

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL (ETSIAMN)



Aplicación de la técnica FISH en la
detección de *Pseudomonas stutzeri*
utilizada para tratamientos de
biolimpieza en obras de arte

Autor: Rosa Márquez Costa

Tutor: Dña. Rosa M^a Montes Estellés

Cotutor: Dña. Yolanda Moreno Trigos

Curso 2016/2017

Trabajo Fin de Grado

Grado en Biotecnología

Valencia, julio de 2017

Resumen

Título del TFG: Aplicación de la técnica FISH en la detección de *Pseudomonas stutzeri* utilizada para tratamientos de biolimpieza en obras de arte

Autor: Dña. Rosa Márquez Costa

Tutor: Dña. Rosa M^a Montes Estellés

Cotutor: Dña. Yolanda Moreno Trigos

Valencia, julio de 2017

Resumen:

En el laboratorio se ha desarrollado una técnica para limpiar la superficie de obras de pintura mural mediante la aplicación de bacterias vivas, proceso conocido como Biolimpieza, en donde éstas eliminan restos de incrustaciones que perjudican la obra y son difíciles de eliminar por los métodos convencionales.

Uno de los problemas que se suscita por el hecho de aplicar los microorganismos directamente sobre la obra es si permanecerán en la superficie a lo largo del tiempo provocando efectos indeseados, por lo que se hace indispensable controlar el proceso y comprobar la ausencia de bacterias tras el tratamiento.

El objetivo es evaluar técnicas de biología molecular para identificar, cuantificar y demostrar la viabilidad de las bacterias mientras actúan en la biolimpieza de las superficies de las obras de arte.

Para ello se ha monitorizado el proceso de biolimpieza mediante el seguimiento y control de la presencia de *P. stutzeri* en probetas de pintura mural durante un total de tres semanas, haciendo uso de diversas técnicas para la detección de la bacteria.

Se destaca el empleo de la técnica FISH (hibridación fluorescente *in situ*) que permite una detección e identificación específica, así como su combinación con DVC (*Direct Viable Count*) para validar la viabilidad de las bacterias encontradas. Estas técnicas se han trasladado a su utilización en pinturas murales que habían sido previamente tratadas con la bacteria.

Palabras clave: *Pseudomonas stutzeri*, Biolimpieza, FISH, biología molecular, DVC-FISH, pintura mural

Abstract

Title: Application of the FISH technique to the detection of *Pseudomonas stutzeri* used for biocleaning treatments in artworks

Author: Dña. Rosa Márquez Costa

Tutor: Dña. Rosa M^a Montes Estellés

Cotutor: Dña. Yolanda Moreno Trigos

Valencia, julio de 2017

Abstract:

In the lab it has been developed a technique for cleaning the surface of wall paintings by the application of live bacteria, process known as Biocleaning, in which the bacteria remove incrustations which damage the piece and are difficult to remove by the conventional methods.

One of the concerns about this technique is the fact that the microorganisms are directly applied over the artwork surface, what raises to think if the bacteria would remain on the surface along the time causing undesirable effects, so it is essential to monitor the process and check the absence of bacteria after the treatment.

This project consists of evaluating molecular biology methods to identify, quantify and evidence the viability of the bacteria while acting during the biocleaning treatment.

In order to achieve that, it has been monitored a biocleaning process by the control of *P. stutzeri* presence in wall tiles during a total of three weeks, using diverse methods for detecting the bacteria.

The use of FISH (fluorescence *in situ* hybridization) is highlighted since it allows a specific detection and identification, as well as its combination with DVC (*Direct Viable Count*) for the validation of viability cell. These techniques have been translated to its use on real wall paintings that were previously treated with the bacteria.

Key words: *Pseudomonas stutzeri*, biocleaning, FISH, molecular biology, DVC-FISH, mural painting

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mi directora Rosa Montes, por la oportunidad de realizar este trabajo, por todo su apoyo y por todo lo que he aprendido con ella.

En segundo lugar a Yolanda por hacerme un hueco en su laboratorio y a todos los compañeros del mismo por toda su ayuda.

A Josele, por introducirme en el mundo de la restauración; sin él este trabajo tampoco hubiera sido posible.

A Sara y Espe por su ayuda incondicional y todos los buenos ratos durante estos 4 años.

Y finalmente, a Dani y David por haberme apoyado y haber confiado siempre en mí.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

Índice

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Biolimpieza	1
1.1.1 Biodeterioro	1
1.1.2 Métodos tradicionales de restauración	1
1.1.3 Biolimpieza	2
1.2. <i>Pseudomonas stutzeri</i>	3
1.2.1 Aspectos generales.....	3
1.2.2 Desnitrificación.....	4
1.2.3 Aplicaciones biotecnológicas	5
1.3 Métodos de detección de bacterias en tratamientos de biolimpieza	6
1.3.1 Detección mediante hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes (FISH)	6
1.3.2 Detección de formas viables mediante <i>Direct Viable Count</i> (DVC).....	7
2. OBJETIVOS	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1. Cepas bacterianas	9
3.2. Sistemas de identificación multipuebas	10
3.3. Hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes (FISH)	10
3.3.1 Sondas	10
3.3.2 Condiciones de fijación	10
3.3.3 Condiciones de hibridación	11
3.4. DVC-FISH	12
3.5. Aplicación <i>in vitro</i>: Monitorización de la presencia de <i>Pseudomonas stutzeri</i> sobre probeta de pintura mural. Valoración de la eficacia de los diferentes métodos y materiales de toma de muestra.	12
3.5.1 Elaboración y distribución de las probetas	12
3.5.2 Obtención del cultivo	14
3.5.3 Toma de muestras.....	14
3.6. Toma de muestras procedentes de pinturas murales	16
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1. Detección mediante hibridación <i>in situ</i> con sondas fluorescentes (FISH)	17
4.2 Detección de formas viables mediante <i>Direct Viable Count</i>	20

4.3. Aplicación <i>in vitro</i>: Monitorización de la presencia de <i>Pseudomonas stutzeri</i> sobre probeta de pintura mural. Valoración de la eficacia de los diferentes métodos y materiales de toma de muestra.	21
4.4. Análisis de muestras procedentes de pinturas murales	30
5. CONCLUSIONES	31
6. BIBLIOGRAFÍA	32
7. ANEXOS	38
ANEXO 1: Medios de cultivo.....	38
ANEXO 2: Tiras API	40
ANEXO 3: Soluciones y reactivos utilizados para FISH	43
ANEXO 4: Resultado de laminocultivos y placas de contacto.....	46
ANEXO 5: Resultados de las hibridaciones FISH.....	48

Índice de tablas

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas	9
Tabla 2. Resultados de la medición de ATP en tratamientos de biolimpieza sobre probeta de pintura mural	23
Tabla 3. Resultados de la toma de muestra de los cuadrados 5 y 6 (pasada una y dos semanas desde el tratamiento de biolimpieza respectivamente).	26
Tabla 4. Resultados de la medición de ATP sobre pintura mural tratada con <i>P. stutzeri</i>	30

ANEXOS

Anexo 2: Tabla 1. Batería de reacciones incluidas en la tira API 20E 40	40
Anexo 2: Tabla 2. Batería de reacciones incluidas en la tira API 20NE	40
Anexo 3: Tabla 3. Concentración de NaCl 5 M y EDTA 0.5 M en función de la concentración de formamida.....	45
Anexo 5: Tabla 4. Resultados de la hibridación de las sondas testadas.....	48
Anexo 5: Tabla 5. Resultados FISH en probeta de pintura mural para la detección de <i>P. stutzeri</i>	48
Anexo 5: Tabla 6. Resultados FISH en probeta de pintura mural para la detección de <i>P. stutzeri</i> pasadas tres semanas desde la aplicación de bacterias viables.....	49
Anexo 5: Tabla 7. Resultados FISH en pintura mural real para la detección de <i>P. stutzeri</i>	49

Índice de figuras

Figura 1. Proceso de desnitrificación	4
Figura 2. Modelo hipotético de la ruta de desnitrificación en <i>P. stutzeri</i> . Organización de los genes <i>nar</i> , <i>nir</i> , <i>nor</i> y <i>nos</i> . (Lalucat <i>et al.</i> , 2006)	5
Figura 3. Imagen de la distribución de la probeta 1	13
Figura 4. Imagen de la probeta 2 con eflorescencias salinas en su superficie	13
Figura 5. Esquema de la distribución y procesado de la toma de muestras de las secciones de la probeta.	15
Figura 6. Esquema de distribución de las tomas de muestra en la probeta	15
Figura 7. Alineamiento de la sonda STU2 en la base de datos NCBI	17
Figura 8. <i>P. stutzeri</i> DSM 5190 hibridada con la sonda PSE1284 marcada con Cy3 (rojo) (A) e hibridada con STU2 marcada con 6-FAM (verde) (B)	18
Figura 9. <i>P. stutzeri</i> CECT 930 hibridada con la sonda PSE1284 marcada con Cy3 (rojo) (A) e hibridada con STU2 marcada con 6-FAM (verde) (B)	18
Figura 10. <i>P. stutzeri</i> DSM 46326 hibridada con la sonda PSE1284 marcada con Cy3 (rojo) (A) e hibridada con STU2 marcada con 6-FAM (verde) (B)	18
Figura 11. <i>P. stutzeri</i> DSM 4166 hibridada con la sonda PSE1284 marcada con Cy3 (rojo) (A) e hibridada con STU2 marcada con 6-FAM (verde) (B)	19
Figura 12. <i>P. aeruginosa</i> CECT 10145 hibridada con la sonda PSE1284 marcada con Cy3 (rojo) (A) e hibridada con STU2 marcada con 6-FAM (verde) (B)	19
Figura 13. <i>P. fluorescens</i> CECT 378 hibridada con la sonda PSE1284 marcada con Cy3 (rojo) (A) e hibridada con STU2 marcada con 6-FAM (verde) (B)	19
Figura 14. <i>P. stutzeri</i> CECT 930 hibridada con la sonda STU2 antes (A) y después de la incubación en el medio DVC _{NAL} durante 16 horas (B)	20
Figura 15. DVC-FISH de <i>P. stutzeri</i> DSM 5190 (A) y CECT 930 (B) hibridadas con la sonda STU2	21
Figura 16. DVC-FISH de <i>P. stutzeri</i> DSM 4166 (A) y DSM 46326 (B) hibridadas con la sonda STU2	21
Figura 17. DVC-FISH de <i>P. stutzeri</i> DSM 5190 empleada para el tratamiento biolimpieza <i>in vitro</i> hibridada con la sonda STU2	22
Figura 18. FISH de las bacterias recién inoculadas sobre probeta 1 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2	24
Figura 19. FISH de las bacterias tras hora y media de biolimpieza sobre probeta 1 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2	24

Figura 20. FISH de las bacterias tras el lavado sobre probeta 1 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2	24
Figura 21. FISH de las bacterias recién inoculadas sobre probeta 2 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2	25
Figura 22. FISH de las bacterias tras hora y media de biolimpieza sobre probeta 2 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2	25
Figura 23. FISH de las bacterias tras el lavado sobre probeta 2 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2	25
Figura 24. DVC-FISH de las bacterias tras una semana desde la biolimpieza sobre probeta 1 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2	27
Figura 25. Incubación de las bacterias tras una semana desde la biolimpieza sobre probeta 1 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2	27
Figura 26. DVC-FISH de las bacterias tras una semana desde la biolimpieza sobre probeta 2 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2	27
Figura 27. Incubación de las bacterias tras una semana desde la biolimpieza sobre probeta 2 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2	28
Figura 28. DVC-FISH de las bacterias tras dos semanas desde la biolimpieza sobre probeta 1 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2	28
Figura 29. Incubación de las bacterias tras dos semanas desde la biolimpieza sobre probeta 1 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2	28
Figura 30. DVC-FISH de las bacterias tras dos semanas desde la biolimpieza sobre probeta 2 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2	29
Figura 31. Incubación de las bacterias tras dos semanas desde la biolimpieza sobre probeta 2 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2	29
Figura 32. Placa de contacto tomada de obra real	30

ANEXOS

Anexo 2: Figura 1. Tira API 20NE de <i>P. stutzeri</i> DSM 5190.....	41
Anexo 2: Figura 2. Identificación APIWEB de la tira API 20NE de <i>P. stutzeri</i> DSM 5190.....	41
Anexo 2: Figura 3. Resultados APIWEB de la tira API 20NE de <i>P. stutzeri</i> DSM 4166	42
Anexo 2: Figura 4. Patrón de metabolización de azúcares de <i>P. stutzeri</i> DSM 4166	42
Anexo 2: Figura 5. Identificación APIWEB de la tira API 20NE de <i>P. stutzeri</i> DSM 4166	42
Anexo 4: Figura 6. Laminocultivos correspondientes a la toma de muestra del cuadrado 1 (A) y 2 (B) en probeta 1	46

Anexo 4: Figura 7. Laminocultivos correspondientes a la toma de muestra del cuadrado 3 (A) y 4 (B) en probeta 1	46
Anexo 4: Figura 8. Laminocultivos correspondientes a la toma de muestra del cuadrado 2 (A) y 3 (B) en probeta 2	46
Anexo 4: Figura 9. Laminocultivo correspondiente a la toma de muestra del cuadrado 4 en probeta 2	47
Anexo 4: Figura 10. Laminocultivos correspondientes a la toma de muestra del cuadrado 5.1 (A) y 5.2 (B) en probeta 2	47
Anexo 4: Figura 11. Laminocultivo correspondiente a la toma de muestra del cuadrado 6 en probeta 2	47

Abreviaturas empleadas

6-FAM	6-carboxyfluoresceína
ATCC	American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)
ATP	Adenosín trifosfato
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares)
DVC	<i>Direct Viable Count</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization
G + C	Guanina + Citosina
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NTCT	National Collection of Type Cultures (Colección Nacional de Cultivos Tipo)
PBS	Tampón fosfato salino
PCA	Plate Count Agar
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehido
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
RPM	Revoluciones por minuto
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
URL	Unidades Relativas de Luz

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Biolimpieza

1.1.1 Biodeterioro

A lo largo de la historia el ser humano ha utilizado la pintura mural como una forma de expresión, sin embargo con el paso del tiempo éstas pasan por diversos procesos de deterioro, debido al propio envejecimiento o al incremento de contaminación ambiental que se ve acentuada en zonas urbanas, donde costras negras, depósitos de polvo así como residuos carbonosos pueden apreciarse en las superficies de las obras (Saiz-Jimenez 1995).

También pueden verse afectadas por una incorrecta restauración donde la aplicación de componentes de origen orgánico como colas animales, vegetales o caseínas pueden oscurecer, amarillear, descamar y en general modificar la estética del fresco llevando incluso a la pérdida de fragmentos (Bosch *et al.*, 2013).

Esta acumulación de materia orgánica que también puede proceder de la deposición de partículas atmosféricas o de restos de colonización de organismos, no solo produce daños en las obras sino que también puede servir como sustrato para la proliferación de microorganismos (Ranalli *et al.*, 2000).

Por otro lado, la formación de sales sobre las pinturas murales, es uno de los mecanismos más importantes en el deterioro de ambientes interiores; las sales una vez en el interior del muro o las pinturas, empiezan procesos de precipitación y crecimiento de cristales lo que desemboca en la generación de microfracturas. La nitrificación y la sulfatación pueden verse producidos también por movimientos de sales disueltas en agua que pueden migrar por capilaridad a través de los muros. El paso del tiempo y los factores ambientales pueden llevar al endurecimiento e insolubilización de estas sales, aumentando enormemente la dificultad para su eliminación (Doménech y Yusá, 2006).

1.1.2 Métodos tradicionales de restauración

Habitualmente los restauradores emplean tratamientos químicos usando, por ejemplo disolventes orgánicos o métodos mecánicos que afectan de manera negativa a las obras (Bosch y Ranalli, 2014), utilizando a su vez materiales tóxicos que inducen un riesgo añadido tanto por la introducción de dichas sustancias en el medio ambiente, como para los trabajadores que se exponen a ellas durante la restauración (Capitelli *et al.*, 2007).

Por ello es necesario el desarrollo de nuevas técnicas respetuosas con el medio ambiente y que no representen un sistema tóxico ni para la pintura ni el restaurador, así mismo para la eliminación de los depósitos indeseados que están fuertemente adheridos a la superficie de la obra, se requiere de métodos selectivos que no causen daños irreversibles a la pintura original (Cremonesi, 2004).

Pese a que los microorganismos han sido considerados como agentes deteriorantes por su participación en las alteraciones de las obras (Montes *et al.*, 1996; Poyatos, 2007; García, 2016), las evidencias como la limpieza en frescos (Ranalli *et al.*, 2005; Bosch *et al.*, 2013), la

eliminación de costras negras y sales en trabajos artísticos de piedra (Heselmeyer *et al.*, 1991; Ranalli *et al.*, 1997; Cappitelli *et al.*, 2006) o la bioconsolidación de material carbonoso (Castanier *et al.*, 1999; Tiano *et al.*, 1999; Bang *et al.*, 2001; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2003; Barabesi *et al.*, 2006; Sprocati *et al.*, 2007), ponen de manifiesto la positiva contribución de los microorganismos a los procesos de restauración de obras de arte en base a sus capacidades metabólicas (Mapelli *et al.*, 2012).

1.1.3 Biolimpieza

Se define así el término “Biolimpieza” como la aplicación de microorganismos o sus productos como agentes de limpieza biológica.

La biolimpieza se ha puesto en práctica siguiendo principalmente dos aproximaciones: la aplicación directa de cepas viables o bien el uso de enzimas, escogidos por su acción selectiva contra sustratos específicos (Grimaldi *et al.*, 2013).

Los primeros ensayos de limpieza con el uso de enzimas datan de 1976, donde Wendelbo utilizó la tripsina para despegar unas páginas de libros que habían sido pegadas con cola animal, al que le siguen otros ensayos para la restauración de pergaminos, (Segal y Cooper 1977), pinturas (Cremonesi 1999), esculturas (Bonomi, 1994), murales (Klein *et al.*, 2002; Beutel *et al.*, 2002) e incluso graffitis (Germinario *et al.*, 2017).

Sin embargo las alteraciones de las obras de arte son de diversa naturaleza y dada la especificidad de sustratos de los enzimas se requiere emplear una mezcla de estos, además es necesario mantener las condiciones óptimas para la actuación, las cuales no son siempre compatibles con el material a tratar, por ello las células bacterianas son una alternativa más eficaz, presentan una gran versatilidad respecto a la producción de enzimas y gracias a la inducción génica son capaces de atacar y degradar diferentes tipos de moléculas únicamente en presencia de las mismas (Ranalli *et al.*, 2005).

Además los tratamientos de biolimpieza no son invasivos ni agresivos con los materiales artísticos, y resultan más eficaces al requerir menor tiempo, menor número de aplicaciones, ser más económicos y representar una alternativa no tóxica y más segura con el medio ambiente (Lustrato *et al.*, 2012).

Esta aplicación de los microorganismos fue empleada por primera vez para la eliminación de sulfatos por Atlas (1988) quien utilizó *Desulfovibrio desulfuricans*, y desde entonces esta tecnología está siendo estudiada e investigada para resolver un gran rango de alteraciones artísticas mediante el uso de diversos microorganismos reductores de sulfato y nitratos, *D. desulfuricans*, *Desulfovibrio vulgaris* y *Pseudomonas stutzeri* entre otras (Heselmeyer *et al.*, 1991; Gauri *et al.*, 1992; Ranalli *et al.*, 2000, 2003, 2005; Cappitelli *et al.*, 2007; Polo *et al.*, 2010; Alfano *et al.*, 2011; Bosch *et al.*, 2012; Troiano *et al.*, 2013).

La principal precaución a considerar respecto a la aplicación de células bacterianas viables es que deben ser seguros, no patógenos y no esporulados con el fin de asegurar que no

representan un riesgo para los operarios y para garantizar la integridad de las obras (Grimaldi *et al.*, 2013).

Para aplicar un tratamiento de biolimpieza de manera eficaz lo primero de todo es caracterizar la composición de la alteración que se desee eliminar para poder seleccionar las bacterias que pueden degradarlo, las cuales se pueden aislar del ambiente, de los materiales artísticos o recurrir a las colecciones internacionales de microorganismos (Toriano *et al.*, 2014).

Se han empleado diferentes estrategias para la aplicación de las bacterias sobre la superficie a limpiar, desde la inmersión directa de la obra de arte en una solución de bacterias (Gauri *et al.*, 1992), la aplicación directa de las mismas, o con el fin de optimizar la actividad, utilizando un soporte que les permita contactar con la alteración sin dañar la superficie y que les proporcione las condiciones adecuadas para la actuación. Este soporte debe ser fácil y rápido de preparar, aplicar y eliminar (Bosch y Ranalli, 2014).

Todos los tratamientos de biolimpieza deben finalizar con una fase de lavado para eliminar lo máximo posible los restos del soporte sobre la superficie artística, comprobando que no queden restos bacterianos en ella, ya que podrían dañar la obra provocando efectos indeseados o favorecer la proliferación de otros microorganismos. Por lo tanto se hace de vital importancia la monitorización de los tratamientos tanto a corto como a largo plazo con el fin de verificar que no se han producido efectos negativos y que no quedan restos de las bacterias en las obras tratadas.

1.2. *Pseudomonas stutzeri*

1.2.1 Aspectos generales

Pseudomonas stutzeri fue descrita por primera vez por Burri y Stutzer en 1895 bajo el nombre de *Bacillus denitrificans* II, pero no fue hasta 1952 que van Niel y Allen definieron de manera precisa sus características fenotípicas y le otorgaron la designación final de *Pseudomonas stutzeri* propuesta por Lehman y Neumann (Lalucat *et al.*, 2006).

P. stutzeri pertenece al género *Pseudomonas sensu stricto*, y se encuentra en el grupo I de homología DNA-rRNA de Palleroni (Palleroni *et al.*, 1973), las cepas representan un grupo muy heterogéneo y están clasificadas en genomovares (grupos de homología DNA/DNA) (Lalucat *et al.*, 2006).

P. stutzeri es un bacilo con un diámetro de 0.5 µm y una longitud entre 1-3 µm, contiene un único flagelo polar, aunque en ocasiones puede presentar uno o dos flagelos laterales. Se trata de una bacteria Gram negativa, catalasa y oxidasa positiva con un metabolismo estrictamente respiratorio. Puede crecer en medios mínimos, sin requerimiento de factores de crecimiento, y pese a que ninguna de sus cepas resiste condiciones ácidas (< pH 4.5), tolera un gran rango de temperaturas, siendo descritas cepas que crecen a 4 °C y a 45 °C, pudiendo crecer en el cuerpo humano.

Son capaces de metabolizar compuestos de carbono raramente utilizados en otras *Pseudomonas* (el almidón, la maltosa o el etilenglicol son algunos ejemplos) y es capaz de usar una gran variedad de fuentes de nitrógeno (Bosch *et al.*, 2016) y a diferencia de otros miembros de *Pseudomonas spp.*, no produce pigmentos fluorescentes (Lalucat *et al.*, 2006). Sin embargo todas sus cepas se definen como desnitrificantes, pueden utilizar el nitrato como aceptor final de electrones e incluso algunas cepas son capaces de fijar el nitrógeno molecular y favorecer el crecimiento de las plantas (Pham *et al.*, 2017).

A nivel genético *P. stutzeri* consta de un cromosoma circular con un tamaño entre 3.75 y 4.64 Mb y un contenido G+C que oscila entre 60.7 a 66.3 mol% (Roselló *et al.*, 1991).

Respecto a su hábitat y relevancia ecológica, gracias a la gran diversidad fisiológica y bioquímica de *P. stutzeri* su distribución es casi universal y ocupa un gran número de nichos ecológicos diferentes. Generalmente se aíslan del medio ambiente, siendo localizadas cepas de la bacteria en aguas subterráneas, suelos, aguas marinas y aguas residuales (Lalucat *et al.*, 2006) y aunque poco común, también se detecta su presencia en muestras clínicas (Holmes, 1986), pero rara vez causa enfermedades; estudios realizados en la década de los 50 no presentaron ningún tipo de asociación clara entre este agente infeccioso y el proceso del cual fue aislado (Noble y Overman, 1994), por lo que su aparición en procesos infecciosos de interés clínico es el de bacteria oportunista (Molgatini *et al.*, 2017), siendo las principales entidades susceptibles aquellos pacientes inmunocomprometidos o con enfermedades subyacentes (Kin *et al.*, 2014).

1.2.2 Desnitrificación

La desnitrificación es un proceso metabólico llevado a cabo por bacterias en los que el óxido de nitrógeno actúa como aceptor final de electrones para obtener energía. El proceso ocurre en cuatro pasos sucesivos, donde varias proteínas catalizan la reducción de NO_3^- a NO_2^- , NO y finalmente de N_2O a N_2 (Grosz *et al.*, 2017) como se observa en la figura 1:

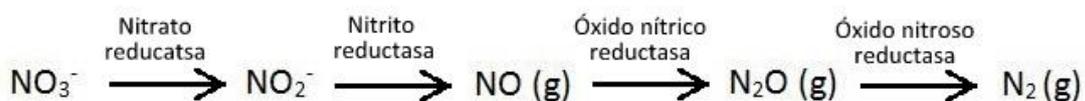


Figura 1. Proceso de desnitrificación

P. stutzeri es una de las bacterias más desnitrificantes que en mayor medida ha aportado a la caracterización bioquímica y genética de este proceso y es considerada como un organismo modelo para su estudio (Zumf *et al.*, 1997).

Son necesarios alrededor de 50 genes para codificar las estructuras participantes en el proceso de desnitrificación, los cuales se localizan en el cromosoma de *P. stutzeri* (Vollack *et al.*, 1998).

Son los genes *nar*, que codifican las nitrato reductasas desasimilatorias, los genes *nir*, codifican para la nitrito reductasa, genes *nor*, codifican para óxido nítrico reductasa y los genes *nos*, que codifican para la óxido nitroso reductasa. Los genes *nar* no se encuentran ligados a los demás genes de la desnitrificación que se hayan en un cluster de 30 kB (Lalucat *et al.*, 2006) (figura 2).

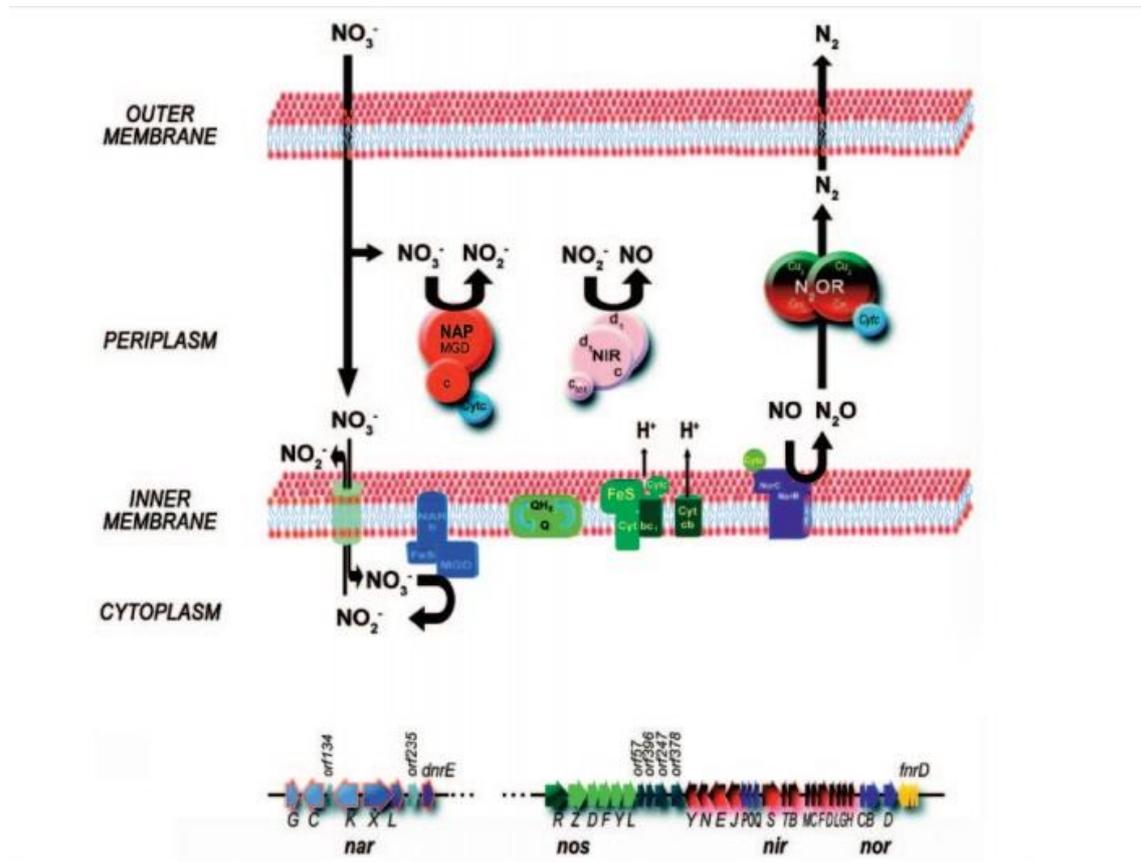


Figura 2. Modelo hipotético de la ruta de desnitrificación en *P. stutzeri*. Organización de los genes *nar*, *nir*, *nor* y *nos*. (Lalucat *et al.*, 2006)

- NAP: Nitrato reductasa periplásmica
- NIR: Nitrito reductasa
- NOR: Óxido nítrico reductasa

1.2.3 Aplicaciones biotecnológicas

Al igual que otras *Pseudomonas*, *P. stutzeri* está involucrada en diferentes actividades metabólicas de relevancia para el medio ambiente, lo que la hace ideal para el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas.

Por ejemplo, *P. stutzeri* ha desarrollado sistemas para asegurar la disponibilidad de metales esenciales y a su vez lidiar con los metales tóxicos mediante sideróforos (Stolworthy *et al.*, 2001), además varias cepas se han descrito con un gran potencial de bioabsorción y resistencia a ciertos metales (Arlinger *et al.*, 2004).

También es capaz de degradar derivados del petróleo (Hou *et al.*, 2004), hidrocarburos aromáticos (Singh y Tiwary, 2017) y biocidas (Jude *et al.*, 2004).

Pero la aplicación a destacar, y en la que se centra este trabajo es su aplicación al ámbito de la biorrestauración. La cepa A29 de esta bacteria ya ha sido exitosamente empleada en frescos para eliminar cola animal (Ranalli *et al.*, 2005), y la cepa DSM 5190 se ha empleado con el mismo fin obteniendo resultados igual de satisfactorios (Bosch *et al.*, 2013).

Además, aprovechando la capacidad desnitrificante de la bacteria se ha visto su eficacia en la eliminación de eflorescencias salinas insolubles difíciles de eliminar mediante los métodos tradicionales (Bosch *et al.*, 2013).

1.3 Métodos de detección de bacterias en tratamientos de biolimpieza

Los métodos habitualmente utilizados para el seguimiento y control de la viabilidad de las bacterias son métodos de microbiología clásica como el uso de placas de contacto para un posterior recuento de colonias e identificación mediante pruebas bioquímicas como tiras API (Lustrato *et al.*, 2012). Otros autores complementan con la medida de ATP por bioluminiscencia (Unković *et al.*, 2015) obteniendo un resultado expresado en Unidades Relativas de Luz (URL), un método rápido pero no específico.

Recientemente los métodos moleculares se han ido implementando, como la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permiten amplificar regiones específicas presentes en *P. stutzeri*, generalmente del gen que codifica el rRNA 16S (Muñoz, 2015).

1.3.1 Detección mediante hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH)

La hibridación *in situ* es un método molecular que permite la detección y localización de secuencias específicas basándose en la hibridación de los ácidos nucleicos cuando existe complementariedad entre sus secuencias.

En la técnica FISH se hace uso de una sonda marcada por fluorescencia que permite detectar las secuencias con las que hibrida específicamente sin dañar a la célula mediante visualización bajo el microscopio de fluorescencia (Stanyon, 2017). Estas sondas se diseñan generalmente para regiones del RNA ribosómico 16S o 23S por su estabilidad, su estructura y su elevado número de copias lo que permite una amplificación de la señal, haciéndola fácilmente detectable (Groben y Medlin, 2005). Presentan una longitud entre 18-25 pares de bases (Frickmann *et al.*, 2017), deben ser específicas para las secuencias para las que han sido diseñadas, y para asegurar esta especificidad hay dos parámetros determinantes: la temperatura –que suele mantenerse constante- y la concentración de formamida en el tampón de hibridación, que es por lo general el parámetro que permite ajustar las condiciones de astringencia en la reacción de hibridación (Riou *et al.*, 2017).

Esta técnica es una herramienta rápida, sencilla y sobre todo muy específica que permite detectar e identificar microorganismos en diferentes ambientes a nivel de género y especie.

Pese a la eficacia de la técnica, en la bibliografía apenas se encuentra información de su uso para la detección de *P. stutzeri*; debido a la heterogeneidad existente entre sus cepas, la tarea de diseñar una sonda específica contra regiones conservadas en todas las cepas que difiera del resto de especies es complicada. Amann *et al.* (1996) logró diseñar dos sondas complementarias al rRNA 16S, sin embargo mostraban complementariedad con otras *Pseudomonas*; en un trabajo anterior, en nuestro laboratorio, Campayo (2014) diseñó una sonda que permitía la detección específica de la cepa DSM 5190 de *P. stutzeri*.

1.3.2 Detección de formas viables mediante *Direct Viable Count* (DVC)

El uso de la técnica FISH ha sido tema de controversia entre muchos autores pues debido a la persistencia de los ácidos nucleicos en las células tras la muerte, la correlación entre la presencia de RNA y la viabilidad no está del todo clara (Uyttendaele *et al.*, 1997; Keer y Birch, 2003).

Se desarrolla por ello la técnica *Direct Viable Count* (DVC) que permite diferenciar las células viables de las no viables. Las células se incuban en presencia de un antibiótico que actúa como inhibidor de la DNA girasa, inhibiendo por tanto la síntesis de DNA sin afectar al resto de las actividades metabólicas; como resultado, al no poder tener lugar la división celular debido a la presencia del antibiótico, las células viables aparecen elongadas y pueden diferenciarse de las no viables (García-Hernández *et al.*, 2012). Las células se consideran viables cuando presentan al menos el doble de longitud que el tamaño original (Moreno *et al.*, 2012).

Este método fue por primera vez descrito por Kogure *et al.*, en 1979 para la enumeración de bacterias viables en un ambiente marino.

La técnica DVC puede combinarse con la de FISH para la detección específica de células viables (DVC-FISH) (Rohde *et al.*, 2017) y fue puesta a punto para la detección de formas viables de *P. stutzeri* DSM 5190 por Campayo (2014).

Aun con el potencial que presentan ambas metodologías y las ventajas que ofrecen frente a los métodos clásicos de microbiología, no se encuentra publicado ningún trabajo que utilice estas técnicas para la detección de las bacterias empleadas en biolimpieza.

2. OBJETIVOS

En los últimos años, se ha acrecentado el interés por las investigaciones en el campo de la biolimpieza, sin embargo, la utilización de bacterias vivas sigue creando la duda de su pervivencia después del tratamiento. Aunque teóricamente las bacterias no sobreviven a la falta de agua del sustrato, se necesita la puesta a punto de protocolos que nos ayuden a detectar la presencia de estas bacterias y su viabilidad a lo largo del tiempo. En estos momentos sólo se dispone de métodos clásicos de microbiología para este fin, por lo que se hace necesaria la investigación en métodos moleculares mucho más específicos y fiables, a la vez que más rápidos.

El Departamento de Biotecnología de la UPV está actualmente colaborando con el Departamento de Conservación y Restauración de Bienes Culturales para optimizar el uso de *P. stutzeri* como agente de biolimpieza de eflorescencias salinas y otras alteraciones en pinturas murales.

En este trabajo, se aborda la necesidad de estudios de métodos moleculares para la detección de *Pseudomonas stutzeri* en los trabajos de biolimpieza sobre pinturas murales, en concreto las técnicas FISH y DVC-FISH. Para ello se han definido los siguientes objetivos:

1. Estudiar la especificidad de una sonda diseñada para la detección de la cepa DSM 5190 en otras cepas de *Pseudomonas stutzeri*.
2. Evaluar la técnica DVC-FISH descrita para *P. stutzeri* DSM 5190 en otras cepas de la misma.
3. Monitorizar la presencia de *P. stutzeri* mediante la simulación del tratamiento de biolimpieza *in vitro* sobre probeta de pintura mural valorando la eficacia de los diferentes métodos y materiales de toma de muestra.
4. Examinar la presencia de *P. stutzeri* en pinturas murales tratadas en julio de 2016.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas

Para la realización de este trabajo se utilizaron diversas cepas de *P.stutzeri* (siendo la principal la cepa de *Pseudomonas stutzeri* DSM 5190, aplicada en los tratamientos de biolimpieza), además de otras especies del género *Pseudomonas* así como otras cepas disponibles en el laboratorio a modo control (tabla 1).

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas

- ¹ DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares)
- ² CECT: Colección Española de Cultivos Tipo
- ³ ATCC: American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo)
- ⁴ NCTC: National Collection of Type Cultures (Colección Nacional de Cultivos Tipo)

Especie Bacteriana	Cepa	Origen
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	5190	DSM ¹
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	4166	DSM
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	46326	DSM
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	930	CECT ²
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	378	CECT
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10145	ATCC ³
<i>Salmonella entérica</i>	4266	CECT
<i>Escherichia coli</i>	101	CECT
<i>Legionella pneumophila</i>	12821	NCTC ⁴

Las cepas se mantuvieron a -80°C en cuentas de vidrio y viales al 20% de glicerol para el almacenamiento y la conservación de las mismas, permitiendo su recuperación en cualquier momento en caso de que fuera necesario.

Los cultivos de *P. stutzeri* se realizaron en Plate Count Agar (PCA), Nutrient Broth (caldo común) (anexo 1) durante 48 horas a 28°C, dependiendo del posterior uso que se fuera a hacer de dicho cultivo.

El resto de bacterias incluidas en el trabajo se sembraron y se incubaron en las condiciones óptimas para las mismas, según el manual de la colección de cultivos tipo de la que procedieran.

3.2. Sistemas de identificación multipuebas

Para la identificación de las bacterias se utilizaron tiras API20E/NE dependiendo del tipo de bacteria a identificar. Cada tira consta de 20 pocillos con distintos sustratos deshidratados, la identificación consta de 21 pruebas bioquímicas (anexo 2, tabla 1 y tabla 2), la prueba de la citocromo oxidasa se hace de manera independiente a la tira siendo necesaria su realización como paso previo con el fin de discriminar si la bacteria es *Enterobacteriaceae* o no, las *No-Enterobacteriaceae* son citocromo oxidasa positivas y las *Enterobacteriaceae*, negativas.

Se procede a rellenar la tira con el protocolo que incorpore la casa comercial, así como el tiempo de incubación a la temperatura requerida y se procede a la lectura de positivos y negativos en la base de datos.

La identificación positiva para *P. stutzeri* puede verse en el anexo 2, figuras 1-5.

3.3. Hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH)

3.3.1 Sondas

Para la detección del género *Pseudomonas* se empleó la sonda PSE1284, complementaria para una región específica del rRNA 16S (Gunasekera *et al.*, 2003), cuya secuencia se encuentra a continuación:

PSE1284: 5' –GATCCGGACTACGATCGGTTT- 3'

La sonda fue marcada con el fluorocromo Cy3, que emite en el espectro rojo, por Fisher Scientific.

Para la detección de *P. stutzeri* en este trabajo se empleó la sonda STU2 diseñada por Campayo (2014) basada en la secuencia del gen rRNA 23S de la cepa DSM 5190 ya que demostró ser altamente específica para la detección de *P. stutzeri* mediante FISH. La secuencia de la sonda es:

STU2: 5'-GCGTTGAACCCGTAGCTTCGGTGCA-3'

La sonda fue marcada con el fluorocromo 6-carboxyfluoresceína (6-FAM), que emite en el espectro verde, por Fisher Scientific.

3.3.2 Condiciones de fijación

Con el fin de fijar bacterias Gram negativas se tomó 1 mL de las muestras crecidas en medio Nutrient Broth, centrifugándose a 8000 rpm durante 8 minutos; se resuspendió el pellet en PBS 1X (anexo 3) (la cantidad de PBS 1X se añade en función del sedimento formado).

A continuación se realizó un lavado centrifugado eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en PBS 1X y PFA (anexo 3) en proporción 1:3. Se mantuvo durante un mínimo de 3 horas en la nevera a 4°C.

Tras el tiempo de refrigeración se realizaron de uno a dos lavados con PBS1X para eliminar el PFA. Tras ello se resuspendió el pellet en PBS 1X y etanol -20°C en proporción 1:1 y se almacenó a -20°C (Wallner *et al.*, 1993).

3.3.3 Condiciones de hibridación

Tras la fijación de las muestras, se tomó un portaobjetos de teflón previamente tratado con gelatina (anexo 3) y se depositó sobre los pocillos 5 µL de muestra; a continuación se dejó secar y se procedió con las deshidrataciones sucesivas, sumergiendo el portaobjetos en soluciones acuosas de etanol 50, 80 y 100% durante 3 minutos cada uno (anexo3).

Tras las deshidrataciones se dejó secar al aire y se cubrieron los pocillos con 10 µl de solución de hibridación al 30% de formamida (anexo 3) conteniendo 50ng de cada sonda marcada con el fluorocromo correspondiente.

El portaobjetos se introdujo en posición horizontal en una cámara de hibridación que contenía una base de celulosa previamente humedecida con la solución de hibridación restante con el fin de generar una atmósfera húmeda.

La reacción de hibridación se llevó a cabo a 46°C en oscuridad durante un total de 1.5 horas. Transcurrido el tiempo de hibridación, se lavó el portaobjetos con una solución de lavado (anexo 3) atemperada a 48°C; primero se procedió a verter una pequeña cantidad de solución sobre el portaobjetos para arrastrar el tampón de hibridación y a continuación se procedió a sumergir el portaobjetos en el contenedor de la solución de lavado para eliminar restos de sonda no unidos. El tiempo de lavado fue de 15 minutos a 48°C en oscuridad (Amann *et al.*, 1990).

Tras el lavado, el portaobjetos se limpió con agua destilada y se dejó secar al aire en oscuridad. Tras el secado se aplicó Vectashield Mountain Media for Fluorescence (Vector Laboratories) en la superficie del portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos. Una vez montado el portaobjetos se procedió a la visualización mediante un microscopio de fluorescencia Olympus BX 50 con filtros U-MWB, U-MWIB y U-MWIG a un aumento de x100.

Es posible la conservación de los portaobjetos mediante congelación para poder ser visualizado en cualquier otro momento.

3.4. DVC-FISH

Para diferenciar entre células viables y no viables de *P. stutzeri* se empleó la técnica combinada de FISH con *Direct Viable Count* (DVC) en donde se emplea un antibiótico que impide la división celular, pudiéndose observar por lo tanto células elongadas.

Se utilizó un cultivo de las diferentes cepas de *P. stutzeri* crecidas en medio Nutrient Broth durante 24 horas a 28°C. El cultivo se centrifugó a 8500 rpm durante 10 minutos y se resuspendió en PBS 1X. Es importante remarcar que cuando el cultivo de bacterias está muy concentrado ($>10^8$ UFC/mL) la técnica DVC no funciona de la manera deseada; por lo que se requiere hacer las diluciones necesarias (Campayo, 2014).

Como medio DVC se preparó caldo LB (anexo 1) diluido 10X y se le incorporó el antibiótico ácido nalidíxico (20 µg/mL) (DVC_{NAL}, anexo 1).

Para la incubación se añadió 1 mL de la suspensión de bacterias en PBS 1X a 9 mL de medio DVC y se mantuvo a 28°C durante 16 horas, tras las cuales se procedió a la centrifugación de los tubos a 8000 rpm durante 8 minutos, resuspendiendo los pellets en 1mL PBS 1X procediendo a su fijación e hibridación como se postula en los apartados anteriores, con el fin de poder hacer el análisis por FISH de las muestras. Inmediatamente después de la inoculación es necesario fijar alícuotas como control.

Tanto el tiempo de incubación como el antibiótico seleccionado habían resultado los más favorables de las condiciones ensayadas para la elongación de las células de *P. stutzeri* DSM 5190 según Campayo (2014).

3.5. Aplicación *in vitro*: Monitorización de la presencia de *Pseudomonas stutzeri* sobre probeta de pintura mural. Valoración de la eficacia de los diferentes métodos y materiales de toma de muestra.

3.5.1 Elaboración y distribución de las probetas

Para poder monitorizar la presencia de las bacterias durante los tratamientos de biolimpieza se simularon pinturas murales en probetas de arcilla (figura 3 y 4).

En una de ellas se simularon eflorescencias salinas basándose en la norma UNE-EN 12370 (1999): “Métodos de ensayo para piedra natural. Determinación de la resistencia a cristalización de sales”. Se introduce la probeta en estufa a 60-100°C hasta formarse una masa constante, a continuación se sumerge hasta un medio de su longitud en una solución de Nitrato de potasio saturada durante un tiempo de dos horas. Se vuelve a introducir en la estufa 60-100°C seis horas y se mantiene a temperatura ambiente alrededor de 13 horas. El proceso se repite un total de tres veces hasta observarse las eflorescencias salinas de color blanquecino en la superficie (figura 4) (Bosch *et al.*, 2010).

Cada baldosa fue dividida en 6 porciones de 100 cm², con el fin de hacer seguimiento del proceso a diferentes tiempos:

1. Antes de la inoculación
2. Tras la inoculación
3. Hora y media después del tratamiento de biolimpieza (antes de lavar)
4. Hora y media después del tratamiento de biolimpieza (después de lavar)
5. Una semana después del tratamiento de biolimpieza
6. Dos semanas después del tratamiento de biolimpieza

A su vez las diferentes porciones estaban divididas en más secciones para obtener muestras mediante diferentes técnicas (apartado 3.5.3) (figura 5).

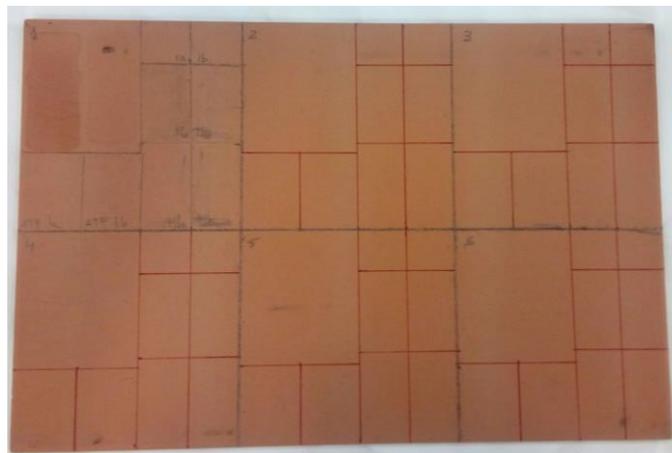


Figura 3. Imagen de la distribución de la probeta 1



Figura 4. Imagen de la probeta 2 con eflorescencias salinas en su superficie

3.5.2 Obtención del cultivo

Para la obtención de la suspensión bacteriana de *P. stutzeri* DSM 5190 utilizada para el tratamiento de biolimpieza se sembraron las bacterias en placas de PCA, incubándose a 28°C durante 48 horas, tras las cuales se inoculó el cultivo en un matraz de 100 mL de Nutrient Broth en agitación 100 RPM 48 horas, 28°C. Transcurrido ese tiempo se tomó una porción de 10 mL que se inocularon nuevamente en un matraz de 300 mL de Nutrient Broth en agitación 100 RPM 48 horas, 28°C.

Tras ello se procedió a la recogida de las bacterias mediante centrifugación a 4000 RPM durante 10 minutos, 3 veces, lavando los pellets con NaCl 0.8% (anexo 1) y resuspendiendo finalmente en agua estéril. La solución obtenida se guardó en nevera a 4°C hasta su uso (Kasana *et al.*, 2008).

Se realizaron diluciones decimales y siembra en profundidad por duplicado para conocer la concentración de bacterias final (UFC/mL) con la que se trabajaba mediante recuento de placas tras la incubación a 28°C, 48 horas.

3.5.3 Toma de muestras

Para la monitorización de la presencia de las bacterias a diferentes tiempos del tratamiento de biolimpieza, se tomaron muestras de diferentes formas por duplicado para poder establecer comparaciones y validar la más eficaz.

Se tomaron muestras mediante laminocultivos con PCA (anexo 1) para un análisis microbiológico tradicional, los cuales fueron cultivados a 28°C, 48 horas. También se hicieron mediciones de ATP mediante el sistema 3M™ Clean-Trace Surface ATP UXL100 que dispone de hisopos de superficie para la toma de la muestra, así como se recogieron muestras mediante torundas estériles y bisturí para análisis mediante FISH o DVC-FISH según procediera, cerciorándose de que las bacterias adheridas se soltaran de su soporte mediante el empleo del vórtex. En el caso de considerarse necesario se enriquecieron las muestras mediante su inoculación en 1mL de caldo común dejándose incubar a 28°C 48 horas, tras las cuales se procedería a su fijación e hibridación como ya se ha mencionado en apartados anteriores.

En las figuras 5 y 6 se encuentra un esquema de la distribución y procesado de las diferentes tomas de muestra sobre la probeta.

Se aplicaron las bacterias en todos los cuadrados mediante un pincel estéril, salvo en el caso del primero, el cual corresponde a la muestra tomada antes de la inoculación de las bacterias. A continuación de la inoculación se recogieron las muestras del cuadrado número 2 y se aplicó una capa de agar al 2% a modo de superficie humectante (anexo 1).

Las bacterias actuaron durante un tiempo total de hora y media a 28°C; tras el tratamiento se tomaron las muestras del cuadrado 3 y se procedió a su limpieza con agua estéril. Posterior al lavado se tomaron las muestras del cuadrado 4. Pasadas una y dos semanas desde el tratamiento, se tomaron las muestras de los cuadrados 5 y 6 respectivamente.

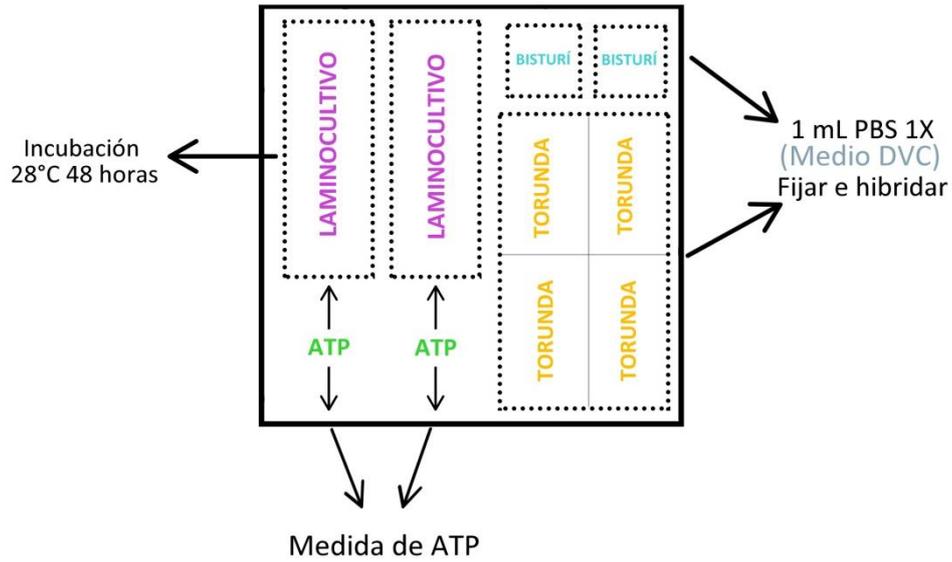


Figura 5. Esquema de la distribución y procesamiento de la toma de muestras de las secciones de la probeta

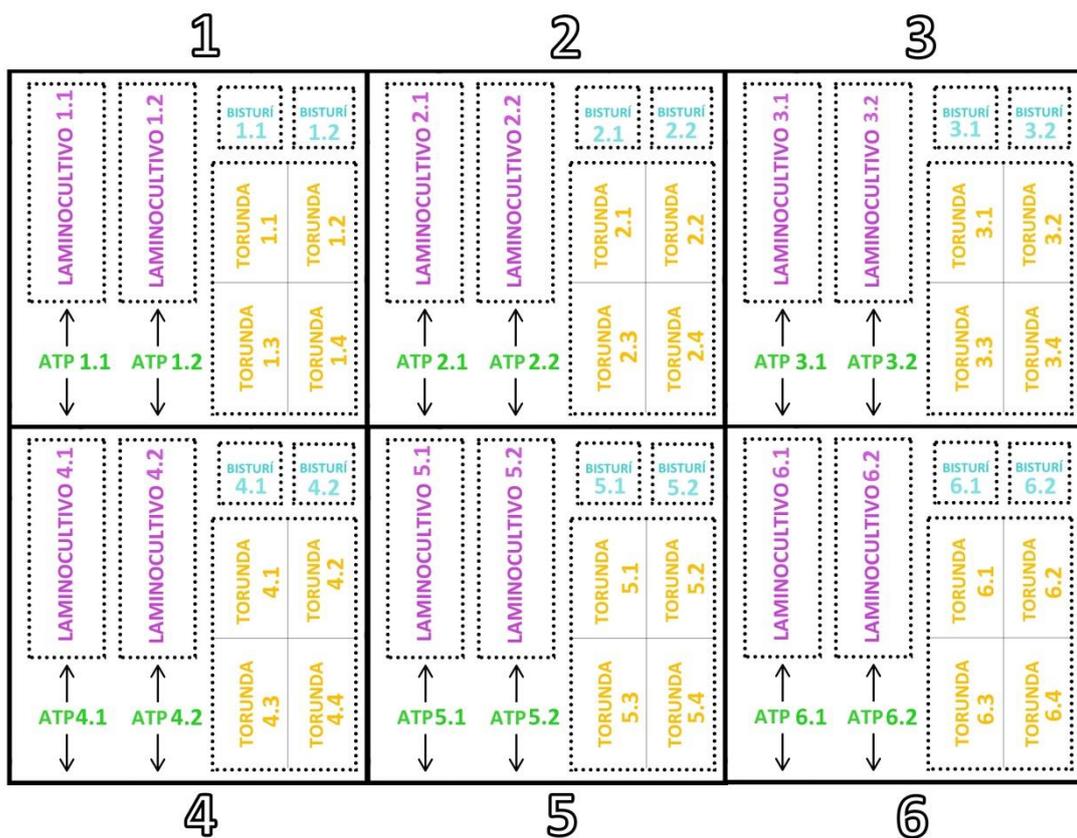


Figura 6. Esquema de distribución de las tomas de muestra en la probeta

3.6. Toma de muestras procedentes de pinturas murales

Las muestras fueron tomadas de la misma manera que en el apartado 3.5.3, con hisopos de superficie para la medida de ATP, placas rodac de PCA en sustitución de los laminocultivos - siendo igualmente incubadas a 28°C durante 48 horas- y torundas y bisturí para el análisis por DVC-FISH.

La toma de muestras se realizó en pinturas murales tratadas previamente con *P. stutzeri* en julio de 2016. Se tomaron tres muestras en las zonas correspondientes a la inoculación de la bacteria, así como una muestra adyacente a esta zona, por la posible migración que podría haber tenido lugar y que habría desplazado a las bacterias. También se tomó una muestra a modo de control negativo en una zona alejada del área de aplicación de *P. stutzeri*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Detección mediante hibridación *in situ* con sondas fluorescentes (FISH)

Uno de los objetivos de este trabajo fue comprobar la especificidad de la sonda STU2 diseñada para la detección de la cepa DSM 5190 de *Pseudomonas stutzeri*.

El alineamiento de la secuencia STU2 con la base de datos de nucleótidos del NCBI mostró su validez teórica (figura 7), ya que mostró complementariedad con varias cepas de la especie y no mostró alineamientos con otras especies del género.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Pseudomonas stutzeri strain ATCC 17588 23S ribosomal RNA gene, complete sequence	50.1	50.1	100%	6e-04	100%	NR_103974.1
Pseudomonas stutzeri strain A1501 23S ribosomal RNA gene, complete sequence	50.1	50.1	100%	6e-04	100%	NR_076417.1
Pseudomonas stutzeri strain CGMCC 1.1803, complete genome	50.1	200	100%	6e-04	100%	CP002881.1
Pseudomonas stutzeri DSM 4166, complete genome	50.1	200	100%	6e-04	100%	CP002622.1
Pseudomonas stutzeri A1501, complete genome	50.1	194	100%	6e-04	100%	CP000304.1
Pseudomonas stutzeri strain SLG510A3-8, complete genome	48.1	192	96%	0.003	100%	CP011854.1

Figura 7. Alineamiento de la sonda STU2 en la base de datos NCBI

Posteriormente se llevó a cabo la técnica FISH con diferentes cepas de *P. stutzeri* así como otras cepas del género *Pseudomonas* y diversas cepas de otras especies a modo de control negativo (tabla 1 del apartado 3.1 en materiales y métodos) para estudiar a nivel experimental la especificidad de la sonda STU2.

En las figuras 8, 9, 10 y 11 se observa como tanto la sonda de PSE1284 utilizada a modo de control, como la sonda STU2 hibridan con todas las cepas de *P. stutzeri* que fueron testadas, por lo que se determina que la sonda no es específica para la cepa para la que fue diseñada y que presenta complementariedad con al menos las que se presentan en este trabajo. Sin embargo no se puede confirmar que la sonda hibride con todas las cepas de la especie, ya que la dificultad de diseñar una sonda específica de la especie *P. stutzeri* ya fue discutida por Amann *et al.* (1996) que lo atribuye a la gran heterogeneidad existente entre cepas.

En los casos de los controles, la sonda STU2 no hibrida con otras especies del género *Pseudomonas* (figuras 12 y 13) y como cabía esperar, en los controles negativos no se observan hibridaciones con ninguna de las sondas, lo que ratifica la especificidad de la sonda STU2 para *P. stutzeri*. Los resultados de la hibridación con las sondas testadas pueden consultarse en la tabla 4 del anexo 5.

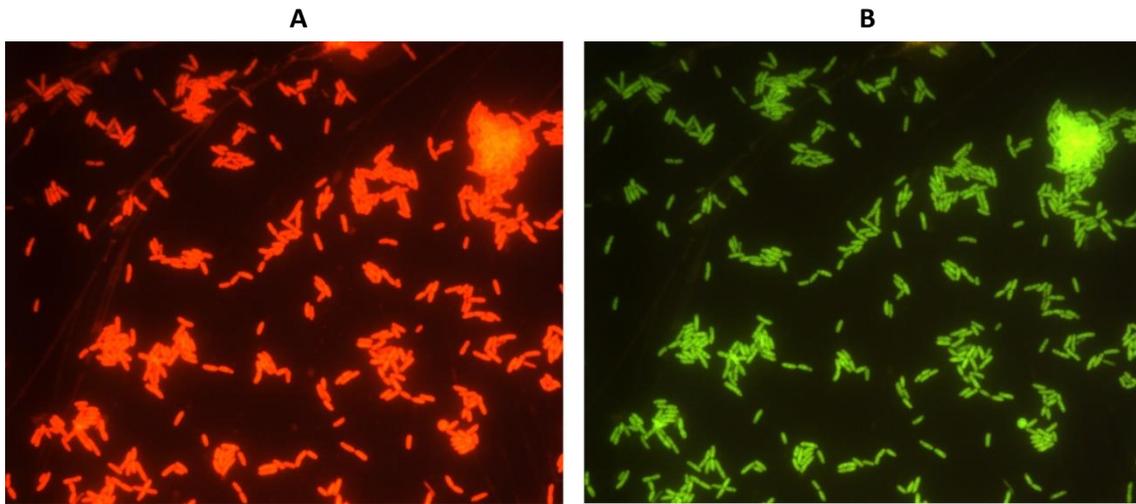


Figura 8. *P. stutzeri* DSM 5190 hibridada con la sonda PSE1284 marcada con Cy3 (rojo) (A) e hibridada con STU2 marcada con 6-FAM (verde) (B)

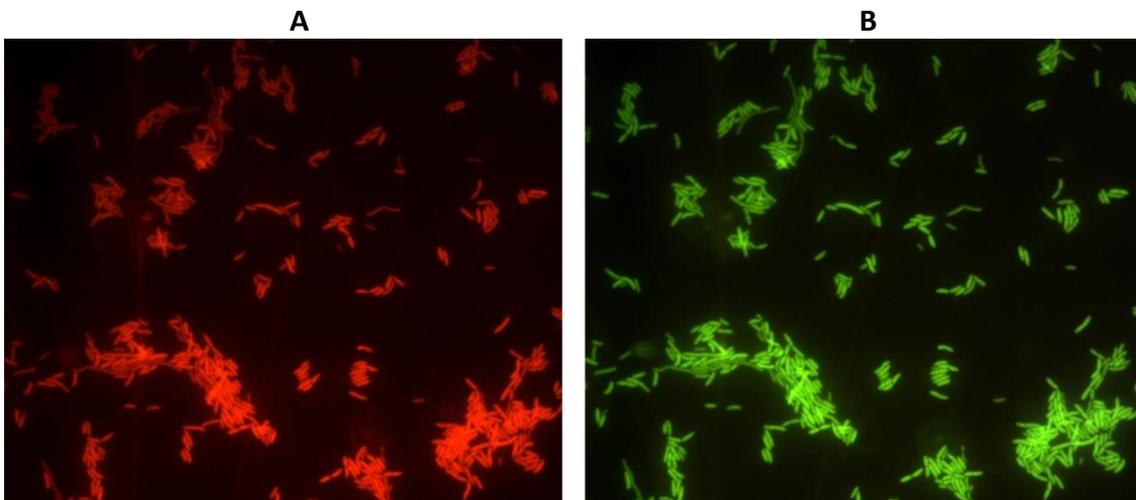


Figura 9. *P. stutzeri* CECT 930 hibridada con la sonda PSE1284 marcada con Cy3 (rojo) (A) e hibridada con STU2 marcada con 6-FAM (verde) (B)

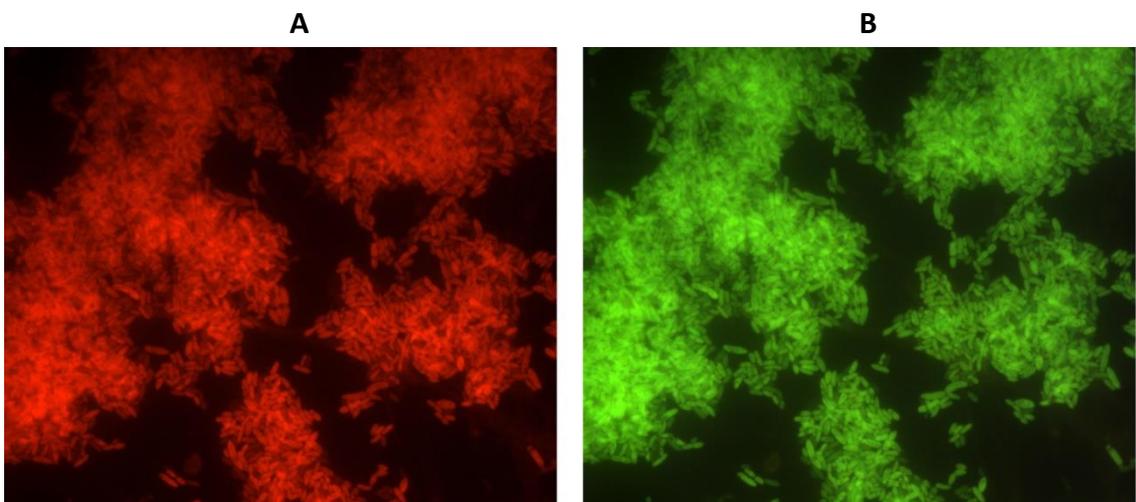


Figura 10. *P. stutzeri* DSM 46326 hibridada con la sonda PSE1284 marcada con Cy3 (rojo) (A) e hibridada con STU2 marcada con 6-FAM (verde) (B)

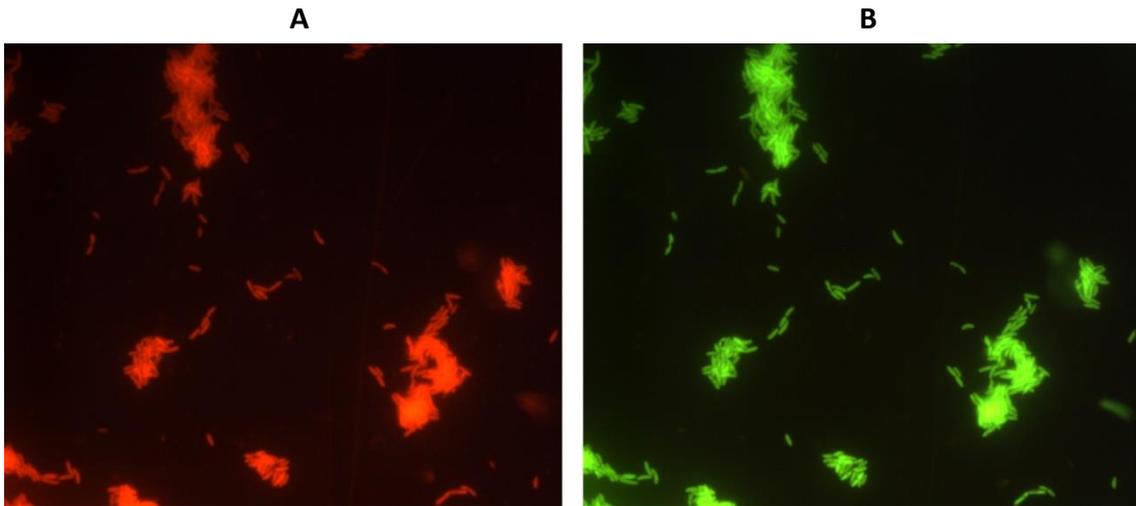


Figura 11. *P. stutzeri* DSM 4166 hibridada con la sonda PSE1284 marcada con Cy3 (rojo) (A) e hibridada con STU2 marcada con 6-FAM (verde) (B)

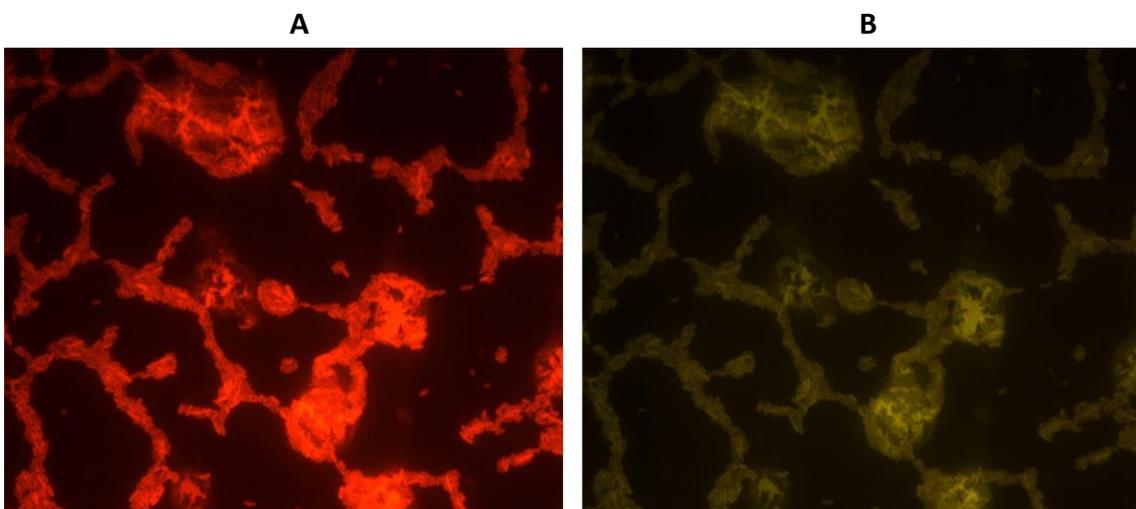


Figura 12. *P. aeruginosa* CECT 10145 hibridada con la sonda PSE1284 marcada con Cy3 (rojo) (A) e hibridada con STU2 marcada con 6-FAM (verde) (B)

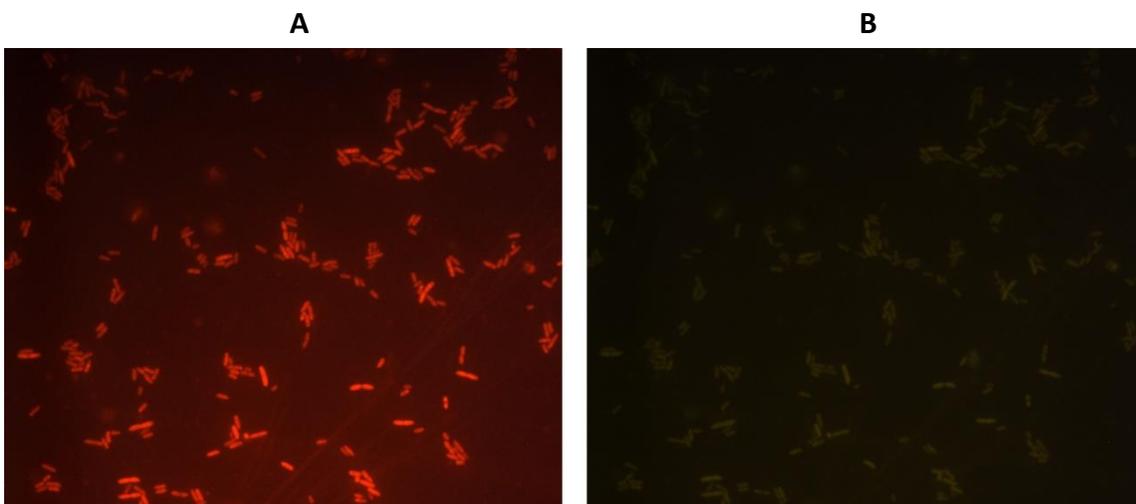


Figura 13. *P. fluorescens* CECT 378 hibridada con la sonda PSE1284 marcada con Cy3 (rojo) (A) e hibridada con STU2 marcada con 6-FAM (verde) (B)

4.2 Detección de formas viables mediante *Direct Viable Count*

Para la evaluación de la técnica DVC-FISH se procedió a la incubación de las diferentes cepas de *P. stutzeri* en medio DVC_{NAL} durante 16 horas, condiciones óptimas para la elongación de células de la cepa DSM 5190, según estipula Campayo (2014); también se tuvo en cuenta que la concentración de células resulta limitante para la técnica, pues a una elevada concentración de células la concentración de antibiótico puede resultar insuficiente para inhibir la división de las células; por ello para este trabajo se realizaron diluciones de 10^{-2} para obtener los resultados deseados.

En las figuras 14 y 15 se observa como el protocolo ensayado inhibe satisfactoriamente la división de las células en el caso de las cepas DSM 5190 y CECT 930, pues se encuentran células elongadas que doblan su longitud original, requisito indispensable para considerarlas viables; sin embargo en las cepas DSM 4166 y 46326 (figura 16) no se observó ningún tipo de elongación significativo.

Las diferencias existentes entre las cepas pueden llevar al desarrollo de resistencia al antibiótico seleccionado, que ya ha sido descrito en la bibliografía para otras especies de *Pseudomonas* (Rella y Haas, 1982). Con el fin de comprobar la posible resistencia al antibiótico y descartar que las células no fueran viables se recurrió al métodos clásicos de microbiología de cultivo en placa (Keer y Birch, 2003). Se tomaron muestras procedentes del caldo crecido utilizado para el DVC de ambas cepas mediante torundas estériles y se sembraron en placas de PCA que se incubarán a 28°C durante 48 horas. En ambos casos se obtuvo crecimiento por lo que se descarta que la ausencia de elongación fuera la no viabilidad de las bacterias utilizadas.

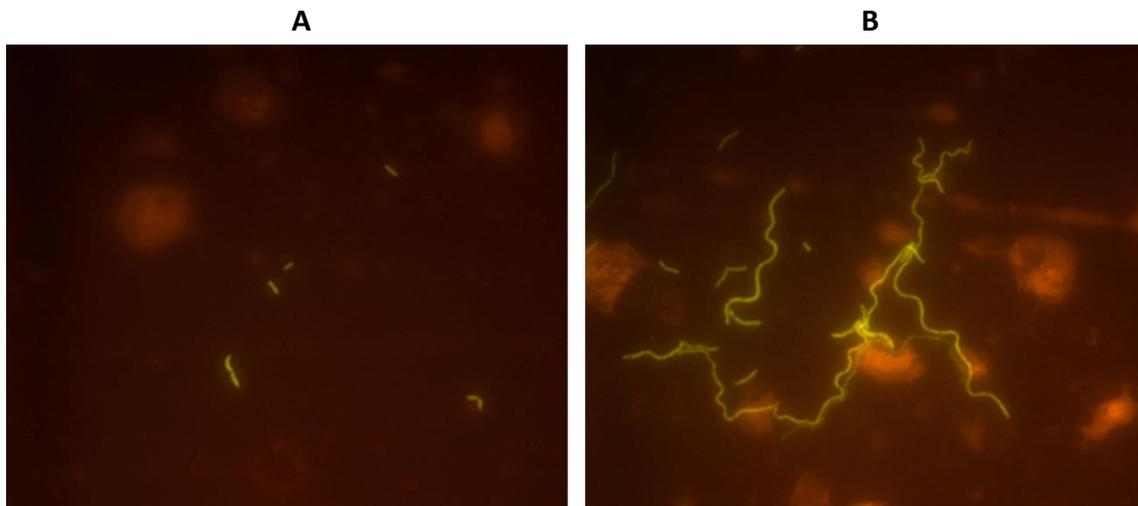


Figura 14. *P. stutzeri* CECT 930 hibridada con la sonda STU2 antes (A) y después de la incubación en el medio DVC_{NAL} durante 16 horas (B)

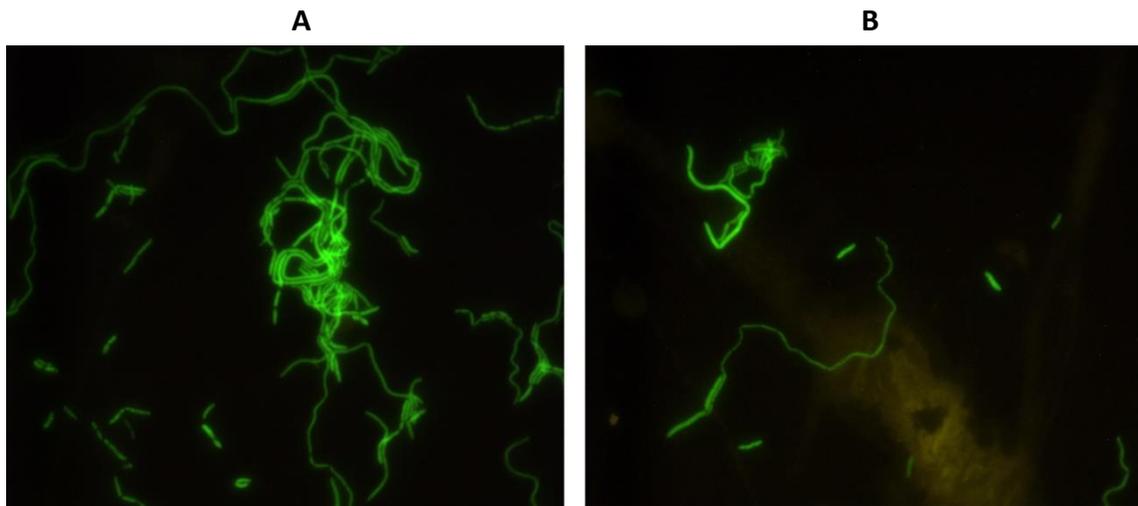


Figura 15. DVC-FISH de *P. stutzeri* DSM 5190 (A) y CECT 930 (B) hibridadas con la sonda STU2

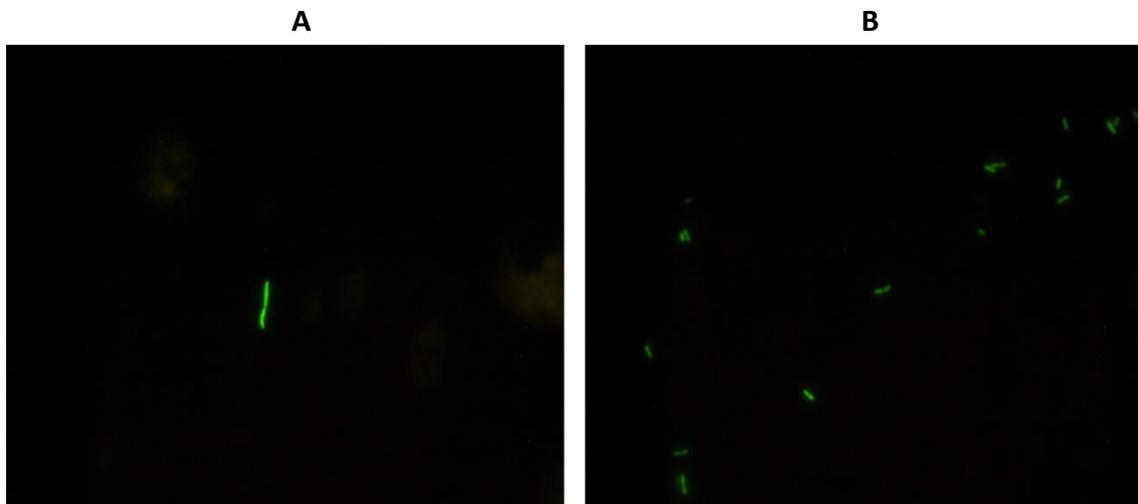


Figura 16. DVC-FISH de *P. stutzeri* DSM 4166 (A) y DSM 46326 (B) hibridadas con la sonda STU2

4.3. Aplicación *in vitro*: Monitorización de la presencia de *Pseudomonas stutzeri* sobre probeta de pintura mural. Valoración de la eficacia de los diferentes métodos y materiales de toma de muestra.

Para el simulacro del proceso de biolimpieza se partió de una suspensión bacteriana de *P. stutzeri* con una concentración de $7.4 \cdot 10^8$ UFC/mL. Para comprobar la viabilidad de la suspensión de bacterias empleada, se tomó una muestra de 50 μ L para su medición de ATP por duplicado, cuyo resultado fue 61754 y 61105 URL, también se tomó 1mL de muestra para su posterior análisis mediante DVC-FISH cuyo resultado puede verse en la figura 17, donde se verifica nuevamente la viabilidad de las bacterias aplicadas.

Es necesario tener en cuenta que el material de las probetas se vuelve relevante para el análisis de los resultados, la probeta 1 ofrece peores resultados ya que absorbió en su totalidad la suspensión de bacterias aplicadas.

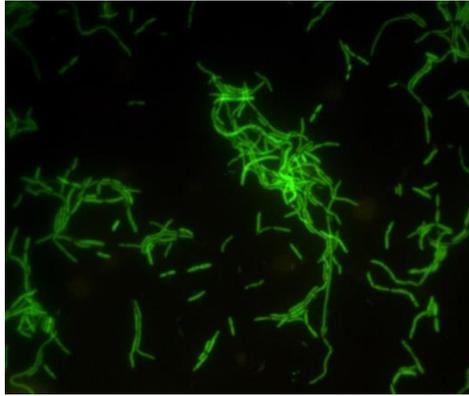


Figura 17. DVC-FISH de *P. stutzeri* DSM 5190 empleada para el tratamiento biolimpieza *in vitro* hibridada con la sonda STU2

Los resultados obtenidos mediante laminocultivos pueden observarse en las figuras 6-11 del anexo 4. En el caso del control negativo (cuadrado 1, anexo 4 figura 6 A) no se observó crecimiento de *P. stutzeri*, únicamente colonias que corresponderían a microorganismos ambientales. En las muestras tomadas correspondientes al cuadrado 2 en ambas probetas se observó un crecimiento en masa en el que las colonias no eran distinguibles, un resultado esperado pues las bacterias se acababan de inocular (anexo 4, figura 6 B y 8 A).

En el cuadrado 3 también se puede ver un crecimiento en masa (anexo 4, figura 7 A y 8 B), sin embargo después de proceder con el lavado, en las muestras tomadas del cuadrado 4 ya se percibe una reducción del crecimiento (anexo 4, figura 7 B y 9).

Pasadas una y dos semanas desde el tratamiento (cuadrado 5 y 6) (anexo 4, figura 10 y 11) hubo una gran disminución del crecimiento bacteriano, pues aparecieron muy pocas colonias. Las colonias crecidas en el laminocultivo correspondiente al cuadrado 6 fueron resemebradas en placas de PCA procediendo a su posterior identificación mediante Tira Api 20NE que constató la presencia de *P. stutzeri*.

Los resultados obtenidos mediante la medida de ATP pueden contemplarse en la tabla 2.

Debido a que la torunda del medidor de ATP solo muestrea la superficie, resultó muy ineficaz en el caso de la probeta 1 que no ofreció mucha diferencia en los valores de URL en los diferentes tiempos de la toma de muestras, por lo que se procederá únicamente al análisis de los resultados de la probeta 2. En el caso del control negativo la medición dio valores de URL muy bajos como era de esperar, posteriormente, recién inoculadas las bacterias, las cifras subieron llegando a su máximo en la toma de muestra del cuadrado 3, lo que podría ser indicador de que durante el tratamiento de biolimpieza las bacterias se multiplican. Tras el lavado las cifras disminuyeron y pasadas una y dos semanas se siguieron obteniendo valores muy bajos.

De las muestras obtenidas mediante torundas y bisturí en los cuatro primeros cuadrados de ambas probetas se realizó únicamente la técnica de FISH, pues se partía de un cultivo fresco de bacterias viables y se considera que mantendrían su viabilidad durante el periodo de toma de muestras de estos cuadrados (figuras 18-23).

Tabla 2. Resultados de la medición de ATP en tratamientos de biolimpieza sobre probeta de pintura mural. ¹URL: Unidades Relativas de Luz

Cuadrado	Muestra	Probeta 1 (URL) ¹	Probeta 2 (URL) ¹
1 Antes de la inoculación	1.1	14	18
	1.2	9	34
2 Tras la inoculación	2.1	78	532
	2.2	56	877
3 1.5 h después del tratamiento de biolimpieza (antes de lavar)	3.1	70	2087
	3.2	92	3824
4 1.5 h después del tratamiento de biolimpieza (después de lavar)	4.1	22	417
	4.2	32	257
5 Una semana después del tratamiento de biolimpieza	5.1	260	58
	5.2	58	26
6 Dos semana después del tratamiento de biolimpieza	6.1	35	42
	6.2	25	24

Los resultados correspondientes a la técnica FISH para la detección de *P. stutzeri* en los diferentes cuadros de las probetas de pintura mural pueden consultarse en la tabla 5 del anexo 5. Como cabía esperar, en el control negativo no se observó ninguna célula de *P. stutzeri* en ninguna de las probetas.

La recogida de muestra en la superficie por torunda no resultó muy eficaz en el caso de la probeta 1 debido al tipo de material como se ha mencionado anteriormente, por lo que apenas se detectaron células mediante ese sistema de recogida (figura 18 A, 19 A y 20 A). Pese a que tampoco se observó una gran cantidad de células en la muestra recién inoculada recogida con bisturí (figura 18 B), si se observó un número considerable de células tras hora y media de biolimpieza (figura 19 B) y tras el lavado se detectó una mayor cantidad de bacterias (figura 20 B), resultado opuesto tanto a las medidas de ATP como a los laminocultivos.

En el caso de la probeta 2, la torunda ofreció mejores resultados que el bisturí; en la toma correspondiente al cuadrado 2 (recién inoculadas las bacterias) (figura 21) se observa una gran cantidad de células que disminuye notablemente en el cuadrado 3 (figura 22), lo cual se contradice con los resultados obtenidos en la medición de ATP; tras el lavado no se detectó con ningún método células (figura 23).

Estos resultados pueden deberse a que la aplicación de bacterias no se hizo de manera homogénea, pero también es necesario tener en cuenta las limitaciones de cada técnica; en el caso de la medida de ATP, aparte de que solo se muestrea la superficie, no es una medida específica, y respecto al método FISH la muestra analizada solo representa un pequeño porcentaje del total, por lo que cabe la posibilidad de que no sea representativa.

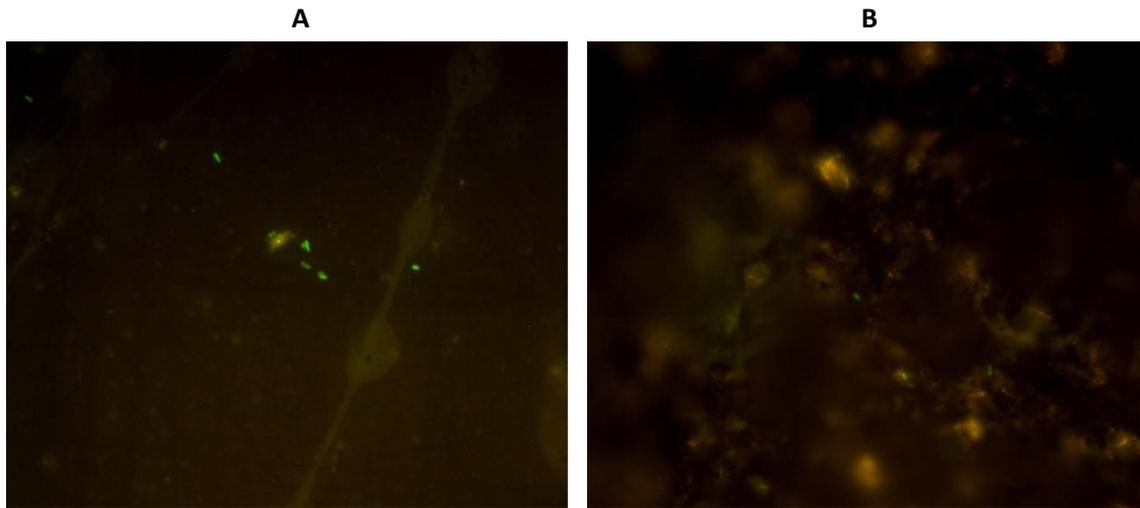


Figura 18. FISH de las bacterias recién inoculadas sobre probeta 1 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2

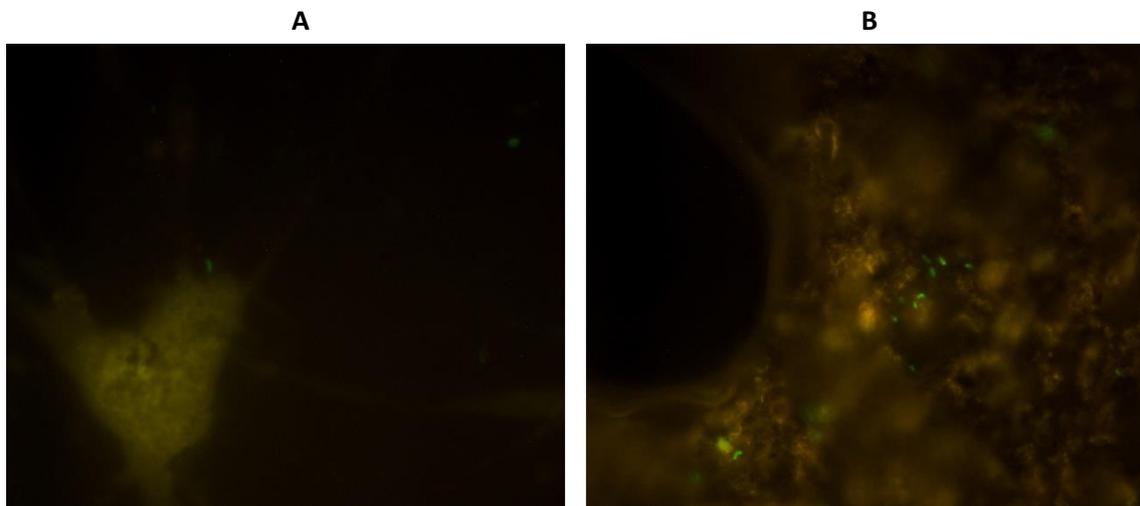


Figura 19. FISH de las bacterias tras hora y media de biolimpieza sobre probeta 1 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2

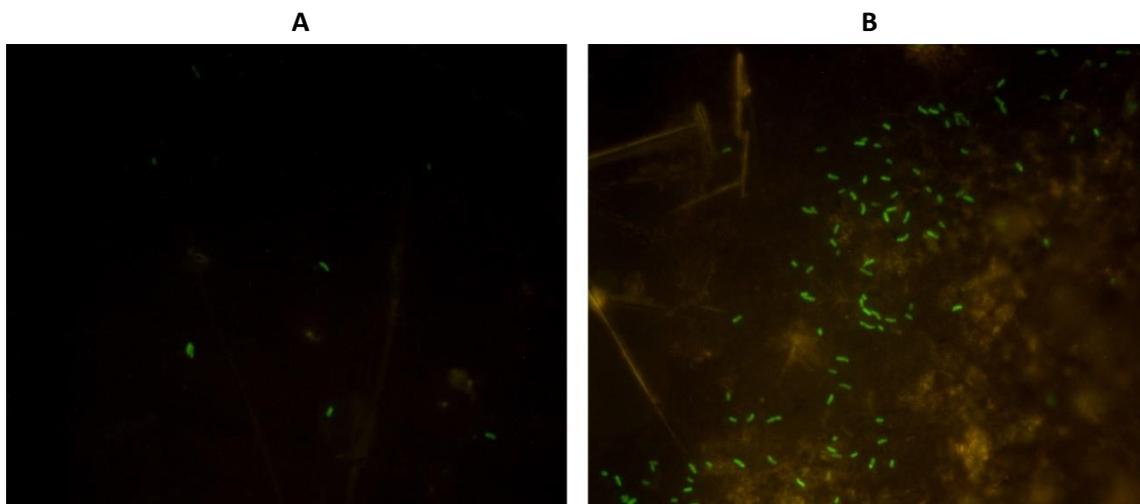


Figura 20. FISH de las bacterias tras el lavado sobre probeta 1 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2

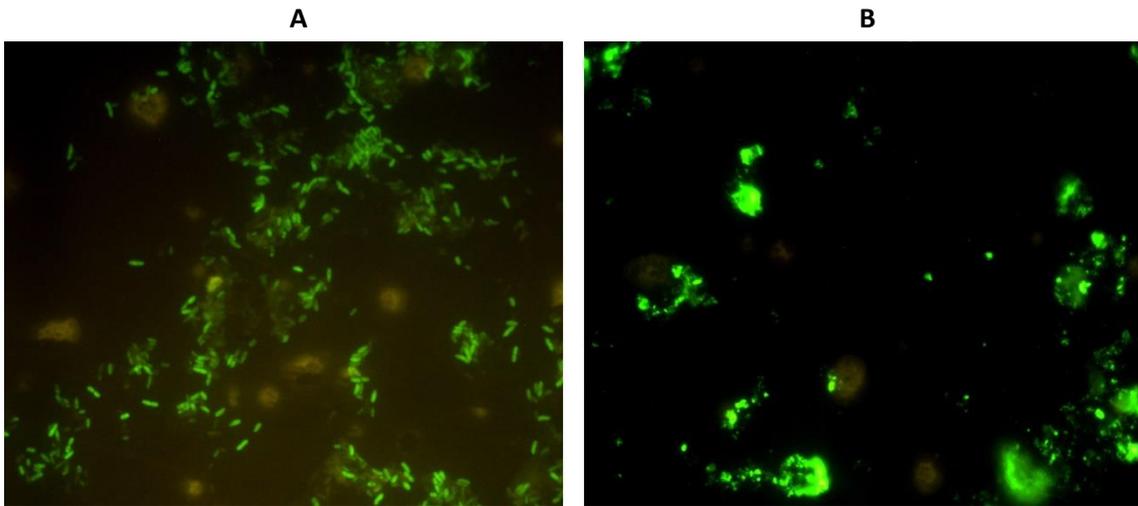


Figura 21. FISH de las bacterias recién inoculadas sobre probeta 2 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2

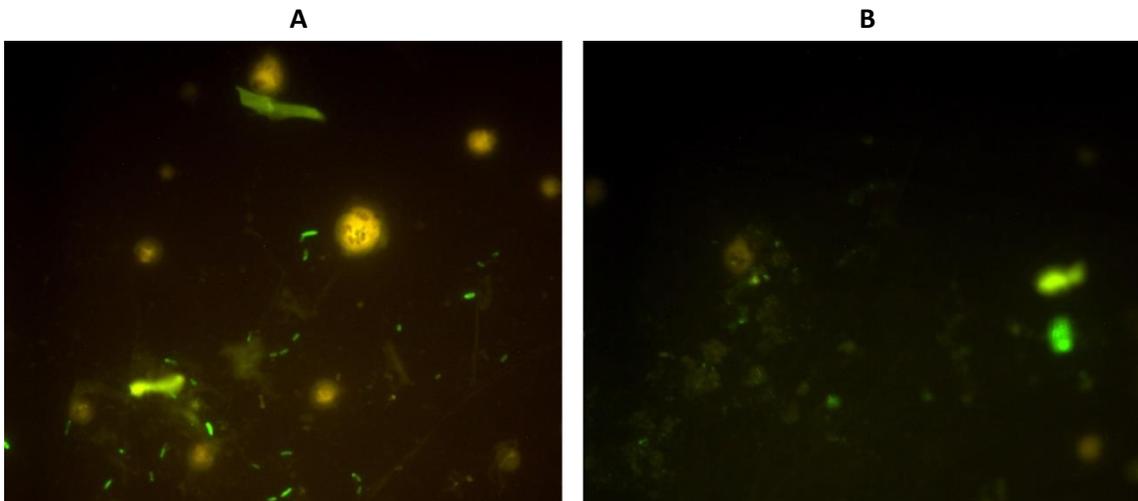


Figura 22. FISH de las bacterias tras hora y media de biolimpieza sobre probeta 2 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2

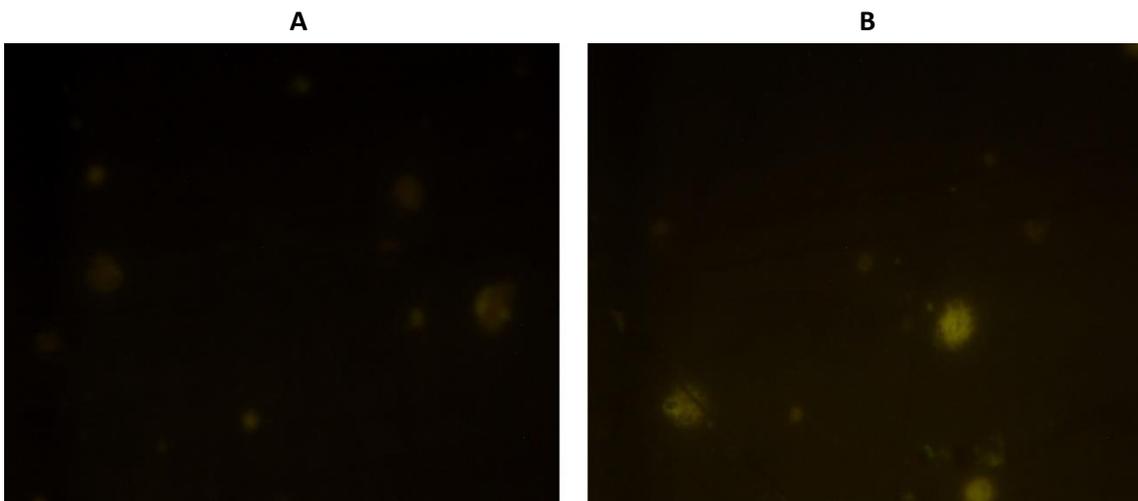


Figura 23. FISH de las bacterias tras el lavado sobre probeta 2 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2

En el caso de los cuadrados 5 y 6 (pasada una y dos semanas desde la aplicación inicial de las bacterias) el tratamiento de las muestras fue diferente, se supuso que la concentración de bacterias sería menor, así como que las que pudiera haber presentes podrían no ser viables, por lo que de las muestras obtenidas, una pasó a ser analizada por DVC-FISH para verificar la viabilidad de las bacterias presentes, mientras que otra fue enriquecida mediante crecimiento en caldo común (28°C, 48 horas) y posteriormente fijada e hibridada. También se analizaron muestras sin ningún tipo de enriquecimiento (anexo 5, tabla 5).

Así mismo todas las muestras correspondientes a estos dos cuadrados fueron resuspendidas en el paso final de la fijación en un volumen menor con el fin de concentrar las muestras.

Los resultados pueden observarse en la tabla 3 así como en las figuras 24-31.

Tabla 3. Resultados de la toma de muestra de los cuadrados 5 y 6 (pasada una y dos semanas desde el tratamiento de biolimpieza respectivamente).

Cuadrado	Probeta	Tratamiento	Método de recogida	Resultado	Figura
5 Una semana después del tratamiento de biolimpieza	1	DVC	Torunda	(-)	24
			Bisturí	(+) Células elongadas	
	2	Incubación	Torunda	(-)	25
			Bisturí	(++)Mucho crecimiento	
	2	DVC	Torunda	(-)	26
			Bisturí	(+) Células elongadas	
Incubación			Torunda	(-)	
	Bisturí	(+)Crecimiento			
6 Dos semanas después del tratamiento de biolimpieza	1	DVC	Torunda	(-)	28
			Bisturí	(+) Células elongadas	
		Incubación	Torunda	(-)	29
	Bisturí		(++) Mucho crecimiento		
	2	DVC	Torunda	(-)	30
			Bisturí	(-)	
Incubación		Torunda	(+)Células no viables	31	
	Bisturí	(++)Mucho crecimiento			

Mediante el enriquecimiento de las muestras en caldo común se encontraron células viables en todos los casos, sin embargo la toma de muestra mediante bisturí resultó mucho más eficiente que la recogida mediante torunda donde apenas se observaron células aisladas en uno de los casos. En las muestras sin enriquecer no se visualizó ninguna célula.

Estos resultados determinan que con el paso del tiempo las bacterias únicamente se logran detectar mediante bisturí, y aunque este sea un método más invasivo y que presenta más fondo en la preparación, lo que dificulta el análisis de los resultados, es la única herramienta válida, ya que se piensa que las bacterias penetran en los poros de la probeta y la torunda no permite su recogida; estas afirmaciones concuerdan a su vez con los resultados obtenidos por Campayo (2014).

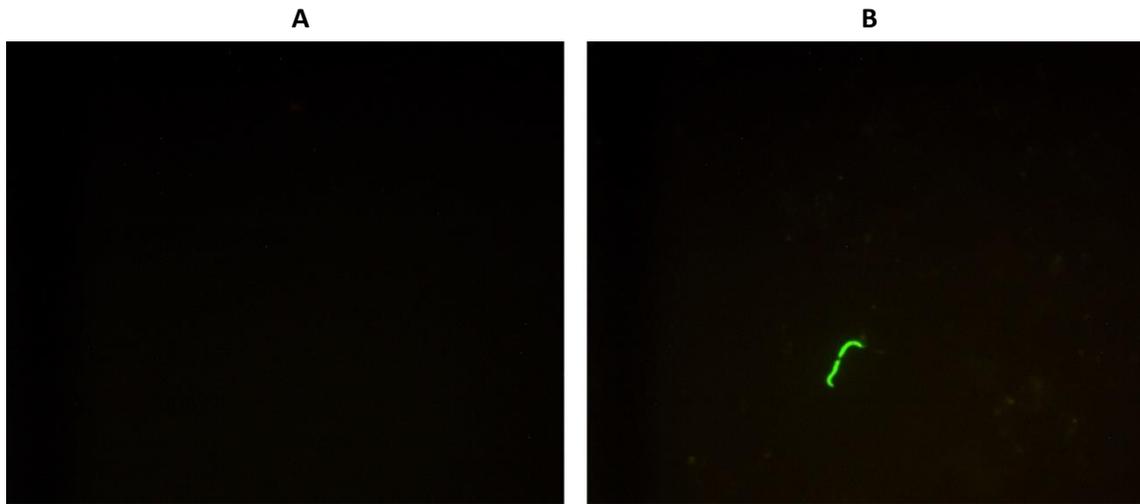


Figura 24. DVC-FISH de las bacterias tras una semana desde la biolimpieza sobre probeta 1 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2

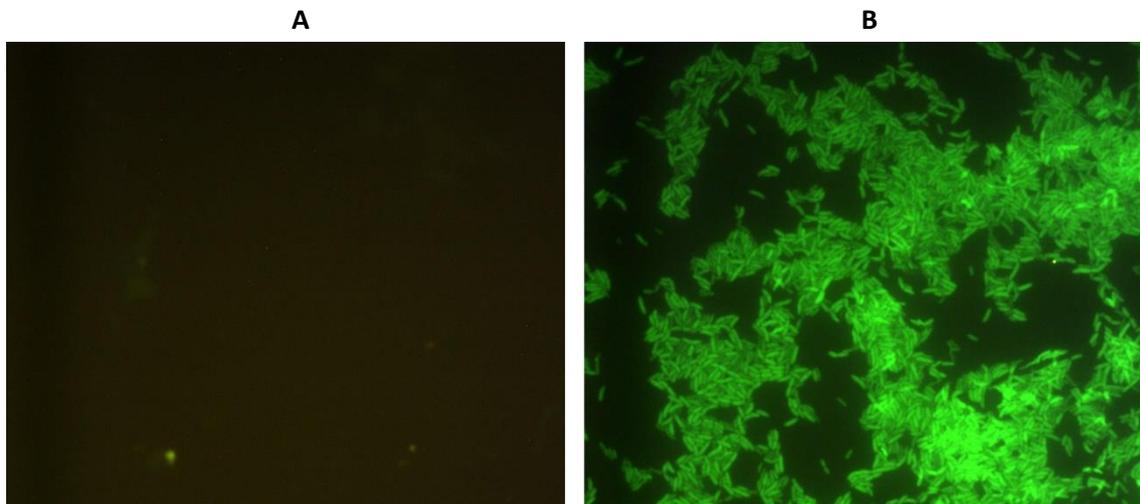


Figura 25. Incubación de las bacterias tras una semana desde la biolimpieza sobre probeta 1 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2

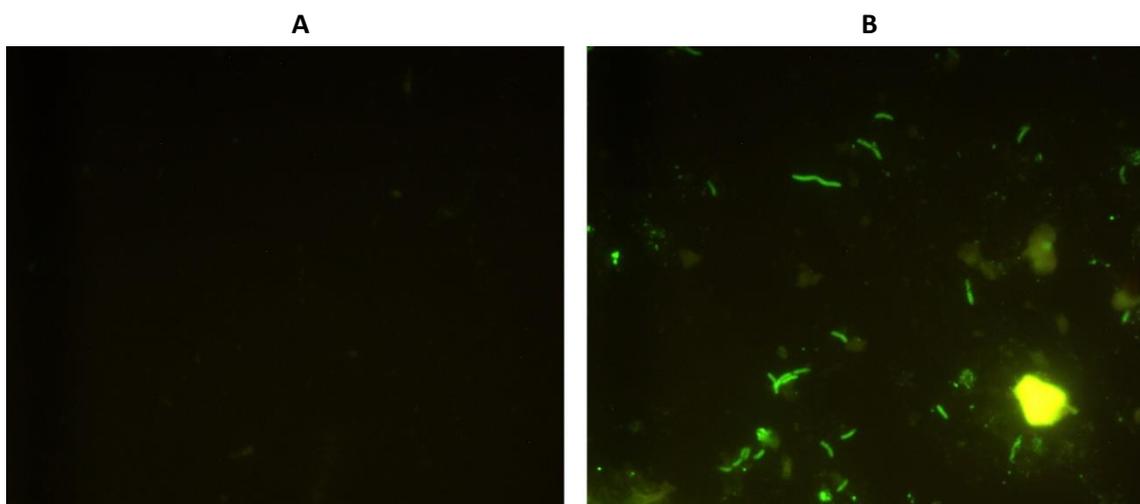


Figura 26. DVC-FISH de las bacterias tras una semana desde la biolimpieza sobre probeta 2 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2

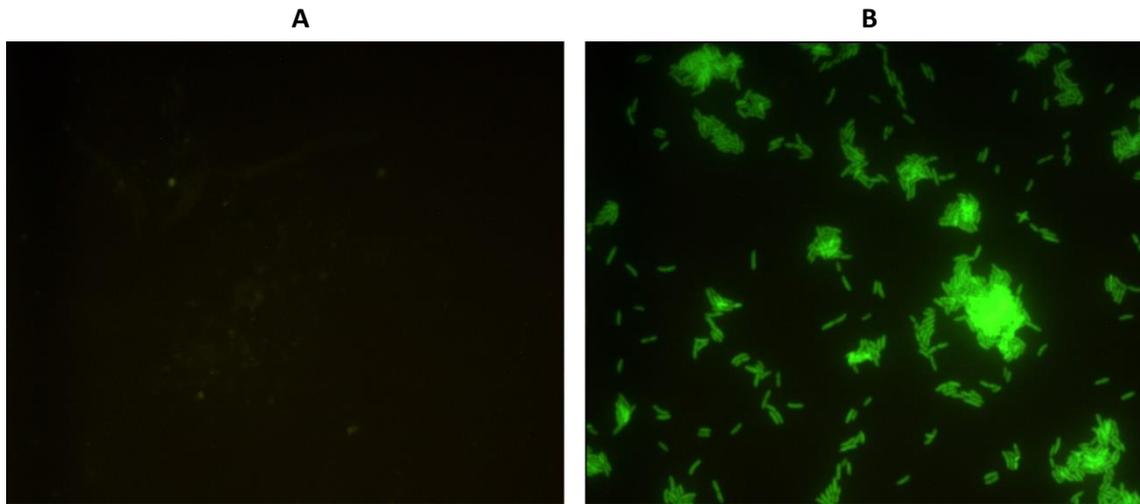


Figura 27. Incubación de las bacterias tras una semana desde la biolimpieza sobre probeta 2 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2

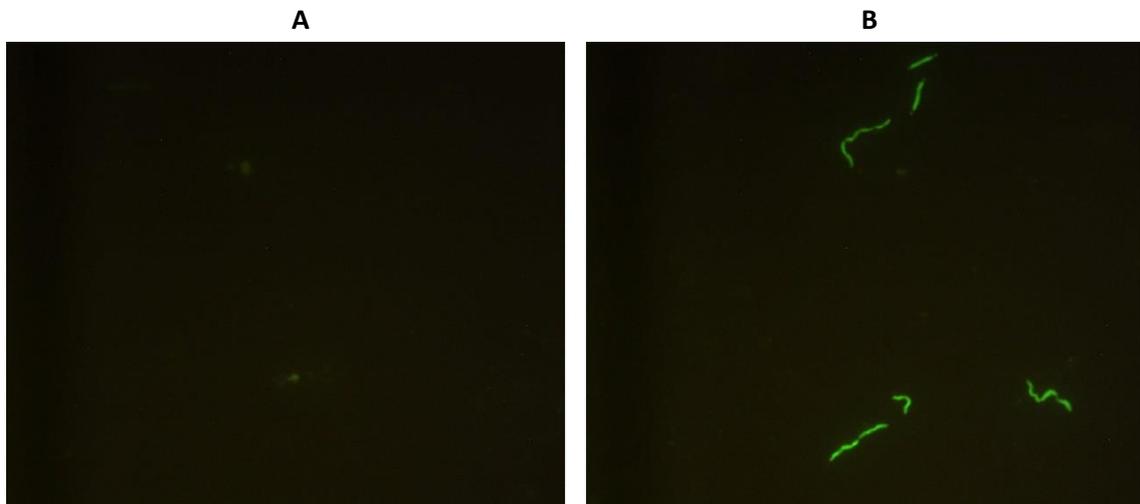


Figura 28. DVC-FISH de las bacterias tras dos semanas desde la biolimpieza sobre probeta 1 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2

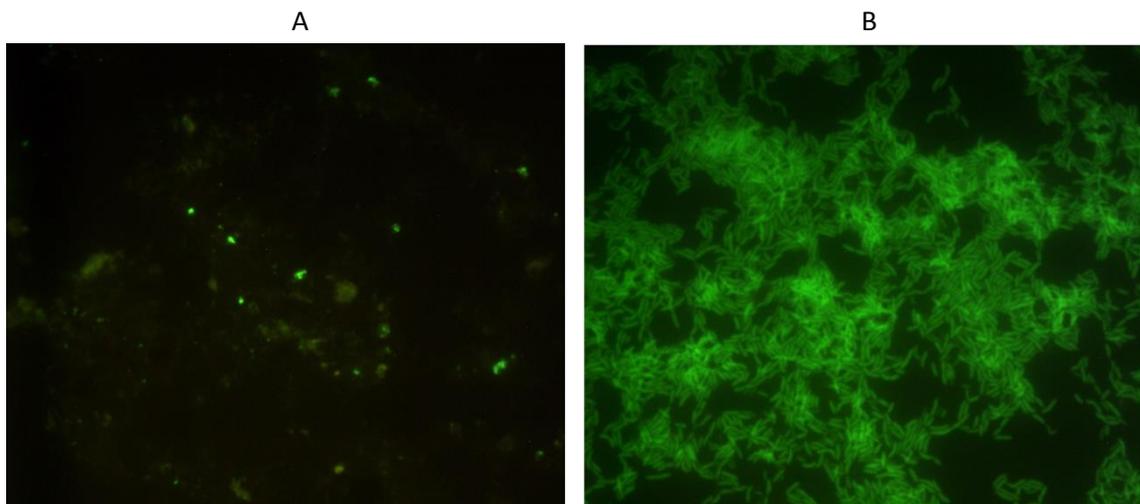


Figura 29. Incubación de las bacterias tras dos semanas desde la biolimpieza sobre probeta 1 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2

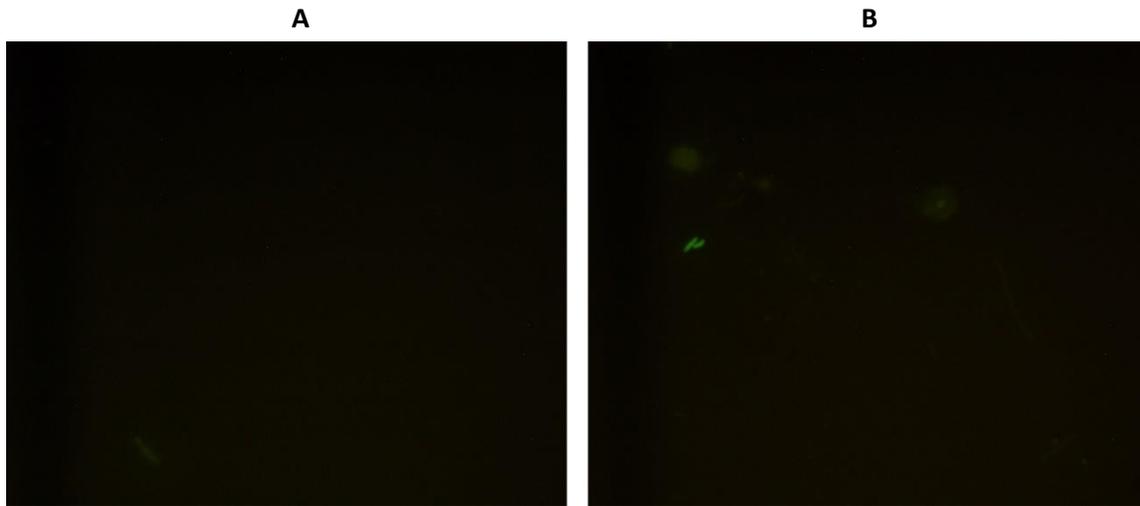


Figura 30. DVC-FISH de las bacterias tras dos semanas desde la biolimpieza sobre probeta 2 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2

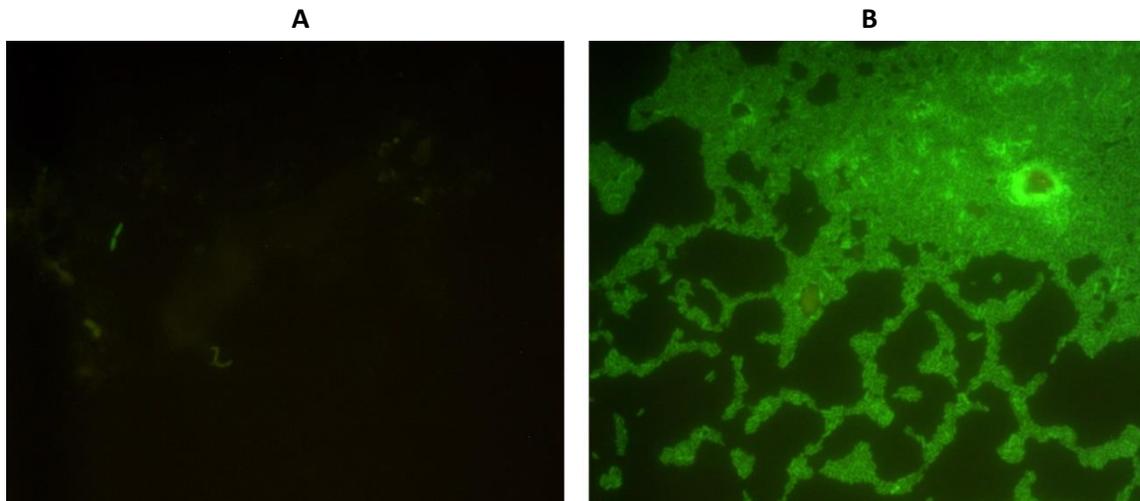


Figura 31. Incubación de las bacterias tras dos semanas desde la biolimpieza sobre probeta 2 recogidas con torunda (A) y con bisturí (B) hibridadas con la sonda STU2

Para continuar con la evaluación de la presencia de *P. stutzeri*, se decidió hacer una toma de muestras pasadas tres semanas con torunda y bisturí con enriquecimiento en caldo común para posterior análisis por FISH, realizando la hibridación por triplicado. Los resultados correspondientes se encuentran en la tabla 6 del anexo 5, en ningún caso se observó ningún tipo de crecimiento por lo que estima que las células presenten que se encontraron no eran viables.

4.4. Análisis de muestras procedentes de pinturas murales

Se tomaron muestras de obras reales que habían sido tratadas mediante biolimpieza con la aplicación de células viables de *P. stutzeri* en julio de 2016. Los resultados de la medición de ATP están disponibles en la tabla 4, los valores obtenidos fueron bastante reducidos, lo que indica que no hay crecimiento activo de microorganismos suficiente para ser detectado por este método.

Tabla 4. Resultados de la medición de ATP sobre pintura mural tratada con *P. stutzeri*. ¹URL: Unidades Relativas de Luz

Muestra	Medida (URL) ¹
Control -	135
Zona Inoculación ₁	12
Zona Inoculación ₂	12
Zona Inoculación ₃	33
Zona adyacente	33

Al igual que en los casos de los cuadrados 5 y 6 de la experiencia anterior, debido al largo periodo de tiempo pasado desde la aplicación de las bacterias hasta la toma de muestras mediante bisturí y torunda, las muestras fueron analizadas tanto por DVC-FISH como enriquecidas por crecimiento en caldo común. Los resultados pueden contemplarse en la tabla 7 del anexo 5. En ninguno de los casos se observó ninguna célula de *P. stutzeri*.

En las placas de contacto que se tomaron, únicamente se seleccionó una colonia que presentaba una morfología similar a *P. stutzeri* para su siembra en PCA y posterior identificación mediante tira Api 20NE (figura 32 rodeada con un círculo rojo), sin embargo se descartó que fuera *P. stutzeri* por la morfología que presentaban las colonias de la resiembra.



Figura 32. Placa de contacto tomada de obra real

5. CONCLUSIONES

Tras los experimentos y ensayos realizados a lo largo de este trabajo, los resultados obtenidos han llevado a la conclusión de que las diferencias existentes entre la variedad de cepas de *P. stutzeri* disponibles en el laboratorio, no son determinantes para la hibridación de la sonda STU2 que fue en principio diseñada y testada para la cepa DSM 5190, ya que esta dio hibridación positiva con todas las cepas de *P. stutzeri* testadas, sin embargo estas diferencias entre cepas sí que fueron determinantes en el ensayo de DVC ya que bajo las mismas condiciones se obtuvieron resultados opuestos, mientras que en las cepas DSM 5190 y CECT 930 se apreciaba una notable elongación de las células, en las cepas DSM 4166 y 46326 no se apreció dicha elongación, por lo que las condiciones del DVC deben establecerse para cada tipo de cepa de la bacteria.

La técnica FISH representa una metodología rápida y específica que permite monitorizar la presencia de *P. stutzeri* en tratamientos de biolimpieza, al contrario que los métodos microbiológicos clásicos, que requieren mayor tiempo de incubación y son menos específicos. Además la técnica FISH combinada con DVC permite determinar la viabilidad celular de manera eficaz. La medida de ATP se considera una herramienta complementaria inespecífica, para determinar la existencia de microorganismos vivos.

Respecto a la toma de muestras para el análisis por FISH/DVC-FISH, mientras que durante las primeras etapas del tratamiento de biolimpieza es posible la detección de las bacterias mediante la recogida de muestra de manera superficial con el uso de torundas, con el paso del tiempo el análisis de la superficie se vuelve ineficaz y las bacterias son únicamente detectables con el uso del bisturí.

Así mismo pasado el tiempo el enriquecimiento de las muestras mediante incubación en caldo común es una manera eficiente de determinar la viabilidad, así como, de aumentar la probabilidad de detección al multiplicar el número de bacterias, lo que evita los falsos negativos que podrían originarse debido a la menor concentración original de bacterias.

Pasadas tres semanas desde el tratamiento de biolimpieza en el simulacro *in vitro* sobre probetas de pintura mural, todos los análisis hechos con y sin enriquecimiento constataron la ausencia de células viables de *P. stutzeri*. De la misma manera en ninguna de las pruebas realizadas en pinturas murales reales tratadas en julio 2016 se detectó la presencia de *P. stutzeri*.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ALFANO, G., LUSTRATO, G., BELLI, C., ZANARDINI, E., CAPPITELLI, F., MELLO, E., & RANALLI, G. (2011). The bioremoval of nitrate and sulfate alterations on artistic stonework: the case-study of Matera Cathedral after six years from the treatment. *International biodeterioration & biodegradation*, 65(7), 1004-1011.
- AMANN, R. I., KRUMHOLZ, L., & STAHL, D. A. (1990). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of bacteriology*, 172(2), 762-770.
- AMANN, R., LUDWIG, W., SCHULZE, R., SPRING, S., MOORE, E., & SCHLEIFER, K. H. (1996). rRNA-targeted oligonucleotide probes for the identification of genuine and former pseudomonads. *Systematic and applied microbiology*, 19(4), 501-509.
- ATLAS, R. M., CHOWDHURY, A. N., & GAURI, K. L. (1988). Microbial calcification of gypsum-rock and sulfated marble. *Studies in conservation*, 33(3), 149-153.
- BANG, S. S., GALINAT, J. K., & RAMAKRISHNAN, V. (2001). Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*. *Enzyme and microbial technology*, 28(4), 404-409.
- BARABESI, C., MASTROMEI, G., & PERITO, B. (2006). La carbonatogenesi batterica nella conservazione delle opere d'arte lapidee. *Biologia e archeobiologia nei beni culturali, conoscenze, problematiche e casi di studio*, 236-247.
- BEUTEL, S., KLEIN, K., KNOBBE, G., KÖNIGFELD, P., PETERSEN, K., ULBER, R., & SCHEPER, T. (2002). Controlled enzymatic removal of damaging casein layers on medieval wall paintings. *Biotechnology and bioengineering*, 80(1), 13-21.
- BONOMI, R. (1994). Utilizzo degli enzimi per il restauro di una scultura in terracotta policroma. *OPD restauro*, (6), 101-162.
- BOSCH, M. D. P., ROS, J. L. R., & MONTES, R. (2013). Biocleaning of nitrate alterations on wall paintings by *Pseudomonas stutzeri*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 84, 266-274.
- BOSCH, M. D. P., ROS, J. L. R., SANCHO, M. P. S., & MONTES, R. M. (2013). Biocleaning of animal glue on wall paintings by *Pseudomonas stutzeri*. In *Chimica Oggi—Chemistry Today* (Vol. 31, No. 1, pp. 50-53). Teknoscienze Srl.
- BOSCH, M. D. P., ROS, J. L. R., SANCHO, M. P. S., CARBO, M. T. D., & MONTES, R. M. (2010). Ensayos de biolimpieza con bacterias en pinturas murales. In *Arché* (No. 4-5, pp. 117-124). Instituto Universitario de Restauración del Patrimonio de la UPV.
- BOSCH, P., & RANALLI, G. (2014). The safety of biocleaning technologies for cultural heritage. *Frontiers in microbiology*, 5.
- BOSCH, P., DECOROSI, F., GIOVANNETTI, L., RANALLI, G., & VITI, C. (2016). Connecting phenome to genome in *Pseudomonas stutzeri* 5190: an artwork biocleaning bacterium. *Research in microbiology*, 167(9), 757-765.

- CAMPAYO, A. (2014). *Puesta a punto de la técnica DVC-FISH para la detección de Pseudomonas stutzeri en tratamientos de biolimpieza de obras de arte.*
- CAPPITELLI, F., TONIOLO, L., SANSONETTI, A., GULOTTA, D., RANALLI, G., ZANARDINI, E., & SORLINI, C. (2007). Advantages of using microbial technology over traditional chemical technology in removal of black crusts from stone surfaces of historical monuments. *Applied and environmental microbiology*, 73(17), 5671-5675.
- CAPPITELLI, F., ZANARDINI, E., RANALLI, G., MELLO, E., DAFFONCHIO, D., & SORLINI, C. (2006). Improved methodology for bioremoval of black crusts on historical stone artworks by use of sulfate-reducing bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 72(5), 3733-3737.
- CASTANIER, S., LE MÉTAYER-LEVREL, G., & PERTHUISOT, J. P. (1999). Ca-carbonates precipitation and limestone genesis—the microbiogeologist point of view. *Sedimentary Geology*, 126(1), 9-23.
- CREMONESI, P. (1999). *L'uso degli enzimi nella pulitura di opere policrome.* Il prato.
- CREMONESI, P. (2004). *L'uso dei solventi organici nella pulitura di opere policrome.* Il prato.
- DOMÉNECH CARBÓ, M. T., & YUSÁ MARCO, D. J. (2006). Aspectos físico-químicos de la pintura mural y su limpieza. *Valencia: Editorial Universidad Politécnica de Valencia.*
- FRICKMANN, H., ZAUTNER, A. E., MOTER, A., KIKHNEY, J., HAGEN, R. M., STENDER, H., & POPPERT, S. (2017). Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(3), 263-293.
- GARCÍA, J. C. R. (2016). Microbiología aplicada: una herramienta para la conservación del Patrimonio Cultural. *Conservar Património*, 24, 23-36.
- GARCÍA-HERNÁNDEZ, J., MORENO, Y., AMOROCHO, C. M., & HERNANDEZ, M. (2012). A combination of direct viable count and fluorescence in situ hybridization for specific enumeration of viable *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Letters in applied microbiology*, 54(3), 247-254.
- GAURI, K. L., PARKS, L., JAYNES, J., & ATLAS, R. (1992). Removal of sulphated-crust from marble using sulphate-reducing bacteria. In *Stone cleaning and the nature, soiling and decay mechanisms of stone: proceedings of the international conference held in Edinburgh, UK, 14-16 April 1992* (pp. 160-165). Donhead.
- GERMINARIO, G., VAN DER WERF, I. D., PALAZZO, G., ROS, J. L. R., MONTES-ESTELLES, R. M., & SABBATINI, L. (2017). Bioremoval of marker pen inks by exploiting lipase hydrolysis. *Progress in Organic Coatings*, 110, 162-171.
- GRIMALDI, M., SPROCATI, A. R., & PERITO, B. (2013). *Search for new surface active compounds of microbial origin in view of the development of bioremediation techniques* (Doctoral dissertation, PhD Thesis in Sciences for the Conservation of Cultural Heritage-XXV cycle).
- GROBEN, R., & MEDLIN, L. (2005). In situ hybridization of phytoplankton using fluorescently labeled rRNA probes. *Methods in enzymology*, 395, 299-310.

- GROSZ, B., WELL, R., DANNENMANN, M., DECHOW, R., KITZLER, B., MICHEL, K., & REENT KÖSTER, J. (2017). Evaluation and adjustment of description of denitrification in the DailyDayCent and COUP models based on N₂ and N₂O laboratory incubation system measurements. In *EGU General Assembly Conference Abstracts* (Vol. 19, p. 16075).
- GUNASEKERA, T. S., DORSCH, M. R., SLADE, M. B., & VEAL, D. A. (2003). Specific detection of *Pseudomonas* spp. in milk by fluorescence in situ hybridization using ribosomal RNA directed probes. *Journal of applied microbiology*, *94*(5), 936-945.
- HESELMAYER, K., FISCHER, U., KRUMBEIN, W. E., & WARSCHIED, T. (1991). Application of *Desulfovibrio vulgaris* for the bioconversion of rock gypsum crusts into calcite. *BIOforum*, *1*(2), 89.
- HOLMES, B. (1986). Identification and distribution of *Pseudomonas stutzeri* in clinical material. *Journal of Applied Microbiology*, *60*(5), 401-411.
- HOU, Y., KONG, Y., YANG, J., XIN, W., & ZHANG, J. (2004). Study on immobilization of petroleum biodesulfurization catalyst {*Agrobacterium tumefaciens*} UP--3. *Wei sheng wu xue tong bao*, *32*(1), 52-56.
- JUDE, F., ARPIN, C., BRACHET-CASTANG, C., CAPDEPUY, M., CAUMETTE, P., & QUENTIN, C. (2004). TbtABM, a multidrug efflux pump associated with tributyltin resistance in *Pseudomonas stutzeri*. *FEMS microbiology letters*, *232*(1), 7-14.
- KALINOWSKI, B. E., OSKARSSON, A., ALBINSSON, Y., ARLINGER, J., ÖDEGAARD-JENSEN, A., ANDLID, T., & PEDERSEN, K. (2004). Microbial leaching of uranium and other trace elements from shale mine tailings at Ranstad. *Geoderma*, *122*(2), 177-194.
- KASANA, R. C., SALWAN, R., DHAR, H., DUTT, S., & GULATI, A. (2008). A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current microbiology*, *57*(5), 503-507.
- KEER, J. T., & BIRCH, L. (2003). Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *Journal of Microbiological Methods*, *53*(2), 175-183.
- KLEIN, K., & BEUTEL, S. (2002). Schädigende Kaseinüberzüge auf Wandmalereien. Teil 1: Innovatives Verfahren zur enzymatischen Abnahme. *Restauro: Zeitschrift für Kunsttechniken, Restaurierung und Museumsfragen*, *108*(7), 496-501.
- KOGURE, K., SIMIDU, U., & TAGA, N. (1979). A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, *25*(3), 415-420.
- LALUCAT, J., BENNASAR, A., BOSCH, R., GARCÍA-VALDÉS, E., & PALLERONI, N. J. (2006). Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *70*(2), 510-547.
- LIN, K. H., CHEN, C. M., WANG, J. H., & HO, M. W. (2014). *Pseudomonas stutzeri* necrotizing pneumonia in pre-existing pulmonary tuberculosis. *Internal Medicine*, *53*(21), 2543-2546.
- LUSTRATO, G., ALFANO, G., ANDREOTTI, A., COLOMBINI, M. P., & RANALLI, G. (2012). Fast biocleaning of mediaeval frescoes using viable bacterial cells. *International biodeterioration & biodegradation*, *69*, 51-61.

- MAPELLI, F., MARASCO, R., BALLOI, A., ROLLI, E., CAPPITELLI, F., DAFFONCHIO, D., & BORIN, S. (2012). Mineral–microbe interactions: biotechnological potential of bioweathering. *Journal of biotechnology*, 157(4), 473-481.
- MOLGATINI, S., REY, E., BASILAKI, J., MOSCA, C., GALANTE, R., & GLIOSCA, L. (2017). Isolation of *Pseudomonas stutzeri* from an odontogenic inflammatory cyst: Diagnostic relevance. *Revista Argentina de microbiologia*, 49(1), 32.
- MONTES, R. M. E., PICAZO, P. R., & GIMÉNEZ, E. H. (1996). *Estudio de la contaminación microbiológica en el patrimonio artístico de la Real Basílica de la Virgen de los Desamparados*. Universidad Politécnica de Valencia.
- MORENO, Y., SÁNCHEZ-CONTRERAS, J., MONTES, R. M., GARCÍA-HERNÁNDEZ, J., BALLESTEROS, L., & FERRÚS, M. A. (2012). Detection and enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells from ready-to-eat and processed vegetable foods by culture and DVC-FISH. *Food Control*, 27(2), 374-379.
- MUÑOZ, M (2015) Desarrollo de un método de detección por PCR de *Pseudomonas stutzeri* para el control de los procesos de biolimpieza en pintura mural
- NOBLE, R. C., & OVERMAN, S. B. (1994). *Pseudomonas stutzeri* infection a review of hospital isolates and a review of the literature. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 19(1), 51-56.
- PALLERONI, N. J., KUNISAWA, R., CONTOPOULOU, R., & DOUDOROFF, M. (1973). Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 23(4), 333-339.
- PHAM, V. T., REDIER, H., GHEQUIRE, M. G., NGUYEN, H. H., DE MOT, R., VANDERLEYDEN, J., & SPAEPEN, S. (2017). The plant growth-promoting effect of the nitrogen-fixing endophyte *Pseudomonas stutzeri* A15. *Archives of microbiology*, 199(3), 513-517.
- POLO, A., CAPPITELLI, F., BRUSETTI, L., PRINCIPI, P., VILLA, F., GIACOMUCCI, L., ... & SORLINI, C. (2010). Feasibility of removing surface deposits on stone using biological and chemical remediation methods. *Microbial Ecology*, 60(1), 1-14.
- POYATOS JIMÉNEZ, F. (2007). Procesos de biodeterioro en pinturas sobre lienzo del Museo de Bellas Artes de Granada: examen visual y gráfico.
- RANALLI, G., ALFANO, G., BELLI, C., LUSTRATO, G., COLOMBINI, M. P., BONADUCE, I., ... & SORLINI, C. (2005). Biotechnology applied to cultural heritage: bioremediation of frescoes using viable bacterial cells and enzymes. *Journal of applied microbiology*, 98(1), 73-83.
- RANALLI, G., CBELLI, C. B., CBARACCHINI, C. B., GCAPONI, G. C., PPACINI, P. P., EZANARDINI, E. Z., & CSORLINI, C. S. (2003). Deterioration and bioremediation of fresco: a case-study.
- RANALLI, G., CHIAVARINI, M., GUIDETTI, V., MARSALA, F., MATTEINI, M., ZANARDINI, E., & SORLINI, C. (1997). The use of microorganisms for the removal of sulphates on artistic stoneworks. *International biodeterioration & biodegradation*, 40(2-4), 255-261.

- RANALLI, G., MATTEINI, M., TOSINI, I., ZANARDINI, E., & SORLINI, C. (2000). Bioremediation of cultural heritage: removal of sulphates, nitrates and organic substances. *Of Microbes and Art: The Role of Microbial Communities in the Degradation and Protection of Cultural Heritage*, 231-45.
- RELLA, M., & HAAS, D. (1982). Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO to nalidixic acid and low levels of beta-lactam antibiotics: mapping of chromosomal genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 22(2), 242-249.
- RIOU, V., PÉRIOT, M., & BIEGALA, I. C. (2017). Specificity Re-evaluation of Oligonucleotide Probes for the Detection of Marine Picoplankton by Tyramide Signal Amplification-Fluorescent In Situ Hybridization. *Frontiers in microbiology*, 8.
- RODRIGUEZ-NAVARRO, C., RODRIGUEZ-GALLEGO, M., CHEKROUN, K. B., & GONZALEZ-MUÑOZ, M. T. (2003). Conservation of ornamental stone by *Myxococcus xanthus*-induced carbonate biomineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4), 2182-2193.
- ROHDE, A., HAMMERL, J. A., APPEL, B., DIECKMANN, R., & AL DAHOUK, S. (2017). Differential detection of pathogenic *Yersinia* spp. by fluorescence in situ hybridization. *Food microbiology*, 62, 39-45.
- ROSSELLÓ, R., GARCÍA-VALDÉS, E., LALUCAT, J., & URSING, J. (1991). Genotypic and phenotypic diversity of *Pseudomonas stutzeri*. *Systematic and applied microbiology*, 14(2), 150-157.
- SAIZ-JIMENEZ, C. (1995). Deposition of anthropogenic compounds on monuments and their effect on airborne microorganisms. *Aerobiologia*, 11(3), 161-175.
- SEGAL, J., & COOPER, D. (1977). The use of enzymes to release adhesives. *The paper conservator*, 2(1), 47-50.
- SINGH, P., & TIWARY, B. N. (2017). Optimization of conditions for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation by *Pseudomonas stutzeri* P2 isolated from Chirimiri coal mines. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 10, 20-29.
- SPROCATI, A. R., ALISI, C., TASSO, F., VEDOVATO, E. B. N., & BARBABIETOLA, N. (2007). Esplorazione della tomba della Mercareccia (Tarquinia) per un'analisi descrittiva dei microorganismi colonizzatori e selezione di ceppi di interesse biotecnologico per la conservazione ed il restauro. *Atti del Convegno Lo stato dell'Arte 5, IGIIIC-gruppo Italiano-the International Institute for Conservation*.
- STANYON, R. (2017). Fluorescence in situ Hybridization. *The International Encyclopedia of Primatology*.
- STOLWORTHY, J. C., PASZCZYNSKI, A., KORUS, R., & CRAWFORD, R. L. (2001). Metal binding by pyridine-2, 6-bis (monothiocarboxylic acid), a biochelator produced by *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas putida*. *Biodegradation*, 12(6), 411-418.
- TIANO, P., BIAGIOTTI, L., & MASTROMEI, G. (1999). Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation. *Journal of microbiological methods*, 36(1), 139-145.

- TROIANO, F., GULOTTA, D., BALLOI, A., POLO, A., TONIOLO, L., LOMBARDI, E., & CAPPITELLI, F. (2013). Successful combination of chemical and biological treatments for the cleaning of stone artworks. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *85*, 294-304.
- TROIANO, F., VICINI, S., GIOVENTÙ, E., LORENZI, P. F., IMPROTA, C. M., & CAPPITELLI, F. (2014). A methodology to select bacteria able to remove synthetic polymers. *Polymer Degradation and Stability*, *107*, 321-327.
- UNKOVIĆ, N., LJALJEVIĆ GRBIĆ, M., STUPAR, M., VUKOJEVIĆ, J., SUBAKOV-SIMIĆ, G., JELIKIĆ, A., & STANOJEVIĆ, D. (2015). ATP bioluminescence method: tool for rapid screening of organic and microbial contaminants on deteriorated mural paintings. *Natural product research*, 1-9.
- UYTTENDAELE, M., BASTIAANSEN, A., & DEBEVERE, J. (1997). Evaluation of the NASBA® nucleic acid amplification system for assessment of the viability of *Campylobacter jejuni*. *International journal of food microbiology*, *37*(1), 13-20.
- VOLLACK, K. U., XIE, J., HÄRTIG, E., RÖMLING, U., & ZUMFT, W. G. (1998). Localization of denitrification genes on the chromosomal map of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, *144*(2), 441-448.
- WALLNER, G., AMANN, R., & BEISKER, W. (1993). Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*, *14*(2), 136-143.
- WENDELBO, O. (1976). The use of proteolytic enzymes in the restoration of paper and papyrus.
- ZUMFT, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and molecular biology reviews*, *61*(4), 533-616.

7. ANEXOS

ANEXO 1: Medios de cultivo

A continuación se muestran los diferentes medios de cultivos utilizados para el crecimiento de las bacterias utilizadas en este trabajo; así como la composición y preparación de cada uno de ellos:

Plate Count Agar (PCA):

– Peptona caseína	5,0 g
– Extracto de levadura	2,5 g
– Dextrosa	1,0 g
– Agar	15,0 g
– Agua destilada	1 L
– pH	7,0 ± 0.2

Preparación:

Suspender 23,5 g de polvo en 1 litro de agua destilada. Agitar hasta su completa disolución. Distribuir en recipientes adecuados y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Nutrient Broth:

– Extracto de carne	3,0 g
– Peptona	5,0 g

Preparación:

Suspender 8 g de polvo en 1 litro de agua destilada. Agitar hasta su completa disolución. Distribuir en recipientes adecuados y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

LB Broth (Sigma)

– Triptona (digestión pancreática de caseína)	10 g/L
– Extracto de levadura	5 g/L
– NaCl	5 g/L

Preparación:

Suspender 20 g de polvo en 1 litro de agua destilada. Agitar hasta su completa disolución.
Distribuir en recipientes adecuados y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

DVC_{NAL}

- LB broth 1/10
- Ácido nalidixico 20 µg/mL

NaCl (0.8 %)

- NaCl 8 g
- Agua Destilada 1000 mL
- pH 7.0

Agar 2%

- Agar 20 g
- Agua destilada 1000mL

Preparación:

Suspender 20 g de polvo en 1 litro de agua destilada. Agitar hasta su completa disolución.
Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

ANEXO 2: Tiras API

Tabla 1. Batería de reacciones incluidas en la tira API 20E

Prueba	Reacción / Enzimas
ONPG	Beta-galactosidasa
ADH	Arginina deshidrolasa
LDC	Lisina descarboxilasa
ODC	Ornitina descarboxilasa
CIT	Utilización del citrato
H ₂ S	Producción de H ₂ S
URE	Ureasa
TDA	Triptófano desaminasa
IND	Producción de indol
VP	Producción de acetoina (Voges-Proskauer)
GEL	Gelatinasa
GLU	Fermentación/oxidación de glucosa
MAN	Fermentación/oxidación de manitol
INO	Fermentación/oxidación de inositol
SOR	Fermentación/oxidación de sorbitol
RHA	Fermentación/oxidación de ramnosa
SAC	Fermentación/oxidación de sacarosa
MEL	Fermentación/oxidación de melobiosa
AMY	Fermentación/oxidación de amigdalina
ARA	Fermentación/oxidación de arabinosa
OX	Citocromo oxidasa

Tabla 2. Batería de reacciones incluidas en la tira API 20NE

Prueba	Reacción / Enzimas
NO ₃	Reducción de nitratos en nitritos
	Reducción de nitritos en nitrógeno
TRP	Formación de índole
GLU	Fermentación glucosa
ADH	Arginina dihidrolasa
URE	Ureasa
ESC	Hidrólisis (β -glucosidasa) (Esculina)
GEL	Hidrólisis (Proteasa)
PNPG	β -Galactosidasa
GLU	Fermentación/oxidación de glucosa
ARA	Fermentación/oxidación de arabinosa
MNE	Fermentación/oxidación de manosa
MAN	Fermentación/oxidación de manitol
NAG	Fermentación/oxidación de N-Acetil-Glucosamina
MAL	Fermentación/oxidación de maltosa
GNT	Fermentación/oxidación de gluconato potásico

CAP	Fermentación/oxidación de ácido caprico
ADI	Fermentación/oxidación de ácido adipico
MLT	Fermentación/oxidación de malata
CIT	Fermentación/oxidación de citrato
PAC	Fermentación/oxidación de ácido fenilacético
OX	Citocromo oxidasa



Figura 1. Tira API 20NE de *P. stutzeri* DSM 5190

BIOMÉRIEUX Universidad Politécnica de Valencia - Valencia **apiweb**

API 20 NE V8.0 [Printout](#) [Export](#) [New test](#) [Modify](#)

REFERENCE: DATE: 5/3/17

COMMENT:

EXCELLENT IDENTIFICATION

Strip	API 20 NE V8.0		
Profile	1 0 4 4 6 5 5		
Note	ID. NOT VALID BEFORE 48 HOURS		

Significant taxa	% ID	T	Tests against
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99.9	1.0	

Next taxon	% ID	T	Tests against
<i>Ralstonia pickettii</i>	0.1	0.43	MANa 10% MALa 1%

API 10S
API 20 A
API 20 C AUX
API 20 E
API 20 NE
API 20 STREP
API 50 CHB
API 50 CHE
API 50 CHL
API CAMPY
API CANDIDA
API CORYNE
API LISTERIA
API NH
API STAPH
RAPID 20 E

ID32

Figura 2. Identificación APIWEB de la tira API 20NE de *P. stutzeri* DSM 5190

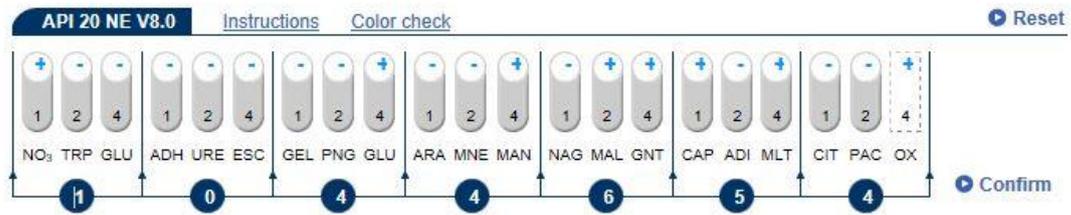


Figura 3. Resultados APIWEB de la tira API 20NE de *P. stutzeri* DSM 4166



Figura 4. Patrón de metabolización de azúcares de *P. stutzeri* DSM 4166

Universidad Politécnica de Valencia - Valencia

API 20 NE V8.0 [Printout](#) [Export](#) [New test](#) [Modify](#)

REFERENCE: DATE: 5/3/17
 COMMENT:

EXCELLENT IDENTIFICATION

Strip	API 20 NE V8.0		
Profile	1 0 4 4 6 5 4		
Note	ID. NOT VALID BEFORE 48 HOURS		

Significant taxa	% ID	T	Tests against
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99.9	0.88	CITa 85%

Next taxon	% ID	T	Tests against
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0.1	0.5	URE 84% ARAa 75% MANa 20% NAGa 75%

API 10S
 API 20 A
 API 20 C AUX
 API 20 E
 API 20 NE
 API 20 STREP
 API 50 CHB
 API 50 CHE
 API 50 CHL
 API CAMPY
 API CANDIDA
 API CORYNE
 API LISTERIA
 API NH
 API STAPH
 RAPID 20 E

ID32

Figura 5. Identificación APIWEB de la tira API 20NE de *P. stutzeri* DSM 4166

ANEXO 3: Soluciones y reactivos utilizados para FISH

PBS 3X

– NaCl	22,8 g
– NaH ₂ PO ₄	3 g
– Na ₂ HPO ₄	2,88 g
– Agua destilada	1 L
– pH	7,5

Preparación:

Disolver los fosfatos y el cloruro sódico por separado. Esterilizar a 115°C durante 20 minutos. El PBS 1X utilizado en el trabajo se preparará a partir de éste.

Paraformaldehído (PFA, Panreac)

Preparación:

Calentar 30 mL de agua destilada a 60°C. Añadir 2 g de PFA al agua y agitar. Adicionar unas gotas de NaOH 5M para disolver el polvo. Completar hasta 50 mL con PBS 3X. Ajustar el pH hasta alcanzar 7,5. Es necesario eliminar los posibles cristales formados mediante filtración. Para su conservación mantener a 4°C si se va a utilizar en las siguientes 48 horas, en caso contrario almacenar a -20°C.

Gelatinización de los portaobjetos

– Gelatina bacteriológica (Cultimed 170-180)	0,1%
– Sulfato potásico cromato (CrK(SO ₄) ₂) (Sigma C-5925)	0,01%

Preparación:

Calentar 40 mL de agua destilada en agitación hasta alcanzar 60°C, añadir 50 mg de gelatina y 5 mg de sal de cromato. Una vez disuelto dejar atemperar hasta 45°C. Sumergir el portaobjetos cubierto con teflón (Marienfeld, red. 9782100) previamente lavados con desengrasante, enjuagados con agua destilada y secados al aire; en esta solución. Escurrir y secar al aire.

Portaobjetos cubiertos con teflón (Marienfeld 9782100)

Lavar los portaobjetos con desengrasante, enjuagar con agua destilada y secar al aire. Sumergir los portaobjetos en geltaína al 0,1% y dejar escurrir. Secar al aire.

Deshidratación de las muestras

- **Etanol 50%:** 100 mL Etanol absoluto + 100 mL agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.
- **Etanol 80%:** 160 mL Etanol absoluto + 40 mL agua destilada. Guardar a temperatura ambiente.
- **Etanol 100% (Absoluto):** Reactivo etanol absoluto grado PRS. Guardar a temperatura ambiente.

Solución de hibridación

- | | |
|----------------|--------|
| – NaCl | 360 µL |
| – HCL-Tris 1 M | 40 µL |
| – Formamida | X µL |
| – SDS 10% | 2 µL |

Completar con agua MiliQ hasta 2 mL

Preparación:

Mezclar todos los componentes añadiendo en último lugar el SDS 10%. Completar con agua MiliQ hasta 2 mL.

La solución de hibridación para este trabajo fue preparada para un 30% de formamida (añadiendo por tanto 600 µL a la solución).

Solución de lavado

– NaCl 5M *	4500-180 μ L
– EDTA 0.5M *	0-500 μ L
– HCL-Tris 1M	1000 μ L
– SDS 10%	50 μ L

Completar con agua MiliQ hasta 50 mL.

*La concentración de NaCl 5M así como la de EDTA 0.5M depende de la concentración de formamida utilizada en la solución de hibridación (tabla 3):

Tabla 3. Concentración de NaCl 5 M y EDTA 0.5 M en función de la concentración de formamida.

%Formamida (Solución de hibridación)	μ L de NaCl 5M (Solución de Lavado)	μ L de EDTA 0.5 M (Solución de Lavado)
10%	4500	-
20%	2150	500
25%	1490	500
30%	1020	500
35%	700	500
40%	460	500
45%	300	500
50%	180	500

La solución de hibridación para este trabajo fue preparada para un 30% de formamida por lo que se añadieron 1020 μ L de NaCl 5M y 500 μ L de EDTA 0.5M.

Sondas

Preparación:

Diluir en agua MiliQ la solución madre de sondas marcadas con fluorocromos hasta alcanzar una concentración de 50 ng/ μ L. Almacenar a -20°C en oscuridad.

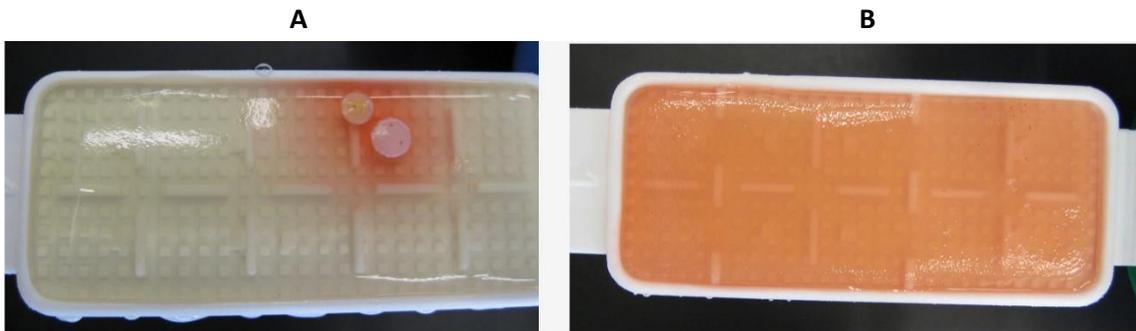
ANEXO 4: Resultado de laminocultivos y placas de contacto

Figura 6. Laminocultivos correspondientes a la toma de muestra del cuadrado 1 (A) y 2 (B) en probeta 1



Figura 7. Laminocultivos correspondientes a la toma de muestra del cuadrado 3 (A) y 4 (B) en probeta 1



Figura 8. Laminocultivos correspondientes a la toma de muestra del cuadrado 2 (A) y 3 (B) en probeta 2

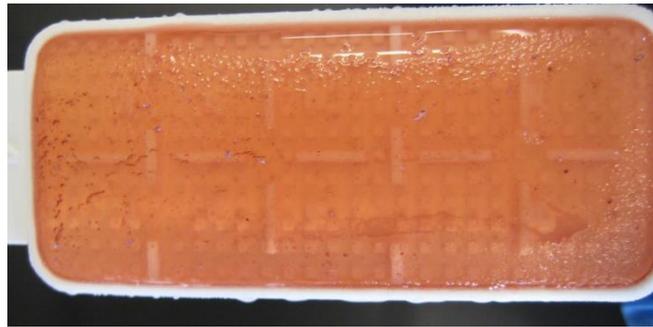


Figura 9. Laminocultivo correspondiente a la toma de muestra del cuadrado 4 en probeta 2

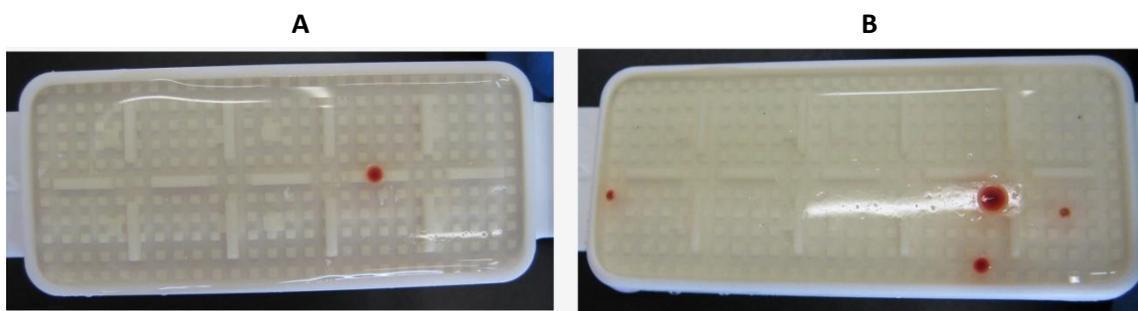


Figura 10. Laminocultivos correspondientes a la toma de muestra del cuadrado 5.1 (A) y 5.2 (B) en probeta 2



Figura 11. Laminocultivo correspondiente a la toma de muestra del cuadrado 6 en probeta 2

ANEXO 5: Resultados de las hibridaciones FISH

Tabla 4. Resultados de la hibridación de las sondas testadas

Especie Bacteriana	Cepa	Origen	Sonda	
			PSE	STU2
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	5190	DSM	(+)	(+)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	4166	DSM	(+)	(+)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	46326	DSM	(+)	(+)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	930	CECT	(+)	(+)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10145	ATCC	(+)	(-)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	378	CECT	(+)	(-)
<i>Salmonella entérica</i>	4266	CECT	(-)	(-)
<i>Escherichia coli</i>	101	CECT	(-)	(-)
<i>Legionella pneumophila</i>	12821	NCTC	(-)	(-)

Tabla 5. Resultados FISH en probeta de pintura mural para la detección de *P. stutzeri*

Cuadrado	Muestra	Probeta 1	Probeta 2
1 Antes de la inoculación	Torunda 1.1	(-)	(-)
	Torunda 1.2	(-)	(-)
	Bisturí 1.1	(-)	(-)
	Bisturí 1.2	(-)	(-)
2 Tras la inoculación	Torunda 2.1	(+)	(+)
	Torunda 2.2	(+)	(+)
	Bisturí 2.1	(+)	(-)
	Bisturí 2.2	(+)	(-)
3 1.5 h después del tratamiento de biolimpieza (antes de lavar)	Torunda 3.1	(+)	(+)
	Torunda 3.2	(-)	(+)
	Bisturí 3.1	(+)	(-)
	Bisturí 3.2	(+)	(-)
4 1.5 h después del tratamiento de biolimpieza (después de lavar)	Torunda 4.1	(+)	(-)
	Torunda 4.2	(+)	(-)
	Bisturí 4.1	(+)	(-)
	Bisturí 4.2	(+)	(-)
5 Una semana después del tratamiento de biolimpieza	Torunda 5.1	(-)	(-)
	Bisturí 5.1	(-)	(-)
6 Dos semanas después del tratamiento de biolimpieza	Torunda 6.1	(-)	(-)
	Bisturí 6.1	(-)	(-)

Tabla 6. Resultados FISH en probeta de pintura mural para la detección de *P. stutzeri* pasadas tres semanas desde la aplicación de bacterias viables

Método de recogida	Enriquecimiento	Hibridación		
Torunda	Si	(-)	(-)	(-)
	No	(-)	(-)	(+)
Bisturí	Si	(-)	(-)	(-)
	No	(+)	(-)	(-)

Tabla 7. Resultados FISH en pintura mural real para la detección de *P. stutzeri*

Muestra	Tratamiento	Método de recogida	Hibridación
Control –	DVC	Torunda	(-)
		Bisturí	(-)
	Incubación	Torunda	(-)
		Bisturí	(-)
Zona Inoculación ₁	DVC	Torunda	(-)
		Bisturí	(-)
	Incubación	Torunda	(-)
		Bisturí	(-)
Zona Inoculación ₂	DVC	Torunda	(-)
		Bisturí	(-)
	Incubación	Torunda	(-)
		Bisturí	(-)
Zona Inoculación ₃	DVC	Torunda	(-)
		Bisturí	(-)
	Incubación	Torunda	(-)
		Bisturí	(-)
Zona adyacente	DVC	Torunda	(-)
		Bisturí	(-)
	Incubación	Torunda	(-)
		Bisturí	(-)