

**GUILHERME DE OLIVEIRA FERREIRA DOS SANTOS**

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE  
*IN SITU* (FISH) PARA DETECÇÃO DE *Bacillus* spp.**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2011**

**GUILHERME DE OLIVEIRA FERREIRA DOS SANTOS**

**APLICAÇÃO DA TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE  
*IN SITU* (FISH) PARA DETECÇÃO DE *Bacillus* spp.**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola, para  
obtenção do título de *Magister  
Scientiae*.

APROVADA: 02 de setembro de 2011.

---

Profa. Silvana de Queiroz Silva

---

Profa. Denise Mara Soares Bazzolli  
(Coorientadora)

---

Prof. Marcos Rogério Tótola  
(Orientador)

*Dedico este trabalho a Deus e aos meus pais, Alda e Edson;*

*Por serem meus pilares, minha força, meus melhores amigos, por nunca me deixarem desistir, e me ampararem em todas as quedas...*

## AGRADECIMENTOS

**“Agradecer é reconhecer que sozinhos nada somos e nada faremos...”**

A Deus, pela presença constante em todos os momentos da minha vida.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade de realizar o Mestrado e por possibilitarem meu amadurecimento profissional e pessoal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Professor Marcos Rogério Tótola, pelo incentivo e confiança, e principalmente por ser um dos responsáveis pelo meu crescimento profissional, nesses quase cinco anos de LBBMA.

À minha coorientadora, Professora Denise Mara Soares Bazzolli, que me acompanha desde a monografia, pela pessoa humana e sensível que é, e pelo apoio e ajuda que nunca me foram negados ao longo de todo esse período.

À minha coorientadora, Professora Maria Catarina Megumi Kasuya, por toda ajuda e apoio, pela corrida atrás de um microscópio, pelos conselhos, e por se mostrar sempre interessada e disponível.

Ao meu coorientador, Professor Antônio Galvão do Nascimento, pela calma, tranquilidade, interesse, idéias e pelo incrível ser humano que é.

A todos os professores e servidores do Departamento de Microbiologia, que ajudaram direta ou indiretamente na conclusão do meu trabalho.

À Professora Silvana de Queiroz Silva (UFOP), por aceitar o convite para compor a Banca Examinadora deste trabalho, seu conhecimento no assunto, acrescentará muito ao nosso trabalho.

À Professora Vera Lúcia dos Santos (UFMG) pela solicitude, colaboração e sugestões oportunas.

À Doutora Beatriz Missagia, pelo auxílio nos primeiros passos da Técnica de FISH.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia do DESA/UFMG, em especial a Professora Juliana Calábria de Araújo, Érika Ferreira de Abreu e Cintia Dutra

Leal, por disponibilizarem o microscópio, pela ajuda com FISH, e por serem tão receptivos.

Ao pessoal do Laboratório de Associações Micorrízicas, pela ajuda com o microscópio, por permitirem meu acesso aos finais de semana, e pela torcida!

À minha estagiária, Luiza Coimbra Scalabrini, pela dedicação e pela ajuda inestimável e indispensável para a conclusão deste trabalho e também pelos momentos de descontração dos intervalos.

Aos meus pais, Alda e Edson, por serem responsáveis por tudo aquilo que sou. Pela amizade, pela força, pela confiança, e pelo amor incondicional que me deram desde que nasci. Amo vocês.

Aos meus demais familiares, pelo amor, carinho, apoio, orações e por todos os bons momentos que compartilhamos.

À minha noiva, Raíssa Mesquita Braga, presente que Deus colocou em minha vida nesta jornada, pelo companheirismo, pelas palavras de conforto e incentivo, pelo amor, e por me aguentar nos momentos mais difíceis... Por tudo isso, estou certo de que você é a mulher da minha vida.

Aos meus grandes amigos Daniel Kumazawa e Carla Gabriela, com quem compartilhei desde os primeiros dias de curso, experiências, tempo, conquistas, angústias e alegrias... Sentirei uma falta imensa do “Trio Petro”, levarei comigo uma única certeza: nossa amizade perdurará por toda uma vida!

Aos amigos e colegas de curso, em especial Patrícia Bernardes, Péricles Fernandes, Marina Fassarella, Carla Godinho, Mônica Silva, Samantha Caixeta, que estiveram comigo ao longo destes dois anos, compartilhando momentos tensos e difíceis, bem como momentos festivos e de comemoração.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA): Cássia, Rita, Karlos, Fábio, Fernanda, Maike, Marcela, Júlia, Diana, Victor, Gisely, Lívia, Thyeli, pela descontração, pelo companheirismo e contribuição para este trabalho.

Aos amigos de sempre, que perto ou longe, fizeram-se presentes: Nathália Menegon, Priscila Tótar, Skarlen Galvarro, Lanna Carrijo, Mariana Rocha, Mariana Barros, Isabella Valadão, Sabrina Feliciano, Aline Lopes.

A todas as pessoas que passaram pela minha vida nesse período em Viçosa, que contribuíram ou colaboraram, de alguma forma, para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

*“É melhor tentar e falhar, que  
preocupar-se e ver a vida passar;  
É melhor tentar, ainda que em vão, que  
sentar-se fazendo nada até o final.  
Eu prefiro na chuva caminhar, que em  
dias tristes em casa me esconder.  
Prefiro ser feliz, embora louco, que em  
conformidade viver...”*

*(Martin Luther King)*



## **BIOGRAFIA**

GUILHERME DE OLIVEIRA FERREIRA DOS SANTOS, filho de Edson Ferreira dos Santos e Geralda Maria de Oliveira, nasceu em 23 de outubro de 1986 em São Paulo, capital.

Em 24 de julho de 2009 graduou-se no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa.

Em agosto de 2009, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa, na área de Microbiologia Ambiental, submetendo-se à defesa de dissertação em 02 de setembro de 2011.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 O gênero <i>Bacillus</i> .....	3
2.2 A técnica de hibridização fluorescente <i>in situ</i> (FISH) .....	5
2.2.1 Utilização do RNAr 16S como molécula alvo.....	6
2.2.2 Panorama metodológico.....	7
2.2.3 Aspectos críticos para aplicação da técnica de FISH.....	11
2.2.4 Aplicações .....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo e fixação das células .....	16
3.2 Hibridização fluorescente <i>in situ</i> .....	16
3.2.1 Sondas de ácidos nucleicos .....	16
3.2.2 Avaliação <i>in silico</i> da especificidade da sonda BAC07 .....	16
3.2.3 Fixação das células.....	17
3.2.4 Montagem das lâminas e pré-tratamento enzimático.....	18
3.2.5 Condições de hibridização .....	18
3.2.6 Observação microscópica .....	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	21
4.1 Avaliação <i>in silico</i> da especificidade da sonda BAC07 .....	21
4.2 Aplicação da técnica de FISH e avaliação experimental da sonda BAC07 .....	24
5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39

## RESUMO

SANTOS, Guilherme de Oliveira Ferreira dos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2011. **Aplicação da técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) para detecção de *Bacillus* spp.** Orientador: Marcos Rogério Tótola. Co-orientadores: Denise Mara Soares Bazzolli, Maria Catarina Megumi Kasuya e Antônio Galvão do Nascimento.

Bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* possuem grande plasticidade fisiológica no que se refere às condições de temperatura, pH e salinidade dos ambientes nos quais são encontradas, como: água, solo, ambientes poluídos, entre outros. Sob o aspecto ambiental, possuem a capacidade de produção de biosurfactantes que as colocam como micro-organismos potenciais para aplicação na Recuperação Avançada de Petróleo Melhorada por Micro-organismos (MEOR). Tecnologias economicamente viáveis e de crescente aceitação, como a MEOR, podem receber informações adicionais das ferramentas moleculares acerca do comportamento microbiano. Neste contexto, a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) apresenta-se como uma importante ferramenta para detecção de micro-organismos presentes em diferentes amostras. Trata-se de uma técnica que permite a detecção de micro-organismos sem a necessidade prévia de cultivo. Sondas de oligonucleotídeos complementares ao RNAr podem ser elaboradas com especificidade que varia desde o nível de espécie até o nível de Domínio. Este trabalho teve como objetivos aplicar a técnica de FISH para detectar bactérias do gênero *Bacillus* e estabelecer a melhor combinação de parâmetros que aliassem especificidade à emissão de um adequado sinal de fluorescência das sondas utilizadas. Desta forma, foram utilizadas uma sonda específica para o gênero *Bacillus* (BAC07) e uma sonda universal para o Domínio *Bacteria* (EUB338). A análise *in silico* revelou que a sequência-alvo da sonda BAC07 é encontrada predominantemente em bactérias do gênero *Bacillus*, porém não foi descartada a possibilidade de hibridização da sonda BAC07 com outros membros da classe *Bacilli*. Para aplicação da técnica de FISH e avaliação experimental da especificidade da sonda BAC07, os parâmetros avaliados foram: o método de fixação das células, a concentração de formamida adicionada ao tampão de

hibridização e o pré-tratamento das células com lisozima. A combinação de parâmetros que garantiu o melhor sinal para a sonda EUB338 foi: células fixadas em solução de paraformaldeído 4%, tampão de hibridização com 35% de formamida, sem pré-tratamento com lisozima; as melhores condições para a sonda BAC07 foram: a fixação das células em solução de paraformaldeído 4%, tampão de hibridização com 40% de formamida e sem pré-tratamento com lisozima. Conseguiu-se uma detecção específica de bactérias do gênero *Bacillus* pela sonda BAC07. No entanto, o sinal de fluorescência foi muito fraco quando comparado ao sinal da sonda EUB338, de modo que, para utilização da sonda BAC07 para detecção específica de *Bacillus* em amostras ambientais, o estabelecimento de condições que promovam a intensificação do sinal é requerido.

## ABSTRACT

SANTOS, Guilherme de Oliveira Ferreira dos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, September 2011. **Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique for detection of *Bacillus* spp.** Adviser: Marcos Rogério Tótola. Co-advisers: Denise Mara Soares Bazzolli, Maria Catarina Megumi Kasuya and Antônio Galvão do Nascimento

Bacteria belonging to the genus *Bacillus* have physiological plasticity regarding to the conditions of temperature, pH and salinity of the environments in where they are found, such as: water, soil, polluted environments, among others. Under the environmental aspect, these bacteria have the capacity to produce biosurfactants which put them as potential microorganisms for the application of Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR). Technologies economically viable and of growing acceptance, like MEOR, can receive additional informations from the molecular tools about the microbial behavior. In this context, the fluorescence *in situ* hybridization technique (FISH) is an important tool for detection of microorganisms present in different samples. This technique allows the detection of microorganisms without the need of cultivation. Oligonucleotide probes complementary to the rRNA can be designed with specificities that range from the species level to the domains level. The aims of this work was to apply the FISH technique to detect bacteria of the genus *Bacillus* and establish the best combination of parameters which combines specificity and good fluorescence signal intensity of the probes utilized. In this way, it was utilized a specific probe for the genus *Bacillus* (BAC07) and a universal probe for the Domain Bacteria (EUB338). The *in silico* analysis revealed that the target sequence of probe BAC07 is found predominantly in bacteria of the genus *Bacillus*, however the possibility of hybridization of probe BAC07 with another member of class *Bacilli* was not discarded. The parameters analyzed for the application of the FISH technique and evaluation of the specificity of probe BAC07 were: cell fixation method, formamide concentration added to the hybridization buffer and pretreatment of cells with lysozyme. The combination of parameters that ensured the best signal for the probe EUB338 was: cells fixed in paraformaldehyde solution 4%, hybridization buffer containing 35% formamide, without pretreatment with lysozyme; the best

conditions for the probe BAC07 were: cells fixed in paraformaldehyde solution 4%, hybridization buffer containing 40% formamide, without pretreatment with lysozyme. A specific detection of bacteria of the genus *Bacillus* was achieved by probe BAC07. However, the fluorescence signal intensity was very weak when in comparison to the signal of probe EUB338, thereby, for the utilization of probe BAC07 for detection of *Bacillus* in environmental samples, an enhanced signal is required.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A Microbiologia Ambiental, em sua fase atual, tem passado por avanços significativos, que se devem em parte ao grande acúmulo de informações biológicas. As comunidades microbianas prosperam nos mais diferentes habitats, como o solo, ambientes aquáticos, no trato digestivo de animais, em tecidos vegetais, etc. Essas comunidades têm sido caracterizadas em detalhes por meio de técnicas variadas, principalmente as moleculares. Informações sobre moléculas-chave, como DNA e proteínas, estão sendo acumuladas em uma taxa exponencial, e acredita-se que novas técnicas moleculares acelerem ainda mais esse processo. Presume-se que, em um futuro próximo ter-se-á uma maior compreensão da diversidade microbiana, o que propiciará a obtenção de informações mais precisas sobre o papel central dos diferentes micro-organismos em seus habitats (RAMETTE et al., 2009).

As técnicas tradicionais de identificação e de detecção de bactérias fundamentam-se principalmente na forma de obtenção de carbono e de energia, exigências nutricionais, meio de cultivo para crescimento e observação microscópica. Contudo, essas técnicas limitam o estudo da diversidade microbiana de um dado ambiente. As condições de cultivo são seletivas para certos organismos, e muitas espécies não são sequer detectadas. Desse modo, tem-se uma caracterização errônea, que não retrata a realidade do ambiente natural (AMANN et al., 1995). Por outro lado, a técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) mostra-se bastante promissora, uma vez que permite a detecção de micro-organismos *in situ*, e sem, portanto, requerer o cultivo prévio.

A técnica de FISH combina a precisão da genética molecular com a informação visual da técnica de microscopia, possibilitando a visualização e identificação de células microbianas em seus habitats naturais (MOTER e GÖBEL, 2000). Trata-se de uma técnica que permite a identificação molecular, enumeração e, na maior parte dos casos, a localização de bactérias fisiologicamente ativas, o que representa uma vantagem em relação às técnicas de *fingerprinting*, como o DGGE (Eletroforese em gel de gradiente desnaturante) (BERTAUX et al., 2007).

O Laboratório de Biodiversidade e Biotecnologia para o Meio Ambiente (LBBMA), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), tem realizado inúmeros

trabalhos de relevância ambiental, explorando as áreas de fisiologia, biologia molecular, diversidade e taxonomia dos micro-organismos envolvidos nos processos biotecnológicos de interesse, a exemplo da biorremediação e recuperação avançada de petróleo. Nesses trabalhos, bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* destacam-se como micro-organismos potenciais para aplicação ambiental. Essas bactérias são comumente encontradas em água de produção de reservatórios de óleo, possuindo características desejáveis, como: formação de esporos, capacidade de produção de ácidos e de biossurfactantes, que as colocam como micro-organismos potenciais para aplicação na Recuperação Avançada de Petróleo Melhorada por Micro-organismos (MEOR) (MCINERNEY *et al.*, 2002).

O estudo da Microbiologia do Petróleo tem contribuído para um melhor aproveitamento deste combustível, por meio de estratégias que propiciam uma melhor recuperação do petróleo, ou ainda por auxiliar na limpeza de vazamentos acidentais de petróleo, por ação de micro-organismos e/ou seus metabólitos.

Tecnologias economicamente viáveis e de crescente aceitação, como a MEOR, podem receber informações adicionais das ferramentas moleculares acerca do comportamento microbiano. Diante dessas considerações e reconhecendo a escassez de estudos relativos à aplicação da técnica de FISH na detecção específica de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, esse trabalho teve como objetivo implementar a técnica de FISH no LBBMA, e padronizá-la para detectar especificamente bactérias do gênero *Bacillus* em cultura pura, visando sua futura aplicação em amostras ambientais associadas ao petróleo. Utilizaram-se duas sondas: a sonda universal para o Domínio *Bacteria* EUB338 (AMANN *et al.*, 1990), importante como controle do estudo, para padronização da intensidade do sinal e comparação do mesmo com o sinal emitido pela sonda BAC07 (LIU *et al.*, 2001), supostamente específica para o gênero *Bacillus*. Avaliou-se ainda, para a sonda BAC07, um conjunto de parâmetros que garantisse especificidade aliada a um bom sinal de fluorescência, tais como: fixação das células, determinação da concentração ideal de formamida adicionada ao tampão de hibridização e efeito da adição de pré-tratamento com lisozima na detecção de *Bacillus* spp.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* consiste de uma grande e heterogênea coleção de bactérias Gram-positivas, caracterizadas pela forma de bastonetes, formadoras de esporos resistentes a condições adversas, tais como escassez de nutrientes, elevada temperatura e baixa atividade de água. Compreende bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, que possuem grande plasticidade fisiológica no que se refere às condições de temperatura, pH e salinidade dos ambientes nos quais são encontradas, tais como: água, solo, superfícies ou tecidos de plantas, ambientes poluídos, entre outros (HOLT et al., 1994, ENCINAS et al., 1996). Muitas espécies são comercialmente importantes, destacando-se nos setores clínico, industrial e ambiental, em razão da produção de anticorpos, enzimas, biossurfactantes, dentre outros produtos (ENCINAS et al., 1996; IVANOVA et al., 1999).

Sob o aspecto ambiental, bactérias do gênero *Bacillus* possuem a capacidade de produção de ácidos, tais como ácido acético e ácido láctico, que pode ser importante em processos de MEOR, principalmente em formações carbonáceas, nas quais os ácidos produzidos podem alterar a estrutura dos poros da rocha, dissolvendo seu material constituinte e facilitando a mobilização do óleo (MCINERNEY et al., 2002). Possuem ainda grande relevância, no que se refere à produção de biossurfactantes, sendo capaz de produzir estes compostos tanto em condições aeróbias quanto em condições anaeróbias (FERNANDES, 2007; BATISTA, 2008; LIMA, 2008; ROSSMANN, 2008).

Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas, possuem propriedades tensoativas que alteram as características superficiais e interfaciais de um líquido. Uma diferença em relação aos surfactantes químicos é que os biossurfactantes são produzidos por seres vivos, sendo de importância relevante os produzidos por microorganismos (MAKKAR e CAMEOTRA, 1998). A significativa redução da tensão interfacial causada pelo biossurfactante aumenta a solubilidade e emulsificação das fases imiscíveis, e a biodisponibilidade do substrato insolúvel para o micro-

organismo (GHOJAVAND et al., 2008). A capacidade de reduzir a tensão nas interfaces água-óleo e óleo-rocha leva à redução das forças capilares culminando com incrementos na recuperação do petróleo (BANAT et al., 2000). Ghojavand et al. (2008) mostraram que o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*, isolado de uma jazida de petróleo iraniana, apresenta alta estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura, e em concentrações de até 20% de NaCl, obtendo-se alta atividade de emulsificação desse biossurfactante, o que pode resultar em grande utilização no transporte de petróleo pesado, e na sua utilização na recuperação avançada do petróleo; desta forma esse composto biológico pôde ser considerado um poderoso tensoativo para aplicações em condições extremas, que normalmente prevalecem na recuperação avançada do petróleo.

Dentro do gênero *Bacillus*, a espécie *Bacillus subtilis* é considerada modelo para estudos de bactérias Gram-positivas, sendo um dos procaríotos mais estudados em nível molecular e celular, servindo como padrão nos estudos de diferenciação, regulação de genes/proteínas e eventos do ciclo celular em bactérias (GRAUMANN, 2007). Trata-se de um micro-organismo de solo, não patogênico, não colonizador de tecidos, formador de esporos, produtor de ácidos e alcoóis, anaeróbio facultativo, capaz de utilizar nitrato ou nitrito como aceptores finais de elétrons (PACCEZ, 2007; SONENSHEIN et al., 1993). Dada a ausência de patogenicidade e incapacidade de colonizar tecidos, foi conferida a esse organismo a denominação GRAS (**g**enerally **r**egarded **a**s **s**afe), assim podendo ser utilizado como probiótico na indústria de alimentos (PACCEZ, 2007).

A classificação sistemática das bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* permaneceu intacta até 2004, quando no Manual de Bergey de Bacteriologia Sistemática, alguns antigos membros do gênero *Bacillus* foram reunidos em novas famílias, incluindo: *Acylobacillaceae*, *Paenibacillaceae* e *Planococcaceae*, obtendo-se assim uma nova hierarquia taxonômica: Domínio *Bacteria*, Filo: *Firmicutes*, Família: *Alicyclobacillaceae* (gênero *Alicyclobacillus*), Família *Bacillaceae* (gêneros *Bacillus*, *Geobacillus*), Família: *Paenibacillaceae* (gêneros *Paenibacillus*, *Brevibacillus*), Família *Planococcaceae* (gênero *Sporosarcina*) (Tabela 1) (GARRITY et al., 2004). Essa nova classificação proposta baseia-se na abordagem filogenética, conseguida em grande parte pela análise de sequências do DNAr 16S (GARRITY et al., 2004). Surpreendentemente, análises de sequências de espécies do gênero

*Bacillus* mostraram certo grau de similaridade com sequências de algumas bactérias não formadoras de esporos, incluindo os gêneros: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, no nível de Ordem, e *Listeria* e *Staphylococcus*, no nível de Família (TODAR, 2011).

**Tabela 1** - Redefinição taxonômica de algumas importantes bactérias anteriormente pertencentes ao gênero *Bacillus* (TODAR, 2011).

<b>Manual de Bergey de Bacteriologia Sistemática (1986)</b>	<b>Manual de Bergey de Bacteriologia Sistemática (2004)</b>
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>
<i>Bacillus agri</i>	<i>Brevibacillus agri</i>
<i>Bacillus alginolyticus</i>	<i>Paenibacillus alginolyticus</i>
<i>Bacillus amylolyticus</i>	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>
<i>Bacillus alvei</i>	<i>Paenibacillus alvei</i>
<i>Bacillus azotofixans</i>	<i>Paenibacillus azotofixans</i>
<i>Bacillus brevis</i>	<i>Brevibacillus brevis</i>
<i>Bacillus globisporus</i>	<i>Sporosarcina globispora</i>
<i>Bacillus larvae</i>	<i>Paenibacillus larvae</i>
<i>Bacillus laterosporus</i>	<i>Brevibacillus laterosporus</i>
<i>Bacillus lentimorbus</i>	<i>Paenibacillus lentimorbus</i>
<i>Bacillus macerans</i>	<i>Paenibacillus macerans</i>
<i>Bacillus pasteurii</i>	<i>Sporosarcina pasteurii</i>
<i>Bacillus polymyxa</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
<i>Bacillus popilliae</i>	<i>Paenibacillus popilliae</i>
<i>Bacillus psychrophilus</i>	<i>Sporosarcina psychrophilia</i>
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
<i>Bacillus thermodenitrificans</i>	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>

## **2.2A técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH)**

Para identificar e quantificar micro-organismos presentes em um dado ecossistema desenvolveu-se métodos independentes de cultivo, uma vez que métodos dependentes de cultivo não possibilitam o estudo da diversidade microbiana total de um ambiente (BOTTARI et al., 2006). Assim, o avanço da Biologia Molecular aliado às limitações dos métodos microbiológicos tradicionais colocam as técnicas moleculares como ferramentas importantes no estudo de

comunidades microbianas (REIS JÚNIOR et al., 2002; RAMETTE et al., 2009). Neste contexto, a técnica de FISH surge como uma das ferramentas para detecção e identificação de micro-organismos sem a necessidade de cultivo. Baseada na conservação irregular do RNAr, sondas de oligonucleotídeos podem ser projetadas com especificidade variada, desde o nível de espécie até o nível de filo ou mesmo Domínio, e ao serem marcadas com um fluorocromo, possibilitam a detecção e identificação de micro-organismos em uma amostra (Amann e Fuchs, 2008). Desta forma, serão abordados os fatores que devem ser analisados criteriosamente antes de executar a técnica de FISH.

### **2.2.1 Utilização do RNAr 16S como molécula alvo**

A técnica de FISH é parte integrante da abordagem sobre RNAr em estudos de ecologia microbiana e evolução (OLSEN et al., 1986). Os RNAr são moléculas funcionalmente constantes, universalmente distribuídas e relativamente bem conservadas, mesmo entre organismos filogeneticamente distantes (WOESE, 1987), e juntamente com proteínas específicas constituem a estrutura supra-molecular, o ribossomo.

O ribossomo é constituído por duas subunidades, cada qual é composta por moléculas de RNAr de diferentes tamanhos, definidas de acordo com as propriedades de sedimentação, designadas como unidades Svedberg. Nos ribossomos de procariotos, a subunidade maior (50S) é constituída pelas moléculas de RNAr 5S e RNAr 23S e a subunidade menor (30S), pelo RNAr 16S (LECHNER e TELHADA, 1994). As moléculas maiores (16S e 23S) contêm diversas regiões conservadas úteis para se obter um alinhamento adequado, e ainda assim apresentam variabilidade suficiente em outras regiões da molécula para servir como cronômetros filogenéticos (AMANN et al., 1995). A molécula de RNAr 16S possui aproximadamente 1500 nucleotídeos, enquanto que a molécula de RNAr 23S possui aproximadamente 3000 nucleotídes, por serem maiores e conterem mais informação, essas duas moléculas permitem com que se tenha melhor distinção entre espécies, o que permite, por sua vez, a obtenção de árvores filogenéticas mais precisas (NEVES, 2002).

De acordo com Amann e Ludwig (2000), a molécula de RNAr 16S pode ser considerada como molécula-alvo dos biomarcadores, em razão de algumas características:

- I. Está sempre presente em todas as células.
- II. Apresenta elevado número de cópias por célula ( $10^4$ ), o que propicia alta sensibilidade de sondas cujo alvo é o RNAr.
- III. É uma molécula que, em razão da sua função essencial, apresenta poucas mutações.
- IV. Possivelmente não ocorre transferência lateral do gene que a codifica.
- V. Muitas sequências já são conhecidas, e estão depositadas em banco de dados.
- VI. A estrutura primária da molécula de RNAr 16S é composta por regiões tanto de baixa como de elevada conservação, ao longo do processo evolutivo.

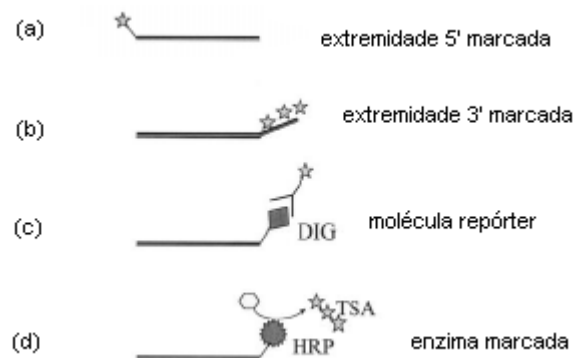
### **2.2.2 Panorama metodológico**

Técnicas moleculares para visualização direta de micro-organismos em seus ambientes naturais têm sido desenvolvidas e utilizadas para auxiliar a compreensão de aspectos relevantes da ecologia de populações e de comunidades microbianas (MOTER e GOBEL, 2000). Dentre as técnicas utilizadas, a técnica de FISH apresenta-se como ferramenta importante no estudo de diferentes segmentos da Microbiologia.

Na construção de uma sonda de ácido nucléico destinada à aplicação da técnica de FISH, preconiza-se a realização de quatro etapas fundamentais (AMANN et al., 1995), a saber:

- I. Alinhamento do gene DNAr da espécie de interesse.
- II. Identificação da sequência-alvo que será usada para se determinar a sequência da sonda de ácido nucléico.
- III. Síntese e marcação da sonda.
- IV. Avaliação experimental e padronização das condições de hibridização para máxima especificidade da sonda.

As sondas utilizadas na técnica de FISH devem ser acopladas às moléculas marcadoras, permitindo a visualização microscópica do micro-organismo após a ocorrência da hibridização entre a sonda e as moléculas de RNAr constituintes dos ribossomos. Existem duas formas de marcação da sonda, uma direta e outra indireta. A marcação direta é o procedimento mais usual, por ser mais rápido, possuir menor custo e ser mais simples. Assim, moléculas fluorescentes são diretamente ligadas ao oligonucleotídeo durante a sua síntese, através de uma ligação amino à extremidade 5' da sonda, ou enzimaticamente, pela utilização de uma transferase terminal que marcará a extremidade 3' (AMANN et al., 1995) (Figura 1). Na marcação indireta, são usadas moléculas sinalizadoras, como anticorpos e enzimas marcadas com fluorescência (MÖTER E GOBEL, 2000) (Figura 1).



**Figura 1** - Marcação da sonda. Marcação direta (a) e (b); marcação indireta (c), (d). Sondas marcadas com dioxigenina (DIG); Peroxidase horseradish (HRP) que usa tiramida (TSA) como substrato para amplificação enzimática de sinal (Adaptado de MOTER e GÖBEL, 2000).

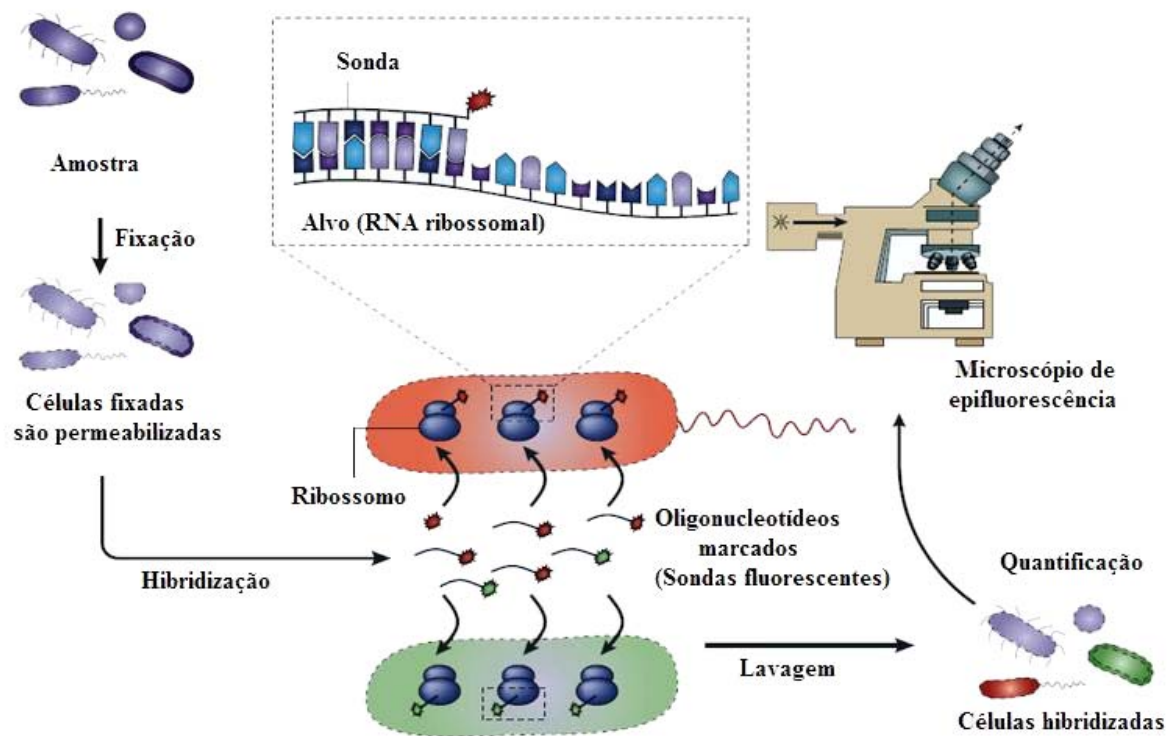
Os fluorocromos mais utilizados estão listados na Tabela 2 (MOTER e GÖBEL, 2000).

**Tabela 2** - Principais fluorocromos utilizados na técnica de FISH (MOTER e GÖBEL, 2000).

Fluorocromo	Cor	Excitação (nm)*	Emissão (nm)*
Alexa488	Verde	493	517
AMCA	Azul	399	446
CY3	Vermelho	552	565
CY5	Vermelho	649	670
CY7	Violeta	743	767
DAPI	Azul	350	456
Fluoresceína	Verde	494	523
Rodamina	Vermelho	555	580
TAMRA	Vermelho	543	575
Texas red	Vermelho	590	615
TRITC	Vermelho-laranja	550	580

\*Os comprimentos de onda podem variar ligeiramente, dependendo do fabricante.  
(AMCA) - ácido acético metil cumarínico, (CY3) - carbocianina 3, (CY5) - carbocianina 5,  
(CY7) - carbocianina 7, (DAPI) - 4'-6-diamidino-2-fenilindol, (TAMRA) - tetrametilrodamina,  
(TRITC) - tetrametilrodamina isotiocianato.

As etapas básicas da técnica compreendem: fixação, que mantém a morfologia da célula; montagem das lâminas, que consiste em fixar as células na lâmina de vidro e desidratá-las em etanol; hibridização, que consiste na entrada da sonda na célula e na ligação da mesma a uma porção do RNAr; coloração com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), um fluorocromo para DNA, que cora todas as células sem especificidade, e por fim, a observação microscópica, sendo possível observar somente os organismos alvos, por meio de filtro específico para a sonda ou observar todos os organismos da amostra, utilizando filtro específico para DAPI (GODINHO, 2010) (Figura 2).



**Figura 2** - Etapas básicas da Técnica de FISH (Adaptado de Amann e Fuchs, 2008).

As sondas marcadas penetram nas células bacterianas fixadas e formam ligações estáveis, por meio de pontes de hidrogênio entre nucleotídeos complementares com a região RNAr 16S dos ribossomos, permitindo a visualização direta da amostra hibridizada em um microscópio de fluorescência ou em um microscópio confocal a laser. Quando não há completa complementariedade, não ocorre uma hibridização estável, e a sonda de oligonucleotídeos poderá ser removida da célula durante as etapas de lavagem (LINDEA et al., 1999).

Antes da hibridização, as células são fixadas e permeabilizadas para entrada das sondas fluorescentes no interior celular, e para prevenção da degradação do RNA por RNAses. Efetiva fixação é crucial para resultados satisfatórios de FISH. A fixação pode empregar agentes precipitantes como o etanol e metanol, ou agentes *cross-linking*, como os aldeídos (MOTER e GOBEL, 2000). Os agentes *cross-linking* podem não ser efetivos para Gram-positivas, sendo nesses casos recomendada a fixação com agentes precipitantes, como o etanol (ROLLER et al., 1994). Em alguns casos de bactérias Gram-positivas, tratamentos enzimáticos com lisozima, lisostafina, ou uma mistura de enzimas são avaliados com o intuito de promover a

desestruturação do peptidoglicano, permitindo assim a entrada da sonda e um melhor sinal fluorescente (LAWSON et al., 2011).

A hibridização ocorre sob condições estringentes, para garantir o anelamento específico da sonda ao sítio-alvo, no entanto, as condições de hibridização são estabelecidas de acordo com o tamanho da sequência, composição desta (%GC) e identidade da sonda com a sequência alvo. A estringência pode ser ajustada por meio da concentração de formamida adicionada ao tampão de hibridização. A formamida diminui a temperatura de *melting*, pelo enfraquecimento das pontes de hidrogênio, permitindo a utilização de temperaturas mais baixas, em condições onde é requerida alta estringência. A hibridização ocorre em câmara escura, geralmente em temperaturas que variam de 37 a 50 °C, com tempo variando de 30 min até várias horas (MOTER e GOBEL, 2000).

### **2.2.3 Aspectos críticos para aplicação da técnica de FISH**

A técnica de FISH apresenta algumas limitações que devem ser analisadas criteriosamente e alternativas devem ser introduzidas para minimizar os problemas enfrentados.

O limite de detecção da técnica é de  $10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Quando populações presentes na amostra estão abaixo dessa concentração, dificilmente serão detectadas (AMANN et al., 1995). Nessa situação, amostras podem ser concentradas, por exemplo, por meio de membranas filtrantes, o que resultará, mesmo em concentrações baixas, em uma densidade celular capaz de ser detectada (AMANN et al., 1995; WAGNER et al., 2003). Em contrapartida, a intensidade proporcionada pelo pareamento da sonda às moléculas alvo não pode correlacionar-se diretamente com o número de células, uma vez que o número de cópias da sequência-alvo depende do estado fisiológico da célula. Assim, um baixo número de ribossomos, que acarreta em uma baixo conteúdo de RNAr, é um dos principais fatores limitantes na aplicação de FISH (AMANN et al., 2000).

Para minimização de problemas relacionados à qualidade do sinal emitido e ao baixo conteúdo ribossomal, a técnica CARD-FISH (do inglês *Catalyzed Reporter Deposition-FISH*) mostra-se como uma ferramenta interessante, uma vez que o sinal

emitido pela sonda é mais forte (STEIL, 2007). Nessa técnica, as sondas estão ligadas à enzima HRP (*horseradish peroxidase*), que catalisa a formação de moléculas altamente reativas (radicais tiramida) marcadas com fluorocromo, que se ligam às regiões ribossomais e a proteínas próximas à sonda, ocasionando aumento significativo do sinal fluorescente (PERNTHALER et al., 2002; STEIL, 2007). Dessa forma, o sinal da sonda é amplificado muitas vezes, pela deposição de tiramida marcada, permitindo a detecção de células com baixo conteúdo ribossomal (PERNTHALER et al., 2002; WAGNER et al., 2003).

Outro fator que limita o processo é a insuficiente penetração da sonda na célula bacteriana, etapa que depende da estrutura da parede celular. Para muitas bactérias Gram-positivas, estratégias diferenciadas de fixação de células e tratamentos enzimáticos são utilizadas para garantir a penetração (MOTER E GOBEL, 2000): lisozima e lisostafina em *Staphylococcus* (LAWSON et al., 2011), lisozima em *Bacillus* (BASHAN et al., 2010), mutanolisina e lisozima para detecção de esporos de *Bacillus* (FILION et al., 2009).

Tratamentos enzimáticos para contornar o obstáculo da parede celular de bactérias Gram-positivas vêm sendo explorados para melhores resultados da técnica de FISH. Tratamentos combinando lisozima e acromopeptidase seguida por exposição à lipase foram utilizados para enumeração e detecção de lactobacilos em biofilmes orais, por meio de sondas específicas (QUEVEDO et al., 2011). Células de *Staphylococcus aureus* foram envolvidas em agarose, e tratadas com metanol e lisozima, conseguindo-se boa permeabilização e bons sinais de fluorescência (LAWSON et al., 2011).

A acessibilidade ao sítio-alvo é um terceiro fator crítico que, quando derrubadas ou minimizadas as barreiras de baixo conteúdo ribossomal e da impermeabilidade celular, figura-se como uma das principais razões para resultados insatisfatórios da técnica (FUCHS et al., 1998). Esses autores realizaram um estudo sistemático da acessibilidade de sítios-alvos do RNAr 16S de *Escherichia coli*, utilizando mais de 200 sondas marcadas com carboxifluoresceína que mapeavam toda a estrutura do RNAr 16S. Essas sondas foram agrupadas de acordo com a fluorescência relativa em seis classes de brilho, sendo a fluorescência de uma dada sonda expressa em função da sonda que apresentava a maior intensidade de fluorescência. A acessibilidade pôde, assim, ser descrita em função do brilho obtido

com cada sonda. Por meio dessa estratégia, os autores descreveram a existência de regiões inacessíveis, de modo que as células tratadas com sondas específicas para essas regiões apresentavam pouco ou nenhum brilho. Por fim, verificaram que as regiões mais variáveis, que possibilitariam a construção de sondas específicas, eram também as mais inacessíveis.

Estudo semelhante ao de Fuchs et al. (1998) foi feito utilizando sondas que tinham como alvo, o RNAr 16S de *Pirellula* sp (Domínio *Bacteria*), RNAr 16S de *Metallosphaerula sedula* (Domínio *Archaea*) e RNAr 18S de *Saccharomyces cerevisiae* (Domínio *Eukarya*), mostrando que os mapas de acessibilidade são muito similares para organismos filogeneticamente próximos (BEHRENS et al., 2003a). Verificaram ainda que o fluorocromo acoplado à sonda também interfere na acessibilidade. Neste caso, foi sugerido que carbocianina 3 (Cy3) por possuir uma estrutura mais linear, poderia reduzir impedimento estérico e, com isso, facilitaria a ligação da sonda ao sítio-alvo (BEHRENS et al., 2003a).

As etapas de fixação e hibridização podem aumentar a acessibilidade da sonda ao sítio-alvo por meio de mudanças conformacionais da molécula-alvo (BEHRENS et al., 2003b). O problema de inacessibilidade pode ser contornado com a utilização de oligonucleotídeos não-marcados (*helpers*) adjacentes ao sítio-alvo da sonda, conseguindo-se aumento do sinal de hibridização em *E. coli* (FUCHS et al., 2000).

Yilmaz e Noguera (2004) revelaram em seus estudos que a eficiência de uma sonda para FISH, pode ser definida não somente pela sua acessibilidade, mas também em função da afinidade termodinâmica da sonda ao sítio alvo. Esses autores verificaram que interações intramoleculares de DNA, interações terciárias RNA-RNA e interação proteína-RNA afetam a estabilidade do híbrido DNA/RNA. A presença de proteínas ribossomais, pode provocar redução direta da afinidade da sonda, por meio de contatos íntimos com o sítio alvo, podendo prevenir a reorganização global do RNAr, o que afeta a termodinâmica ou a cinética da hibridização (YILMAZ e NOGUERA, 2004).

## 2.2.4 Aplicações

Mesmo com limitações, a técnica de FISH tem sido utilizada nos mais diversos segmentos da Microbiologia, a saber: diversidade microbiana em amostras de ambientais naturais, em sistema de tratamento de águas residuárias, detecção de patógenos de humanos, animais e vegetais, amostras de alimentos, em culturas de sangue, etc (MOTER e GOBEL, 2000).

A combinação de métodos hidrogeológicos e moleculares, utilizando FISH e DGGE, forneceram melhores informações sobre a comunidade e as potencialidades da atividade de micro-organismos metanogênicos em um aquífero contaminado com hidrocarbonetos de petróleo (KLEIKEMPER et al., 2005).

Nove diferentes tipos de sondas de oligonucleotídeos fluorescentes, para a região D1/D2 do RNAr 26S de diferentes leveduras envolvidas no processo de vinificação, foram desenvolvidos para aplicação da técnica de FISH, demonstrando claramente o potencial da técnica de FISH para identificar leveduras naturalmente presentes nos vinhos (XUFRE et al., 2006).

Uma sonda de oligonucleotídeos, específica para o RNA ribossomal 16S de espécies do gênero *Rickettsia* foi desenvolvida, conseguindo-se hibridização específica, apenas com espécies de *Rickettsia*, colocando a técnica de FISH como um método sensível e específico na detecção de *Rickettsia* spp. em amostras de tecidos pulmonares de suínos (SVENDSEN et al., 2007)

Protocolos rápidos e efetivos, utilizando diferenciados tratamentos enzimáticos, detectaram esporos de *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* e *Bacillus atrophaeus*, reduzindo o tempo de execução da técnica (incluindo os pré-tratamentos enzimáticos e a etapa de hibridização) para cerca de uma hora, alcançando eficácia também em populações de células mistas (FILION et al., 2009). Segundo os autores, estes protocolos podem ser adaptados para outros tipos de esporos bacterianos.

Utilizando duas sondas, uma específica, e outra universal para detectar *Bacillus pumillus* ES4, que promove o crescimento e melhora o estabelecimento de plantas em rejeitos de minas, a análise de FISH visualizada por meio de microscopia confocal a laser, revelou que os locais preferenciais de colonização destas bactérias são as pontas das raízes e a região de alongação radicular (BASHAN et al., 2010).

A técnica de FISH foi otimizada para detecção de propionibactérias do leite por meio de sondas específicas, os resultados foram comparados com métodos de plaqueamento de queijo Gruyère comercial, revelando que a técnica de FISH poderia ser utilizada como um método rápido para enumeração destas bactérias em amostras de queijo (BABOT et al., 2011).

A comunidade microbiana que habita a coluna de água de Terra Nova Bay, Antártica, foi analisada por FISH, revelando como grupos majoritários: *Bacteroidetes*, que prosperam em altas concentrações de matéria orgânica dissolvida; *Gammaproteobacteria* que foram ubíquos, sugerindo um papel central destes organismos na comunidade bacterioplanctônica analisada; e *Actinobacteria* que mostraram ampla gama de tolerância ao sal (LO GIUDICE et al., 2011).

Detecção de leveduras do gênero *Candida* e detecção específica de *Candida albicans* foram conseguidas fixando as células em etanol/formalina (BISHA et al., 2011). Os autores utilizaram, adicionalmente, oligonucleotídeos *helpers* que aumentaram em 10 vezes a intensidade de fluorescência das sondas, garantindo excelentes sinais.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo e fixação das células**

Culturas puras das seguintes bactérias foram utilizadas neste estudo: *Acinetobacter baumannii* (LBBMA 54), *Bacillus cereus* (LBBMA 103), *Bacillus licheniformis* (LBBMA RI4978), *Bacillus sphaericus* (LBBMA RI4915), *Bacillus subtilis spizizenii* (LBBMA RI4951), *Enterobacter agglomerans* (LBBMA 102A), *Micrococcus luteus* (LBBMA 98), *Pseudomonas aeruginosa* (LBBMA 88A). Todas as bactérias foram selecionadas por serem isoladas de amostras de ambientes com presença de petróleo, e pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Biodiversidade e Biotecnologia para o Meio Ambiente (LBBMA), da Universidade Federal de Viçosa, Brasil. Os isolados bacterianos foram cultivados em caldo nutriente a 30°C por 12 horas e a 200 rpm. As células foram coletadas na fase de crescimento exponencial (densidade ótica a 600nm de 0,5-1,0).

#### **3.2 Hibridização fluorescente *in situ***

##### **3.2.1 Sondas de ácidos nucléicos**

Foram utilizadas duas sondas: EUB338 (5' - GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') (AMANN et al., 1990), que tem como alvo uma região do RNAr 16S de microorganismos pertencentes ao Domínio *Bacteria*, e uma sonda específica, complementar à região do RNAr 16S de *Bacillus* spp. (BAC07 - 5'-ACAGATTTGTGGGATTGGCT-3') (LIU et al., 2001). As sondas eram marcadas na extremidade 5' com o fluorocromo Cy3 (Alpha DNA, Montreal, Canadá), e foram ressuspendidas em água MilliQ para uma concentração estoque de 1 µg µL<sup>-1</sup>.

##### **3.2.2 Avaliação *in silico* da especificidade da sonda BAC07**

Para avaliação *in silico* da especificidade da sonda BAC07, utilizou-se o Programa Probecheck (LOY *et al.*, 2008), um programa criado e mantido pelo Departamento de Ecologia Microbiana da Universidade de Viena que informa quais organismos podem conter a sequência-alvo da sonda. Além disso, foi realizada uma prospecção dos genes DNAr 16S no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Primeiramente, selecionou-se sequências do DNAr 16S das espécies bacterianas utilizadas neste estudo, que foram analisadas no programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2008), onde realizou-se o alinhamento das sequências selecionadas com o reverso complementar da sequência da sonda BAC07.

Em um segundo momento, buscou-se no banco de dados sequências do DNAr 16S de micro-organismos que, de acordo com a nova classificação sistemática de 2004, não pertencem mais ao gênero *Bacillus*, e foram agrupados em um novo gênero, a saber: *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Brevibacillus brevis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Paenibacillus larvae* e *Sporosarcina pasteurii*. Buscou-se ainda por sequências do DNAr 16S de: *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus agilis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*, uma vez que sequências destas espécies pertencem a gêneros que, de acordo com Garrity *et al.* (2004), apresentam certo grau de similaridade com sequências de espécies do gênero *Bacillus*. Por meio do programa MEGA 4.0, alinhou-se sequências obtidas de cada um dos micro-organismos acima listados, com o reverso complementar da sequência da sonda BAC07.

### **3.2.3 Fixação das células**

As células bacterianas coletadas após cultivo foram lavadas em tampão salina fosfato (PBS) (130 mM NaCl, 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2) e fixadas por dois métodos distintos, a saber:

(1) fixação das amostras de todas as espécies em solução de paraformaldeído a 4% em PBS (m/v), segundo metodologia descrita por AMANN *et al.* (1990). Três volumes de solução de paraformaldeído 4% foram adicionados a

um volume de cada amostra bacteriana. A incubação foi realizada a 4 °C por 14 h. O sobrenadante foi removido de cada amostra após 5 min de centrifugação (7.600 rpm), posteriormente as amostras foram lavadas duas vezes com solução de PBS (7.600 rpm por 5 min cada vez). Os precipitados foram ressuspensos em PBS/etanol (1:1, v/v) e mantidos à -20 °C.

(2) fixação das amostras de bactérias do gênero *Bacillus* em solução de etanol 50%, segundo metodologia descrita por ROLLER et al. (1994). Um volume de solução de etanol 50% foi adicionado a um volume de cada amostra bacteriana. As amostras foram centrifugadas por 5 min (5.000 rpm), o sobrenadante foi descartado. Os precipitados foram ressuspensos em PBS e adicionou-se etanol para uma concentração final de 50%, em seguida foram mantidos à -20 °C.

### **3.2.4 Montagem das lâminas e pré-tratamento enzimático**

As amostras fixadas (10 µL) foram aplicadas na superfície de lâminas para epifluorescência contendo 12 poços (Perfecta) e secas por 20 min a 46 °C. A seguir, foram desidratadas sequencialmente em soluções de etanol a 50%, 80% e 100% por 3 min cada.

Com o intuito de aumentar a permeabilidade celular, efetuou-se, adicionalmente, nas amostras fixadas de acordo com o método (1) descrito na seção 3.2.3, um pré-tratamento enzimático com lisozima (10 mg mL<sup>-1</sup> ou 50 mg mL<sup>-1</sup>) durante 20 min a 37 °C, e utilização de uma série de desidratação (50%, 80% e 100% de etanol), antes e depois do tratamento com lisozima.

### **3.2.5 Condições de hibridização**

A hibridização foi realizada segundo o protocolo proposto por Amann et al. (1995), com modificações: 9 µL de tampão de hibridização (0,9 M NaCl, 20 mM Tris.HCl [pH 8,0], 0,01% SDS e formamida), adicionado de 1 µL da sonda correspondente (50 ng µL<sup>-1</sup>), foram aplicados em cada poço da lâmina. As reações de hibridização foram realizadas sob temperatura de 46 °C por 2 h, com concentrações crescentes de formamida (de 10 a 45% v/v, com incrementos

sucessivos de 5%), adicionada ao tampão de hibridização, na tentativa de se garantir melhor especificidade e qualidade do sinal emitido pelas sondas.

Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em tampão de lavagem (20 mM Tris.HCl [pH 8,0], 0,01% SDS, 5 mM EDTA e NaCl) pré- aquecido a 48 °C, por 15 min. A concentração de NaCl foi ajustada em razão da concentração de formamida adicionada ao tampão de hibridização, conforme descrito por Pernthaler et al. (2001) (Tabela 3). A etapa final de lavagem foi realizada com água MilliQ. As lâminas foram secas no escuro em temperatura ambiente. Em seguida, adicionaram-se 5 µL de DAPI (4', 6 -diamidino-2-fenilindol) 0,001% em cada poço, seguindo-se de incubação no escuro por 10 min, sob temperatura ambiente. O excesso de DAPI foi retirado com água MilliQ, e as lâminas foram guardadas no escuro e sob refrigeração a 4 °C, até a observação microscópica.

**Tabela 3** - Concentração de NaCl no tampão de lavagem ajustada em razão da concentração de formamida adicionada ao tampão de hibridização (PERNTHALER et al., 2001).

% de Formamida no tampão de hibridização	Concentração de NaCl no tampão de lavagem
10	0,450 M
15	0,318 M
20	0,225 M
25	0,159 M
30	0,112 M
35	0,080 M
40	0,056 M
45	0,040 M

### 3.2.6 Observação microscópica

As lâminas foram observadas em microscópio Olympus BX-50, sob epifluorescência, em aumento de até 1.000 vezes. Foram utilizados filtros específicos com excitação na região de 510 a 550 nm, para observação das células hibridizadas com sondas marcadas com Cy3, e com excitação na região de 330 a 385 nm para captação da fluorescência das células coradas com DAPI. As imagens foram capturadas com câmeras digitais QColor3 (Olympus PM-C35DX) e QColor5 (Olympus PM-10AK3). Para aquisição de imagens utilizou-se o programa Q-capture

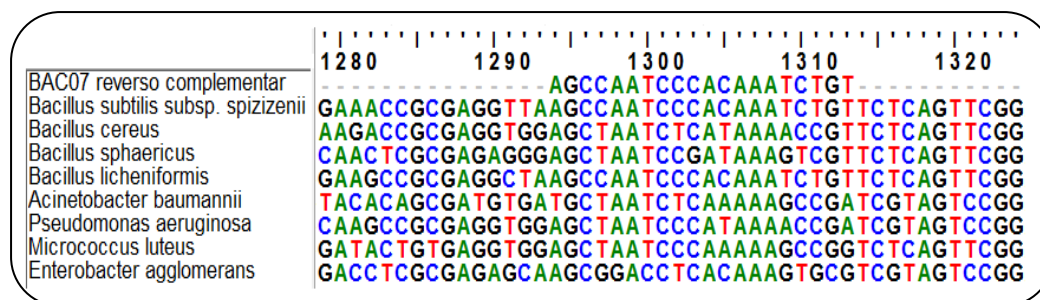
Suite. Cinco campos microscópicos representativos foram selecionados para análise das imagens.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação *in silico* da especificidade da sonda BAC07

A análise *in silico* pelo programa probeCheck revelou que a sequência-alvo da sonda BAC07 é encontrada, sem nenhuma incompatibilidade de base, em diversos isolados de espécies do gênero *Bacillus*, e em alguns representantes do gênero *Paenibacillus*. Verificou-se também, que alguns isolados bacterianos pertencentes ao gênero *Sporosarcina*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Lactobacillus* apresentaram de uma a quatro incompatibilidades de base com a sequência-alvo da sonda BAC07, podendo, experimentalmente, hibridizar com a sonda. O programa probeCheck é uma importante ferramenta para avaliar a especificidade de sondas, uma vez que reúne dados obtidos de outros programas, como: ARB Project, RDP (Ribosomal Database Project), Greengenes, SILVA, FGPR (Functional Gene Pipeline / Repository), estes programas funcionam como repositórios de sequências RNAr 16S, permitindo a manipulação, alinhamento e análise das mesmas. Diante disso, pode-se utilizar o programa probeCheck como padrão para uma avaliação inicial da especificidade da sequência estudada.

O alinhamento do reverso complementar da sequência da sonda BAC07 com as sequências do DNAr 16S das espécies utilizadas neste estudo revelou 100% de similaridade com sequências de *Bacillus subtilis spizizenii* e *Bacillus licheniformis* (Figura 3 e Tabela 4). *Bacillus cereus* e *Bacillus sphaericus* apresentaram, 75% e 70% de similaridade, respectivamente, enquanto que para as outras espécies, a similaridade variou de 55 a 75% (Figura 3 e Tabela 4).



**Figura 3** - Alinhamento entre o reverso complementar da sequência da sonda BAC07 com as sequências do DNAr 16S das mesmas espécies utilizadas neste trabalho. O

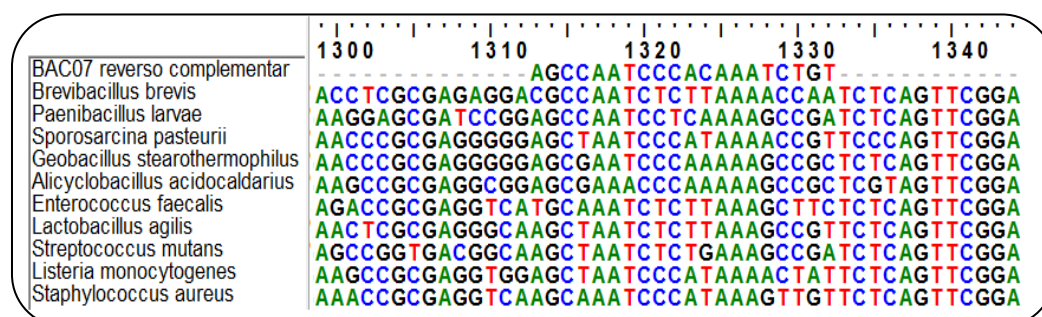
alinhamento foi obtido com o Programa BioEdit, e as sequências alinhadas foram retiradas do banco de dados NCBI.

**Tabela 4** – Similaridade das sequências do DNAr 16S das espécies utilizadas neste trabalho com o reverso complementar da sequência da sonda BAC07.

Bactéria	Similaridade com o reverso complementar da sequência da sonda BAC07
<i>Bacillus subtilis spizizenii</i>	100%
<i>Bacillus cereus</i>	75%
<i>Bacillus sphaericus</i>	70%
<i>Bacillus licheniformis</i>	100%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	65%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75%
<i>Micrococcus luteus</i>	75%
<i>Enterobacter agglomerans</i>	55%

As sequências encontradas no banco de dados NCBI pertencem às mesmas espécies utilizadas neste trabalho, porém constituem-se isolados diferentes.

Para conclusão da análise *in silico*, verificou-se, pelo alinhamento de sequências do DNAr 16S retiradas do NCBI, que as espécies *Sporosarcina pasteurii* e *Listeria monocytogenes* apresentaram similaridade de 80% com o reverso complementar da sequência da sonda BAC07 (Figura 4 e Tabela 5). Esta similaridade foi maior, do que a obtida para as espécies *Bacillus cereus* e *Bacillus sphaericus*. O alinhamento com as sequências do DNAr 16S de outras espécies (*Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Brevibacillus brevis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Paenibacillus larvae*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus agilis*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans*) resultou em uma similaridade de 60 a 75% com o reverso complementar da sequência da sonda BAC07 (Figura 4 e Tabela 5).



**Figura 4** – Alinhamento entre o reverso complementar da sequência da sonda BAC07 com as sequências do DNAr 16S de *Brevibacillus brevis*, *Paenibacillus larvae*, *Sporosarcina pasteurii*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus agilis*, *Streptococcus mutans*, *Listeria*

*monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. O alinhamento foi obtido com o Programa BioEdit, e as sequências alinhadas foram retiradas do banco de dados NCBI.

**Tabela 5** – Similaridade das sequências do DNAr 16S de espécies não pertencentes ao gênero *Bacillus* com o reverso complementar da sequência da sonda BAC07.

Bactéria	Similaridade com o reverso complementar da sequência da sonda BAC07
<i>Brevibacillus brevis</i>	60%
<i>Paenibacillus larvae</i>	70%
<i>Sporosarcina pasteurii</i>	80%
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	75%
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	70%
<i>Enterococcus faecalis</i>	60%
<i>Lactobacillus agilis</i>	70%
<i>Streptococcus mutans</i>	65%
<i>Listeria monocytogenes</i>	80%
<i>Staphylococcus aureus</i>	75%

A sequência da sonda BAC07 foi estudada por Liu et al. (2001), classificada como supostamente específica para o grupo *Subtilis*, que inclui *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus polilliae*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus licheniformis*. Nove anos depois, Bashan et al. (2010) verificaram pelo programa probeCheck que a especificidade da sonda BAC07 abrangia todo o gênero *Bacillus*. Os bancos de dados estão sendo constantemente atualizados, de modo que a diversidade total de RNAr depositada atualmente é muito maior do que a que existia há dez anos atrás. Assim, muitas sondas construídas há anos atrás para um grupo alvo específico, devem ser novamente avaliadas para verificação da abrangência de sua especificidade.

Os dados deste trabalho vão além dos dados de Bashan et al. (2010). A avaliação realizada pelo programa probeCheck em agosto de 2011 revelou que a sonda BAC07 mostrou complementariedade total com membros do gênero *Bacillus* e *Paenibacillus*, além de ter poucas divergências de bases com outros membros da classe *Bacilli*, pertencentes aos gêneros *Sporosarcina*, *Staphylococcus*, *Listeria* e *Lactobacillus*. Os alinhamentos realizados entre sequências do DNAr 16S de bactérias da classe *Bacilli* com o reverso complementar da sequência da sonda BAC07 confirmam a alta similaridade, possuindo um percentual de similaridade igual

ou superior ao percentual obtido com alguns membros pertencentes ao gênero *Bacillus*, como *B. cereus* e *B. sphaericus*.

A avaliação *in silico* foi realizada a partir de sequências depositadas no banco de dados NCBI. As sequências dos isolados de estudo podem apresentar divergência de bases em relação às sequências depositadas no banco de dados. Embora sequências de *Micrococcus luteus* e *Pseudomonas aeruginosa* alinhadas com o reverso complementar da sequência da sonda BAC07 tenham mostrado um percentual de similaridade igual ou superior ao percentual de alguns membros do gênero *Bacillus* (Figura 3 e Tabela 4), o programa probeCheck não aponta essas bactérias como possíveis alvos da sonda BAC07. Dessa forma, a análise *in silico* fornece um padrão para avaliação inicial da sonda, porém somente a avaliação experimental poderá concluir pela especificidade final da sonda.

Por fim, deve-se levar em conta a amostra a ser analisada. No presente trabalho, os isolados são provenientes de amostras de petróleo, que não possuem representantes do gênero *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria* (que poderiam vir a hibridizar com a sonda, de acordo com o programa probeCheck). Assim, a sonda BAC07 poderá ser utilizada para detecção específica de *Bacillus* spp oriundos de amostras de petróleo, uma vez que a avaliação *in silico* revelou a possibilidade de hibridização com todos os membros do gênero *Bacillus* e impossibilidade de hibridização com as outras bactérias do estudo (*Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter agglomerans*, *Micrococcus luteus* e *Pseudomonas aeruginosa*).

#### **4.2 Aplicação da técnica de FISH e avaliação experimental da sonda BAC07**

A fixação das células de *B. cereus* e *B. subtilis spizizenii* com solução de paraformaldeído 4%, seguida de hibridização com 35% de formamida foram as condições que propiciaram a obtenção de maior intensidade de fluorescência com a sonda EUB338 (Tabela 6). Não houve diferenças perceptíveis de intensidade de fluorescência entre os dois tipos de tratamento de fixação, paraformaldeído 4% ou etanol 50%, na mesma concentração de formamida, para as demais espécies do gênero. A fixação das outras espécies avaliadas (*Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter agglomerans*, *Micrococcus luteus* e *Pseudomonas aeruginosa*) com a

solução de paraformaldeído 4% resultou na obtenção de sinal fraco a forte, dependendo da concentração de formamida (Tabela 6).

Bertaux et al. (2007) fixaram amostras de solo em solução de paraformaldeído 3% e utilizaram 35% de formamida no tampão de hibridização para obtenção de um bom sinal na detecção de bactérias com a sonda EUB338, já Kleikemper et al. (2005) fixaram amostras de água de um aquífero contaminado com hidrocarbonetos de petróleo em solução de paraformaldeído 4%, utilizando 30% de formamida no tampão de hibridização para detecção de bactérias com a mesma sonda. Amann et al. (1990), autores da sonda EUB338, fixaram células de *Escherichia coli*, *Desulfovibrio gigas* e *Desulfobacter hydrogenophilus* em solução de paraformaldeído 4% e não utilizaram formamida no tampão de hibridização. Esses dados indicam que a percentagem de formamida no tampão de hibridização, para detecção de bactérias com a sonda EUB338, pode variar em função da amostra e dos micro-organismos a serem detectados. No presente trabalho, verificou-se que, o decréscimo na porcentagem de formamida adicionada ao tampão de hibridização fornecia uma intensidade de sinal mais fraco. Na condição em que se empregou 10% de formamida adicionada ao tampão de hibridização foram obtidos sinais muito fracos para algumas bactérias. Desta forma, a realização de uma hibridização com ausência de formamida no tampão de hibridização foi descartada.

As condições que propiciaram a especificidade esperada com a sonda BAC07 foram: a fixação das células em solução de paraformaldeído 4% e hibridização com 40% de formamida (Tabela 7). Não houve, nas concentrações de formamida testadas, diferenças perceptíveis entre os tratamentos em que se utilizou o etanol 50% ou o paraformaldeído 4%, como agente fixador, exceto para *B. cereus* e *B. licheniformis* que, em solução de paraformaldeído 4% e hibridização com 25% de formamida, apresentaram maior intensidade de fluorescência. Em geral, solução de paraformaldeído 3-4% é suficiente para fixação de bactérias Gram-negativas (MOTER e GOBEL, 2000), mas nem sempre é efetiva para Gram-positivas, sendo em alguns casos recomendada a fixação desse grupo com agentes precipitantes, como o etanol (ROLLER et al., 1994). Com base nesses resultados preliminares, as próximas etapas do estudo foram realizadas adotando-se a fixação das células em solução de paraformaldeído 4%. O estabelecimento das condições ideais de fixação é essencial para obtenção de resultados satisfatórios com FISH, de modo a se

preservar a morfologia das células e permeabilizá-las para facilitar a entrada da sonda (ABREU, 2004).

**Tabela 6** - Intensidades do sinal obtidas pela técnica de FISH utilizando a sonda EUB338, estimadas pela observação microscópica, de todos os tratamentos utilizados.

Bactérias	Tratamento/ Fixação																	
	PFA 4%+% Formamida									Etanol 50%+ % Formamida			PFA 4% + Lisozima (10 mg mL <sup>-1</sup> ) + % de Formamida			PFA 4% + Lisozima (50 mg mL <sup>-1</sup> ) + % de Formamida		
	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%	45%		25%	30%	35%	25%	30%	35%	25%	30%	35%
<i>Acinetobacter baumannii</i>	++	++	+++	+++	+++	+++	+	+	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	++	++	++	+++	++	+	++	+	++	++	++	++	+	+	+	
<i>Bacillus licheniformis</i>	+	++	++	++	++	++	+	-	+	++	++	++	++	++	+	+	+	
<i>Bacillus sphaericus</i>	+	+	++	++	++	++	+	+	+	++	++	-	-	+	-	-	-	
<i>Bacillus subtilis spizizenii</i>	++	++	++	++	+++	+++	+++	+	++	++	++	-	-	+	-	-	-	
<i>Enterobacter agglomerans</i>	++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
<i>Micrococcus luteus</i>	+	++	++	+++	+++	+++	++	+	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	++	+++	+++	+++	+++	+	+	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	

(-) = nenhum sinal emitido, (+) = sinal fraco, (++) = sinal médio, (+++) = sinal forte, (N.A.) = não avaliado.

As bactérias foram fixadas em solução de paraformaldeído (PFA) 4% ou etanol 50%, submetidas à hibridização com diferentes porcentagens de formamida (variando de 10 a 45%, v/v) no tampão de hibridização. Bactérias fixadas em solução de paraformaldeído 4% foram, adicionalmente, tratadas com solução de lisozima (10 mg mL<sup>-1</sup> ou 50 mg mL<sup>-1</sup>) por 20 min a 37 °C, antes da etapa de hibridização.

**Tabela 7** - Intensidades do sinal obtidas pela técnica de FISH utilizando a sonda BAC07, estimadas pela observação microscópica, de todos os tratamentos utilizados.

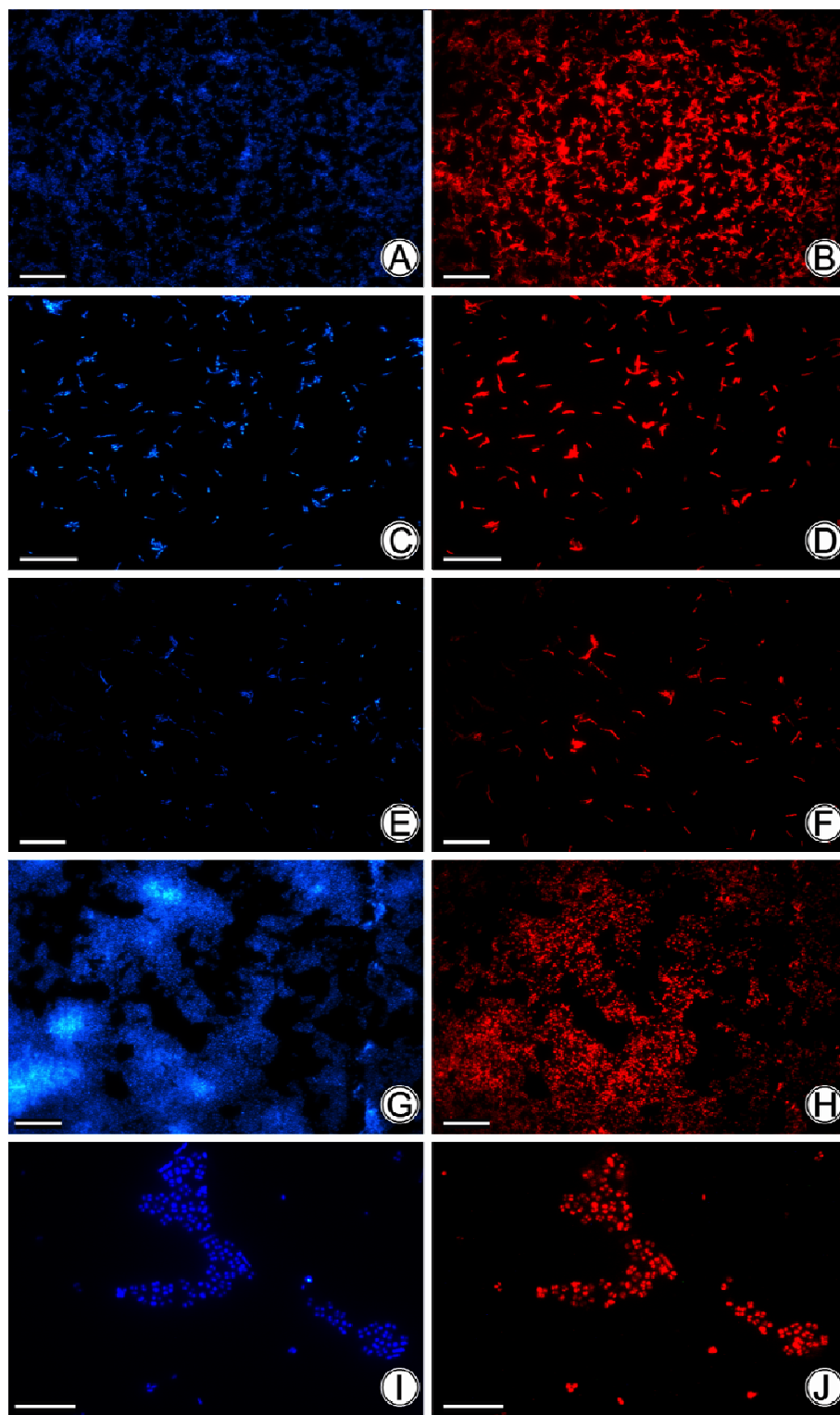
Bactérias	Tratamento/ Fixação																	
	PFA 4%+% Formamida									Etanol 50%+ % Formamida			PFA 4% + Lisozima (10 mg mL <sup>-1</sup> ) + % de Formamida			PFA 4% + Lisozima (50 mg mL <sup>-1</sup> ) + % de Formamida		
	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%	45%	25%	30%	35%	25%	35%	40%	25%	35%	40%	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	++	+	-	+	+	-	-	-	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
<i>Bacillus cereus</i>	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Bacillus licheniformis</i>	++	-	+	++	+	+	+	-	+	+	+	+	+	++	-	-	-	
<i>Bacillus sphaericus</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Bacillus subtilis spizizenii</i>	++	+	+	++	+	+	++	+	++	+	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Enterobacter agglomerans</i>	++	++	+	++	+	+	-	-	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
<i>Micrococcus luteus</i>	+	++	++	+	+	-	-	-	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	

(-) = nenhum sinal emitido, (+) = sinal fraco, (++) = sinal médio, (+++) = sinal forte, (N.A.) = não avaliado.

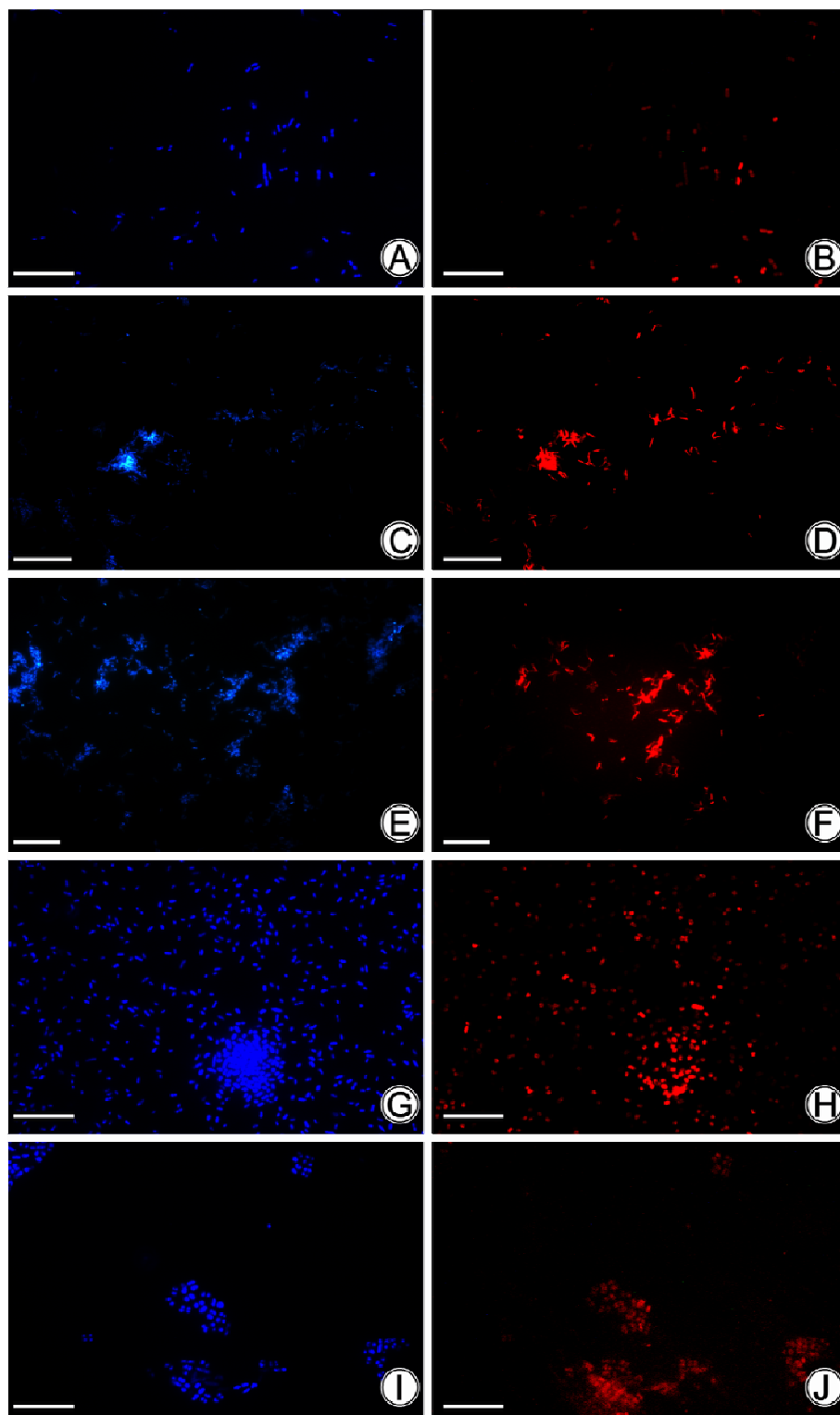
As bactérias foram fixadas em solução de paraformaldeído (PFA) 4% ou etanol 50%, submetidas à hibridização com diferentes porcentagens de formamida (variando de 10 a 45%, v/v) no tampão de hibridização. Bactérias fixadas em solução de paraformaldeído 4% foram, adicionalmente, tratadas com solução de lisozima (10 mg mL<sup>-1</sup> ou 50 mg mL<sup>-1</sup>) por 20 min a 37 °C, antes da etapa de hibridização.

A sonda universal EUB338 mostrou uma intensidade de sinal de médio a forte com todas as bactérias, quando se empregou hibridização com 35% de formamida (Figura 5). A hibridização com a sonda BAC07, empregando-se 25% de formamida, propiciou o melhor sinal para os organismos-alvo, exceto para *B. sphaericus*. Contudo, não se obteve a especificidade predita *in silico*, uma vez que ocorreu hibridização com os micro-organismos não-alvo, como *A. baumannii*, *E. agglomerans* e *M. luteus* (Figura 6).

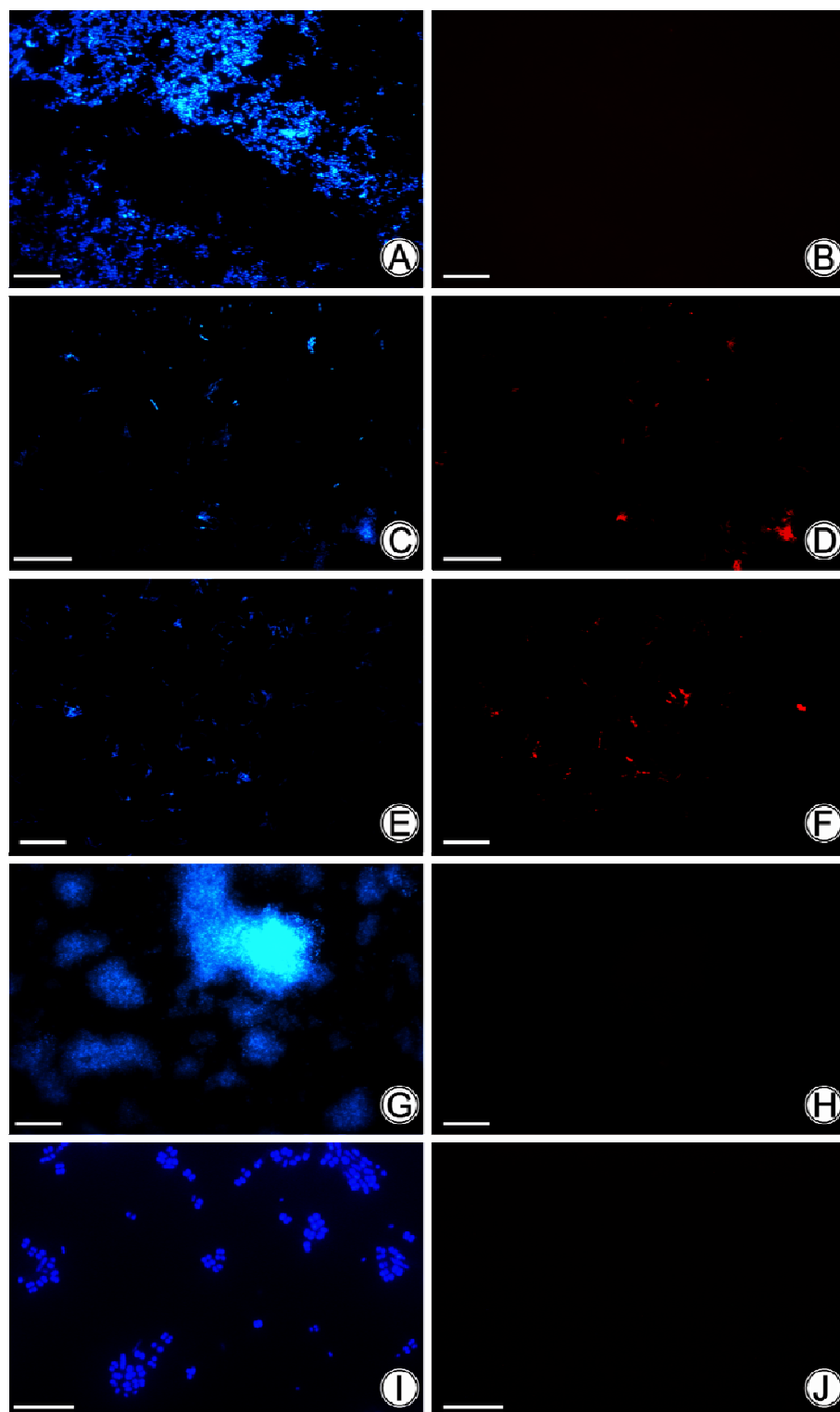
A especificidade predita *in silico* foi obtida quando se empregou uma concentração de formamida de 40% no tampão de hibridização, o que, porém, forneceu um sinal de fluorescência de fraco a médio (Figura 7). A determinação da concentração de formamida adicionada ao tampão de hibridização pode interferir diretamente na qualidade da hibridização, podendo levar a resultados falsos-negativos ou falsos-positivos (GODINHO, 2010). De acordo com Pernthaler et al. (2001), a estringência adequada é aquela obtida quando se utiliza a maior concentração de formamida no tampão de hibridização que não resulte na perda de intensidade de fluorescência das células-alvo, uma vez que nesta concentração de formamida, hibridizações com organismos não-alvo não devem mais ocorrer.



**Figura 5** - Detecção de bactérias por FISH utilizando a sonda EUB338. Células bacterianas de *Acinetobacter baumannii* (A, B), *Bacillus subtilis spizizenii* (C, D), *Bacillus licheniformis* (E, F), *Enterobacter agglomerans* (G, H), *Micrococcus luteus* (I, J), visualizadas com filtros específicos para DAPI (A, C, E, G e I) e Cy3 (B, D, F, H, J), após a fixação em solução de paraformaldeído 4% e hibridização com 35% de formamida, sob temperatura de 46 °C por 2 h (barras A-H = 20 µm e I-J 10 µm).



**Figura 6** - Inespecificidade da sonda BAC07, empregando-se 25% de formamida. Células bacterianas de *Acinetobacter baumannii* (A, B), *Bacillus subtilis spizizenii* (C, D), *Bacillus licheniformis* (E,F), *Enterobacter agglomerans* (G, H), *Micrococcus luteus* (I, J), visualizadas com filtros específicos para DAPI (A, C, E, G e I) e Cy3 (B, D, F, H, J), após fixação em solução de paraformaldeído 4% e hibridização com 25% de formamida, sob temperatura de 46 °C por 2 h (barras A-H = 20 µm e I-J 10 µm).

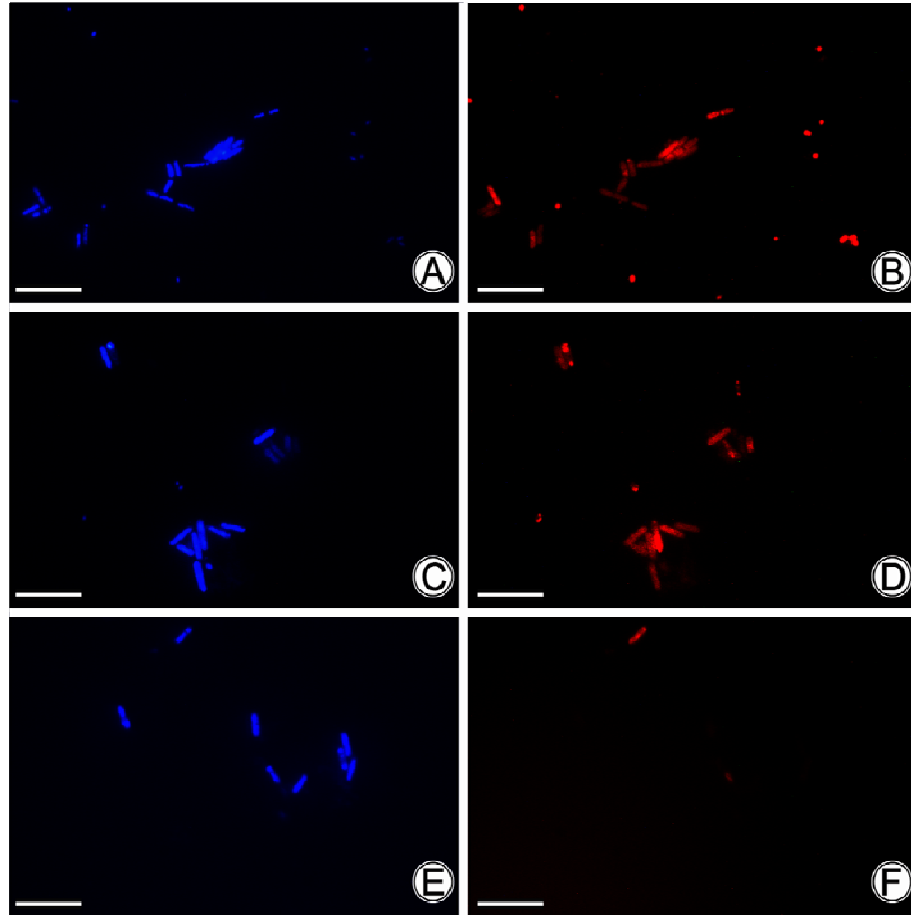


**Figura 7** - Detecção específica de bactérias do gênero *Bacillus* por FISH utilizando a sonda BAC07, empregando-se 40% de formamida. Células bacterianas de *Acinetobacter baumannii* (A, B), *Bacillus subtilis spizizenii* (C, D), *Bacillus licheniformis* (E,F), *Enterobacter agglomerans* (G, H), *Micrococcus luteus* (I, J), visualizadas com filtros específicos para DAPI (A, C, E, G e I) e Cy3 (B, D, F, H, J), após fixação em solução de paraformaldeído 4% e hibridização com 40% de formamida, sob temperatura de 46 °C por 2 h (barras A-H = 20 µm e I-J 10 µm).

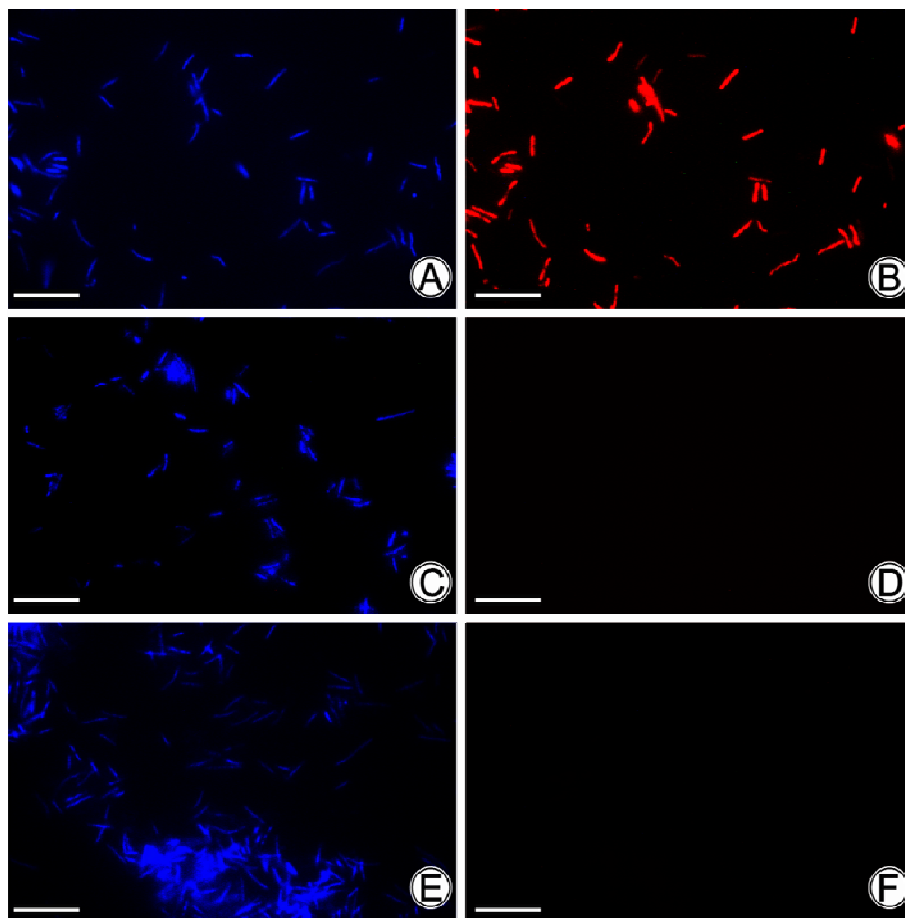
A sonda BAC07 foi anteriormente avaliada pelo Programa ProbeCheck, e também utilizada no trabalho de Bashan et al. (2010), porém não havia relatos na literatura consultada de avaliação experimental da especificidade da mesma para detecção de *Bacillus* spp. Bashan et al. (2010) utilizaram esta sonda para detecção específica de *B. pumilus*, empregando 15 % de formamida no tampão de hibridização. Os autores relataram a obtenção de boa intensidade de sinal; porém não foi demonstrado experimentalmente se a sonda poderia ou não ter hibridizado com outras bactérias não-alvo, e não foi realizado um estudo com variação da concentração de formamida adicionada ao tampão de hibridização. Há indícios de que os autores basearam-se apenas na análise *in silico* e, a partir dessa premissa, houve a afirmação de que as bactérias detectadas pela sonda BAC07 eram *B. pumilus*.

Neste trabalho, ao se empregar 15 % formamida no tampão de hibridização, observou-se sinal fraco para *B. cereus*, *B. sphaericus* e *B. subtilis spizizenii* e ausência de sinal para *B. licheniformis* (Tabela 7). Não obstante, verificou-se hibridização inespecífica com *A. baumannii*, *E. agglomerans* e *M. luteus*.

Em função dos resultados obtidos com a variação da concentração de formamida no tampão de hibridização (10-45%, Tabelas 6 e 7) foram utilizados os três melhores tratamentos para cada sonda para se avaliar o efeito de um pré-tratamento com lisozima na intensidade de sinal emitido. Para *B. cereus* (Figura 8) e *B. licheniformis* (Tabela 6 e Tabela 7), o tratamento com lisozima (10 mg mL<sup>-1</sup>) não apresentou acentuadas diferenças na intensidade do sinal, quando comparado ao tratamento sem adição da lisozima. Uma exceção foi o tratamento em que foi empregada a sonda BAC07 e uma concentração de formamida de 40%, no qual, na presença de lisozima, se obteve melhor sinal para *B. licheniformis* (Tabela 7). Em contrapartida, observou-se que para *B. sphaericus* (Figura 9) e *B. subtilis spizizenii* (Tabela 6 e Tabela 7), o tratamento com lisozima (10 mg mL<sup>-1</sup>) provocou uma queda da intensidade do sinal e, em alguns casos, suprimiu completamente a emissão de sinal. O mesmo acontece, de uma maneira mais pronunciada, quando se aumenta a concentração de lisozima para 50 mg mL<sup>-1</sup>, no qual, se obteve sinal fraco ou completa supressão de emissão de fluorescência para todas as bactérias do gênero *Bacillus* testadas (Tabela 6 e Tabela 7).



**Figura 8** - Influência da lisozima na detecção de *Bacillus cereus* por FISH. Células bacterianas de (A, B) *B. cereus* sem tratamento com lisozima (C, D) *B. cereus* com tratamento de lisozima na concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup>. (E, F) *B. cereus* com tratamento de lisozima na concentração de 50 mg mL<sup>-1</sup>, visualizadas com filtros específicos para DAPI (A, C e E) e Cy3 (B, D e F), após fixação em solução de paraformaldeído 4% e hibridização realizada com a sonda EUB338 com 35% de formamida, sob temperatura de 46 °C por 2 h (barra: 10 µm).



**Figura 9** - Influência da lisozima na detecção de *Bacillus sphaericus* por FISH. Células bacterianas de (A, B) *B. sphaericus* sem tratamento com lisozima (C, D) *B. sphaericus* com tratamento de lisozima na concentração de  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ . (E, F) *B. sphaericus* com tratamento de lisozima na concentração de  $50 \text{ mg mL}^{-1}$ , visualizadas com filtros específicos para DAPI (A, C e E) e Cy3 (B, D e F), após fixação em solução de paraformaldeído 4% e hibridização realizada com a sonda EUB338 com 30% de formamida, sob temperatura de  $46 \text{ }^\circ\text{C}$  por 2 h (barra:  $10 \text{ }\mu\text{m}$ ).

A permeabilização das células é considerada um dos principais complicadores para a aplicação de FISH. Em alguns casos, para que a sonda consiga atingir o interior celular de bactérias Gram-positivas, são necessários tratamentos enzimáticos para abrir a camada de peptidoglicano, sendo o mais usual o tratamento com lisozima (BOTTARI et al., 2006). Uma permeabilização abaixo da ideal pode resultar em um baixo sinal; já uma permeabilização excessiva pode ocasionar a lise e perda de conteúdo celular (LAWSON et al., 2011). Uma melhora no sinal com pré-tratamento utilizando lisozima foi relatado por Wagner et

al. (1998) na detecção de *Listeria monocytogenes* e também por Bashan et al (2010), para aumentar a permeabilização da sonda em *Bacillus*.

Neste trabalho, a ação da lisozima pode ter ocasionado a perda parcial do conteúdo celular, de modo que, uma pronunciada parcela de ribossomos pode ter sido perdida. Assim, não haveria uma quantidade suficiente de moléculas de RNAr 16S alvo da sonda, não sendo possível a ocorrência da hibridização. Por outro lado, baseando-se no trabalho de Hayashi et al. (1972), resíduos de glucosamina com grupos amino livres podem estar presentes, em grande quantidade, no componente peptidoglicano da parede celular de bactérias do gênero *Bacillus*. Esses resíduos, quando presentes em quantidades significativas, são responsáveis pela resistência de algumas bactérias à ação da lisozima. Neste contexto, se os resíduos de glucosamina estivessem presentes na parede celular das bactérias testadas, a lisozima não estaria sendo efetiva, e a sua aplicação poderia impedir a entrada da sonda na célula.

Após avaliar todas as condições testadas, verificou-se que o sinal emitido pela sonda EUB338 apresentou-se superior ao da BAC07 (nas melhores condições de hibridização para cada sonda), que apresentou um sinal fraco quando não perdeu sua especificidade.

Fuchs et al. (1998) mostraram por meio do mapeamento do RNAr 16S de *Escherichia coli* que, juntamente com a impermeabilidade da parede celular e um baixo conteúdo celular de ribossomos, um terceiro problema que ocasiona sinais fracos ou até mesmo o fracasso de FISH é a baixa acessibilidade ou inacessibilidade do sítio alvo da sonda.

Partindo da premissa de que as células foram coletadas em fase exponencial de crescimento e que os tratamentos de permeabilização foram realizados para hibridização com ambas as sondas, a acessibilidade pode explicar a diferença de sinal de fluorescência entre as sondas testadas. No trabalho de Fuchs et al. (1998), a sonda universal EUB338, cujo alvo situa-se na posição 338-355, foi classificada como uma sonda de classe III (de um total de 6 classes de brilho, sendo classe I a de maior fluorescência, e a classe VI de menor fluorescência), com um brilho relativo de 58% da sonda que apresentou maior intensidade de fluorescência. Se os dados obtidos por esses autores, no mapeamento de *E. coli* podem ou não ser extrapolados para outros micro-organismos, é uma questão que permanece em

aberto. Bottari et al. (2006) afirmaram que devido a alta conservação evolucionária da molécula de RNAr, estas descobertas poderiam sim servir como ponto de partida para construção de sondas de outros organismos.

A região alvo da sonda BAC07 (1281-1300, de acordo com Liu et al., 2001) apresentou-se como uma região do RNAr 16S de difícil acessibilidade, entre os organismos estudados em trabalhos anteriores (FUCHS et al., 1998; BEHRENS et al., 2003a). As sondas utilizadas que possuíam como alvo essa região, classificaram-se como sondas de classe IV ou V (brilho entre 21 e 40% ou entre 6 e 20%, respectivamente, relativo à sonda que obteve o melhor sinal de fluorescência). No entanto, por mais conservada que seja a molécula RNAr, o que se tem aqui em relação às bactérias do gênero *Bacillus*, são apenas inferências, a partir da extrapolação de dados de outros micro-organismos. Assim, para maior compreensão sobre a acessibilidade do RNAr 16S de *Bacillus*, estudos semelhantes aos descritos anteriormente, tornam-se necessários.

O sinal fraco emitido pela sonda BAC07 poderia ainda ser melhorado por meio da utilização de oligonucleotídeos *helpers*. Fuchs et al. (2000), conseguiram um incremento de 25 vezes do sinal de fluorescência de uma sonda que apresentava sinal de fluorescência fraco, por meio da utilização de oligonucleotídeos *helpers*. Esses oligonucleotídeos não são marcados com fluorocromos e são complementares a sítios adjacentes ao local alvo da sonda, conseguindo abrir sítios inacessíveis por meio de mudanças conformacionais.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A avaliação *in silico* da sonda BAC07 revelou a possibilidade de ocorrência de hibridização da sonda com bactérias da classe *Bacilli*.

Aplicou-se com sucesso a técnica de FISH, conseguindo-se bons sinais de fluorescência ao se utilizar a sonda EUB338 na detecção de culturas puras de todas as bactérias.

A fixação em solução de paraformaldeído 4% foi efetiva para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

O tratamento enzimático com lisozima não foi efetivo para detecção de bactérias do gênero *Bacillus* neste estudo.

A determinação da concentração ideal de formamida foi decisiva para se conseguir uma hibridização com a especificidade esperada.

A sonda BAC07 detectou especificamente bactérias do gênero *Bacillus* em condições de alta estringência (46°C, 40% de formamida), porém o sinal emitido é fraco quando comparado ao sinal máximo obtido pela sonda EUB338. Assim, para aplicação de FISH para detecção de bactérias do gênero *Bacillus* advindas de amostras ambientais por esta sonda, estratégias como a utilização de oligonucleotídeos *helpers* podem representar uma estratégia interessante para ampliar o sinal de fluorescência, capaz de visualizá-las mesmo sob interferências ambientais.

O estudo de novas sequências para confecção de sondas específicas para detecção de bactérias do gênero *Bacillus* deve ser também considerado, uma vez que a acessibilidade do sítio alvo pela sonda BAC07 não foi descartado como uma possível razão do sinal fraco. Desta forma, pode-se ter sequências que possam ser específicas e ao mesmo tempo estarem em um sítio mais acessível do RNAr, possibilitando a construção de uma sonda que propicie um sinal forte em FISH, sem a necessidade de estratégias adicionais para melhoria do sinal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, A. A. V. **Identificação de bactérias filamentosas em processos de lamas activadas através da técnica de Hibridização *in-situ* de fluorescência (FISH)**. 2004. 142 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) - Universidade do Minho, Portugal, 2004.

AMANN, R. I.; KRUMHOLZ, L.; STAHL, D. A. Fluorescent-Oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 2, p. 762-770, 1990.

AMANN, R.I; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 1, p. 143-169, 1995.

AMANN, R.; LUDWIG, W. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 5, p. 555-565, 2000.

AMANN, R.; FUCHS, B. M. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n.5, p. 339-348, 2008.

BABOT, J. D.; HIDALGO, M.; ARGAÑARAZ-MARTÍNEZ, E.; APELLA, M. C.; PEREZ CHAIA, A. Fluorescence *in situ* hybridization for detection of classical propionibacteria with specific RNAr 16S-targeted probes and its application to enumeration in Gruyère cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 221-228, 2011.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495-508, 2000.

BASHAN, L. E.; HERNANDEZ, J-P.; BASHAN, Y.; MAIER, R. *Bacillus pumilus* ES4: Candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 69, n. 3, p. 343-352, 2010.

BATISTA, F. M. **Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* com elevada eficiência na mobilização de óleo pesado**. 2008. 71f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

BEHRENS, S.; RÜHLAND, C.; INÁCIO, J.; HUBER, H.; FONSECA, Á.; SPENCER-MARTINS, I.; FUCHS, B. M.; AMANN, R. *In Situ* Accessibility of Small-Subunit RNAr of Members of the Domains *Bacteria*, *Archaea*, and *Eucarya* to Cy3-Labeled Oligonucleotide Probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1748–1758, 2003a.

BEHRENS, S.; FUCHS, B. M.; MUELLER, F.; AMANN, R. Is the *In Situ* Accessibility of the RNAr 16S of *Escherichia coli* for Cy3-Labeled Oligonucleotide Probes Predicted by a Three-Dimensional Structure Model of the 30S Ribosomal Subunit? **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 8, p.4935-4941, 2003b.

BISHA, B.; KIM, H. J.; BREHM-STECHER, B. F. Improved DNA-FISH for cytometric detection of *Candida* spp. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n.4, p. 881-892, 2011.

BERTAUX, J.; GLOGER, U.; SCHMID, M.; HARTMANN, A.; SCHEU, S. Routine fluorescence *in situ* hybridization in soil. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, n. 3, p. 451-460, 2007.

BOTTARI, B.; ERCOLINI, D.; GATTI, M.; NEVIANI, E. Application of FISH technology for microbiological analysis: Current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, n. 3, p. 485-494, 2006.

ENCINAS, J. P.; SANZ-GOMES, J.; GARCIA-LOPEZ, M. L.; GARCIA-ARMESTO, M. R.; OTERO, A. Evaluation of different systems for identification of *Bacillus* strains isolated from spanish fermented sausages. **Meat Science**, v. 42, n. 2, p.127-131, 1996.

FERNANDES, P. L. **Produção de biossurfactantes por *Bacillus* spp. em condições anaeróbia**. 77f. 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

FILION, G.; LAFLAMME, C.; TURGEON, N.; HO, J.; DUCHAINE, C. Permeabilization and hybridization protocols for rapid detection of *Bacillus* spores using fluorescence *in situ* hybridization. **Journal of Microbiological Methods**, v. 77, n. 1, p. 29-36, 2010.

FUCHS, B.M.; WALLNER, G.; BEISKER, W.; SCHWIPPL, I.; LUDWIG, W.; AMANN, R. Flow Cytometric Analysis of the *In Situ* Accessibility of *Escherichia coli* RNAr 16S for Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 12, p. 4973-4982, 1998.

FUCHS, B. M.; GLOCKNER, F. O.; WULF, J.; AMANN, R. Unlabeled Helper Oligonucleotides Increase the *In Situ* Accessibility to RNAr 16S of Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3603–3607, 2000.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. Taxonomic Outline of the Prokaryotes. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2 ed. Release 5.0, Springer-Verlag, 399p, 2004.

GHOJAVAND, H.; VAHABZADEH, F.; ROAYAEI, E.; SHAHRAKI, A. K. Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 324, p. 172-176, 2008.

GODINHO, V. M. **Investigação de bactérias patogênicas por técnicas moleculares em um sistema de tratamento de esgotos composto por reator UASB e lagoas de polimento**. 2010. 182 f. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2010.

GRAUMANN, P. **Bacillus: Cellular and Molecular Biology**. Caister Academic Press, 454p, 2007.

HAYASHI, H.; ARAKI, Y.; ITO, E. Occurrence of Glucosamine Residues with Free Amino Groups in Cell Wall Peptidoglycan from Bacilli as a Factor Responsible for Resistance to Lysozyme. **Journal of Bacteriology**, v. 113, n. 2, p. 592-598, 1973.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STANLEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 787p, 1994.

IVANOVA, E. P.; VYSOTSKII, M. V.; SVETASHEV, V. I.; NEDASHKOVSKAYA, O. I.; GORSHKOVA, N. M.; MIKHAILOV, V. V.; YUMOTO, N.; SHIGERI, Y.; TAGUCHI, T.; YOSHIKAWA, S.. Characterization of *Bacillus* strains of marine origin. **International Microbiology**, v. 2, n. 4, p.267-271, 1999.

KLEIKEMPER, J.; POMBO, S. A.; SCHROTH, M. H.; SIGLER, W. V.; PESARO, M.; ZEYER, J. Activity and diversity of methanogens in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n.1, p. 149-158.

LAWSON, T.S.; CONNALLY, R.E.; IREDELL, J.R.; VEMULPAD, S.; PIPER, J.A. Detection of *Staphylococcus aureus* with a fluorescence *in situ* hybridization that does not require lysostaphin. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 25, n. 2, p. 142-147, 2011.

LECHNER, M.; TELHADA, M. Expressão dos genes. Transcrição. In: AZEVEDO, C. (Org.). **Biologia Celular**. Lidel: Edições técnicas, p. 159-172, 1994.

LIMA, T. M. S. **Determinação estrutural, toxicidade, biodegradabilidade e eficácia de biossurfactantes na remoção de fenantreno e cádmio do solo**. 2008. 172f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

LINDEA, K. C.; SEVIOUR, E. M.; SEVIOUR, R. J.; BLACKALL, L. L.; SODDELL, J. A. Practical methods for the examination and characterization of activated sludge. In: SEVIOUR, R. J.; BLACKALL, L. L.. (Ed.) **The microbiology of activated sludge**. Kluwer Academic Publishers, p. 257-301, 1999.

LIU, W-T; MIRZABEKOV, A. D.; STAHL, D. A. Optimization of an oligonucleotide microchip for microbial identification studies: a non-equilibrium dissociation approach. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 619-629, 2001.

LO GIUDICE, A.; CARUSO, C.; MANGANO, S.; BRUNI, V.; DE DOMENICO, M.; MICHAUD, L. Marine Bacterioplankton Diversity and Community Composition in an Antarctic Coastal Environment. **Microbial Ecology**, p. 1-14, 2011.

LOY, A.; ARNOLD, R.; TISCHLER, P.; RATTEI, T.; WAGNER, M.; HORN, M. ProbeCheck – a central resource for evaluating oligonucleotide probe coverage and specificity. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 10, p. 2894-2898, 2008.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA S. S. Production of biosurfactant at mesophilic and thermophilic conditions by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 48–52, 1998.

MCINERNEY, M. J.; DUNCAN, K. E., YOUSSEF, N. H.; FINCHER, T.; MAUDGALYA, S.; FOLMSBEE, M. J.; KNAPP, R. M.; SIMPSON, D. R.; RAVI, N.;

NAGLE, D. P. **Final report to the U. S. Department of Energy: development of microorganisms with improved transport and biosurfactant activity for enhanced oil recovery**, DE-FC-02NT15321 R 02. University of Oklahoma, Norman, OK, 2002.

MOTER, A.; GÖBEL, U. B. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 41, n. 2, p. 85-112, 2000.

NEVES, L. M. G. F. **Caracterização de biomassa anaeróbia granular: Análise qualitativa e quantitativa de imagem, hibridização com sondas genéticas (FISH), e técnicas histológicas**. 2002. 102 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) - Universidade do Minho, Portugal, 2002.

OLSEN, G. J.; LANE, D. J.; GIOVANNONI, S. J.; PACE, N. R.; STAHL, D. A. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNAr approach. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 337–365, 1986.

PACCEZ, J. D. **Aplicação de linhagens geneticamente modificadas de *Bacillus subtilis* no desenvolvimento de vacinas de mucosas contra patógenos entéricos**. 2007. 91f. Tese (Doutorado em Ciências - Microbiologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2007.

PERNTHALER, J.; GLÖCKNER, F. O.; SCHÖNHUBER, W.; AMANN, R. Fluorescence *in situ* hybridization. In: PAUL, J. (org.), **Methods in Microbiology: Marine Microbiology**. London: Academic Press Ltd, 2001, 666p.

PERNTHALER, A.; PERNTHALER, J.; AMANN, R. Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 3094-3101, 2002.

QUEVEDO, B.; GIERTSEN, E.; ZIJNGE, V.; LÜTHI-SCHALLER, H.; GUGGENHEIM, B.; THURNHEER, T.; GMÜR, R. Phylogenetic group- and species-specific oligonucleotide probes for single-cell detection of lactic acid bacteria in oral biofilms. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 14, p. 1-12, 2011.

RAMETTE, A.; TIEDJE, J. M.; BOETIUS, A. Impact of space, time and complex environments on microbial communities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 60-62, 2009.

REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. **Uso de ferramentas moleculares em estudo de diversidade de micro-organismos do solo**. 1 ed. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002. 33p.

ROLLER, C.; WAGNER M.; AMANN R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER K. H. *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S RNAr-targeted oligonucleotides. **Microbiology**, v. 140, n. 10, p. 2849-2858, 1994.

ROSSMANN, M. **Otimização da produção e propriedades tensoativas de biossurfactantes em meios à base de melaço e manipueira**. 2008. 112 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

SONENSHEIN A. L.; HOCH, J. A.; LOSICK R. **Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria**. **Biochemistry, physiology, and molecular genetics**. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1993.

STEIL, L. **Avaliação da atividade microbiana anaeróbia metanogênica na lagoa de estabilização anaeróbia da estação de tratamento de esgotos sanitários do município de Cajati, Vale do Ribeira de Iguape, estado de São Paulo**. 2007. 291f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2007.

SVENDSEN, C. B.; BOYE, M.; STRUVE, C.; KROGFELT, K. A. A novel fluorescent *in situ* hybridization technique for detection of *Rickettsia* spp. in archival samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 76, n. 3, p. 301-304, 2008.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

TODAR, K. **Online Textbook of Bacteriology**. Disponível em: <<http://www.textbookofbacteriology.net>>. Acesso em: 18 ago. 2011.

WAGNER, M.; SCHMID, M.; JURETSCHKO, S.; TREBESIUS, K.-H.; BUBERT, A.; GOEBEL, W.; SCHLEIFER, K.-H. *In situ* detection of a virulence factor mRNA and RNAr 16S in *Listeria monocytogenes*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 160, n. 1, p. 159-168, 1998.

WAGNER, M.; HORN, M.; DAIMS, H. Fluorescence *in situ* hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 302-309, 2003.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221-271, 1987.

XUFRE, A.; ALBERGARIA, H.; INÁCIO, J.; SPENCER-MARTINS, I.; GÍRIO, F. Application of fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) to the analysis of yeast population dynamics in winery and laboratory grape must fermentations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 3, p. 376-384, 2006.

YILMAZ, L. S.; NOGUERA, D. R. Mechanistic Approach to the Problem of Hybridization Efficiency in Fluorescent *In Situ* Hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7126–7139, 2004.