

Novos desenvolvimentos para a deteção de leveduras e bactérias presentes em argamassas

Ricardo Vieira^{1,*}
Marina González-Pérez¹
António Pereira^{1,2}
António Candeias^{1,2}
Ana T. Caldeira^{1,2}

¹ Laboratório HERCULES, Universidade de Évora, Évora, Portugal

² Departamento de Química, Escola de Ciência e Tecnologia, Universidade de Évora, Évora, Portugal

* ricardo.o.vieira89@gmail.com

Resumo

O desenvolvimento de novas abordagens simples e rápidas para analisar as comunidades microbianas colonizadoras do Património Cultural é vital para a sua salvaguarda. A técnica de hibridação fluorescente *in situ* dirigida às moléculas de ácidos ribonucleicos (ARN-FISH) tem demonstrado um grande potencial para tal propósito. Em estudos anteriores, foi desenvolvido um protocolo FISH que permite a deteção de fungos filamentosos em argamassas. Neste trabalho adaptou-se o protocolo para a deteção de leveduras e bactérias, obtendo-se bons resultados na análise de suspensões de isolados destes microrganismos. O protocolo otimizado foi aplicado em microamostras de argamassas sintéticas inoculadas artificialmente com isolados leveduriformes e bacterianos e obtiveram-se resultados promissores na análise *ex situ* das leveduras e bactérias presentes em argamassas.

Palavras-chave

Hibridação fluorescente *in situ*
Património Cultural
Comunidades microbianas

Development of new approaches for the detection of yeast and bacteria thriving in mortars

Abstract

The development of simple and rapid new approaches for analysing microbial communities colonising Cultural Heritage materials is pivotal for its safeguard. Fluorescence *in situ* hybridisation technique using ribosomal RNA directed probes (RNA-FISH) has demonstrated a great potential for this purpose. A protocol for analysing filamentous fungi in mortars has been already developed in previous studies. In this work this protocol has been adapted for detecting bacteria and yeasts. Good results have been obtained for the analysis of suspensions of isolates. In this way, the optimized protocol was applied in microsamples from synthetic mortar artificially inoculated with yeast and bacterial isolates. Promising results have been obtained for the *ex situ* analysis of yeast and bacteria thriving in mortar microsamples.

Keywords

Fluorescence *in situ* hybridisation
Cultural Heritage
Microbial communities

ISSN 2182-9942

Introdução

O desenvolvimento de estratégias de conservação, restauro, preservação e controlo, eficazes e adequadas, são de extrema importância para a salvaguarda do Património Cultural [1]. No entanto até há algumas décadas, na formulação das estratégias de conservação, a contribuição dos microrganismos na deterioração foi completamente negligenciada [2-3]. Apesar dos avanços notáveis conseguidos no estudo da população microbiana presente nos bens patrimoniais, particularmente com a implementação e adaptação das técnicas moleculares da microbiologia, continua a ser fundamental a implementação de novas abordagens que o facilitem. Estas devem ser versáteis, simples, rápidas e preferencialmente acessíveis aos utilizadores finais, eventualmente não especialistas em microbiologia.

A hibridação fluorescente *in situ* dirigida a moléculas de ácidos ribonucleicos (ARN-FISH) é uma técnica robusta e versátil que permite detetar e identificar os microrganismos assim como analisar a sua viabilidade, morfologia e distribuição tridimensional em matrizes complexas [2, 4]. Este potencial analítico representa uma alternativa potente para a microbiologia aplicada ao Património. A técnica é baseada no uso de sondas ARN-FISH, que são constituídas por oligonucleótidos sintéticos ligados a um ou mais marcadores fluorescentes que hibridam com uma região específica do ARN do microrganismo alvo, tornando assim, as células fluorescentes sob a luz adequada [5-6]. É uma ferramenta rápida, fornecendo resultados em 5-24 h, e simples, ocorrendo em quatro passos: *i*) fixação e permeabilização, *ii*) hibridação, *iii*) lavagem e *iv*) deteção e identificação dos microrganismos [6]. A consecução de bons resultados depende da optimização dos diversos passos para se adaptar às características da amostra em estudo e dos microrganismos alvo [5]. Apesar da ampla utilização da técnica ARN-FISH noutras áreas de investigação como na microbiologia clínica, alimentar e ambiental para o estudo das comunidades microbianas ou na deteção de microrganismos concretos [7-10], a sua aplicação no estudo da biodeterioração tem sido reduzida [2, 9-10]. A técnica foi utilizada na identificação de microrganismos envolvidos na biodeterioração de obras de arte *ex situ*: *i*) em amostras recolhidas com fitas adesivas de catacumbas romanas na deteção de bactérias e fungos [11], *ii*) na deteção de conídios em superfícies de monumentos [12], *iii*) na deteção de bactérias em pinturas murais medievais danificadas [13] e *iv*) na determinação do número de microrganismos presentes em amostras de estalactites das cavernas de Sahastradhara [14]; bem como *in situ*: no estudo da distribuição espacial dos procariotas em pinturas do século dezasseis [15].

Para poder explorar as inúmeras potencialidades desta técnica no estudo das comunidades microbiológicas colonizadoras do Património Cultural Material, é necessário desenvolver protocolos específicos que

permitam a análise dos microrganismos de interesse nas diferentes matrizes. Para facilitar esta análise, é importante o desenvolvimento de protocolos FISH que permitam analisar vários tipos de microrganismos simultaneamente de modo a minimizar o número de ensaios e a quantidade de amostra requerida, quando necessário. Este é um dos focos do nosso grupo de investigação que, de facto, já tem desenvolvido um protocolo FISH que permite a deteção de fungos filamentosos em argamassas [16]. Este trabalho tem como objetivo a ampliação da gama de microrganismos analisáveis mediante esta metodologia FISH, às leveduras e bactérias. Foi testado primeiramente em suspensões de isolados, para evitar as possíveis interferências da matriz, e posteriormente em argamassas utilizando microamostras inoculadas artificialmente.

Métodos

Microrganismos e crescimento microbiano em meio líquido

Foram usados como modelo biológico duas leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* CCMI 396 e *Rhodotorula sp.*) e duas bactérias (*Escherichia coli* ATCC 25922, Gram-negativa, e *Bacillus sp.*, Gram-positiva). *Saccharomyces cerevisiae* pertence à Coleção de Culturas de Microrganismos Industriais de Lisboa, a *Escherichia coli* à American Type Culture Collection de Manassas e *Rhodotorula sp.* e *Bacillus sp.* foram isolados de pinturas murais em estado avançado de degradação e pertencem à coleção HERCULES-Biotech Lab da Universidade de Évora.

As estirpes foram rotineiramente mantidas a 4,0 °C em rampas de YEPD-agar (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) para as leveduras ou NA (*Nutrient Agar*) para as bactérias. Os inóculos foram preparados a partir de rampas (pré-cultivadas durante 48 h a 28,0 °C) e suspensas em 1,0 mL de NaCl 0,85% (p/v).

Para o estudo da técnica FISH em células em fase exponencial, o inóculo foi transferido para um erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido YPD (*Yeast Peptone Dextrose*) para leveduras ou NB (*Nutrient Broth*) para bactérias. As culturas líquidas foram incubadas com agitação orbital constante de 120 rpm a 28,0 °C. Após 6 h de crescimento, foram recolhidas alíquotas de 2,0 mL do meio para analisar as células, na fase exponencial.

Para analisar as células sem controlar o seu estado fisiológico, recuperaram-se as células diretamente das rampas (culturas de armazenamento) por ressuspensão em NaCl 0,85% (p/v).

Hibridação *in situ* fluorescente

O protocolo FISH, previamente desenvolvido com sucesso pelo nosso grupo de investigação para a deteção de fungos filamentosos em suspensão e em argamassas,

foi adaptado para a detecção de leveduras e bactérias [16]. Para tal, foram incluídas duas modificações no referido protocolo: *i*) na etapa de hibridação fixou-se a razão [células fixadas]/[sonda] em $8,33 \times 10^3$ e $8,33 \times 10^5$ células/ng_{sonda} para as leveduras e bactérias, respectivamente [8,17]; e *ii*) a análise foi realizada através de microscopia de epifluorescência e citometria de fluxo utilizando filtros específicos para o fluorocromo.

Inicialmente os ensaios foram realizados em suspensão controlando o estado fisiológico das células (fase exponencial), uma vez que o conteúdo de ARN e a permeabilidade da membrana celular variam consoante o estado fisiológico [18-20]. Só uma vez validado o protocolo em suspensão, este foi aplicado às células sem controlar o seu estado fisiológico tanto em suspensão como em argamassas. Todos os ensaios foram feitos em triplicado.

FISH em suspensão

As células foram centrifugadas, lavadas com tampão fosfato salino PBS (*Phosphate Buffered Saline* – 130 mM NaCl, 8 mM NaH₂PO₄, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2) e fixadas com etanol absoluto durante 1 h à temperatura ambiente. As células fixadas, após lavagem com PBS, foram hibridadas durante 2 h a 46,0 °C com 1,0 µL da sonda (120,0 ng/µL) em 80,0 µL de tampão de hibridação, HB (*Hybridization Buffer* – 0,9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0,1% SDS *sodium dodecyl sulfate* [p/v]). Foram usadas 10⁸ e 10⁶ células fixadas e as sondas universais para o domínio Bactéria, EUB338-Cy3 (5'Cy3-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'), e para o domínio *Eukarya*, EUK516-Cy3 (5'Cy3-ACCAGACTTGCCCTCC-3'), para a análise das bactérias e das leveduras, respectivamente. Após a hibridação, as células foram centrifugadas e lavadas com 100,0 µL de HB pré-aquecido durante 30 min a 46,0 °C. Uma vez centrifugadas, as células foram re-suspensas em PBS (0,5 mL e 0,4 mL para as leveduras e as bactérias, respectivamente) para a sua análise por citometria de fluxo e/ou por microscopia. Todas as centrifugações foram realizadas a 4500 rpm durante 5 min ou 13000 rpm durante 15 min para as leveduras e para as bactérias, respectivamente.

De modo a analisar a influência da exposição das células à luz UV de onda curta, as células de *E. coli*, após hibridadas, foram expostas a uma fonte de luz UV-C ($\lambda = 254$ nm) durante 60 min e analisadas através de citometria de fluxo em intervalos de 5 min.

Inoculação das argamassas

As argamassas sintéticas (0,3 g), constituídas por cal e areia ao traço em volume (1/3), foram inoculadas com 1,0 mL de suspensão microbiana durante 24 h à temperatura ambiente. Após incubação, uma pequena quantidade de argamassa (0,1 g) foi transferida para um microtubo de 1,5 mL.

FISH em argamassas

Para o estudo da aplicabilidade da técnica FISH em argamassas foram aplicadas três metodologias diferentes, uma *in situ* e duas *ex situ*, testadas com os quatro microrganismos em estudo.

Para a análise *in situ*, o protocolo FISH foi aplicado diretamente num microtubo contendo a argamassa.

Para a análise *ex situ* foram desenvolvidas duas metodologias que diferem exclusivamente no momento em que as células são extraídas da argamassa. Na primeira metodologia, as células são recuperadas e só depois é aplicada a técnica FISH. As células são contadas antes da hibridação, de modo a utilizar a mesma razão de [células fixadas]/[sonda] aplicada na técnica FISH em suspensão. Já na segunda metodologia as células são hibridadas *in situ* nas argamassas e só depois são recuperadas e analisadas.

A análise, tanto *in situ* como *ex situ*, foi realizada por microscopia de epifluorescência.

Em ambas as metodologias o procedimento de extração das células foi idêntico. As células foram extraídas com 0,5 mL de soro fisiológico *overnight* a 28,0 °C sob agitação orbital constante 120 rpm. Após a extração, as células foram centrifugadas a 1200 rpm durante 30 s, para separar a argamassa das células. O sobrenadante, contendo as células, foi transferido para um microtubo de 1,5 mL.

O protocolo ARN-FISH aplicado foi o mesmo que otimizado para a análise em suspensão.

Análise

Para análise mediante microscopia de epifluorescência foi utilizado um microscópio biológico BA410E Motic equipado com uma unidade de alimentação (MOTIC MXH-100) com um equipamento de Episcopia de Fluorescência (EF-UPR-III). As observações foram realizadas com um filtro de fluorescência TRITC – set Motic TRITC (Rhodamine)/DII/Cy3: excitação D540/25×, espelho dicróico 565DCLP, emissão D605/55m.

Para a análise através de citometria de fluxo foi utilizado o Muse Cell Analyzer, equipado com um laser verde (532 nm) e um detetor amarelo de fotodiodos (576/28).

Resultados

O protocolo FISH desenvolvido previamente e aplicado com sucesso para a detecção de fungos filamentosos em argamassas [16], foi aplicado como descrito nos métodos às suspensões celulares de isolados de leveduras e bactérias em fase exponencial de crescimento. As células foram analisadas qualitativamente, através de microscopia, e quantitativamente, através de citometria de fluxo.

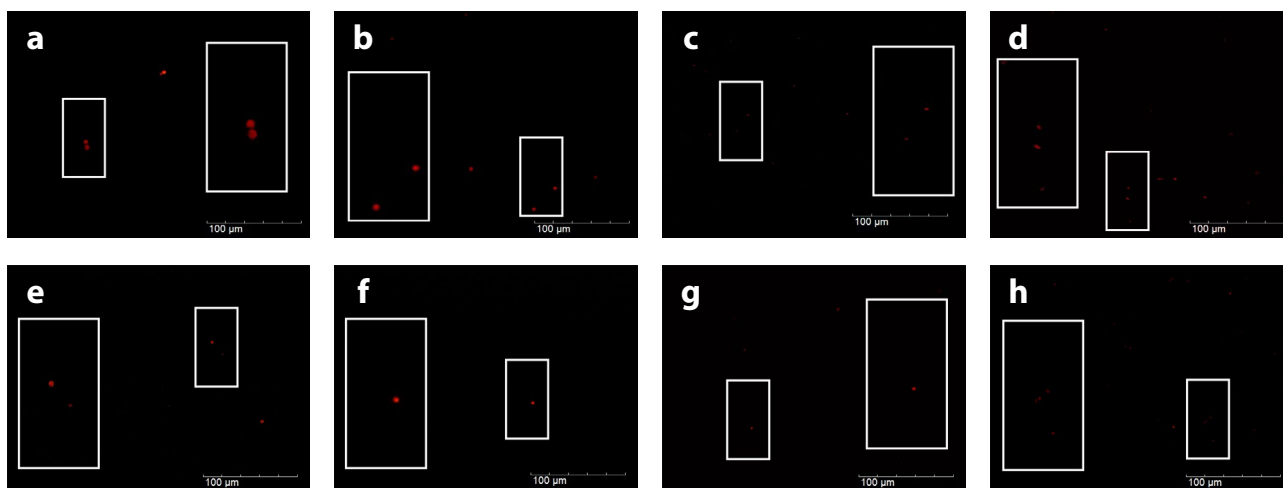


Figura 1. Visualização dos sinais FISH das leveduras e bactérias em suspensão em fase exponencial e sem controlar o estado fisiológico, respetivamente: *Saccharomyces cerevisiae* (a, e), *Rhodotorula sp.* (b, f), *Escherichia coli* (c, g) e *Bacillus sp.* (d, h) através de microscopia de epifluorescência com o filtro TRITC.

Através da microscopia de epifluorescência, foram observados sinais fluorescentes durante períodos de tempo prolongados (> 1 min) sem redução notável da intensidade de fluorescência, bem como sinais intensos e reprodutíveis que evidenciaram que o protocolo FISH, permite a análise de leveduras e bactérias em suspensões celulares (Figuras 1a-d). De modo a investigar a importância da escolha dos filtros com que se faz a análise para conseguir sinais duradouros e estáveis, efetuaram-se estudos quantitativos, em células de *E. coli*, relativos ao efeito da exposição prolongada à luz UV-C, relativamente à intensidade média de fluorescência das células (IF) e a sua estabilidade e ao número de células fluorescentes. Deste modo foi monitorizado o decaimento da fluorescência das células na presença de uma luz UV-C através de citometria de fluxo. Os resultados revelaram que a exposição das células fluorescentes à luz UV-C não só produz uma diminuição notável da fluorescência (12 %) (Figura 2a) como também no número de células fluorescentes (17%) (Figura 2b). Estes resultados, permitem concluir que para garantir a deteção mediante a técnica FISH e a reprodutibilidade das análises através de microscopia, é recomendável incluir no protocolo a análise através de microscopia de epifluorescência com filtros específicos. Quando é utilizado o fluorocromo Cy3 deve-se evitar a exposição das células à luz de comprimento de onda inferior a 400 nm e evitar o uso de filtros de excitação SP (*short-pass*).

As suspensões celulares resultantes da aplicação do protocolo FISH na fase exponencial, também foram analisadas quantitativamente, através de citometria de fluxo, em termos de intensidade média de fluorescência das células e de percentagem de células fluorescentes (relativamente ao número de células iniciais fixadas que são hibridadas). Os resultados revelaram que a percentagem de células que detêm fluorescência, após a aplicação do protocolo, é consideravelmente superior nas leveduras comparativamente às bactérias (Figura

3a). Este facto parece estar diretamente relacionado com a utilização do etanol como fixante, mais efectivo para a fixação de células de leveduras. Em termos de intensidade de fluorescência, mesmo que existam diferenças significativas entre os microorganismos estudados, as intensidades detetadas em todos os casos são elevadas (Figura 3b). Apesar do número de células fluorescentes ser muito baixo, após a aplicação do protocolo ARN-FISH, a deteção não fica comprometida ao serem os valores de intensidade de fluorescência elevados. Os bons resultados obtidos mediante citometria

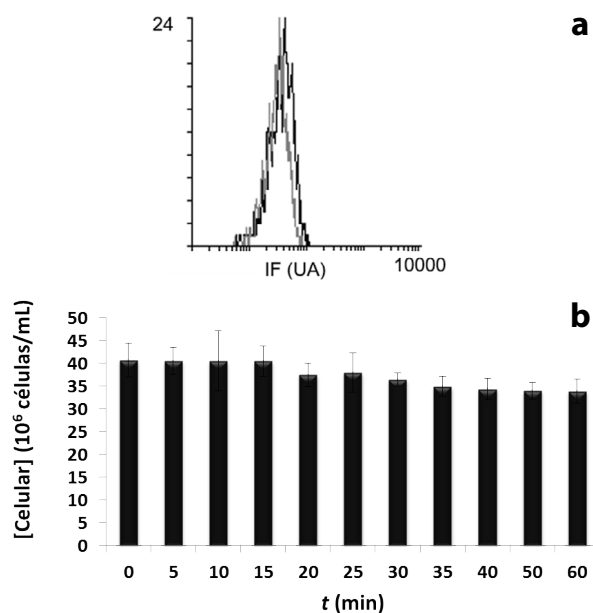


Figura 2. Resultados do efeito da exposição de *Escherichia coli* à luz UV-C durante uma hora, relativamente à intensidade de fluorescência das células (a) antes da exposição (linha a preto) e depois (linha a cinzento) e monitorização da concentração de células fluorescentes (b).

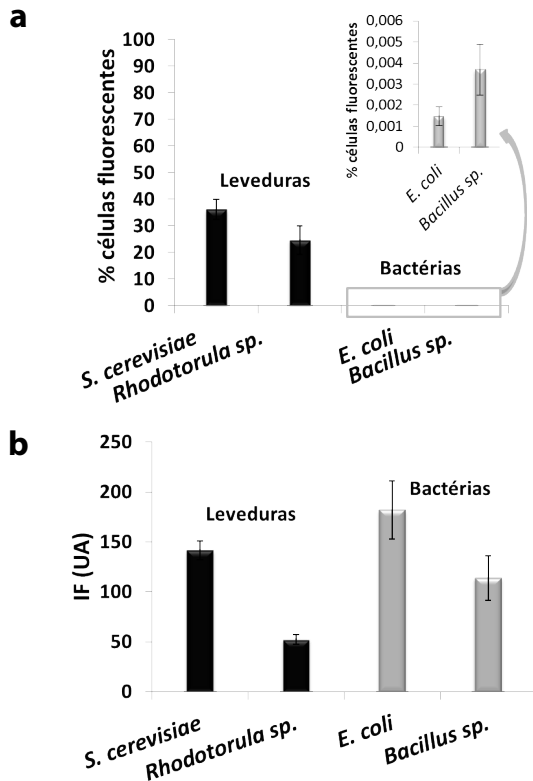


Figura 3. Resultados da análise de leveduras e bactérias em suspensão através de citometria fluxo relativamente à percentagem de células fluorescentes (a) e intensidade média de fluorescência por célula (b).

de fluxo em suspensão: *i*) abrem a porta à utilização na análise *ex situ* destes microrganismos em argamassas, mediante a extração prévia das células; e *ii*) evidenciam a possibilidade de usar o mesmo fixante/permeabilizante para a detecção de leveduras e bactérias o que pode representar uma vantagem notável, particularmente na análise destes microrganismos em argamassas de bens patrimoniais, dado que a quantidade de amostra disponível para análise é limitada e a utilização do fixante comum reduz consideravelmente a quantidade de amostra que seria necessária.

Após o êxito da aplicação do protocolo FISH otimizado na análise de células de leveduras e bactérias em fase exponencial, e dado que nas amostras recolhidas em Património Cultural os microrganismos presentes

se encontram em estados fisiológicos muito diversos, foi avaliada a capacidade do protocolo para detectar, através de microscopia de epifluorescência, as leveduras e bactérias sem controlar o estado fisiológico. Ao analisar os resultados obtidos é possível afirmar que o protocolo FISH descrito neste trabalho permite detectar e identificar reprodutivamente leveduras e bactérias em suspensão, independentemente do seu estado fisiológico (Figuras 1e-h).

Assim, o protocolo foi aplicado em argamassas sintéticas inoculadas artificialmente com isolados de bactérias ou leveduras de modo a avaliar a sua possível aplicação na análise *in situ* ou *ex situ* destes microrganismos. Nas análises *in situ* foram detetados sinais fluorescentes associados às células de leveduras (Figura 4a). Contudo a autofluorescência da própria argamassa impede a detecção e identificação inequívoca dos microrganismos de interesse. Assim, foi investigada a possibilidade de detetar as células *ex situ*, mediante a sua recuperação em suspensão. Foram utilizadas duas abordagens diferentes: *i*) a extração das células seguida da aplicação do protocolo FISH desenvolvido ou *ii*) a aplicação do protocolo FISH directamente na argamassa e posterior extração das células. Os resultados obtidos através da microscopia de epifluorescência mostraram que é possível detetar as leveduras, independentemente da abordagem adoptada (Figura 4b e 4c), e as bactérias detetaram-se exclusivamente com o protocolo da extração das células antes de aplicar a técnica FISH (Figura 4d). A detecção de leveduras aplicando a técnica FISH directamente na argamassa e realizando a extração das células *a posteriori*, evidencia o potencial da técnica FISH para tornar fluorescentes as células directamente nas argamassas e aponta que eliminando a autofluorescência da matriz podem detectar-se as células *in situ*. No entanto, aplicando o protocolo FISH após a extração das células das argamassas, o rendimento obtido foi maior em termos de número de células fluorescentes e de intensidade de fluorescência dos sinais, do que extraíndo as células após a hibridação directamente na argamassa. Esta abordagem apresenta ainda vantagens adicionais: *i*) permitir controlar o número de células fixadas que são hibridadas; e *ii*) permitir a análise imediata após a aplicação da técnica. Assim, esta metodologia, de entre as duas estudadas, é a melhor alternativa para realizar a análise *ex situ* e apresenta-se

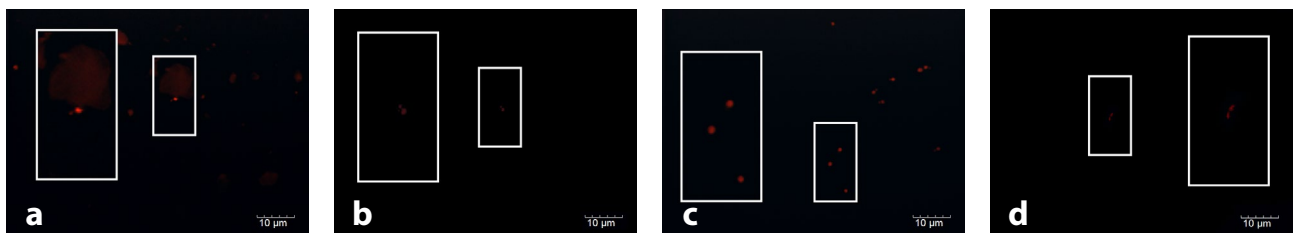


Figura 4. Microfotografias obtidas através de microscopia de epifluorescência com o filtro TRITC na análise *in situ* e *ex situ* de leveduras e bactérias em argamassas: *Saccharomyces cerevisiae* CCM1 396 *in situ* (a), *ex situ* realizando a hibridação antes da extração (b) e após a extração (c) das células. *Escherichia coli* analisada *ex situ* realizando a hibridação após a recuperação das células (d).

como uma promissora ferramenta na análise de leveduras e bactérias presentes em argamassas, que poderá ser aplicada no estudo das comunidades microbianas que proliferam no Património.

Considerações finais

O protocolo ARN-FISH desenvolvido neste trabalho oferece a possibilidade de detectar e identificar leveduras e bactérias em argamassas *ex situ* utilizando um procedimento comum. Os avanços apresentados irão servir de base para o desenvolvimento e otimização de futuras aplicações da técnica FISH na identificação *ex situ* e *in situ* de um amplo espectro de microrganismos em argamassas.

Os promissores resultados aqui apresentados junto com os que tinham sido já obtidos pelo nosso grupo de investigação na deteção e identificação de fungos filamentosos em argamassas, apontam que a técnica ARN-FISH poderá ser uma ferramenta com elevado potencial para o estudo das comunidades microbianas que proliferam no Património.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao projeto “HIT3CH - HERCULES Interface for Technology Transfer and Teaming in Cultural Heritage”, ref. ALT20-03-0246-FEDER-000004, co-financiado pela União Europeia através do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional, enquadrado no ALENTEJO 2020 (Programa Operacional Regional do Alentejo). 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), da bolsa para licenciado micortech_lic_2016 e da bolsa post-doutoral SFRH/BPD/100754/2014.

Referências

- 1 Sterflinger, K.; Piñar G., ‘Microbial deterioration of cultural heritage and works of art-tilting at windmills?’, *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**(22) (2013) 9637-9646, doi:10.1007/s00253-013-5283-1.
- 2 Dakal, T.; Arora, P., ‘Evaluation of potential of molecular and physical techniques in studying biodeterioration’, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **11**(1) (2012) 71-104, doi:10.1007/s11157-012-9264-0.
- 3 Otlewska, A.; Adamiak, J.; Gutarowska, B., ‘Application of molecular techniques for the assessment of microorganism diversity on cultural heritage objects’, *Acta Biochimica Polonica* **61**(2) (2014) 217-225.
- 4 Bottari, B.; Ercolini, D.; Gatti M.; Neviani, E., ‘Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects’, *Applied Microbiology and Biotechnology* **73**(3) (2006) 485-494 doi:10.1007/s00253-006-0615-z.
- 5 Moter, A.; Göbel, U. B., ‘Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms’, *Journal of Microbiological Methods* **41**(2) (2000) 85-112, doi:10.1016/S0167-7012(00)00152-4.
- 6 Amann, R.; Fuchs B. M.; Behrens, S., ‘The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation’, *Current Opinion in Biotechnology* **12**(3) (2001) 231-236, doi:10.1016/S0958-1669(00)00204-4.
- 7 Souza, J.; Moreira da Silva, R.; Koshikene, D.; Silva, E., ‘Applications of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in environmental microbiology’, *Journal of Food Agriculture and Environment* **5** (2007) 408-411.
- 8 Xufre, A.; Albergaria, H.; Inácio, J.; Spencer-Martins, I.; Gírio, F., ‘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**(3) (2006) 376-384, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.025.
- 9 Douterelo, I.; Boxall, J. B.; Deines, P.; Sekar, R.; Fish, K. E.; Biggs, C. A., ‘Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems’, *Water Research* **65**(0) (2014) 134-156, doi:10.1016/j.watres.2014.07.008.
- 10 Kempf, V. A. J.; Trebesius, K.; Autenrieth, I. B., ‘Fluorescent *in situ* hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures’, *Journal of Clinical Microbiology*, **38**(2) (2000) 830-838, <http://jcm.asm.org/content/38/2/830> (acesso em 2016-07-25).
- 11 Urzì, C.; La Cono, V.; De Leo, F.; Donato, P., ‘Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) to study biodeterioration’, in *International Congress on Molecular Biology and Cultural Heritage*, Balkema Publishing, Sevilha (2003) 55-60.
- 12 Villa, F.; Cappitelli, F.; Principi, P.; Polo, A.; Sorlini, C., ‘Permeabilization method for *in-situ* investigation of fungal conidia on surfaces’, *Letters in Applied Microbiology* **48**(2) (2009) 234-240, doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02520.x.
- 13 Piñar, G.; Ramos, C.; Rölleke, S.; Schabereiter-Gurtner, C.; Vybiral, D.; Lubitz, W.; Denner, E. B. M., ‘Detection of indigenous halobacillus populations in damaged ancient wall paintings and building materials: molecular monitoring and cultivation’, *Applied and Environmental Microbiology* **67**(10) (2001) 4891-4895, doi:10.1128/aem.67.10.4891-4895.2001.
- 14 Baskar, S.; Baskar, R.; Mauclair, L.; McKenzie, J. A., ‘Microbially induced calcite precipitation in culture experiments: Possible origin for stalactites in Sahastradhara caves, Dehradun, India’, *Current Science* **90**(1) (2006) 58-64, <http://www.iisc.ernet.in/currsci/jan102006/58.pdf> (acesso em 2016-07-25).
- 15 Santos, A.; Cerrada, A.; García, S.; San Andrés, M.; Abrusci, C.; Marquina, D., ‘Application of molecular techniques to the elucidation of the microbial community structure of antique paintings’, *Microbial Ecology* **58**(4) (2009) 692-702, doi:10.1007/s00248-009-9564-2.
- 16 Vieira, R.; Nunes, P.; Martins, S.; González, M.; Rosado, T.; Pereira, A.; Candeias, A.; Caldeira, A., ‘Fluorescence *in situ* hybridisation for microbiological detection in mortars’, in *Science, Technology and Cultural Heritage*, ed. A. Rogerio-Candelera, Taylor & Francis, London (2014) 257-262.
- 17 Kalyuzhnaya, M.; Zabinsky, R.; Bowerman, S.; Baker, D.; Lidstrom, M.; Chistoserdova, L., ‘Fluorescence *in situ* hybridization-flow cytometry-cell sorting-based method for separation and enrichment of type i and type ii methanotroph populations’, *Applied and Environmental Microbiology* **72**(6) (2006) 4293-4301, doi:10.1128/AEM.00161-06.
- 18 Fuchs, B. M.; Wallner, G.; Beisker, W.; Schwippl, I.; Ludwig, W.; Amann, R., ‘Flow cytometric analysis of the *in situ* accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes’, *Applied and Environmental Microbiology* **64**(12) (1998), 4973-4982, <http://aem.asm.org/content/64/12/4973> (acesso em 2016-07-25).
- 19 Fuchs, B. M.; Syutsubo, K.; Ludwig, W.; Amann, R., ‘*In situ* accessibility of *Escherichia coli* 23S rRNA to fluorescently labeled oligonucleotide probes’, *Applied and Environmental*

Microbiology **67**(2) (2001), 961-968, doi:10.1128/AEM.67.2.961-968.2001.

- 20 Bottari, B.; Ercolini, D.; Gatti M.; Neviani E., 'Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects', *Applied Microbiology and Biotechnology* **73**(3) (2006) 485-494 doi:10.1007/s00253-006-0615-z.

Recebido: 2015-12-28

Aceite: 2016-07-14

Online: 2016-07-27



Licenciado sob uma Licença Creative Commons
Atribuição-NãoComercial-SemDerivações 4.0 Internacional.
Para ver uma cópia desta licença, visite
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.pt>.