microrganismos em argamassas reais.

3.5. Avaliação da proliferação microbiana

Para a avaliação de contaminações biológicas nos microfragmentos das argamassas reais, foram executadas análises por MEV e ensaios de MTT.

A imagem obtida por MEV permite a observação de hifas de fungos a penetrarem as microestruturas das argamassas inoculadas com o fungo *Nectria* sp. (Figura 18a). As imagens obtidas a partir de argamassas, inoculadas com SC396, revelam a presença de células de levedura (Figura 18c). Além disso, análises de EDS (Figura 18b-d) das estruturas de ambas as amostras, confirmam a presença de elementos característicos de material orgânico, tal como o carbono e azoto, o que indica a presença de contaminação microbiana.

Assim, os resultados de MEV-EDS atestam a presença de fungos nas amostras de argamassas.

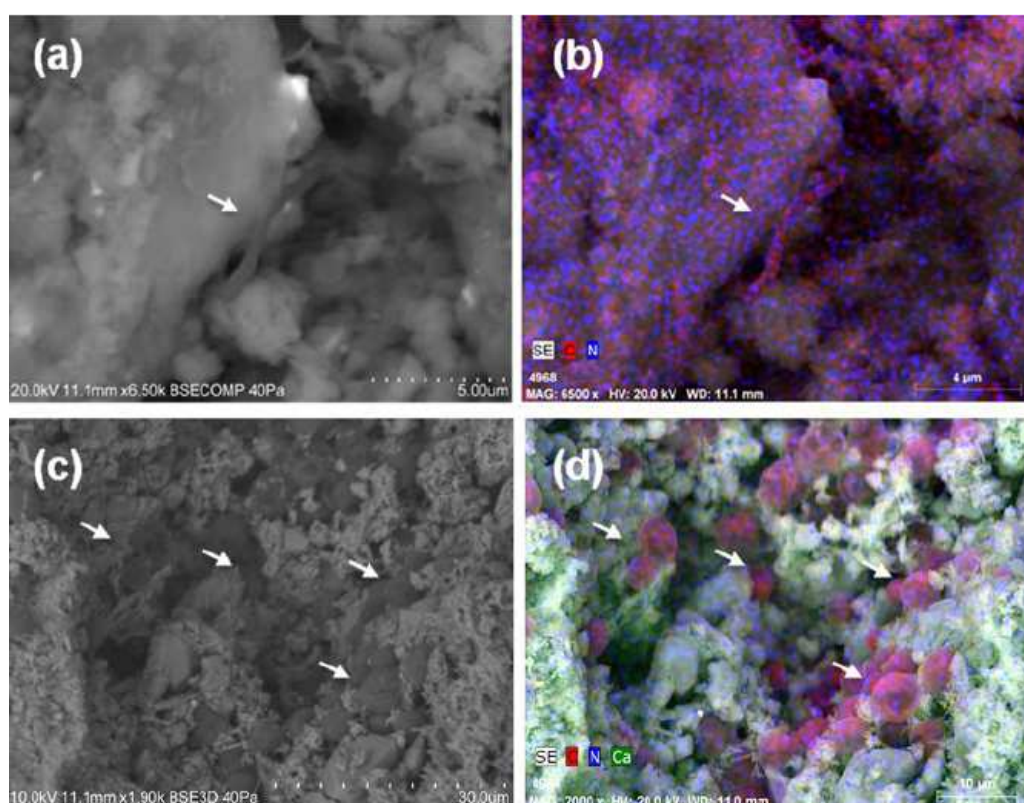


Figura 18: Visualização dos microfragmentos por MEV (a, c) e análise por EDS (b, d).

A atividade metabólica também foi investigada em amostras de argamassas, que tinham sido inoculadas com suspensões fúngicas (SC396 e *Nectria* sp.), utilizando o ensaio de MTT. O aparecimento de cristais de formazano roxo, proporcionais à concentração de células viáveis na amostra, pode ser um marcador útil e rápido. A cor mais intensa está

associada a uma maior viabilidade das células numa amostra. Assim, a amostra inoculada com SC396 apresenta uma maior resposta do que a amostra inoculada com *Nectria* sp., podendo-se aferir que a SC396 exibe uma maior actividade metabólica, como é apresentado na Figura 19.

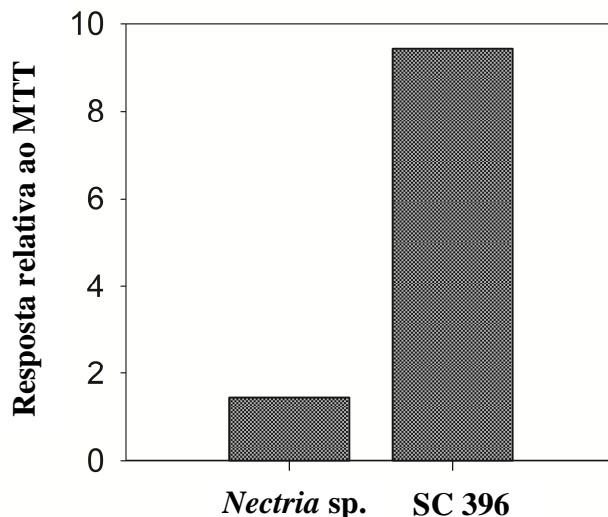
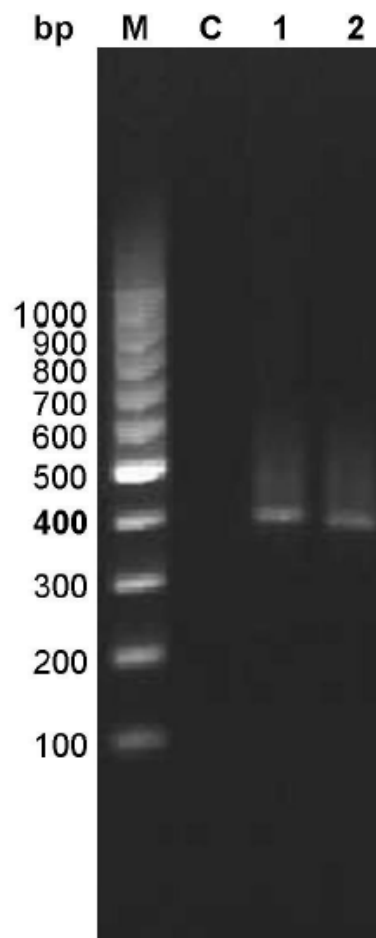


Figura 19: Resposta relativa ao MTT do fungo *Nectria* sp. e da levedura SC396.

3.6. Confirmação molecular de fungos

A presença de células de fungos nas amostras de argamassas inoculadas com SC396 e *Nectria* sp., foram também investigadas por técnicas moleculares. O DNA metagenómico foi extraído e amplificado por PCR. Os produtos amplificados foram corridos num gel de agarose. O DNA das amostras de argamassas mostrou ampliações positivas na zona 18S rDNA utilizando *primers* fúngicos (Figura 20). O tamanho dos produtos de PCR foi aproximadamente de 400 pb, sugerindo a presença de fungos em amostras estudadas.

Figura 20: Gel de electroforese dos produtos de amplificação de PCR a partir do DNA extraído de argamassas inoculadas com SC396 e *Nectria* sp. (poços 1 e 2, respetivamente). O poço M corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb do DNA e o poço C ao controlo.



4. Conclusões



Neste trabalho foi proposto o uso da técnica FISH para a deteção de microrganismos diretamente em amostras reais de argamassas, tendo sido utilizada uma sonda universal para eucariotas. Tendo em conta o objetivo pretendido, foi necessário desenvolver testes em suspensão microbiana e em argamassas (sintéticas e reais) inoculadas com fungos, onde foram estudadas as várias condições de fixação celular, uma vez que estas condições podem variar de acordo com o microrganismo e a sonda utilizada.

Nos estudos com microrganismos em suspensão, foram obtidos resultados positivos para todos os fungos filamentosos em todas as condições de fixação estudadas. Relativamente à hibridação de leveduras em suspensão, não se obtiveram bons sinais de fluorescência para células crescidas em meio YPD durante 48 h a 28°C. Para ultrapassar esta limitação, as leveduras foram hibridadas em diferentes fases de crescimento. Entre as três e oito horas de crescimento em meio líquido, foi possível observar sinais de fluorescência contudo estes sinais eram menos intensos do que os sinais em fungos filamentosos.

Ainda antes da aplicação da técnica FISH nas argamassas reais, esta foi usada em argamassas sintéticas, as quais tinham sido inoculadas com microrganismos, simulando as superfícies de monumentos. Em amostras inoculadas com leveduras não se conseguiram alcançar sinais claros de fluorescência, pois a deteção de leveduras parece estar condicionada à fase de crescimento das células, que por sua vez influencia a permeabilidade das membranas e o conteúdo de rRNA. Por outro lado, obtiveram-se sinais intensos de fluorescência para todos os fungos filamentosos.

No estudo com argamassas reais foram utilizados os fungos *Nectria* sp. e SC396, os quais foram fixados com 4% de paraformaldeído durante 4 h a 4°C e 50% de etanol durante 1 h a 20°C. Obtiveram-se sinais claros de fluorescência para o *Nectria* sp., não tendo acontecido o mesmo para a SC396.

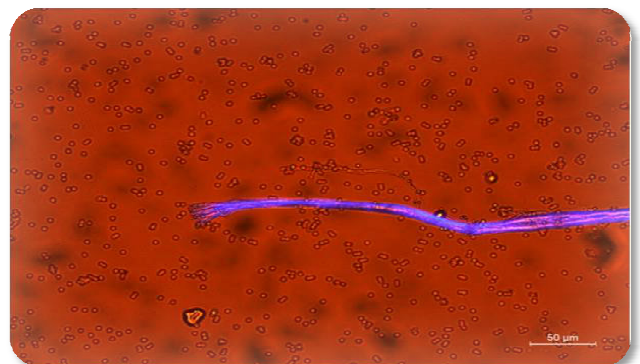
Após a otimização das condições de fixação e deteção, a técnica FISH foi aplicada, com sucesso, em amostras reais. As amostras reais foram recolhidas de pinturas murais da ermida de Santo Aleixo (Évora, Portugal). Nestas amostras foi possível detetar microrganismos eucariotas pois a sonda é dirigida a estes microrganismos.

Os resultados obtidos por FISH nas argamassas reais foram confirmados por MEV-EDS e técnicas moleculares. As técnicas anteriormente referidas em conjunto com a utilização do teste de MTT, mostraram a presença de células metabolicamente ativas nas amostras de argamassas.

4. Conclusões

Os resultados promissores obtidos neste trabalho para a detecção de contaminação microbiana em argamassas de amostras reais, abrem a porta à possibilidade de investigar a aplicação da técnica FISH como uma ferramenta, não só para a detecção, mas também para a identificação de microrganismos diretamente em argamassas reais utilizando sondas específicas. Esta aplicação parece bastante auspiciosa, pois poderia simplificar e facilitar o trabalho nas áreas de conservação e restauro.

5. Perspetivas Futuras



- Desenvolvimento de sondas específicas para microrganismos biodeteriogénicos;
- Uso de sondas específicas na identificação dos microrganismos que causam danos no património;
- Desenvolver sondas específicas com diferentes corantes para a identificação simultânea de comunidades mistas;
- Desenvolvimento de um protocolo FISH para deteção e identificação de bactérias encontradas no património cultural;
- Aplicação da técnica FISH noutros materiais de bens patrimoniais;
- Desenvolvimento de um kit de fácil uso por parte dos restauradores e conservadores na identificação de microrganismos biodeteriogénicos.

6. Referências bibliográficas



Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., and Stahl, D. A. (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations, *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1919-1925.

Amann, R., Fuchs, B. M., and Behrens, S. (2001). The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation, *Current Opinion in Biotechnology* 12, 231-236.

Andorra, I., Monteiro, M., Esteve-Zarzoso, B., Albergaria, H., and Mas, A. (2011). Analysis and direct quantification of *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora guilliermondii* populations during alcoholic fermentation by fluorescence in situ hybridization, flow cytometry and quantitative PCR, *Food Microbiology* 28, 1483-1491.

Bärlocher, F. (2007). Molecular approaches applied to aquatic hyphomycetes, *Fungal Biology Reviews* 21, 19-24.

Berbee, M. L., and Taylor, J. W. (1992). 18S Ribosomal RNA gene sequence characters place the human pathogen *Sporothrix schenckii* in the genus *Ophiostoma*, *Experimental Mycology* 16, 87-91.

Berner, M., Wanner, G., and Lubitz, W. (1997). A comparative study of the fungal flora present in medieval wall paintings in the chapel of the castle Herberstein and in the parish church of St Georgen in Styria, Austria, *International Biodeterioration & Biodegradation* 40, 53-61.

Bottari, B., Ercolini, D., Gatti, M., and Neviani, E. (2006). Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects, *Appl Microbiol Biotechnol* 73, 485-494.

Ciferri, O. (1999). Microbial Degradation of Paintings, *Applied and Environmental Microbiology* 65, 879-885.

De Leo, F., Campanella, G., Proverbio, E., and Urzì, C. (2013). Laboratory tests of fungal biocorrosion of unbonded lubricated post-tensioned tendons, *Construction and Building Materials* 49, 821-827.

- DeLong, E. F., Wickham, G. S., and Pace, N. R. (1989). Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells, *Science* 243, 1360-1363.
- Ettenauer, J. D., Piñar, G., Lopandic, K., Spangl, B., Ellersdorfer, G., Voitl, C., and Sterflinger, K. (2012). Microbes on building materials — Evaluation of DNA extraction protocols as common basis for molecular analysis, *Science of The Total Environment* 439, 44-53.
- Fonseca, A. J., Pina, F., Macedo, M. F., Leal, N., Romanowska-Deskins, A., Laiz, L., Gómez-Bolea, A., and Saiz-Jimenez, C. (2010). Anatase as an alternative application for preventing biodeterioration of mortars: Evaluation and comparison with other biocides, *International Biodeterioration & Biodegradation* 64, 388-396.
- Fuchs, B. M., Glöckner, F. O., Wulf, J., and Amann, R. (2000). Unlabeled Helper Oligonucleotides Increase the In Situ Accessibility to 16S rRNA of Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes, *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3603-3607.
- Gaylarde, C. C., and Morton, L. H. G. (1999). Deteriogenic biofilms on buildings and their control: A review, *Biofouling* 14, 59-74.
- Gérard, E., Guyot, F., Philippot, P., and López-García, P. (2005). Fluorescence in situ hybridisation coupled to ultra small immunogold detection to identify prokaryotic cells using transmission and scanning electron microscopy, *Journal of Microbiological Methods* 63, 20-28.
- Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Olsen, G. J., and Pace, N. R. (1988). Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells, *Journal of Bacteriology* 170, 720-726.
- Gorbushina, A. A., and Petersen, K. (2000). Distribution of microorganisms on ancient wall paintings as related to associated faunal elements, *International Biodeterioration & Biodegradation* 46, 277-284.
- Graf, B., Gobel, U. B., and Adam, T. (1998). [Qualitative and quantitative studies of autofluorescence in fungi], *Mycoses* 1, 39-46.

- Griffin, P. S., Indictor, N., and Koestler, R. J. (1991). The biodeterioration of stone: a review of deterioration mechanisms, conservation case histories, and treatment, *International Biodeterioration* 28, 187-207.
- Harvey, B., and Levitus, M. (2009). Nucleobase-Specific Enhancement of Cy3 Fluorescence, *J Fluoresc* 19, 443-448.
- Hibbett, D. S. (1996). Phylogenetic evidence for horizontal transmission of group I introns in the nuclear ribosomal DNA of mushroom-forming fungi, *Molecular Biology and Evolution* 13, 903-917.
- Hibbett, D. S., Pine, E. M., Langer, E., Langer, G., and Donoghue, M. J. (1997). Evolution of gilled mushrooms and puffballs inferred from ribosomal DNA sequences, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 12002-12006.
- Jiang, J., and Gill, B. S. (2006). Current status and the future of fluorescence in situ hybridization (FISH) in plant genome research, *Genome* 49, 1057-1068.
- La Cono, V., and Urzì, C. (2003). Fluorescent in situ hybridization applied on samples taken with adhesive tape strips, *Journal of Microbiological Methods* 55, 65-71.
- Leefflang, P., Smit, E., Glandorf, D. C. M., van Hannen, E. J., and Wernars, K. (2002). Effects of *Pseudomonas putida* WCS358r and its genetically modified phenazine producing derivative on the *Fusarium* population in a field experiment, as determined by 18S rDNA analysis, *Soil Biology and Biochemistry* 34, 1021-1025.
- Levitus, M., and Ranjit, S. (2011). Cyanine dyes in biophysical research: the photophysics of polymethine fluorescent dyes in biomolecular environments, *Quarterly Reviews of Biophysics* 44, 123-151.
- Liu, Y.-T., Luo, Z.-Y., Long, C.-N., Wang, H.-D., Long, M.-N., and Hu, Z. (2011). Cellulase production in a new mutant strain of *Penicillium decumbens* ML-017 by solid state fermentation with rice bran, *New Biotechnology* 28, 733-737.
- Moter, A., and Göbel, U. B. (2000). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms, *Journal of Microbiological Methods* 41, 85-112.

Pepe, O., Sannino, L., Palomba, S., Anastasio, M., Blaiotta, G., Villani, F., and Moschetti, G. (2010). Heterotrophic microorganisms in deteriorated medieval wall paintings in southern Italian churches, *Microbiological Research* 165, 21-32.

Rojas, J. A., Cruz, C., Mikán, J. F., Villalba, L. S., Cepero de García, M. C., and Restrepo, S. (2009). Isoenzyme characterization of proteases and amylases and partial purification of proteases from filamentous fungi causing biodeterioration of industrial paper, *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, 169-175.

Rosado, T., Gil, M., Mirão, J., Candeias, A., and Caldeira, A. T. (2013). Oxalate biofilm formation in mural paintings due to microorganisms – A comprehensive study, *International Biodeterioration & Biodegradation* 85, 1-7.

Rosado, T., Reis, A., Mirão, J., Candeias, A., Vandenabeele, P., and Caldeira, A. T. (2014). Pink! Why not? On the unusual colour of Évora Cathedral, *International Biodeterioration & Biodegradation* 94, 121-127.

Santos, A., Cerrada, A., García, S., San Andrés, M., Abrusci, C., and Marquina, D. (2009). Application of Molecular Techniques to the Elucidation of the Microbial Community Structure of Antique Paintings, *Microb Ecol* 58, 692-702.

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., and Consortium, F. B. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 6241-6246.

Shirakawa, M. A., Loh, K., John, V. M., Silva, M. E. S., and Gaylarde, C. C. (2011). Biodeterioration of painted mortar surfaces in tropical urban and coastal situations: Comparison of four paint formulations, *International Biodeterioration & Biodegradation* 65, 669-674.

Sørensen, A. H., Torsvik, V. L., Torsvik, T., Poulsen, L. K., and Ahring, B. K. (1997). Whole-cell hybridization of *Methanosarcina* cells with two new oligonucleotide probes, *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3043-3050.

Sterflinger, K., and Piñar, G. (2013). Microbial deterioration of cultural heritage and works of art — tilting at windmills?, *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 9637-9646.

- Suh, S.-O., Takashima, M., and Nakase, T. (1996). Phylogenetic study of the anamorphic basidiomycetous yeasts *Rhodotorula Lactosa* and *R. Minuta*, and related taxa based on 18s ribosomal DNA sequences, *The Journal of General and Applied Microbiology* 42, 1-6.
- Suihko, M.-L., Alakomi, H.-L., Gorbushina, A., Fortune, I., Marquardt, J., and Saarela, M. (2007). Characterization of aerobic bacterial and fungal microbiota on surfaces of historic Scottish monuments, *Systematic and Applied Microbiology* 30, 494-508.
- Tsui, C. K. M., Woodhall, J., Chen, W., Andrélévesque, C., Lau, A., Schoen, C. D., Baschien, C., Najafzadeh, M., and de Hoog, S. G. (2011). Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment, *IMA Fungus* 2, 177-189.
- Urzi, C., La Cono, V., and Stackebrandt, E. (2004). Design and application of two oligonucleotide probes for the identification of Geodermatophilaceae strains using fluorescence in situ hybridization (FISH), *Environmental Microbiology* 6, 678-685.
- Villa, F., Cappitelli, F., Principi, P., Polo, A., and Sorlini, C. (2009). Permeabilization method for in-situ investigation of fungal conidia on surfaces, *Letters in Applied Microbiology* 48, 234-240.
- Wagner, M., Horn, M., and Daims, H. (2003). Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes, *Current Opinion in Microbiology* 6, 302-309.
- Wallner, G., Fuchs, B., Spring, S., Beisker, W., and Amann, R. (1997). Flow sorting of microorganisms for molecular analysis, *Applied and Environmental Microbiology* 63, 4223-4231.
- Warscheid, T., and Braams, J. (2000). Biodeterioration of stone: a review, *International Biodeterioration & Biodegradation* 46, 343-368.
- Wei, S., Jiang, Z., Liu, H., Zhou, D., and Sanchez-Silva, M. (2013). Microbiologically induced deterioration of concrete: a review, *Brazilian Journal of Microbiology* 44, 1001-1007.

- Wiktor, V., De Leo, F., Urzì, C., Guyonnet, R., Grosseau, P., and Garcia-Diaz, E. (2009). Accelerated laboratory test to study fungal biodeterioration of cementitious matrix, *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, 1061-1065.
- Wu, Z., Tsumura, Y., Blomquist, G., and Wang, X.-R. (2003). 18S rRNA Gene Variation among Common Airborne Fungi, and Development of Specific Oligonucleotide Probes for the Detection of Fungal Isolates, *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5389-5397.
- Xin, G., Glawe, D., and Doty, S. L. (2009). Characterization of three endophytic, indole-3-acetic acid-producing yeasts occurring in Populus trees, *Mycological Research* 113, 973-980.
- Xufre, A., Albergaria, H., Inácio, J., Spencer-Martins, I., and Gírio, F. (2006). Application of fluorescence in situ hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations, *International Journal of Food Microbiology* 108, 376-384.
- Zalar, P., de Hoog, G. S., Schroers, H. J., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., and Gunde-Cimerman, N. (2007). Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments, *Studies in Mycology* 58, 157-183.
- Zhao, K., Ping, W., Li, Q., Hao, S., Zhao, L., Gao, T., and Zhou, D. (2009). *Aspergillus niger* var. *taxi*, a new species variant of taxol-producing fungus isolated from *Taxus cuspidata* in China, *Journal of Applied Microbiology* 107, 1202-1207.
- Zhu, X.-F., Tan, H.-Q., Zhu, C., Liao, L., Zhang, X.-Q., and Wu, M. (2012). Cloning and overexpression of a new chitosanase gene from *Penicillium* sp. D-1, *AMB Express* 2, 13.
- Zucconi, L., Gagliardi, M., Isola, D., Onofri, S., Andaloro, M. C., Pelosi, C., Pogliani, P., and Selbmann, L. (2012). Biodeterioration agents dwelling in or on the wall paintings of the Holy Saviour's cave (Vallerano, Italy), *International Biodeterioration & Biodegradation* 70, 40-46.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., and van 't Riet, K. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve, *Applied and Environmental Microbiology* 56, 1875-1881.

7. Anexos



Anexo A – Composição dos meios de cultura e tampões

Meios de cultura

➤ **Meio de cultura sólido**

○ **YPD**

-10 g de extrato de levedura

-10 g peptona bacteriológica

-20 g glucose

-20 g agar bacteriológico

Dissolveu-se tudo em 1 L de água destilada. Em seguida autoclavou-se a 121°C durante 20 min a 1 atm.

➤ **Meio de cultura líquido**

○ **YPD**

-10 g de extrato de levedura

-10 g de peptona bacteriológica

-20 g de glucose

Dissolveu-se tudo em 1 L de água destilada. Em seguida autoclavou-se a 121°C durante 20 min a 1 atm.

Tampões

➤ **PBS**

-76 g NaCl

-0,2 g de KCl

-1,424 g Na₂HPO₄

-0,2 g KH₂PO₄

Dissolveu-se em 1 L de água Mili-Q. Calibrou-se o pH a 7,2. Filtrou-se a solução e em seguida autoclavou-se a 121°C durante 20 min a 1 atm.

➤ **Tampão de hibridação**

-300 mL 0,9 M NaCl

-20 mL 20 mM Tris-HCl

-1 mL 0,01% (p/v) de SDS

Perfez-se o volume de 1 L com água Mili-Q. Filtrou-se a solução e em seguida autoclavou-se a 121°C durante 20 min a 1 atm.

➤ **Paraformaldeído 4% em PBS**

Dissolveu-se 4 g de paraformaldeído em 100 mL de PBS.

➤ **NaCl (0,85%)**

Dissolveu-se 85 g de NaCl em 1 L de água destilada.

➤ **MTT (0,5 mg / mL)**

Dissolveu-se 5 g de MTT em 10 mL de PBS.

Anexo B: Alinhamento múltiplo das sequências 18S rDNA dos microrganismos biodeteriogênicos.

	10	20	30	40	50
Aspergillus niger	---TCCAACCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTCAAAGA			
Cladosporium cladosporioides	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Fusarium solani	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Nectria pseudotrichia	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Penicillium decumbens	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Stereum hirsutum	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Sporothrix schenckii	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Saccharomyces cerevisiae	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Rhodotorula lactosa	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
EUK516	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
	60	70	80	90	100
Aspergillus niger	TTAAGCCATGCATGTCTAAGTATAAG-CACTTTATACTGTGAAACTGCCA			
Cladosporium cladosporioides	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Fusarium solani	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Nectria pseudotrichia	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Penicillium decumbens	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Stereum hirsutum	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Sporothrix schenckii	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Saccharomyces cerevisiae	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Rhodotorula lactosa	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
EUK516	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
	110	120	130	140	150
Aspergillus niger	ATGGCTCATTAAATCAGTTATCGTTTATTTGATAGTACCTTACTA-CATG			
Cladosporium cladosporioides	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Fusarium solani	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Nectria pseudotrichia	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Penicillium decumbens	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Stereum hirsutum	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Sporothrix schenckii	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Saccharomyces cerevisiae	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Rhodotorula lactosa	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
EUK516	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
	160	170	180	190	200
Aspergillus niger	GATACCTG-TGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCTGA-AAACCTCGACTT			
Cladosporium cladosporioides	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Fusarium solani	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Nectria pseudotrichia	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Penicillium decumbens	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Stereum hirsutum	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Sporothrix schenckii	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Saccharomyces cerevisiae	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Rhodotorula lactosa	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
EUK516	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
	210	220	230	240	250
Aspergillus niger	C-GGAAGGGGTGTATTTATTAGATAAAAAACCAATG-CCCTTCGGGGCTC			
Cladosporium cladosporioides	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Fusarium solani	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Nectria pseudotrichia	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Penicillium decumbens	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				
Stereum hirsutum	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----				

Anexo B: Alinhamento múltiplo das sequências 18S rDNA dos microrganismos biodeteriogênicos (continuação).

Sporothrix schenckii	TCGGAAGGGATGTTATTTATTAGATTAATAAACAATG CCCTTCGGGGCTC
Saccharomyces cerevisiae	TTGGAAAGAGATGTTATTTATTAGATTAATAAATCAATG TCTTC--GGACTC
Rhodotorula lactosa	CTGGGAGGGGTGTTATTTATTAGATTAATAAACAATGGCGGGTCAAACCGT
EUK516	-----

	260 270 280 290 300
Aspergillus niger	CTT--GGTGAATCATAATAACTTAACGAATCGCATGGCCTTTCGCCGGCG
Cladosporium cladosporioides	CTT--GGTGAATCATAATAACTTAACGAATCGCATGGCCTTTCGCCGGCG
Fusarium solani	ACT--GGTGATTCATGATAACTCCTCGAATCGCATGGCCTTGTGCCGGCG
Nectria pseudotrichia	CTT--GGTGATTCATGATAACTTCTCGAATCGCATGGCCTTTCGCCGGCG
Penicillium decumbens	CTT--GGTGAATCATAATAACTTAACGAATCGCATGGCCTTTCGCCGGCG
Stereum hirsutum	CTT TGGTGATTCATAATAACTTCTCGAATCGCATGGCCTTGTGCCGGCG
Sporothrix schenckii	CCT--GGTGATTCATAATAACTTCTCGAATCGCACGGCCTTTCGCCGGCG
Saccharomyces cerevisiae	TTT--GATGATTCATAATAACTTTTCGAATCGCATGGCCTTGTGCTGGCG
Rhodotorula lactosa	CTTTCGTTGAATCATGATAACTGCTCGAATCGCATGGCCTTTCGCCGGCG
EUK516	-----

	310 320 330 340 350
Aspergillus niger	ATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGG
Cladosporium cladosporioides	ATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGG
Fusarium solani	ATGGTTCATTCAAATTTCTCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGG
Nectria pseudotrichia	ATGGTTCATTCAAATTTCTTCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGG
Penicillium decumbens	ATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGG
Stereum hirsutum	ATGGTTCATTCAAATATCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAGG
Sporothrix schenckii	ATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGACGGCTGGGTCTTGG
Saccharomyces cerevisiae	ATGGTTCATTCAAATTTCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGTGG
Rhodotorula lactosa	ATGCTTCATTCAAATATCTGCCCTATCAACTTTTCGATGGTAGGATAGAGG
EUK516	-----

	360 370 380 390 400
Aspergillus niger	CCTACCATGGTGGCAACGGGTAAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCGGGAGA
Cladosporium cladosporioides	CCTACCATGGTATCAACGGGTAAACGGGGAATTAGGGTTCGACTCCGGAGA
Fusarium solani	CCAAACATGGTTGCAACGGGTAAACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGA
Nectria pseudotrichia	CCAAACATGGTTGCAACGGGTAAACGGAGGGTTAGGGCTCGACCCCGGAGA
Penicillium decumbens	CCTACCATGGTGGCAACGGGTAAACGGGGAATTAGGGTTCGATTCGGGAGA
Stereum hirsutum	CCTACCATGGTTTCAACGGG-TAACGGGGAATAAGGGNTCGATTCGGGAGA
Sporothrix schenckii	CCAGCCATGGTGAACAACGGGTAAACGGAGGGTTAGGGTTCGATTCGGGAGA
Saccharomyces cerevisiae	CCTACCATGGTTTCAACGGGTAAACGGGGAATAAGGGTTCGATTCGGGAGA
Rhodotorula lactosa	CCTACCATGGTATGACGGGTAAACGGGGAATAAGGGTTCGATTCGGGAGA
EUK516	-----

	410 420 430 440 450
Aspergillus niger	GGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA
Cladosporium cladosporioides	GGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA
Fusarium solani	AGGAGCCTGAGAAACGGCTACTACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA
Nectria pseudotrichia	AGGAGCCTGAGAAACGGCTACTACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA
Penicillium decumbens	GGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA
Stereum hirsutum	GGGAGCCTGAGAAACGGCTNCCAATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA
Sporothrix schenckii	AGGAGCCTGAGAAACGGCTACTACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA
Saccharomyces cerevisiae	GGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAA
Rhodotorula lactosa	GAGGGCCTGAGAAACGGCCCTCAGTCTTAAGGGAGC-AGCAGGCGCGCAA
EUK516	-----

	460 470 480 490 500
Aspergillus niger	ATTACCCAATCCCACACGGGGAGGTAGTGACAAATAAATACTGATACGGG

Anexo B: Alinhamento múltiplo das sequências 18S rDNA dos microrganismos biodeteriogênicos (continuação).

```

Cladosporium cladosporioides  ATTACCCAATCCCACACGGGGAGGTAGTGACAATAAACTGATACAGG
Fusarium solani                ATTACCCAATCCCACACGGGGAGGTAGTGACAATAAACTGATACAGG
Nectria pseudotrichia          ATTACCCAATCCCACACTCGGGGAGGTAGTGACAATAAACTGATACAGG
Penicillium decumbens           ATTACCCAATCCCATACGGGGAGGTAGTGACAATAAACTGATACAGG
Stereum hirsutum                ATTACCCAATCCCACACGGGGAGGTAGTGACAATAAACTAACATATAGG
Sporothrix schenckii           ATTACCCAATCCCACACGGGGAGGTAGTGACAATAAACTGATACAGG
Saccharomyces cerevisiae       ATTACCCAATCCTAATTCAGGGAGGTAGTGACAATAAACTAACGATACAGG
Rhodotorula lactosa            ATTTCCCA-TCCCACACGGGGAGATAGTGACAATAAACTAACATATAGG
EUK516

```

```

                    510      520      530      540      550
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger          GCTCTTTTGGGTCTCGTAATTGGAATGAGTACAATTTAAATCCCTTAACG
Cladosporium cladosporioides GCTCTTTTGGGTCTTGTAATTGGAATGAGTACAATTTAAATCCCTTAACG
Fusarium solani            GCTCTTTTGGGTCTTGTAATTGGAATGAGTACAATTTAAATCCCTTAACG
Nectria pseudotrichia     GCTCTTTTGGGTCTTGTAATTGGAATGAGTACAATTTAAATCCCTTAACG
Penicillium decumbens     GCTCTTTTGGGTCTCGTAATTGGAATGAGAACAAATTTAAATCCCTTAACG
Stereum hirsutum          GCTCTTTTGGGTCTTATAAATTGGAATGAGTACAATTTAAATCCCTTAACG
Sporothrix schenckii      GCTCTTTTGGGTCTTGTAATTGGAATGAGTACAATTTAAATCCCTTAACG
Saccharomyces cerevisiae  GCCCATTCGGGTCTTGTAATTGGAATGAGTACAATGTAATACCTTAACG
Rhodotorula lactosa      GCTCTTTTGGGTCT-ATAAATTGGAATGAGTACAATTTAAATCCCTTAACG
EUK516

```

```

                    560      570      580      590      600
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger          AGGAACAATTTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGC
Cladosporium cladosporioides AGGAACAATTTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGC
Fusarium solani            AGGAACAATTTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGC
Nectria pseudotrichia     AGGAACAATTTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGC
Penicillium decumbens     AGGAACAATTTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGC
Stereum hirsutum          AGGAACAATTTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGC
Sporothrix schenckii      AGGAACAATTTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGC
Saccharomyces cerevisiae  AGGAACAATTTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGC
Rhodotorula lactosa      AGGATCAATTTGGAGGGCAAGTCTGGTCCAGCAGCCGCGGTAATCCAGC
EUK516

```

```

                    610      620      630      640      650
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger          TCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAAC
Cladosporium cladosporioides TCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAAC
Fusarium solani            TCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGTTGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAAC
Nectria pseudotrichia     TCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGTTGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAAC
Penicillium decumbens     TCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAAC
Stereum hirsutum          TCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAAC
Sporothrix schenckii      TCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAAC
Saccharomyces cerevisiae  TCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAAC
Rhodotorula lactosa      TCCAATAGCGTATATTTAAAGTTGTTGCCGTTAAAAAGCTCGCAGTCGAAC
EUK516

```

```

                    660      670      680      690      700
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger          CTTGGGCTTGGCTGGCCGGTCCGCCTCACC--GCGAGTACTGG--TCCG
Cladosporium cladosporioides CTTGGGCTTGGCTGGCCGGTCCGCCTCACC--GCGTGTACTGG--TCCG
Fusarium solani            CTTGGGCTTGGCTGGCCGGTCCGCCTCACC--GCGTGTACTGG--TCCG
Nectria pseudotrichia     CTTGGGCTTGGCTGGCCGGTCCGCCTCACC--GCGTGTACTGG--TCCG
Penicillium decumbens     CTTGGGCTTGGCTGGCCGGTCCGCCTCACC--GCGAGTACTG--TCCG
Stereum hirsutum          TTCAGACTTGCCCGGGTCCGCCTAAC--GGTGAGTACTG--TCTG
Sporothrix schenckii      CTTGGGCTTGGCTGGCCGGTCCGCCTCACC--GCGTGTACTGG--TCCG
Saccharomyces cerevisiae  TTTGGGCCCGGTTGGCCGGTCCGATTT-TT--TCGTGTACTGGATTTCCA
Rhodotorula lactosa      TT--GCCTTTGCCCGCCGGTCCGCCTTTTTGGGTGTGTACTGG--AGCG

```

Anexo B: Alinhamento múltiplo das sequências 18S rDNA dos microrganismos biodeteriogênicos (continuação).

EUK516

```

-----
          710       720       730       740       750
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger      GCTGGACCTTTCCCTTCTGGGGAATCT-CATGGCCTTCACTGGCTGTGG-G
Cladosporium cladosporioides GCCGGGCCTTTCCCTTCTGGGGAACCT-CATGCCCTTCACTGGGCTGTGG
Fusarium solani       GCCGGGCCTTTCCCTTCTGTGGAAACCC-CATGCCCTTCACTGGGTGTGGCG
Nectria pseudotrichia GCCGGGCCTTTCCCTTCTGTGGAAACCC-CATGCCCTTCACTGGGTGTGGCG
Penicillium decumbens GCTGGACCTTTCCCTTCTGGGGAACCT-CATGGCCTTCACTGGCTGTGG-G
Stereum hirsutum     GCTGGGCCTTACCTCTTGGTGAGCCGGCATGCCCTTCACTGGGTGTGTCCG
Sporothrix schenckii  GCCGGGTCTTTCCCTTCTGGGGAGCCG-CATGCCCTTCACTGGGTGTGTCCG
Saccharomyces cerevisiae ACGGGGCCTTTCCCTTCTGGCTAACCT-TGAGTCCTTG--TGGCTCT--TG
Rhodotorula lactosa  GTGGAGGCTTACCTCGTGGTGAGC-GCTATGCCCTTAACTGGG-GTAGTC
EUK516
-----

```

```

          760       770       780       790       800
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger      GGGAAACAGGACTTTTACTGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCT
Cladosporium cladosporioides GGGAAACAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCT
Fusarium solani       GGGAAACAGGACTTTTACTGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCT
Nectria pseudotrichia GGGAAACAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCT
Penicillium decumbens GGGAAACAGGACTTTTACTGTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCT
Stereum hirsutum     GGGAAACAGGACTTTTACTTTGAGAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGG-CC
Sporothrix schenckii  GGGAAACAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCT
Saccharomyces cerevisiae GCGAACCNAGGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCCT
Rhodotorula lactosa  GGGAAACATGACTTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGACT
EUK516
-----

```

```

          810       820       830       840       850
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger      TT-GCTCGAATACATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTGCGGTTCTA
Cladosporium cladosporioides TT-GCTCGAATACATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTGTGGTTCTA
Fusarium solani       AT-GCTCGAATACATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTGTGGTTCTA
Nectria pseudotrichia AT-GCTCGAATACATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTGTGGTTCTA
Penicillium decumbens TT-GCTCGAATACATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTGCGGTTCTA
Stereum hirsutum     TATGCCCGAATACATTAGCATGGAATAATAAAATAGGACGTGCGGTTCTA
Sporothrix schenckii AT-GCTCGGATACATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTGCGGTTCTA
Saccharomyces cerevisiae ATTGCTCGAATATATTAGCATGGAATAATAGAATAGGACGTTTGGTTCTA
Rhodotorula lactosa  TACGCCCAATACATTAGCATGGAATAATAAAATAGGACGTGCGGTTCTA
EUK516
-----

```

```

          860       870       880       890       900
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger      TTTTGTGGTTTCTAGGACCGCCGTAATGATTAATAGGGATAGTCGGGGG
Cladosporium cladosporioides TTTTGTGGTTTCTAGGACCGCCGTAATGATTAATAGGGATAGTCGGGGG
Fusarium solani       TTTTGTGGTTTCTAGGACCGCCGTAATGATTAATAGGGACAGTCGGGGG
Nectria pseudotrichia TTTTGTGGTTTCTAGGACCGCCGTAATGATTAATAGGGATAGTCGGGGG
Penicillium decumbens TTTTGTGGTTTCTAGGACCGCCGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGG
Stereum hirsutum     TTTTGTGGTTTCTAGAGTCGCGTAATGATTAATAGGGATAGTTGGGGG
Sporothrix schenckii TTTTGTGGTTTCTAGGACCGCCGTAATGATTAATAGGGACAGTCGGGGG
Saccharomyces cerevisiae TTTTGTGGTTTCTAGGACCATCGTAATGATTAATAGGGACGGTCGGGGG
Rhodotorula lactosa  TTTTGTGGTTTCTAGGATCGCCGTAATGATTAATAGG-ATAGTTGGGGG
EUK516
-----

```

```

          910       920       930       940       950
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger      CGTCAGTATTCAATCGTCAGAGGTGAAATTCCTTGGATTGCTGAAGACTA
Cladosporium cladosporioides CATCAGTATTCAATCGTCAGAGGTGAAATTCCTTGGATTGATTGAAGACTA
Fusarium solani       CATCAGTATTCAATGTCAGAGGTGAAATTCCTTGGATTGATTGAAGACTA
Nectria pseudotrichia CATCAGTATTCCGTTGTCAGAGGTGAAATTCCTTGGATTGATTGAAGACTA

```

Anexo B: Alinhamento múltiplo das sequências 18S rDNA dos microrganismos biodeteriogênicos (continuação).

Penicillium decumbens	CGTCAGTATTGCTGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTGCTGAAGACTA
Stereum hirsutum	CATTAGTATTGCGTTGCTAGAGGTGAAATTCCTGGATTGACGCAAGACTA
Sporothrix schenckii	CATCAGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTATTGAAGACTA
Saccharomyces cerevisiae	CATCAGTATTCAATTGTCAGAGGTGAAATTCCTGGATTATTGAAGACTA
Rhodotorula lactosa	C-TTCGTATTCAATTGCTAGAGGTGAA-TTCCTGGATTATTGAAGACTA
EUK516	-----
	960 970 980 990 1000
Aspergillus niger	ACTACTGCGAAAGCATTTCGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAGGGAAACGAA
Cladosporium cladosporioides	ACTACTGCGAAAGCATTTCGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAGTGAACGAA
Fusarium solani	ACTACTGCGAAAGCATTTCGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAG-GAACGAA
Nectria pseudotrichia	ACTACTGCGAAAGCATTTCGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAG-GAACGAA
Penicillium decumbens	ACTACTGCGAAAGCATTTCGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAGGGAAACGAA
Stereum hirsutum	ACTACTGCGAAAGCATTTCGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAA-GAACGAA
Sporothrix schenckii	ACTACTGCGAAAGCATTTCGCCAAGGATGTTTTCATTAATCAG-GAACGAA
Saccharomyces cerevisiae	ACTACTGCGAAAGCATTTCGCCAAGGACGTTTTCATTAATCAA-GAACGAA
Rhodotorula lactosa	ACTACTGCGAAAGCATTTCGCCAAGGATGTTTTCATTGATCAA-GAACGAA
EUK516	-----
	1010 1020 1030 1040 1050
Aspergillus niger	AGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAAC
Cladosporium cladosporioides	AGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAAC
Fusarium solani	AGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAAC
Nectria pseudotrichia	AGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAAC
Penicillium decumbens	AGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAAC
Stereum hirsutum	GGTTAGGGGATCGAAAACGATCAGATACCGTTGTAGTCTTAACCATAAAC
Sporothrix schenckii	AGTTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAAC
Saccharomyces cerevisiae	AGTTAGGGGATCGAAGATGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACCATAAAC
Rhodotorula lactosa	GGTTAGGG-ATCGAAAC-ATCAGA-ACCGTTGTAGTCTTAACAGTAA-C
EUK516	-----
	1060 1070 1080 1090 1100
Aspergillus niger	TATGCCGACTAGGGATCGGACCGTGTTCATTATGACCCGTTCCGGCACC
Cladosporium cladosporioides	TATGCCGACTAGGGATCGGACCGTGTTCATTATGACCCGTTCCGGCACC
Fusarium solani	TATGCCGACTAGGGATCGGACCGTG-TTATTTTTGACCCGTTCCGGCACC
Nectria pseudotrichia	TATGCCGACTAGGGATCGGACGATG-TTATTTTTGACTCGTTCGGCACC
Penicillium decumbens	TATGCCGACTAGGGATCGGACCGG-GATTCTATGATGCCCGTTCCGGCACC
Stereum hirsutum	TATGCCGACTAGGGATCGGGCGAACTCAATTTATGTGCTCCGGCACC
Sporothrix schenckii	TATGCCGACTAGGGATCGGACGATG-TTATTTTTGACTCGTTCGGCACC
Saccharomyces cerevisiae	TATGCCGACTAGGGATCGGGTGGTGTTCATTTTAAATGACCCACTCCGGCACC
Rhodotorula lactosa	GATGCCGACTAGGGATCGGACGAGG-ATTTTTAATGACTCTTCGGCACC
EUK516	-----
	1110 1120 1130 1140 1150
Aspergillus niger	TTACGAGAAATCA-AAGTTTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCCGAAGG
Cladosporium cladosporioides	TTACGAGAAATCA-AAGTTTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCCGAAGG
Fusarium solani	TTACGAGAAATCA-AAGTCTTGGGCTCCAGGGGAGTATGGTCCGAAGG
Nectria pseudotrichia	TTACGAGAAATCA-AAGTGCTGG-
Penicillium decumbens	TTACGAGAAATCA-AAGTTTTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCCGAAGG
Stereum hirsutum	TTACGAGAAATCA-AAGTCTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCCGAAGG
Sporothrix schenckii	TTACACGAAAGTACAAGTTTTCTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCCGAAGG
Saccharomyces cerevisiae	TTACGAGAAATCA-AAGTCTTGGGTTCTGGGGGAGTATGGTCCGAAGG
Rhodotorula lactosa	TCAAGAGAAATCT-TTAAGTT-AGTTTCGGGGGAGTATGGTCCGAAGG
EUK516	-----
	1160 1170 1180 1190 1200

Anexo B: Alinhamento múltiplo das sequências 18S rDNA dos microrganismos biodeteriogênicos (continuação).

```

...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger      CTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCA GGCCTGGAGCCTG
Cladosporium cladosporioides
Fusarium solani      CTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCA GGGGTGGAGCCTG
Nectria pseudotrichia
Penicillium decumbens CTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACAA GGCCTGGAGCCTG
Stereum hirsutum     CTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCA GGAGTGGAGCCTG
Sporothrix schenckii CTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCA GGGGTGGAATCTG
Saccharomyces cerevisiae
Rhodotorula lactosa  CTGAAACTTAAAGAAATTGACGGAAGGGCACCACCA GGAGTGGAGCCTG
EUK516
-----

1210      1220      1230      1240      1250
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger      CGGCCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCAGACAAAATA
Cladosporium cladosporioides
Fusarium solani      CGGCCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCAGACACAATG
Nectria pseudotrichia
Penicillium decumbens CGGCCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCAGACAAAATA
Stereum hirsutum     CGGCCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCAGACATAACT
Sporothrix schenckii CGGCCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCAGACACGATG
Saccharomyces cerevisiae
Rhodotorula lactosa  CGGCCTTAATTTGACTCAACACGGGGAAACTCACCAGGTCAGACACGACA
EUK516
-----

1260      1270      1280      1290      1300
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger      AGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATCTTTTGGATGGTGGTGAT
Cladosporium cladosporioides
Fusarium solani      AGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTTTGTGGTGGTGGTGAT
Nectria pseudotrichia
Penicillium decumbens AGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATCTTTTGGATGGTGGTGAT
Stereum hirsutum     AGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTTTATGGTGGTGGTGAT
Sporothrix schenckii AGGATTGACAGATTGAGAGCTCTTTCTTGATTTTGTGGTGGTGGTGAT
Saccharomyces cerevisiae
Rhodotorula lactosa  AGGATTGACAGATTGATAGCTCTTTCTTGATTTTGTGGTGGTGGTGAT
EUK516
-----

1310      1320      1330      1340      1350
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger      GGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTCCGATAACGAA
Cladosporium cladosporioides
Fusarium solani      GGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTCCGATAACGAA
Nectria pseudotrichia
Penicillium decumbens GGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTCCGATAACGAA
Stereum hirsutum     GGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTCCGATAACGAA
Sporothrix schenckii GGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTCCGATAACGAA
Saccharomyces cerevisiae
Rhodotorula lactosa  GGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGTGATTTGTCTGCTTAATTCCGATAACGAA
EUK516
-----

1360      1370      1380      1390      1400
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger      CGAGACCTCGGCC -TTAAATAGCCCGTCCGCATTTGCGGGCCGCTGGC
Cladosporium cladosporioides
Fusarium solani      CGAGACCTTAACCTGCTAAATAGCCCGTATTGCTTTGGCAGTACGCTGGC
Nectria pseudotrichia
Penicillium decumbens CGAGACCTCGGCC -TTAAATAGCCCGTCCGCATTTGCGGGCCGCTGGC
Stereum hirsutum     CGAGACCTTAACCTGCTAAATAGCCCGCCGCTTTTGTGGTGGTGGC
Sporothrix schenckii CGAGACCTTAACCTGCTAAATAGCCCGCTTGTCTTTGGCAGCGCGCTGGC

```

Anexo B: Alinhamento múltiplo das sequências 18S rDNA dos microrganismos biodeteriogênicos (continuação).

```

Saccharomyces cerevisiae      CGAGACCTTAACCTACTAAATAGTGGTGCTAGCATTGCTGGTTATCCAC
Rhodotorula lactosa          CGAGACCTTAACCTGCTAAATAGCCCAGCCGACTTTGGTTGGTCGCTGGC
EUK516

      1410      1420      1430      1440      1450
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger            TTCTTAGAGGGGACTATCGGC - TCAAGCCGATGGAAGTTCGCGGCAATAAC
Cladosporium cladosporioides
Fusarium solani              TTCTTAGAGGGGACTATCGGC - TCAAGCCGATGGAAGTTTGAAGCAATAAC
Nectria pseudotrichia
Penicillium decumbens        TTCTTAGAGGGGACTATCGGC - TCAAGCCGATGGAAGTTCGCGGCAATAAC
Stereum hirsutum             TTCTTAGAGGGGACTATCGGC - TCAAGCCGATGGAAGTTTGAAGCAATAAC
Sporothrix schenckii         TTCTTAGAGGGGACTATCGGC - TCAAGCCGATGGAAGTTTGAAGCAATAAC
Saccharomyces cerevisiae     TTCTTAGAGGGGACTATCGGTTTCAAGCCGATGGAAGTTTGAAGCAATAAC
Rhodotorula lactosa         TTCTTAGAGGGGACTATCGGCGTTAGCCGATGGAAGTTTGAAGCAATAAC
EUK516

      1460      1470      1480      1490      1500
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger            AGGCTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCTACACTGAC
Cladosporium cladosporioides
Fusarium solani              AGGCTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCTACACTGAC
Nectria pseudotrichia
Penicillium decumbens        AGGCTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCTACACTGAC
Stereum hirsutum             AGGCTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCTACACTGAC
Sporothrix schenckii         AGGCTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCTACACTGAC
Saccharomyces cerevisiae     AGGCTCTGTGATGCCCTTAGACGTTCTGGGCCGCACGCGCTACACTGAC
Rhodotorula lactosa         AGGCTCTGTGATGCCCTTAGATGTTCTGGGCCGCACGCGCTACACTGAC
EUK516

      1510      1520      1530      1540      1550
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger            AGGGCCAGCGAGTACATCACCTTGGCCGAGAGGTTCTGGGTAATCTTGTGA
Cladosporium cladosporioides
Fusarium solani              GGAGCCAGCGAGTACTTC - CTTGTCCGAAAGGTTCCGGTAATCTTGTGA
Nectria pseudotrichia
Penicillium decumbens        AGGGCCAGCGAGTACATCACCTTGGCCGAGAGGTTCTGGGTAATCTTGTGA
Stereum hirsutum             AGAGCCAGCGAGTTTCACTCCTTGTCCGGAAGGACTGGGTAATCTTGTGA
Sporothrix schenckii         AGAGCCAGCGAGTTCTTC - CTTGGCCGAAAGGCTGGGTAATCTTGTGA
Saccharomyces cerevisiae     GGAGCCAGCGAGTTCAAC - CTTGGCCGAGAGGTTCTTGGTAATCTTGTGA
Rhodotorula lactosa         CGAACCAGCGAGTTTTTCTCCTTAGCCGGAAGGCTTGGGTAATCTTGTGA
EUK516

      1560      1570      1580      1590      1600
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger            AACCCTGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAG
Cladosporium cladosporioides
Fusarium solani              AACTCCGTGTCGTGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAG
Nectria pseudotrichia
Penicillium decumbens        AACCCTGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAG
Stereum hirsutum             AACTCTGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAG
Sporothrix schenckii         AACTCTGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAG
Saccharomyces cerevisiae     AACTCCGTGTCGTGCTGGGGATAGAGCATTGTAATTATTGCTCTTCAACGAG
Rhodotorula lactosa         AACTCGGTGTCGTGATGGGGATAGAGCATTGCAATTATTGCTCTTCAACGAG
EUK516

      1610      1620      1630      1640      1650
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger            GAATGCCTAGTAGGCACGAGTCATCAGCTCGTGCCGATTACGTCCTGCGC
Cladosporium cladosporioides

```

Anexo B: Alinhamento múltiplo das sequências 18S rDNA dos microrganismos biodeteriogênicos (continuação).

```

Fusarium solani          GAATCCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTGATTACGTCCCTGCC
Nectria pseudotrichia
Penicillium decumbens    GAATGCCTAGTAGGCACGAGTCATCAGCTCGTGCCGATTACGTCCCTGCC
Stereum hirsutum        GAATTCCCTAGTAAGCGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGATTACGTCCCTGCC
Sporothrix schenckii    GAATCCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAACTTGCCTTGATTACGTCCCTGCC
Saccharomyces cerevisiae GAATTCCCTAGTAAGCGCAAGTCATCAGCTTGCCTTGATTACGTCCCTGCC
Rhodotorula lactosa     GAATACCTAGTAAGCGTGAGTCATCAGCTCGCGTTGAATACGTCCCTGCC
EUK516

      1660      1670      1680      1690      1700
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger       CTTTGTACACACCCGCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTCAGTGAGGC
Cladosporium cladosporioides
Fusarium solani        CTTTGTACACACCCGCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTCAGTGAGGC
Nectria pseudotrichia
Penicillium decumbens  CTTTGTACACACCCGCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTCAGTGAGGC
Stereum hirsutum      CTTTGTACACACCCGCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGAC
Sporothrix schenckii  CTTTGTACACACCCGCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTCAGTGAGGC
Saccharomyces cerevisiae CTTTGTACACACCCGCCGTCGCTAGTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGC
Rhodotorula lactosa   CTTTGTACACACCCGCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGT
EUK516

      1710      1720      1730      1740      1750
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger       CTTCCGACTGGCTCAGGAGGGTTGGCAACGACCCCCCAGAGCCGGAAAGT
Cladosporium cladosporioides
Fusarium solani        GTCCGGACTGGCCCAGAGAGGTGG
Nectria pseudotrichia
Penicillium decumbens  CTTCCGACTGGCTCAGGAGGGTTGGCAACGACCCCCCAGAGCCGGAAAGT
Stereum hirsutum      CTCCGGATTGGCTTTGGGGAGTCGGCAACGACACCCATTGCTGAGAAGT
Sporothrix schenckii  TTCCGGACTGGCCCAGAGGGGTGGGCAACTACCCCTCCGGGCCGGAAAGT
Saccharomyces cerevisiae CTCAGGATCTGCTTAGAGAAAGGGGGCAACTCCATCTCAGAGCCGAGAAAT
Rhodotorula lactosa   CTCCGGATTGGCTTCTGGGAGCCGGCAACGGCACCTAGTCCGTGAGAAGT
EUK516

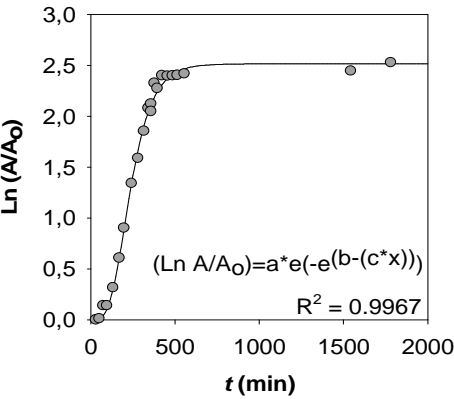
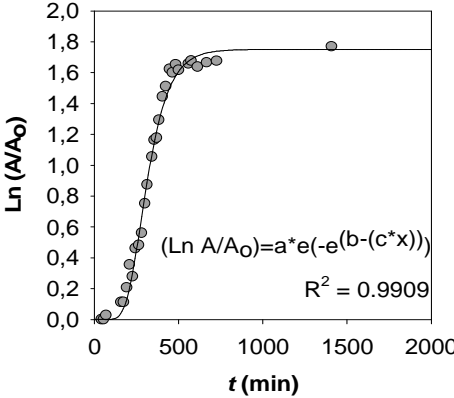
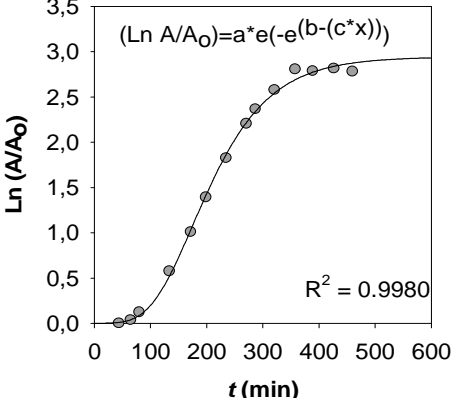
      1760      1770      1780      1790      1800
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger       TGGTCAAACCCGGTCAATTTAGAG
Cladosporium cladosporioides
Fusarium solani
Nectria pseudotrichia
Penicillium decumbens  TGGTCAAACCTCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAAACAAGGTTTCCG
Stereum hirsutum      TGGTCAAACCTTGGTCAATTTAGAGGAA - TAAAATCGTAACAAG - TTCCG
Sporothrix schenckii  TATCCAAACTCGGTCATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAAACAAGGTTCCG
Saccharomyces cerevisiae TGGACAAACTTGGTCAATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAAACAAGGT
Rhodotorula lactosa   TGATCGAACTTGGTCAATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAAACAAGGTTTCCG
EUK516

      1810      1820      1830      1840      1850
...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
Aspergillus niger
Cladosporium cladosporioides
Fusarium solani
Nectria pseudotrichia
Penicillium decumbens  TAGGTGAACCTGCCGA
Stereum hirsutum      TAGTGAACCTGC
Sporothrix schenckii  TTGGTGAACCTGCCG
Saccharomyces cerevisiae
Rhodotorula lactosa   T
EUK516

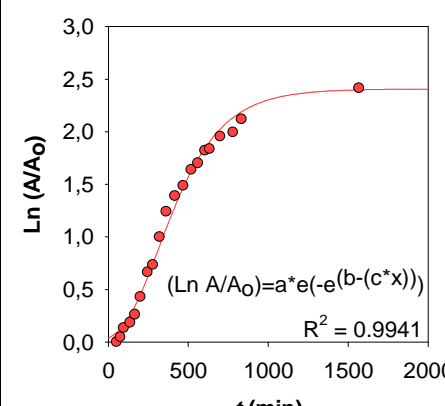
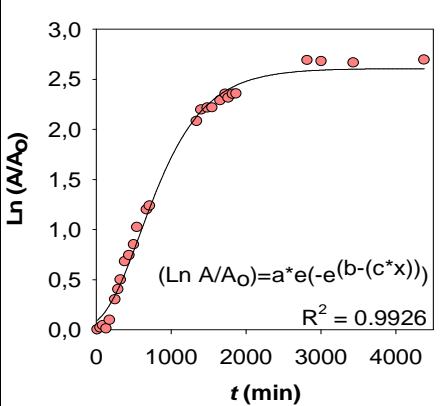
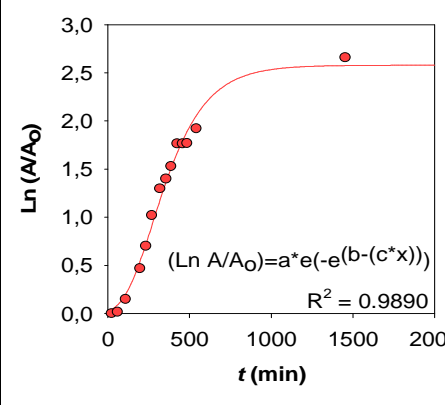
```


Anexo C: Curvas de crescimento de leveduras

Seguiu-se o crescimento das leveduras a 600 nm e os dados absorvência/tempo foram ajustados segundo Zwietering *et al.*, 1990.

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CCMI 396 crescida em YPD					
Condições		Gráfico	Ajuste		
			Coeficiente	Erro padrão	
T (°C)	28		a	2,5143	0,0278
Vagitação (r.p.m.)	120		b	2,2185	0,0999
Volumen (mL)	100		c	0,0111	0,0005
			R²	0.9967	
T (°C)	28		a	1,7508	0,0244
Vagitação (r.p.m.)	120		b	3,0757	0,1696
Volumen (mL)	100		c	0,0111	0,0006
			R²	0.9909	
T (°C)	28		a	2,9422	0,0428
Vagitação (r.p.m.)	120		b	2,3155	0,115
Volumen (mL)	100		c	0,0132	0,0007
			R²	0,998	

Anexo C: Curvas de crescimento de leveduras (continuação)

<i>Rhodotorula</i> sp. crescida em YPD					
Condições		Gráfico	Ajuste		
			Coefficiente	Erro padrão	
T (°C)	28		a	3.2132	0.0298
Vagitação (r.p.m.)	120		b	1.9116	0.1265
Vt (mL)	100		c	0.0063	0.0004
			R²	0.9941	
T (°C)	28		a	2,316	0,0225
Vagitação (r.p.m.)	120		b	1,7971	0,0798
Vt (mL)	100		c	0,0058	0,0002
			R²	0.9926	
T (°C)	28		a	2,5779	0,0889
Vagitação (r.p.m.)	120		b	1,5466	0,1063
Vt (mL)	100		c	0,0056	0,0004
			R²	0.9890	