



Escola de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química
Licenciatura em Biotecnologia

**Otimização da técnica FISH para a sua aplicação
na deteção de microrganismos que colonizam
os bens patrimoniais**

Sara Margarida de Oliveira Baptista Lopes Batista

Orientação: Professora Doutora Ana Teresa Caldeira
Doutora Marina González Pérez

Relatório de Estágio

Évora, junho 2016



Escola de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química
Licenciatura em Biotecnologia

**Otimização da técnica FISH para a sua aplicação
na deteção de microrganismos que colonizam
os bens patrimoniais**

Sara Margarida de Oliveira Baptista Lopes Batista

Orientação: Professora Doutora Ana Teresa Caldeira
Doutora Marina González Pérez

Relatório de Estágio

Évora, junho 2016

Agradecimentos

Ao longo da realização deste trabalho, tive o privilégio de contar com o apoio, disponibilidade e preocupação de algumas pessoas, sem os quais não seria possível a conclusão deste projeto.

Em primeiro lugar, quero agradecer à Marina pela disponibilidade, preocupação, carinho, e sobretudo pelos conhecimentos que me transmitiu. Quero ainda agradecer por me ter inculido um sentido de responsabilidade que certamente será útil no meu futuro profissional. Queria também agradecer à professora Dra. Ana Teresa Caldeira, por toda a disponibilidade demonstrada.

Agradeço aos colegas do Laboratório Hércules, em especial, ao Ricardo pela simpatia e por ter demonstrado disponível em ajudar em qualquer dúvida relativamente ao trabalho experimental.

Sem dúvida que o maior agradecimento vai para os meus pais e namorado, por terem acreditado em mim e por todo o apoio depositado nas alturas mais difíceis. Ainda assim quero agradecer ao meu gato por me ter, de certa forma, confortado com as sua lambidelas e companhia ao logo de toda a realização deste relatório.

Não podia deixar de agradecer a todos os colegas da faculdade e fora da faculdade, por todos estes anos de bons e maus momentos, que de certa forma me deram forças para lutar por este objetivo.

Terminando assim por agradecer a cidade de Évora, por me ter proporcionado esta experiência de vida.

UM GRANDE OBRIGADA!

Este trabalho é financiado por Fundos Nacionais através da FCT –Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto “MICROTECH-ART – Desenvolvimento de uma Ferramenta Analítica para deteção de Microrganismos que proliferam no Património Cultural” (PTDC/BBB-IMG/0046/2014).

Resumo

Os bens patrimoniais constituem uma parte importante da herança cultural e estão continuamente sujeitos a processos que favorecem a sua deterioração. São múltiplos os fatores que contribuem no processo (pH, temperatura, humidade, entre outros) e os microrganismos (estirpe bacteriana, estirpe de leveduras, fungos, entre outros) têm um papel importante. Deste modo é crucial compreender o papel destes agentes no processo de deterioração, identificando-os, para formular estratégias adequadas para a conservação e salvaguarda do património cultural. E por isso necessário desenvolver e/ou adaptar as metodologias e técnicas que permitam responder a estas necessidades.

O objetivo deste trabalho é desenvolver um protocolo inovador que permita reduzir os tempos necessários para detetar e analisar estirpe bacteriana e estirpe de leveduras aplicando a técnica de Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH). Para tal fim, foram testados vários métodos de hibridação, alguns deles baseados na aplicação de microondas, em células fixadas quimicamente, através da técnica FISH. Uma vez determinado o melhor método de hibridação para cada microrganismo, estes foram combinados junto com a fixação com microondas de modo a tentar reduzir os tempos até o máximo possível. Da análise, tanto quantitativa como qualitativa dos resultados obtidos, poderá vir desenvolver-se um protocolo rápido, económico com aplicação na análise dos bens patrimoniais.

Palavras-chave: Microondas; Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH); Estirpe de leveduras; Estirpe bacteriana; Património Cultural;

Abstract

Artworks and tangible Cultural Heritage are an important part of Cultural Heritage. They are continuously exposed to processes that favor their deterioration. There are multiple factors that contribute to it (pH, temperature, humidity, among others) and microorganisms (bacteria, yeasts, fungi, etc) are key-players. In this way, it is crucial to understand the role of these agents in the deterioration process, identifying them in order to formulate appropriate strategies for the conservation and safeguard of Cultural Heritage. Thus, it is necessary to develop and/or adapt methodologies and techniques to respond to these needs.

The objective of this work is to develop an innovative protocol that allows to reduce the time required to detect and analyze bacteria and yeasts by applying Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH) technique. With this aim, several hybridization methods have been tested, some of them based on the application of microwaves, with chemically fixed cells, using the FISH technique. Once determined the best hybridization method for each microorganism, they were combined with the fixation with microwaves in search of reducing the time up to the maximum possible. From the quantitative and qualitative analysis, the results obtained may allow to develop a rapid, economic protocol application in the analysis of tangible Cultural Heritage.

Keywords: Microwave; Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH); Yeast; Bacteria; Cultural Heritage.

Listas de abreviaturas

- Abreviaturas

PBS - Tampão Fosfato-Salino

FISH - Fluorescence *In Situ* Hybridization; Híbridação Fluorescente *In situ*

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

ARN -  cido Ribonucleico

rRNA –  cido Ribonucleico Ribossomal

ADN -  cido Desoxirribonucleico

E.coli - *Escherichia coli*

NB – Nutrient Broth

NA – Nutrient Agar

MEA – Malt Extract Agar

ME – Malt Extract

Enquadramento do projeto e objetivos

O património cultural tangível ou material, tem grande significado sociocultural porque constitui uma parte importante da herança cultural ou da humanidade inteira. Deste modo é, de extrema importância desenvolver estratégias adequadas para a sua conservação e salvaguarda.

Os microrganismos são fatores cruciais na deterioração, contudo, a sua ação só tem vindo a ser considerada há algumas décadas. Por isso, é vital identificar os microrganismos presentes nos bens patrimoniais, investigar a sua capacidade biodeteriorativa e determinar os efeitos que produzem. No entanto, a microbiologia aplicada ao Património é uma área relativamente nova, por isso, torna-se crucial desenvolver e/ou importar técnicas biotecnológicas que se adaptem às características e particularidades dos materiais a analisar e permitam caracterizar a contaminação de forma mais simples, rápida e acessível. De este modo, será mais fácil formular estratégias mais apropriadas na preservação e remediação do património.

Apesar do grande potencial da técnica de Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH), e os grandes logros sucedidos com a sua aplicação na análise microbiológica noutras áreas, como a clínica e ambiental, não tem sido apenas aplicada na área de biodegradação e biodeterioração do património. O grupo de Biotecnologia do laboratório HERCULES está a investir no desenvolvimento dum kit que, baseado nesta técnica, permita a análise rápida e fácil, *in situ* e/ou *ex situ*, das comunidades microbianas presentes nos bens patrimoniais. Até o momento, têm-se desenvolvido uma metodologia que permite, numas seis horas, analisar fungos ou estirpe bacteriana *ex situ* e os fungos filamentosos *in situ*, em argamassas. Atualmente se está a investigar o uso das microondas na técnica FISH de forma a reduzir os tempos e os reagentes necessários. Tem-se conseguido já resultados satisfatórios ao aplicar as microondas na fixação e permeabilização de estirpe de leveduras e estirpe bacteriana. Assim, o fim de este trabalho, foi primeiramente aferir as condições para aplicar as microondas na hibridação, para depois, desenvolver um protocolo FISH inovador, que mediante o uso das microondas na fixação e hibridação torne a técnica mais rápida, acessível e barata.

Objetivos:

- Otimizar a etapa de hibridação da técnica FISH, na análise de estirpe de leveduras e estirpe bacteriana: estudar a potencial aplicação das microondas ou a redução do tempo de incubação em banho maria para
- Desenvolver um protocolo inovador, baseado na otimização das etapas de fixação e hibridação, que permita a deteção dos microrganismos de interesse, tais como estirpe de leveduras e estirpe bacteriana.

Otimização da técnica FISH para a sua aplicação na deteção de microrganismos que colonizam os bens patrimoniais

Índice

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	V
LISTAS DE ABREVIATURAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE TABELAS	XV
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Microbiologia na Salvaguarda do Património Cultural	1
1.2 O relevante papel dos microrganismos na Biodeterioração	1
1.3 Detecção e análise das comunidades microbianas nos bens patrimoniais	3
1.3.1 Técnicas utilizadas habitualmente	3
1.3.1.1 Técnicas espectroscópicas	3
1.3.1.2 Técnicas Tradicionais.....	4
1.3.1.3 Técnicas Moleculares	4
1.3.2 Hibridação <i>In Situ</i> Fluorescente (FISH).....	5
1.3.2.1 Aplicação	5
1.3.2.2 Diferentes tipos de Técnicas FISH (Hibridação <i>In Situ</i> Fluorescente).....	6
1.3.2.3 Aplicação das microondas no protocolo FISH	9
2 METODOLOGIA	11
2.1 Estratégia.....	11
2.1.1 Local de realização	11
2.1.2 Duração do projeto.....	11
2.1.3 Modelo biológico	11
2.1.4 Técnicas e métodos utilizados	11
2.2 Organigrama	12
2.3 Procedimento experimental	12
2.3.1 Preparação e crescimento das estirpe bacteriana e estirpe de leveduras em meio líquido	13
2.3.2 Seguimento do crescimento microbiano por turbidimetria	13
2.3.3 Hibridação <i>In Situ</i> Fluorescente	13
2.3.3.1 Avaliação de vários métodos de hibridação com células fixadas quimicamente ...	13
2.3.3.2 Aplicação de um protocolo FISH, reduzindo os tempos das principais etapas: fixação com microondas	15
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
3.1 Seguimento do crescimento microbiano por turbidimetria	16
3.2 Hibridação <i>In Situ</i> Fluorescente (FISH)	16
3.2.1 Avaliação de vários métodos de hibridação, fixando as células quimicamente	17
3.2.1.1 Microscopia de epifluorescência.....	17
3.2.1.2 Fluorimetria.....	21
3.2.2 Aplicação de um protocolo FISH, reduzindo os tempos das principais etapas realizando a fixação com microondas.....	22
3.2.2.1 Microscopia de epifluorescência.....	22
3.2.2.2 Fluorimetria.....	24
4 CONCLUSÕES	27

Índice de figuras

Figura 1. Representação esquemática da técnica Hibridação <i>In Situ</i> Fluorescente (FISH).....	8
Figura 2. Representação gráfica das curvas de crescimento obtidas através de turbidimetria seguindo a variação da absorvância a 600 nm (a) dos Cocos Gram-negativos(a) e dos cocos Gram-positivos (b) em meio NB, $T = 30,0^{\circ}\text{C}$, 120 rpm.	16
Figura 3. Microfotografias de epifluorescência captadas para a mesma região da amostra (estirpe de levedura <i>Rhodotorula</i> utilizando o método de hibridação MW1), com o filtro FITC (para o 6-FAM), com intervalos de 15 s entre cada uma delas.	20

Índice de tabelas

Tabela 1. Mecanismos e tipos de deterioração associados aos diferentes microrganismos	2
Tabela 2. Causas que produzem falsos positivos e falsos negativos na utilização da técnica FISH na detecção de microrganismos.	7
Tabela 3. Protocolos de hibridação aplicados neste trabalho.	14
Tabela 4. Microfotografias de epifluorescência da estirpe de levedura <i>Rhodotorula</i> , após a aplicação da técnica FISH utilizando os diferentes protocolos de hibridação.	18
Tabela 5. Microfotografias de epifluorescência da bactéria cocos Gram-Negativos, após a aplicação da técnica FISH utilizando os diferentes protocolos de hibridação.	18
Tabela 6. Microfotografias de epifluorescência da estirpe de levedura <i>S. cerevisiae</i> , após a aplicação da técnica FISH utilizando os diferentes protocolos de hibridação.	19
Tabela 7. Microfotografias de epifluorescência da bactéria <i>E. coli</i> , após a aplicação da técnica FISH utilizando os diferentes protocolos de hibridação.	19
Tabela 8. Microfotografias de epifluorescência dos cocos Gram-Positivos, após a aplicação da técnica FISH utilizando os diferentes protocolos de hibridação.	20
Tabela 9. Intensidades de fluorescência (IF), obtidas a través de fluorimetria, para cada microrganismo usando diferentes métodos de hibridação.	21
Tabela 10. Microfotografias de epifluorescência das estirpe de leveduras <i>S. cerevisiae</i> e <i>Rhodotorula</i> , com o filtro TRITC (para o CY3), correspondentes a aplicação da fixação com microondas e do melhor método de hibridação.	23
Tabela 11. Microfotografias de epifluorescência das estirpe bacteriana <i>E.coli</i> , cocos Gram-negativos e cocos Gram-positivos com o filtro TRITC (para o CY3), a aplicação da fixação com microondas e do melhor método de hibridação.	23
Tabela 12. Intensidades de fluorescência (IF), obtida mediante análise fluorimétrico, para cada microrganismo usando a fixação celular com microondas.	24

1 Introdução

1.1 Microbiologia na Salvaguarda do Património Cultural

O Património Cultural material abrange bens de natureza diversa: monumentos (obras arquitetónicas, esculturas, pinturas e obras de carácter arqueológico), conjuntos (construções separadas ou unidas), lugares (obras do homem e da natureza). Estes bens de valor incalculável (sociocultural, económico, histórico, social, espiritual, religioso e estético entre outros) estão sujeitos continuamente a diversos processos que favorecem a sua deterioração. Tendo isso em vista, para projetar e desenvolver estratégias eficazes de conservação, restauro, preservação e controlo e salvaguarda é necessário realizar o diagnóstico mediante um estudo completo (ex: histórico, artístico, económico) que inclui analisar e caracterizar os diferentes fatores que contribuem á deterioração [1]. Os especialistas são confrontados com um substrato sobre o qual, muitas vezes, a degradação teve lugar durante muitos anos ou séculos, e o estado em que se encontra é o resultado dos efeitos dos diferentes fatores implicados no seu deterioro e da sua evolução durante a vida útil do objeto de arte [1].

Durante muitos anos pensou-se que a deterioração dos materiais estava relacionada apenas com fatores ambientais, tais como pH, altas temperatura e humidade relativa e foi completamente negligenciada a importante contribuição dos microrganismos (fungos, estirpe bacteriana, algas, líquens e cianoestirpe bacteriana) no restauro e preservação do património[1,2]. No entanto, a biodeterioração, deterioração devida às atividades vitais de organismos vivos, é um processo complexo fundamental no processo global de alteração de obras de arte que provoca alterações indesejáveis nas características físicas, químicas, mecânicas e estéticas num material [3,4].

1.2 O relevante papel dos microrganismos na biodeterioração

Devido à sua grande capacidade de adaptação às condições ambientais [5], os microrganismos são capazes de prosperar e sobreviver em todas as partes da biosfera. Por tanto, proliferam também nos materiais dos bens patrimoniais (madeira, algodão, fibras, corantes, cerâmica, pedra, metais, papel, etc) ao constituir uma fonte de nutrientes e energia e jogam um papel importante na sua deterioração, provocando alterações estéticas (descoloração de materiais e formação de biofilmes nas superfícies) ou estruturais (aparecimento de fendas e destacamento de fragmentos) dos monumentos [6,7]. O aparecimento destas alterações esta associado à sua proliferação, à utilização dos materiais como substratos para o metabolismo e à excreção de compostos resultantes do mesmo (ácidos orgânicos e inorgânicos).

Cada tipo de microrganismo é capaz de produzir diferentes tipos de alterações através de diferentes mecanismos conhecidos de deterioração (Tabela 1), causando danos nos monumentos e obras de arte que podem resultar na perda irreversível e irreparável da sua integridade física, aparência estética, valor e informação [7,8].

Tabela 1. Mecanismos e tipos de deterioração associados aos diferentes microrganismos

Microrganismo	Tipo de deterioração	Mecanismo de deterioração	Ref.
Cianoestirpe bacteriana	Estética e Química	Formação de biofilme; Alteração de cor; Formação de crostas;	[9]
Líquen	Química e Mecânica	Extração de nutrientes da superfície da pedra Formação de oxalato; Produção de ácidos carbónicos; Intrusões físicas em pequenos poros etc.	[9-11]
Algas	Estética e Química	Formação de biofilme; Alteração de cor; Formação de crostas pretas.	[12-14]
Bacterias Heterotróficas	Estética e Química	Formação de crostas; Esfoliação; Alteração de cor.	[15,16]
Fungos	Estética, Química, Física e Mecânica	Alteração de cor ; Formação de oxalato ; Intrusão física ou penetração de hifas fúngicas e desestabilização da textura de pedra;	[1,17]
Musgos	Estética e Química	Descoloração; Manchas verde - cinza; Extração de minerais da superfície da pedra.	[18,19]

As estirpe bacteriana, podem ser ativas em ambientes anóxicos (baixa concentração de oxigénio), que proporciona a produção de ácidos que podem contribuir à deterioração dos bens patrimoniais. [1]. As cianoestirpe bacteriana têm a habilidade de sobreviver em condições de secagem e reidratação, que ocorrem na exposição em superfícies de monumentos e para se protegerem das radiações UV produzem pigmentos protetores. As estirpe bacteriana heterotróficas crescem em ambientes hipógeos (alta humidade relativa, temperatura constante durante todo o ano e baixo fluxo de fotões) e são as principais responsáveis pelos danos irreversíveis em obras de arte interiores (Ex: pinturas de parede e estuques) e por sua vez, menos envolvidas na deterioração de monumentos que se encontrem ao ar livre. Os fungos são os que apresentam efeitos mais nocivos, associados à biodeterioração de materiais orgânicos e inorgânicos [20]. A sua presença nos monumentos históricos é relatada como estando associada, não só à deterioração estética dos monumentos,

mas também às mudanças de cor. 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 lascar a superfície dos monumentos [20].

No entanto, apesar dos microrganismos serem reconhecidos como agentes envolvidos na degradação dos bens patrimoniais, e a sua presença ser considerada indesejável, nos dias de hoje, também são reconhecidos como sendo uma alternativa viável aos tratamentos químicos tradicionais aplicados para a conservação e restauro, tais como solventes orgânicos ou outros métodos de conservação agressivos (tratamentos mecânicos). Os mesmos mecanismos envolvidos na biodegradação fazem dos microrganismos bioagentes para a recuperação e conservação de obras de arte e monumentos arquitetónicos históricos [5].

É por isso necessário identificar, caracterizar e conhecer o papel dos microrganismos no processo de alteração de obras de arte. Detetando e identificando o potencial biodeteriorogénico dos componentes das comunidades microbianas que colonizam as obras de arte é possível aplicar estratégias de mitigação, conservação ou preservação adequadas, mas também determinar o potencial dos microrganismos como bioagentes na recuperação das mesmas.

1.3 Deteção e análise das comunidades microbianas nos bens patrimoniais

De modo a aplicar o tratamento mais adequado para a conservação dos bens patrimoniais equipas multidisciplinares têm-se dedicado, ao longo das últimas décadas, à introdução de diversas metodologias para identificar e caracterizar as comunidades microbiológicas presentes nos bens patrimoniais [21] baseadas em técnicas de cultura, abordagens moleculares ou espectroscópicas.

1.3.1 Técnicas utilizadas habitualmente

1.3.1.1 Técnicas espectroscópicas

- As técnicas espectroscópicas, são técnicas alternativas na deteção de comunidades microbianas, entre elas podem-se destacar:
- Espectroscopia RAMAN: consiste num método bastante sensível que permite obter a identidade de microrganismos sem necessidade de uma preparação de uma amostra [22].
- Espectroscopia FTIR (Espectroscopia de infravermelhos com transformada de fourier): esta técnica tem alta reprodutibilidade, é fácil de aplicar, é rápida e bastante versátil e também não precisa de uma preparação e uma amostra. Permite a análise de sólidos, pastas, géis, líquidos e pós.

- MEV (Microscopia Eletrónica de Varrimento): esta técnica acoplada à espectroscopia de raio X dispersiva de energia, permite obter imagens ampliadas das amostras com alta resolução, que levam à deteção da proliferação de microrganismos na amostra [22]

Apesar destas técnicas serem uteis na deteção de microrganismos, não permitem distinguir se estes estão viáveis ou não. Algumas delas são técnicas destrutivas, no caso da espectroscopia RAMAN é devido ao aquecimento causado pela radiação do laser e no caso da microscopia FTIR às elevadas pressões que se aplicam na amostra [22]

1.3.1.2 Técnicas tradicionais

As técnicas tradicionais baseiam-se na cultura e isolamento dos microrganismos a partir das amostras. Contudo estes métodos são muito trabalhosos, demorados e fornecem apenas informação parcial. O cultivo e isolamento permite investigar apenas os microrganismos capazes de proliferar e formar colónias, viáveis e cultiváveis, nos meios de crescimento selecionados e nas condições laboratoriais. Esta é uma das principais desvantagens desta técnica, a possível perda de informação da componente microbiana. No entanto a principal vantagem destes métodos é que permitem a obtenção de células de microrganismos que podem posteriormente ser utilizadas noutros estudos como por exemplo na simulação para investigar os efeitos que produzem nos diferentes materiais do património [21,23-26].

As limitações das técnicas tradicionais foram ultrapassadas com a implementação das técnicas da biologia molecular na área da microbiologia aplicada ao património [27].

1.3.1.3 Técnicas moleculares

As técnicas moleculares permitem a identificação da totalidade dos microrganismos presentes na amostra sem necessidade de cultivo. Baseiam-se na análise dos ácidos nucleicos dado que estes contêm regiões altamente conservadas e outras específicas que permitem distinguir entre organismos em todos os níveis filogenéticos [28].

Através de uma abordagem baseada na análise do ADN, podem-se identificar a totalidade dos microrganismos presentes numa amostra. No entanto, numa abordagem baseada na análise do ARN, dado que os níveis de RNA em células são proporcionais à necessidade da célula para a síntese proteica necessária para o metabolismo e está presente só em células viáveis, pode-se analisar o conjunto dos microrganismos metabolicamente ativos na amostra [28].

O ponto de partida para uma abordagem molecular pode ser a extração dos ácidos nucleicos, de qualidade suficiente, e a subsequente amplificação dos mesmos utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) [27]. O ADN extraído é utilizado como um molde para amplificar os fragmentos de genes por PCR utilizando iniciadores específicos e sensíveis [29]. Posteriormente os segmentos amplificados de PCR são clonados, formando uma biblioteca de clones, contendo sequencias ribossómicas com inserções, que juntamente com a comparação entre as sequencias obtidas e as sequencias presentes nas bases de dados, permite identificar a posição filogenética dos microrganismos correspondentes sem o seu cultivo [27].

A extração dos ácidos nucleicos impossibilita qualquer informação sobre a relação entre os microrganismos e a própria superfície. No entanto, existem outras abordagens baseadas na marcação direta dos ácidos nucleicos nas próprias células, como são os métodos de Hibridação *In Situ* que permitem obter esta informação.

1.3.2 Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH)

A Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH) teve inicio á quase 30 anos e marcou o inicio de uma nova era para o estudo da estrutura e função cromossómica. A técnica FISH é muito simples; económica e rápida. Consiste na hibridação de um fragmento de DNA marcado com um fluorocromo (sonda fluorescente ou sonda FISH), á sua sequencia complementar presente no DNA ou RNA do microrganismo alvo permitindo identificar diretamente, sem necessidade de isolamento em cultura, microrganismos presentes numa amostra [30]. A análise pode ser feita por microscopia de fluorescência e fluorimetria, entre outras.

1.3.2.1 Aplicação

A técnica FISH é reconhecida como uma técnica de mapeamento físico para apoiar os esforços de mapeamento e sequenciamento em larga escala, relacionados com genoma humano. No entanto a sua precisão e adaptação foram simultaneamente exploradas em outras áreas de investigação, nomeadamente, biológica e médica, tendo aplicações na genética clinica, neurociências, medicina reprodutiva, toxicologia, ecologia microbiana, biologia evolutiva e biologia cromossómica [30].

Além disto, a aplicação da técnica FISH na microbiologia do Património Cultural tem vindo a revelar um robusto e poderoso potencial para avaliar a extensão e/ou profundidade das comunidades microbianas, identificar os seus componentes e a sua viabilidade. Facilita, deste modo, o conhecimento do papel dos microrganismos e na monitorização das suas ações nos bens patrimoniais [24,31].

Contudo, esta técnica tem vindo a ser aplicada timidamente na área da conservação e restauro para estudar os microrganismos envolvidos na biodeterioração do Património cultural e artístico [32]. São escassos os estudos realizados com a técnica FISH em relação a esta matéria. Assim, incentivar a investigação da técnica FISH aplicada ao Património Cultural é essencial para tornar viável e eficaz a sua aplicação.

1.3.2.2 Diferentes tipos de técnicas FISH (Hibridação *In Situ* Fluorescente)

Existem diversas variantes da técnica FISH, tais como a CLASI-FISH, RING-FISH, FISH-DVC, MICRO-FISH OU MW-FISH, MAR-FISH, CARD-FISH, RCA-FISH, brdU-FISH e spike-FISH, entre outros, que permitem ampliar as possibilidades analíticas da técnica variando a metodologia utilizada ou mediante a combinação com outras técnicas analíticas. Apresentam-se algumas das mais utilizadas:

- MAR-FISH: (MicroAutoRadiografia (MAR) FISH)

Consiste em combinar microautoradiografia radioisotópica com Hibridação *In Situ* Fluorescente, usando substratos orgânicos e inorgânicos radiomarcados com ^3H ou ^{14}C . Esta técnica para além de permitir examinar os componentes marcados em sistemas microbianos complexos, também permite identificar a atividade metabólica das baterias a um nível de uma única célula [33,34]. A grande desvantagem deste método é a falta de resolução taxonómica de sondas FISH e a incapacidade de usar muitas sondas simultaneamente [35].

- CARD-FISH: (Deposição de repórter catalisada FISH)

Envolve a peroxidase de rábano (HRP) e a amplificação do sinal de tiramida. Assim é possível melhorar de forma significativa a intensidade do sinal das células hibridadas e identificar as células com baixo teor de conteúdo ribossómico da amostra [36].

- RING-FISH:

Um método utilizado para a identificação de genes individuais em uma única célula bacteriana, utilizando altas concentrações de sondas de polinucleótidos, para o aumento da sensibilidade e visualização [30].

- FISH-BrdU: (5-Bromo 2-desoxi-uridina)

Neste método, os microrganismos são identificados utilizando 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU). Não há necessidade de usar paraformaldeído para fixação das células ou formamida para a desnaturação de ADN. O método é reconhecido para ser mais seguro do que as técnicas clássicas FISH [37].

- RAMAN-FISH (FISH combinado com RAMAN)

Este método amplia e complementa as tecnologias atuais, como microautoradiografia FISH e isótopo estável de sondagem, e pode ser aplicado para investigações de comunidades microbianas complexas em uma resolução de uma única célula [38].

1.3.2.2.1 ARN-FISH

Esta técnica permite a detecção de RNA dentro das células, e deste modo a detecção e identificação de microrganismos a níveis taxonômicos diferentes (desde o domínio até a espécie e subespécie), dependendo da especificidade da sonda usada. As sondas ARN-FISH são constituídas por um oligonucleótido, complementar de determinada região específica do ARN do microrganismo alvo de análise, ao qual se encontra ligado um ou mais marcadores fluorescentes [25]. Os fluorocromos mais utilizados englobam-se nos derivados das fluoresceínas (6-FAM e Oregon Green), cianinas (Cy3, Cy5 e Cy7), coumarinas e rodaminas (Texas Red e Rhodamine Green™). Durante a hibridação, as sondas penetram nas células e ligam-se à sua sequência alvo, tornando a célula fluorescente [39].

No entanto, existem causas que podem provocar falsos negativos e positivos, na utilização desta técnica, tal como descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Causas que produzem falsos positivos e falsos negativos na utilização da técnica FISH na detecção de microrganismos.

Falsos Positivos	Falsos negativos
<p>✓ A autofluorescência que os microrganismos poderão manifestar e que pode ser confundida com os sinais de hibridação ou a autofluorescência do material envolvente: células vegetais, glóbulos vermelhos [36,40].</p> <p>Nota: 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 ou que detenham mais energia e que permitam assim sinais de hibridação fortes e que sejam difíceis de confundir [36,40].</p>	<p>✓ Inacessibilidade das sondas às regiões-alvo [40].</p> <p>✓ Permeabilização insuficiente da parede celular [40].</p> <p>✓ Utilização de condições de hibridação não otimizadas, de sondas com uma sequência incorreta ou marcadores não eficazes [40].</p> <p>✓ Possibilidade das sondas, eventualmente, exibirem sinais de fluorescência muito fracos [40].</p> <p>✓ Baixo 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 [40].</p>

Apesar disso, a técnica FISH apresenta diversas vantagens, entre outras [41]:

- i) é altamente sensível e quantitativa;

- ii) permite a visualização de microrganismos não cultiváveis;
- iii) possibilita a detecção simultânea de vários microrganismos diferentes a través do uso de vários corantes fluorescentes.

1.3.2.2.1.1 Técnicas/Protocolos utilizadas/os habitualmente para os diferentes microrganismos.

A técnica FISH ocorre em essencialmente em quatro passos (Figura 1):

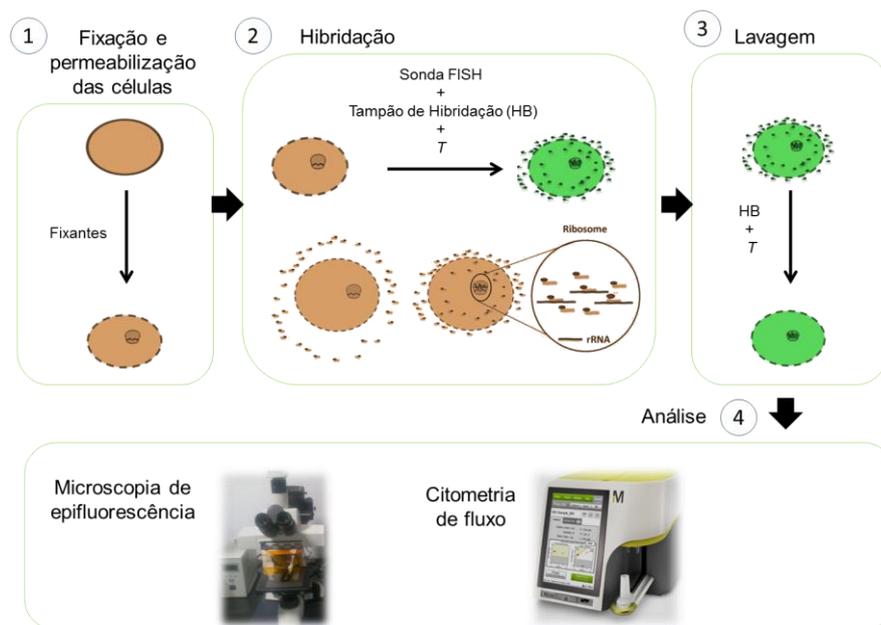


Figura 1. Representação esquemática da técnica Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH).

1. Fixação e permeabilização da amostra: Neste passo ocorre a permeabilização das células presentes na amostra, permitindo a penetração das sondas fluorescentes até ao lugar da célula onde encontra-se o ácido nucleico alvo. Também tem como fim proteger ao ARN da degradação e fixar o conteúdo das células. Uma fixação eficaz traduz-se numa boa penetração da sonda, de modo a reter o nível máximo de RNA alvo e manter a integridade da célula. As condições de fixação variam dependendo do organismo e do tipo de sonda usada [26,42] Contudo os fixantes mais usados são álcoois (etanol e metanol) ou aldeídos (paraformaldeído), tanto para estirpe bacteriana como também para estirpe de leveduras. O tempo de fixação pode variar entre os 3 min e as 16 h.
2. Hibridação: Depois da permeabilização das células é aplicado um tampão de hibridação e a sonda FISH complementar ao RNA. A sonda é adicionada em excesso, de forma a favorecer a cinética de ligação ao ácido nucleico alvo. A

hibridação pode ser executada em microtubos, ocorrendo a incubação numa camara húmida com temperatura, ou em laminas de microscópio apropriadas [26].

3. Lavagem: O objetivo desta etapa é retirar as sondas em excesso (que não hibridaram) bem como as sondas que hibridaram de forma não específica em zonas não complementares.
4. Análise: A deteção do sinal é conseguida pela excitação do fluorocromo associado á sonda mediante a incidência de um feixe de luz de comprimento de onda adequado. Deste modo, a análise pode ser feita através de microscopia de fluorescência ou fluorimetria [43].

(a) Microscopia de Fluorescência

A microscopia de fluorescência permite a visualização dos microrganismos alvo ao fazer incidir um feixe de luz UV [43].

(b) Fluorimetria

A fluorimetria consiste na técnica utilizada na determinação qualitativa de substância, nas quais ocorre o fenómeno da fluorescência [44].

A diversificação do protocolo original da técnica FISH, para o impressionante número de procedimentos disponíveis nos dias de hoje tem sido promovida ao longo dos anos por um número de fatores interligados, tais como a melhoria na sensibilidade, especificidade, e resolução da técnica, provocada por uma melhor compreensão das propriedades químicas e físicas de ácidos nucleicos e cromatina, juntamente com os avanços nas áreas de microscopia de fluorescência e imagem digital, e a crescente disponibilidade de recursos genómicos e de bioinformática [30].

1.3.2.3 Aplicação das microondas no protocolo FISH

Ao longo dos últimos anos tem vindo a ser introduzida a aplicação das microondas no protocolo FISH em diferentes áreas, particularmente, na investigação clínica e ambiental, obtendo-se excelentes resultados. Assim a rápida fixação das células com microondas, tem sido estabelecida como um passo importante entre as outras etapas do processamento. [45]. Na área da investigação clínica, a fixação com microondas, tem sido bem sucedida, por exemplo, na deteção de antigénios intracelulares, na fixação de células cultivadas em cultura de tecidos antes da coloração dos anticorpos fluorescentes e na preservação da morfologia celular [46].

Com a utilização deste método, para além de reduzir os tempos de fixação, obter baixos custos, elimina os efeitos causados pelos produtos químicos, tais como alterar as macromoléculas das células [46].

**Otimização da técnica FISH para a sua aplicação na deteção
de microrganismos que colonizam os bens patrimoniais**

Deste modo, neste trabalho tem-se investigado a aplicação de microondas na etapa de hibridação, ou a sua combinação com a fixação das células com microondas, para reduzir ainda os tempos dos protocolos FISH aplicados no Património Cultural e os reagentes envolvidos.

2 Metodologia

2.1 Estratégia

2.1.1 Local de realização

- Laboratório HERCULES- Herança Cultural Estudos e Salvaguarda, da Universidade de Évora.
- Laboratório de Biotecnologia do departamento de química no Colégio Luís António Verney da Universidade de Évora.

2.1.2 Duração do projeto

Aproximadamente 2 semestres (ano letivo 2015/2016).

2.1.3 Modelo biológico

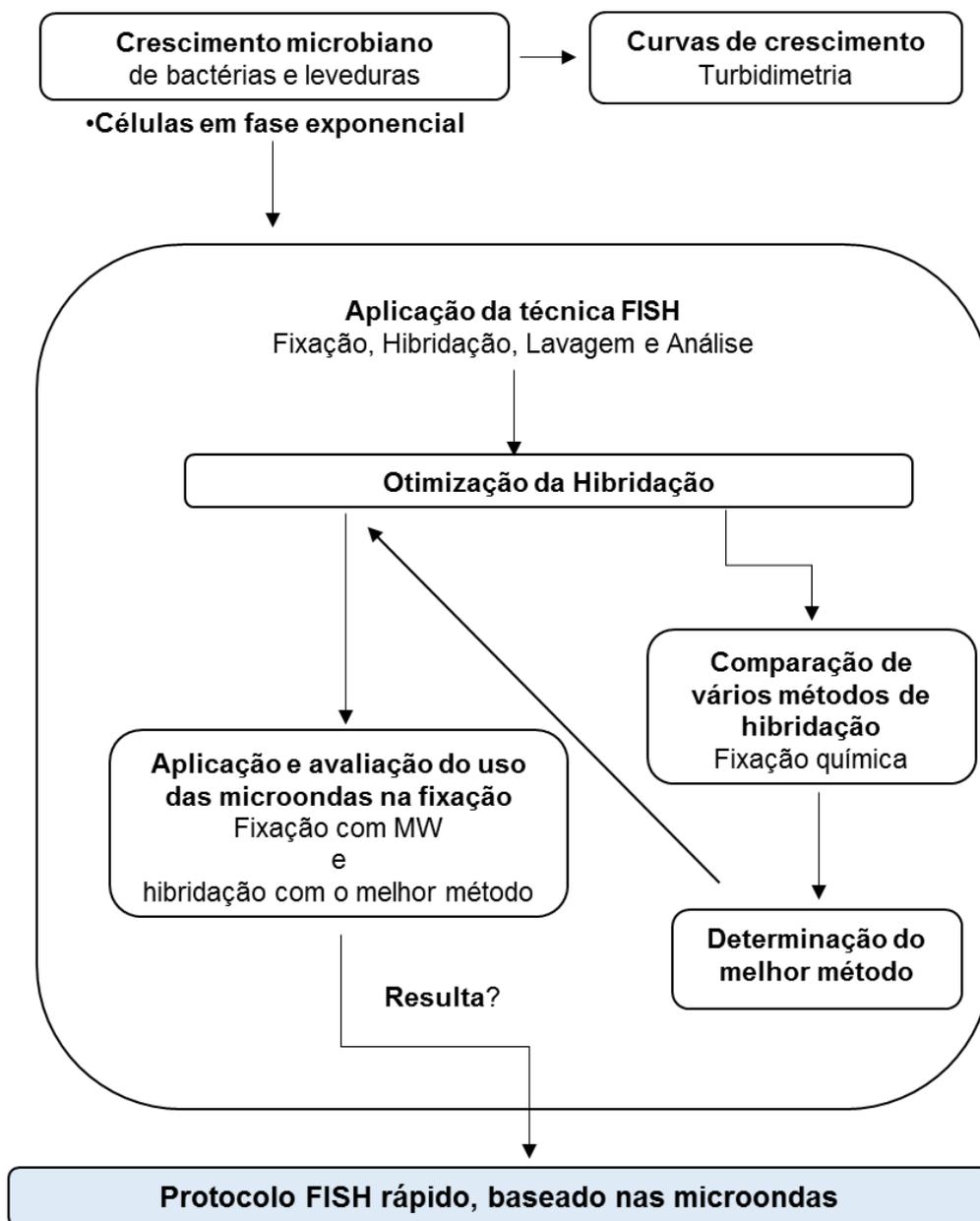
Foram utilizadas 4 estirpe bacteriana, duas Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e Cocos 1) uma Gram-positiva (Cocos 2) e duas estirpe de leveduras (*Rhodotorula sp.* e *Saccharomyces cerevisiae* CCMI396). *Saccharomyces cerevisiae* pertence à Coleção de Culturas de Microrganismos Industriais de Lisboa, a *Escherichia coli* à American Type Culture Collection de Manassas. Ambos os cocos e a *Rhodotorula sp* foram isolados de monumentos portugueses em estado avançado de degradação e pertencem à coleção HERCULES-Biotech Lab, Universidade de Évora. O DNA extraído dos cocos tem sido enviado para sequenciação, para poder realizar a sua identificação.

2.1.4 Técnicas e métodos utilizados

- Preparação e crescimento de microrganismos em meio líquido;
- Seguimento do crescimento microbiano através de turbidimetria;
- Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH);
- Contagem de células em câmara de Neubauer;
- Microscopia de epifluorescência;
- Fluorimetria.

Nota: Todos os ensaios foram realizados na câmara de fluxo laminar quando necessário e foram sempre tomadas as medidas de assepsia fundamentais para todos os experimentos.

2.2 Organigrama



2.3 Procedimento experimental

Todos os reagentes estão referenciados nos anexos I e os instrumentos e equipamentos no anexo II e II. Os ensaios, foram sempre realizados por triplicado. Quando não é especificado, as centrifugações referidas foram sempre realizadas nas seguintes condições: 13000 rpm durante 15 min para as estirpe bacteriana e 4500 rpm durante 5 min para as estirpe de leveduras, a temperatura é mantida a 4°C.

2.3.1 Preparação e crescimento das estirpe bacteriana e estirpe de leveduras em meio líquido

As células foram colhidas a partir da superfície de rampas da coleção HERCULES-Biotech Lab (de Malt Extract Agar (MEA), para as estirpe de leveduras, e de Nutrient Agar (NA), para as estirpe bacteriana) adicionando 2,0 mL de soro estéril para suspender as células. Cada suspensão microbiana foi colocada num erlenmeyer contendo 100,0 mL de meio líquido estéril (Nutrient Broth (NB) para estirpe bacteriana e Malt Extract (ME) para estirpe de leveduras). A cultura cresceu com agitação orbital constante de 120 rpm a 30,0°C.

2.3.2 Seguimento do crescimento microbiano por turbidimetria

O crescimento microbiano foi seguido por turbidimetria para os (Cocos Gram-negativos e Gram-positivos). Em diferentes intervalos de tempo foram retiradas três alíquotas (200,0 µL) da cultura em crescimento de cada bactéria para uma placa de poliestireno de 96 poços. Fez-se a leitura no espectrofotômetro de microplacas a um comprimento de onda de 600 nm. De modo a fazer o seguimento da absorvância associada exclusivamente ao crescimento celular, a absorvância do meio de cultura foi subtraída da absorvância medida.

Através das curvas de crescimento resultantes foi possível determinar os intervalos de tempo em que as células se encontravam na fase exponencial.

2.3.3 Hibridação *In Situ* Fluorescente

2.3.3.1 Avaliação de vários métodos de hibridação com células fixadas quimicamente

Foram preparadas as culturas em meio líquido como descrito na seção (2.3.1) e recolhidas as células na fase exponencial, após 5 h de iniciada a incubação. Para tal fim, foram adicionados a vários falcons de 25,0 mL de cultura. Uma vez centrifugados, descartou-se o sobrenadante e as células foram lavadas com 10,0 mL de solução tampão salina, PBS (Anexo I), e foram novamente centrifugados.

- Fixação celular: Depois de descartar o sobrenadante as células foram fixadas durante 1 h a 25,0°C com 10,0 mL de etanol, voltou-se a centrifugar e descartaram-se 5,0 mL sobrenadante. Às células fixadas adicionou-se PBS (5,0 mL) para as preservar a -20,0 °C em EtOH:PBS 50:50 (v/v).
- Hibridação: foram testados vários métodos de hibridação. Para tal fim, após descongelar, um volume da suspensão celular contendo 5×10^7 células fixadas de estirpe bacteriana e 5×10^5 células fixadas de estirpe de leveduras, foi

Otimização da técnica FISH para a sua aplicação na detecção de microrganismos que colonizam os bens patrimoniais

adicionado para cada ensaio em microtubos de 1,5 mL. O volume da suspensão celular foi calculado determinando a concentração celular da suspensão celular a través da contagem usando a camara de Neubauer.

Os microtubos foram centrifugados e o sobrenadante foi descartado. Para realizar a hibridação adicionou-se 20,0 µL de tampão de hibridação (HB) e 0,5 µL da sonda correspondente. (120 ng /µL). Neste trabalho adicionou-se a sonda complementar EUK516, para as estirpe de leveduras e a sonda EUB338 para as estirpe bacteriana, com diferentes corantes: Cy3 e 6-FAM uma vez que se ligam ás sequencias de RNA correspondentes a cada microrganismo. No entanto, para testar se as condições de hibridação eram ótimas, os ensaios foram realizados com sondas complementares e não complementares para cada um dos microrganismos.

Posteriormente foram aplicados quatro métodos diferentes para otimizar a etapa de hibridação, tal como descritos na Tabela 3, sendo dois deles baseados no uso das microondas (MW).

Tabela 3. Protocolos de hibridação aplicados neste trabalho.

Método de Hibridação	Procedimento
MW1	➤ Aplicaram-se as MW durante 15 s e posteriormente incubaram-se em banho maria durante 15 min (este procedimento repetiu-se duas vezes).
MW2	➤ Aplicaram-se as MW durante 30 s e posteriormente incubaram-se em banho maria durante 30 min.
TN1	➤ Incubaram-se em banho maria durante 30 min.
TN2	➤ Incubaram-se em banho maria durante 2h.

Nota: A potencia das microondas aplicada neste trabalho foi média alta (200 Watts) e a temperatura do banho maria foi mantida a 46,0°C.

- **Lavagem:** A lavagem das células foi realizada com 25,0 µL de tampão de hibridação, HB, independentemente do tratamento realizado. Nos protocolos MW1, MW2 e TN1, as células foram tratadas com microondas (10 s a potência 200 Watts) e incubadas posteriormente no banho maria a 46°C durante 7,5 min. No protocolo TN2 a lavagem foi diferente, os microtubos foram exclusivamente mantidos durante 30 min no banho maria a 46°C. Para finalizar, os microtubos foram centrifugados, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 200,0 µL de PBS para a análise.
- **Deteção e análise:** As amostras foram analisadas através de: i) microscopia de epifluorescência; ii) fluorimetria com real time PCR.

2.3.3.2 Aplicação de um protocolo FISH, reduzindo os tempos das principais etapas: fixação com microondas

Para desenvolver um protocolo FISH rápido, avaliou-se a possibilidade de combinar, para cada microrganismo, o uso das microondas na fixação e do melhor método de hibridação resultante de aqueles testados previamente. Deste modo fez-se:

- o crescimento dos microrganismos, a lavagem e a análise das amostras foram realizadas tal como descrito na seção (2.3.1).

- a fixação com microondas, como testado previamente com sucesso no nosso grupo de investigação (resultados não publicados), foi realizada aplicando um procedimento único para todos os microrganismos (30 s em potencia média, 130 Watts).

- a hibridação, utilizando o protocolo que revelou ser o mais adequado para cada microrganismo, daqueles testados anteriormente (seção 2.3.3.1).

3 Resultados e discussão

3.1 Seguimento do crescimento microbiano por turbidimetria

Foi realizado o seguimento do crescimento microbiano por turbidimetria dos cocos Gram-positivos e Gram-negativos (dado que se desconhecia o perfil de crescimento destes microrganismos), com o fim de determinar os tempos de recolha das células para realizar a sua análise na fase exponencial. Na Figura 2, podem-se observar as curvas de crescimento tanto dos cocos Gram-positivos (Figura 2 (a)) como Gram-negativos (Figura 2 (b)). De acordo com os resultados obtidos seleccionaram-se os tempos de recolha de alíquotas das culturas dos cocos para realizar os diferentes ensaios na fase exponencial. Os tempos seleccionados foram 22 e 5 h para os cocos Gram-positivos e Gram-negativos, respetivamente.

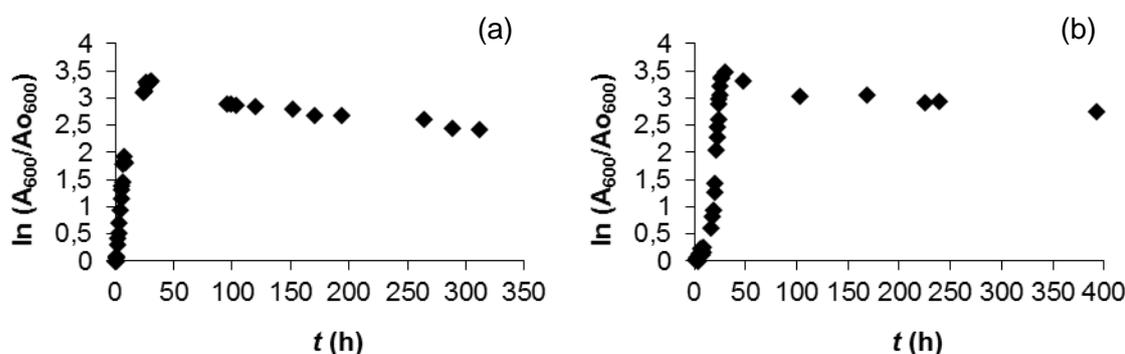


Figura 2. Representação gráfica das curvas de crescimento obtidas através de turbidimetria seguindo a variação da absorvância a 600 nm (a) dos cocos *Gram-negativos*(a) e dos cocos *Gram-positivos* (b) em meio NB, $T = 30,0^{\circ}\text{C}$, 120 rpm.

Através das curvas de crescimento obtidas em trabalhos anteriores do grupo de investigação, os tempos seleccionados foram 3 h para a *Rhodotorula sp.* e *Sacharomyces cerevisiae*, em meio ME (Anexo II) e para a *E.coli* em meio NB (Anexo II), respectivamente, utilizando as mesmas condições que nas apresentadas neste trabalho.

3.2 Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH)

Uma das etapas mais importantes da técnica FISH é a hibridação. Sempre que a hibridação se realiza nas condições ótimas, sondas complementares às sequências presentes no rRNA. do microrganismo alvo, hibridam e tornam às células fluorescentes. Isto não é suposto acontecer com sondas não complementares. Por isso, para identificar os microrganismos de forma inequívoca, é fundamental realizar a hibridação nas condições apropriadas.

Até agora, na nossa equipa de investigação, tem-se aplicado a técnica FISH, utilizando métodos baseados no uso do etanol e incubação em banho maria para a fixação e hibridação, respetivamente. Entretanto, nos últimos anos, tem vindo a testar-se o método de fixação baseado no uso de microondas obtendo excelentes resultados.

Neste trabalho testaram-se diferentes protocolos de hibridação baseados na redução do tempo de hibridação com o uso das microondas (MW1 e MW2), ou mediante a redução do tempo de incubação em banho maria (TN1). O fim foi desenvolver um protocolo inovador que permita, obtendo resultados iguais ou semelhantes, aos conseguidos anteriormente (TN2), reduzir o tempo preciso para a etapa de hibridação (de 2 h necessária na aplicação do protocolo anterior TN2, á 45 min nos protocolos aqui apresentados). Para determinar qual é o melhor método dentro dos testados, após a aplicação da técnica FISH, as células foram analisadas, em termos de detetabilidade (usando a microscopia de epifluorescência), como em termos de intensidade de fluorescência, através de fluorimetria.

3.2.1 Avaliação de vários métodos de hibridação, fixando as células quimicamente

Os vários métodos de hibridação, descritos na seção (2.3.3.1), foram avaliados de forma quantitativa e qualitativa de modo a seleccionar o melhor método de hibridação que permite detetar de forma inequívoca os microrganismos.

Assim, assumiu-se que o método ideal deveria apresentar uma forte fluorescência com as sondas complementares (contendo os primers EUK516 para estirpe de leveduras e EUB338 para estirpe bacteriana ligados a Cy3 ou 6-FAM), relativamente à sonda não complementar e ao branco. Apesar de serem mostrados os resultados para o método TN2, este nunca foi considerado como alternativa, dado que é o método de referencia.

3.2.1.1 Microscopia de epifluorescência

Para avaliar os diferentes métodos, para cada um dos microrganismos, captaram-se as microfotografias correspondentes. Através do estudo comparativo das mesmas foi possível determinar o método que apresenta os melhores resultados, tendo em conta as condições descritas na seção (3.2.1).

Deste modo, assumiu-se que para a *Rhodotorula* (Tabela 4) qualquer um dos métodos poderia ser implementado com bons resultados mesmo que o MW2, seria aquele escolhido por produzir sinais, mais intensos do que os outros com a sonda EUK516-6-FAM. Para os cocos Gram-negativos (Tabela 5) o melhor método é o MW2.

Otimização da técnica FISH para a sua aplicação na detecção de microrganismos que colonizam os bens patrimoniais

Para a *Saccharomyces cerevisiae* e *E. coli* selecionou-se o método TN1 (Tabela 6 e Tabela 7, respectivamente) e para os cocos Gram-positivos o MW1 (Tabela 8)

Tabela 4. Microfotografias de epifluorescência da estirpe de levedura *Rhodotorula*, após a aplicação da técnica FISH utilizando os diferentes protocolos de hibridação.

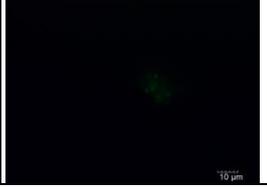
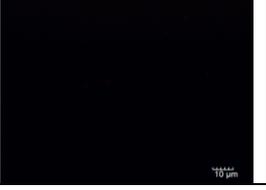
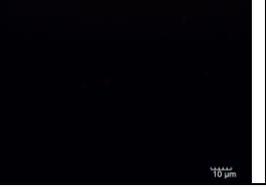
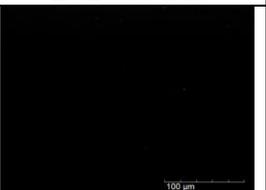
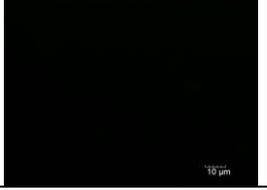
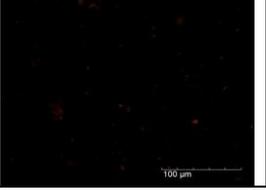
	Sondas			
	EUK516-6-FAM	EUK516-CY3	EUB338-CY3	-
MW1				
MW2				
TN1				

Tabela 5. Microfotografias de epifluorescência da bactéria cocos Gram-Negativos, após a aplicação da técnica FISH utilizando os diferentes protocolos de hibridação.

	Sondas			
	EUK516-CY3	EUB338-6FAM	EUB338-CY3	-
MW1				
MW2				
TN1				
TN2	N.A			N.A

N.A – Não Analisado

Tabela 6. Microfotografias de epifluorescência da estirpe de levedura *S. cerevisiae*, após a aplicação da técnica FISH utilizando os diferentes protocolos de hibridação.

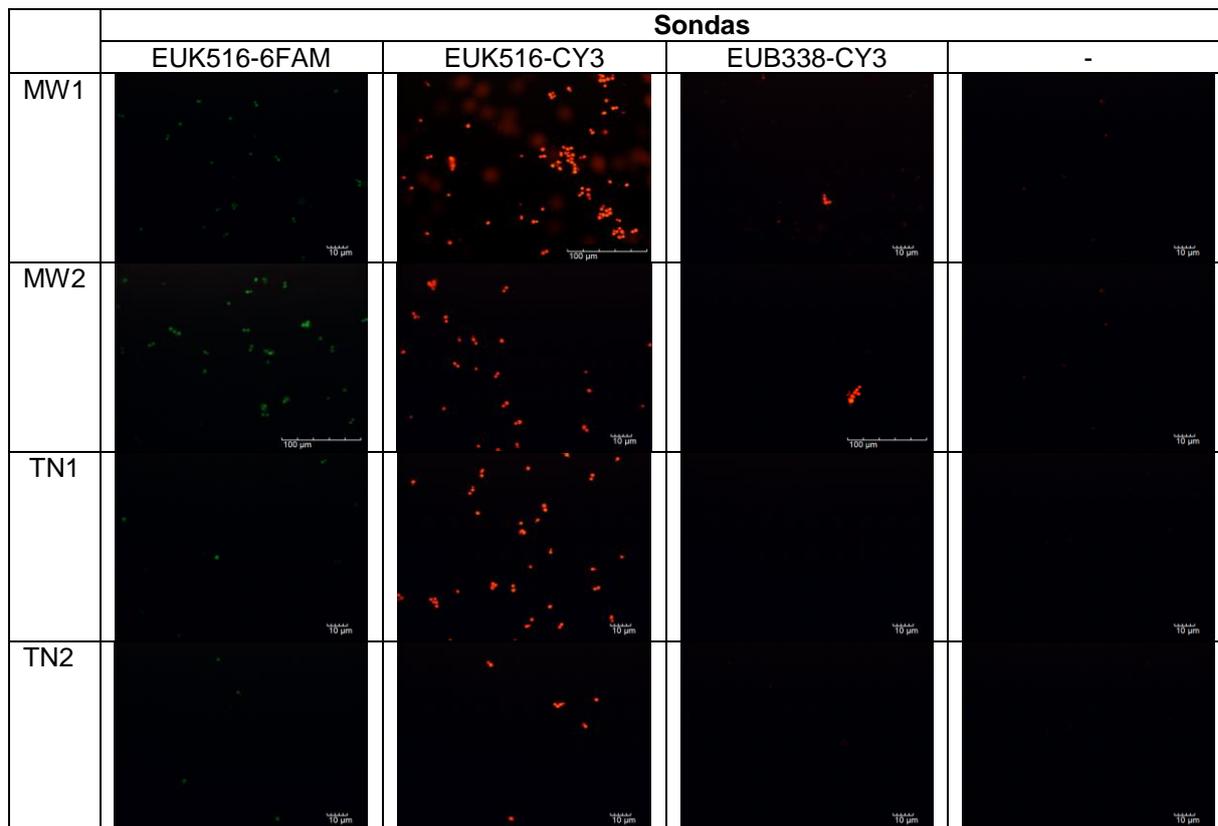
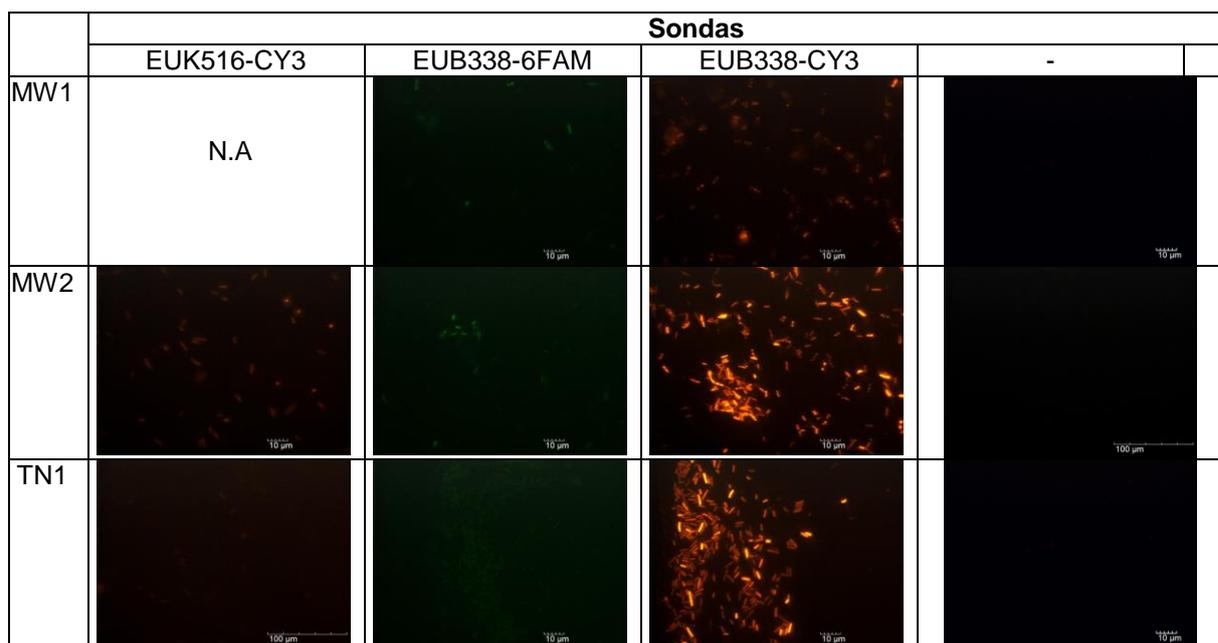


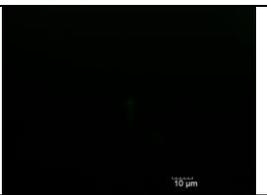
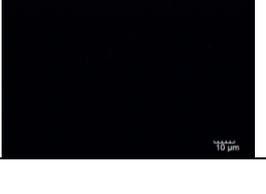
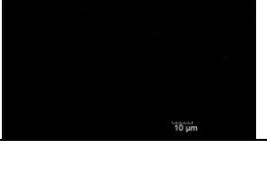
Tabela 7. Microfotografias de epifluorescência da bactéria *E. coli*, após a aplicação da técnica FISH utilizando os diferentes protocolos de hibridação.



N.A – Não Analisado

Otimização da técnica FISH para a sua aplicação na detecção de microrganismos que colonizam os bens patrimoniais

Tabela 8. Microfotografias de epifluorescência dos cocos Gram-Positivos, após a aplicação da técnica FISH utilizando os diferentes protocolos de hibridação.

	Sondas			
	EUK516-CY3	EUB338-6FAM	EUB338-CY3	-
MW1				
MW2				
TN1				
TN2	N.A			N.A

N.A- Não Analisado

Observou-se (Tabelas 5-9) que em muitos dos casos quando aplicados os métodos de hibridação não ideais, utilizando as sondas não complementares as células apresentam fluorescência ou autofluorescência. Esta autofluorescência das células pode estar influenciada pelos métodos de hibridação aplicados.

Verificou-se ainda que, para todos os microrganismos, quando utilizada a sonda com o primer específico e ligado ao 6-FAM, a intensidade de fluorescência do corante decai rapidamente. A modo de exemplo mostram-se as microfotografias obtidas ao longo de 30 s para a *Rhodotorula* (Figura 3).

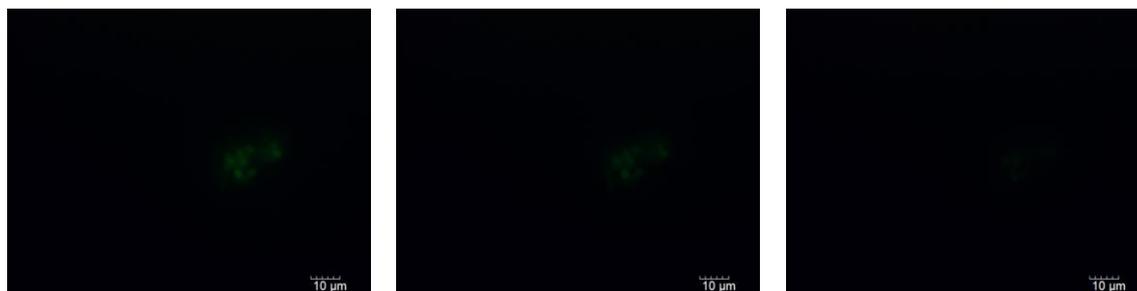


Figura 3. Microfotografias de epifluorescência captadas para a mesma região da amostra (estirpe de levedura *Rhodotorula* utilizando o método de hibridação MW1), com o filtro FITC

(para o 6-FAM), com intervalos de 15 s entre cada uma delas.

3.2.1.2 Fluorimetria

Recorreu-se ainda à fluorimetria, de modo a comparar estes resultados, a partir das Intensidades de Fluorescência (IF), com os resultados obtidos mediante microscopia de epifluorescência (3.2.1.1).

A partir das amostras obtidas após a aplicação da técnica FISH, foi determinada a IF ($IF = IF_{\text{medida}} - IF_{\text{branco}}$) correspondente (Tabela 9).

Tabela 9. Intensidades de fluorescência (IF), obtidas a través de fluorimetria, para cada microrganismo usando diferentes métodos de hibridação.

Microrganismo	Método de hibridação	IF (u.a.)								
		Sonda								
		EUB338-CY3			EUK516-CY3			PRIMER-6-FAM		
<i>Rhodotorula</i> sp.	MW1	302	±	8	503	±	211	480	±	1
	MW2			0	462	±	42	358	±	1
	TN1	46	±	19	641	±	111	268	±	2
	TN2	261		22			N.A.			N.A.
<i>S. Cerevisiae</i>	MW1			0	567	±	4	277	±	71
	MW2			0	1009	±	88	708	±	71
	TN1	69	±	66	349	±	2	343	±	31
	TN2	165	±	16	354	±	36			N.A.
<i>E. coli</i>	MW1	113	±	34			0	122	±	9
	MW2	331	±	75	7	±	0	119	±	16
	TN1	303	±	21			0	144	±	22
	TN2	121	±	41			0	251	±	9
Cocos Gram-positivos	MW1	246	±	51	89	±	32	101	±	31
	MW2	57	±	50			0	422	±	14
	TN1	128	±	11			0	21	±	7
	TN2	388	±	94			0	50	±	18
Cocos Gram-negativos	MW1			0			0	40	±	13
	MW2	217	±	106			0	28	±	5
	TN1	28	±	9			0	33	±	2
	TN2	240	±	42			N.A.	30	±	1

*PRIMER= EUK516 para as estirpe de leveduras e PRIMER=EUB338 para as estirpe bacteriana

N.A – Não Analisado

Assim, tendo em conta os critérios previamente referidos para realizar a seleção do melhor método, verificou-se que os melhores métodos escolhidos através da microscopia de epifluorescência correspondem maioritariamente com aqueles que apresentam uma maior IF através de fluorimetria, focando a atenção sempre em reduzir os tempos, e, deste modo não considerando o método TN2 como alternativa.

Para a *E. coli* observaram-se discrepâncias, o método que produz células com uma maior intensidade de fluorescência (MW2), ao realizar a análise através de fluorimetria, mediante microscopia revela fluorescência das células quando usada a sonda não específica e também quando não foi acrescentada sonda. Deste modo, optou-se por escolher o segundo melhor método, quando ordenados em termos de maior a menor IF obtido por fluorimetria (TN1), que cumpre os requisitos estabelecidos para ser o melhor método quando analisadas as células através de microscopia.

Para a *Rhodotorula*, dado que o método que produz as IF maiores com as sondas específicas EUK516-Cy3 e EUK516-6-FAM apresenta também elevadas IF quando usada a sonda não específica. E considerando que o MW2 é aquele que produz maiores intensidades de fluorescência com as sondas específicas, independentemente do fluorocromo utilizado. Deste modo ao concordar com as conclusões extraídas da análise mediante microscopia de epifluorescência, este método foi escolhido como o melhor para a hibridação da *Rhodotorula*.

3.2.2 Aplicação de um protocolo FISH, reduzindo os tempos das principais etapas realizando a fixação com microondas

Avaliou-se a possibilidade de desenvolver um protocolo FISH rápido que permitisse reduzir substancialmente os tempos necessários para detetar os microrganismos de interesse de forma inequívoca, utilizando microondas na fixação e o melhor método selecionado anteriormente na seção (3.2.1) na hibridação. Para tal fim os resultados foram avaliados de forma quantitativa e qualitativa.

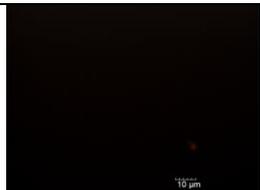
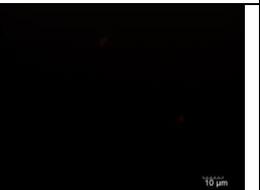
3.2.2.1 Microscopia de epifluorescência

Para avaliar, se os protocolos FISH resultantes, podem ser utilizados para detetar cada um dos microrganismos, captaram-se as microfotografias correspondentes aos ensaios realizados utilizando a sonda complementar e não complementar corada com Cy3 e sem adicionar sonda.

Para as estirpe de leveduras *Rhodotorula sp.* e *Saccharomyces cerevisiae*, com a aplicação de microondas para a fixação e os métodos MW2 e MW3, respetivamente, para a hibridação, observou-se uma forte fluorescência ao utilizar a sonda complementar (EUK516-Cy3), comparativamente aquando usada à sonda não complementar (EUB338-Cy3) ou aquando não foi acrescentada sonda. Isto permite, afirmar que ambos protocolos FISH poderiam vir a ser utilizados na detecção destes microrganismos. No entanto, é necessário considerar, para evitar falsos positivos que: i) para a *Rhodotorula* em ambas as amostras em que não foi adicionada a sonda

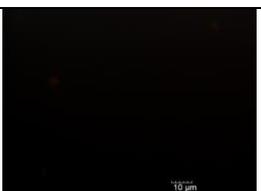
complementar, verificou-se uma fraca fluorescência, podendo tratar-se de uma autofluorescência das próprias células dos microrganismos; e para ii) *S.cerevisiae*, com a sonda não específica se observam células fluorescentes, mesmo que a fluorescência é muito fraca e perfeitamente distinguível da correspondente á hibridação com a sonda complementar.

Tabela 10. Microfotografias de epifluorescência das estirpe de leveduras *S. cerevisiae* e *Rhodotorula*, com o filtro TRITC (para o CY3), correspondentes a aplicação da fixação com microondas e do melhor método de hibridação.

Microrganismo Método de hibridação	Sonda		
	EUK516-CY3	EUB338-CY3	-
<i>Rhodotorula</i> MW2			
<i>S. cerevisiae</i> TN1			

Na Tabela 11 encontram-se os resultados correspondentes ás estirpes bacterianas.

Tabela 11. Microfotografias de epifluorescência das estirpe bacteriana *E.coli*, cocos Gram-negativos e cocos Gram-positivos com o filtro TRITC (para o CY3), a aplicação da fixação com microondas e do melhor método de hibridação.

Microrganismo Método de hibridação	Sonda	
	EUB338-CY3	-
Cocos Gram-positivos MW1		
<i>E. coli</i> TN1		
Cocos Gram-negativos MW2		

É possível observar que para os cocos Gram-positivos e os cocos Gram-negativos, a fluorescência é idêntica, e praticamente não detetável, para as amostras tratadas com a sonda complementar (EUB338-Cy3) e para os correspondentes brancos. Deste modo, estes os protocolos utilizados para obter estes resultados, não seriam alternativas elegíveis para detetar estes microrganismos. Contudo, o protocolo desenvolvido para a *E.coli*, ao combinar a fixação com microondas com a aplicação do método de hibridação MW3, é um protocolo com potencial aplicação para reduzir os tempos necessários para a detecção mediante a técnica FISH (a amostra tratada com sonda complementar apresenta um forte fluorescência (EUB338-Cy3) que é inexistente no branco).

Todos os resultados e conclusões apresentadas tem de ser confirmados a través da análise mediante fluorimetria.

3.2.2.2 Fluorimetria

Recorreu-se ainda à fluorimetria, de modo a verificar os resultados obtidos mediante microscopia de epifluorescência,

Na Tabela 12 apresentam-se seguinte as IF ($IF_{medida} - IF_{branco}$) calculadas para cada amostra

Tabela 12. Intensidades de fluorescência (IF), obtida mediante análise fluorimetrico, para cada microrganismo usando a fixação celular com microondas.

Microrganismo	Método fixação Método hibridação	IF (u.a.)			
		Sonda			
		EUB338-CY3		EUK516-CY3	
<i>Rhodotorula sp.</i>	MW2	22	± 2	109	± 9
<i>S. cerevisiae</i>	TN1	0		19	± 1
<i>E. coli</i>	TN1	636	± 32	375	± 29
<i>Cocos</i> Gram-positivos	MW1	145	± 6	129	± 1
<i>Cocos</i> Gram-negativos	MW2	26	± 4	16	± 2

Como podemos verificar na Tabela 12 a Intensidade de Fluorescência (IF) para todos os microrganismos apresenta valores mais elevados quando as amostras são tratadas com a sonda complementar aquando o são com a não complementar. No entanto, para a estirpe de levedura *S. cerevisiae* e as estirpe bacteriana cocos Gram-positivos e negativos, apresentam valores pouco diferenciados. Deste modo podemos assumir assim que os protocolos utilizados combinando o uso de microondas para a

fixação e os melhores protocolos de hibridação, não seriam apropriados para detetar a presencias destes microrganismos de forma inequívoca.

Contudo também se verificou que para os microrganismos, *Rhodotorula* sp. e *E.coli*, a combinação da fixação com microondas com os métodos MW2 e TN1 para a hibridação, respetivamente, permitem obter diferenças elevadas entre as amostras contendo a sonda complementar e a não complementar. Estes resultados concordam com as conclusões extraídas da análise mediante microscopia de epifluorescência. Deste modo, é possível afirmar que tem-se desenvolvido dos protocolos que permitem aplicar a técnica FISH reduzindo os tempos necessários substancialmente para detetar *Rhodotorula* e *E.coli* nos bens patrimoniais.

4 Conclusões

Neste trabalho conseguiu-se desenvolver um protocolo para reduzir os tempos necessários para aplicar a técnica FISH na deteção dos microrganismos em estudo, estirpe de leveduras e estirpe bacteriana:

- Ao investigar a possibilidade de otimizar a etapa de hibridação da técnica FISH, na análise de estirpe de leveduras e estirpe bacteriana fixadas quimicamente, conseguiu-se desenvolver um protocolo que permitiu, para a deteção de todos os microrganismos estudados utilizando sondas universais, reduzir o tempo requerido para a hibridação de 2 h, com o protocolo habitual, a 30 minutos.
- Foi possível desenvolver também um protocolo que permitiu não só otimizar a etapa de hibridação se não também de etapa de fixação, aplicando as microondas para tal fim. Deste modo conseguiu reduzir-se o protocolo em mais 55 minutos para a estirpe de levedura *Rhodotorula* e a bactéria *E.coli*.

5 Perspetivas Futuras

As perspetivas futuras visam:

- Testar os protocolos desenvolvidos neste trabalho que permitem reduzir ao máximo os tempos necessários para a aplicação da técnica FISH na deteção de estirpe de leveduras e estirpe bacteriana (combinação da fixação com microondas e os métodos MW2 e TN1, para estirpe de leveduras e estirpe bacteriana, respetivamente), de modo a desenvolver um protocolo único que possibilite a deteção de estirpe de leveduras ou bacterias. Para tal, será necessário incrementar o numero de microrganismos testados.
- Desenvolver um protocolo FISH único que permita a deteção simultânea de estirpe de leveduras e estirpe bacteriana, reduzindo os tempos, relativamente aos existentes atualmente.

Referencias bibliográficasUncategorized References

- [1] Biswas, J., Sharma, K., Harris, K. K., and Rajput, Y. (2013) Biodeterioration agents: Bacterial and fungal diversity dwelling in or on the pre-historic rock-paints of Kabra-pahad, India. *Iranian Journal of Microbiology* **5**, 309-314
- [2] Sterflinger, K., and Piñar, G. (2013) Microbial deterioration of cultural heritage and works of art-tilting at windmills? *Applied microbiology and biotechnology* **97**, 9637-9646
- [3] Dakal, T. C., and Cameotra, S. S. (2012) Microbially induced deterioration of architectural heritages: routes and mechanisms involved. *Environmental Sciences Europe* **24**, 1-13
- [4] Ortega-Calvo, J. J., Hernandez-Marine, M., and Saiz-Jimenez, C. (1991) Biodeterioration of building materials by cyanobacteria and algae. *International Biodeterioration* **28**, 165-185
- [5] Bosch-Roig, P., and Ranalli, G. (2014) The safety of biocleaning technologies for cultural heritage. *Frontiers in Microbiology* **5**, 155
- [6] Saiz-Jimenez, C., and Laiz, L. (2000) Occurrence of halotolerant/halophilic bacterial communities in deteriorated monuments. *International Biodeterioration & Biodegradation* **46**, 319-326
- [7] Scheerer, S., Ortega-Morales, O., and Gaylarde, C. (2009) Microbial deterioration of stone monuments--an updated overview. *Advances in applied microbiology* **66**, 97-139
- [8] Grossi, C. M., Brimblecombe, P., Esbert, R. M., and Alonso, F. J. (2007) Color changes in architectural limestones from pollution and cleaning. *Color Research & Application* **32**, 320-331
- [9] Cuzman, O. A., Ventura, S., Sili, C., Mascalchi, C., Turchetti, T., D'Acqui, L. P., and Tiano, P. (2010) Biodiversity of phototrophic biofilms dwelling on monumental fountains. *Microbial ecology* **60**, 81-95
- [10] Adamo, P., and Violante, P. (2000) Weathering of rocks and neogenesis of minerals associated with lichen activity. *Applied Clay Science* **16**, 229-256
- [11] Seneviratne, G., and Indrasena, I. K. (2006) Nitrogen fixation in lichens is important for improved rock weathering. *Journal of biosciences* **31**, 639-643
- [12] Crispim, C. A., and Gaylarde, C. C. (2004) Cyanobacteria and Biodeterioration of Cultural Heritage: A Review. *Microbial ecology* **49**, 1-9
- [13] Ramirez, M., Hernandez-Marine, M., Novelo, E., and Roldan, M. (2010) Cyanobacteria-containing biofilms from a Mayan monument in Palenque, Mexico. *Biofouling* **26**, 399-409
- [14] Lamenti, G., Tiano, P., and Tomaselli, L. Biodeterioration of ornamental marble statues in the Boboli Gardens (Florence, Italy). *Journal of Applied Phycology* **12**, 427-433
- [15] Albertano, P., and Urzì, C. Structural Interactions among Epilithic Cyanobacteria and Heterotrophic Microorganisms in Roman Hypogea. *Microbial Ecology* **38**, 244-252
- [16] Adeyemi, A. O., and Gadd, G. M. (2005) Fungal degradation of calcium-, lead- and silicon-bearing minerals. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* **18**, 269-281
- [17] Sterflinger, K. (2000) Fungi as Geologic Agents. *Geomicrobiology Journal* **17**, 97-124
- [18] Altieri, A., and Ricci, S. (1997) Calcium uptake in mosses and its role in stone biodeterioration. *International Biodeterioration & Biodegradation* **40**, 201-204
- [19] Saiz-Jimenez, C. (1994) Biodeterioration of Stone in Historic Buildings and Monuments. in *Mycotoxins, Wood Decay, Plant Stress, Biocorrosion, and*

- General Biodeterioration* (Llewellyn, G. C., Dashek, W. V., and O'Rear, C. E. eds.), Springer US, Boston, MA. pp 587-604
- [20] Wiktor, V., De Leo, F., Urzi, 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
- [21] Moter, A., and Gobel, U. B. (2000) Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of microbiological methods* **41**, 85-112
- [22] Rosado, T., Mirao, J., Candeias, A., and Caldeira, A. T. (2015) Characterizing microbial diversity and damage in mural paintings. *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* **21**, 78-83
- [23] 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
- [24] 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). *Environ Microbiol* **6**, 678-685
- [25] 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
- [26] Bottari, B., Ercolini, D., Gatti, M., and Neviani, E. (2006) Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. *Applied microbiology and biotechnology* **73**, 485-494
- [27] Pinar, G., and Lubitz, W. (2004) Molecular Techniques: Application to the analysis of microbial communities colonizing art works and to the monitoring of changes. Case study: Wall paintings of the castle of Herberstein. . in *European Research on Cultural Heritage. State-of-the-Art Studies* (Drdáček, M. ed.), Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague. pp 421-432
- [28] Maidak, B. L., Cole, J. R., Parker, C. T., Jr., Garrity, G. M., Larsen, N., Li, B., Lilburn, T. G., McCaughey, M. J., Olsen, G. J., Overbeek, R., Pramanik, S., Schmidt, T. M., Tiedje, J. M., and Woese, C. R. (1999) A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic acids research* **27**, 171-173
- [29] Ward, D. M., Weller, R., and Bateson, M. M. (1990) 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* **345**, 63-65
- [30] Volpi, E. V., and Bridger, J. M. (2008) FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *BioTechniques* **45**, 385-386, 388, 390 passim
- [31] Dakal, T. C., and Arora, P. K. (2012) Evaluation of potential of molecular and physical techniques in studying biodeterioration. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **11**, 71-104
- [32] La Cono, V., and Urzi, C. (2003) Fluorescent in situ hybridization applied on samples taken with adhesive tape strips. *Journal of microbiological methods* **55**, 65-71
- [33] Aoi, Y. (2002) In situ identification of microorganisms in biofilm communities. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **94**, 552-556
- [34] Alonso, C. (2012) Tips and tricks for high quality MAR-FISH preparations: focus on bacterioplankton analysis. *Systematic and applied microbiology* **35**, 503-512

- [35] Ariesyady, H. D., Ito, T., Yoshiguchi, K., and Okabe, S. (2007) Phylogenetic and functional diversity of propionate-oxidizing bacteria in an anaerobic digester sludge. *Applied microbiology and biotechnology* **75**, 673-683
- [36] Wagner, M., and Haider, S. (2012) New trends in fluorescence in situ hybridization for identification and functional analyses of microbes. *Current Opinion in Biotechnology* **23**, 96-102
- [37] Moralli, D., and Monaco, Z. L. (2009) Simultaneous Detection of FISH Signals and Bromo-Deoxyuridine Incorporation in Fixed Tissue Cultured Cells. *PLoS ONE* **4**, e4483
- [38] Huang, W. E., Stoecker, K., Griffiths, R., Newbold, L., Daims, H., Whiteley, A. S., and Wagner, M. (2007) Raman-FISH: combining stable-isotope Raman spectroscopy and fluorescence in situ hybridization for the single cell analysis of identity and function. *Environmental Microbiology* **9**, 1878-1889
- [39] Morrison, L. E., Ramakrishnan, R., Ruffalo, T. M., and Wilber, K. A. (2003) Labeling Fluorescence In Situ Hybridization Probes for Genomic Targets. in *Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications* (Fan, Y.-S. ed.), Humana Press, Totowa, NJ. pp 21-40
- [40] 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
- [41] Douterelo, I., Boxall, J. B., Deines, P., Sekar, R., Fish, K. E., and Biggs, C. A. (2014) Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems. *Water Research* **65**, 134-156
- [42] Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W., and Schleifer, K. H. (1994) In situ probing of gram-positive bacteria with high DNA G + C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology (Reading, England)* **140 (Pt 10)**, 2849-2858
- [43] 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
- [44] de Vilasboas, D. I., and de Souza Gil, E. (2010) FLUORIMETRIA NA ANÁLISE FARMACÊUTICA: UMA REVISÃO. *Revista Eletrônica de Farmácia* **7**, 15
- [45] Weise, A., Liehr, T., Claussen, U., and Halbhuber, K.-J. (2005) Increased Efficiency of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Using the Microwave. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **53**, 1301-1303
- [46] Kitayama, Y., Igarashi, H., and Sugimura, H. (0000) Initial Intermittent Microwave Irradiation for Fluorescence In Situ Hybridization Analysis in Paraffin-Embedded Tissue Sections of Gastrointestinal Neoplasia. *Lab Invest* **80**, 779-781

Anexos

Anexo I. Soluções

Todas as soluções foram filtradas com assepsia antes de serem utilizadas.

- Tampão PBS 10x: 76,0 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,4 g Na₂HPO₄·2H₂O e; 0,2 g KH₂PO₄ em 1,0 L de água Mili-Q, pH 7,2.
- Tampão de hibridação: 300,0 mL NaCl 0,9 M; 20,0 mL Tris-HCl 20 mM; 1,0 mL de SDS 0,01% (p/v) em 1,0 L de água Milli-Q.
- Soro fisiológico: 9,0 g NaCl em 1,0L de água Milli-Q.
- Azul-de-metileno: 0,01 g de azul-de-metileno; 2,0 g de citrato de sódio em 100,0 mL de H₂O destilada. Filtrar a solução com um filtro de 0,2 µm após filtrar com papel de filtro.

Anexo II. Meios de cultura

- NB: 8,0 g de nutriente bacteriológico em 1,0L de água Milli-Q.
- NA: 15,0 g agar; 3,0 g extrato de carne e; 5,0 g peptona bacteriológica em 1,0L de água Milli-Q.
- MEA: 20g agar; 20 g extrato malta; 1g peptona; 20g glucose em 1,0L de água Mili-Q.
- ME: 20 g extrato malta; 1g peptona; 20g glucose em 1,0L de água Milli-Q.

Anexo III. Equipamentos

- Espectrofotômetro de Microplacas com cuvette incl Microdrop Placa, Thermo Scientific, Multiskan Go, 2014.
- Câmara de fluxo laminar horizontal, Telstar, AH-100, 2014.
- Microscópio biológico equipado com uma unidade de alimentação (MOTIC MXH -100) juntamente com um módulo de episcopia de fluorescência (EF-UPR -III) com cubos de filtros de excitação para DAPI, FITC e TRITC, Motic, BA410E, 2014.
- Sistema de PCR em tempo real PikoReal™.
- Câmara, Motic, Moticom Pro 282B, 2014.
- Incubadora, Memmert, UN 110, 2014.
- Banho de água, Memmert, WNB 14, 2014.
- Centrífuga, Biobase, TGL 21M, 2014.
- Sistema de Produção de Água ultrapura, Type Solutions, Merck Millipore Milli-Q Integral, 2012.

