

PROSPECÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES (qPCR e FISH) A SEREM UTILIZADAS EM AMOSTRAS AMBIENTAIS PARA PESQUISA NA ÁREA DE BIOTECNOLOGIA

Luciana Reis Lima^{1,2}; Paulo Fernando de Almeida²; Josilene Borges Torres Lima Matos²

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, BA, Brasil. (reisluciana@ig.com.br)

²Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, UFBA, Salvador, BA, Brasil.

Rec.: 19.09.2014. Ace.: 20.12.2015

RESUMO

Informações relacionadas com a diversidade microbiana em amostras ambientais são restritas, em função da dificuldade de isolamento de diversos micro-organismos. Métodos de isolamento envolvem o cultivo e, devido à impossibilidade de fornecer as condições reais encontradas em ambientes naturais, técnicas de Biologia Molecular vêm sendo utilizadas para a identificação e caracterização de populações microbianas (métodos independentes de cultivo). Destarte, o objetivo deste estudo foi realizar uma prospecção entre técnicas moleculares que pudessem ser utilizadas em amostras ambientais, comparando as técnicas qPCR e FISH, enfatizando a importância das mesmas para o conhecimento estrutural das comunidades microbianas, destacando as vantagens e desvantagens de cada técnica, bem como suas aplicações. Um estudo comparativo foi realizado, utilizando trabalhos publicados, a fim de reunir informações atualizadas que incentivassem o desenvolvimento de pesquisas e novas patentes utilizando a qPCR e a FISH para estudo da diversidade microbiana inexplorada, em particular de amostras ambientais.

Palavras chave: qPCR. Hibridização Fluorescente *in situ*. Amostras Ambientais.

ABSTRACT

Information related to microbial diversity in environmental samples is restricted due to the difficulty of isolation of several micro-organisms. Isolation methods involve crops and because of the impossibility of providing the actual conditions found in natural environments, Molecular Biology techniques have been used to identify and characterize microbial populations (independent cultivation methods). Therefore, the aim of this study was to conduct a survey of molecular techniques that could be used in environmental samples by comparing the techniques: qPCR and FISH, emphasizing their importance for the structural knowledge of microbial communities, highlighting the advantages and disadvantages of each technique as well as their applications. A comparative study was conducted using published works to gather updated information that would encourage the development of research and new patents using qPCR and FISH to study the unexplored microbial diversity, especially of environmental samples.

Keywords: qPCR. Fluorescent *in situ* Hybridization. Environmental Samples.

Área Tecnológica: Biologia Molecular.

INTRODUÇÃO

Os micro-organismos são considerados como as entidades bióticas mais numerosas e antigas, que colonizaram vários nichos do planeta com sucesso (OLIVEIRA; SETTE; FANTINATTI-GARBOGGINI, 2006), porém, são poucas as informações obtidas sobre a dinâmica das comunidades destes seres presentes em amostras ambientais. Calcula-se que hoje sejam conhecidos menos de 1% e no máximo 10% das espécies microbianas presentes em amostras naturais (ZILLI et al., 2003). Apesar de estarem frequentemente associados a processos patológicos ou de deterioração, os micro-organismos são capazes de produzir substâncias químicas (bioativos) com grande aplicação para diversos setores, a exemplo da indústria farmacêutica, da agricultura, do meio ambiente, dentre outras (CONTI; GUIMARÃES; PUPO, 2012), o que torna esses agentes de grande valia para a indústria e, principalmente, para a Biotecnologia.

Para o conhecimento das comunidades microbianas e suas interações, os métodos clássicos de cultivo são ideais (DITTAMI; EDVARSDEN, 2012), contudo, sabe-se que a quantificação dos micro-organismos isolados apresenta resultados divergentes quando comparada com a contagem direta de micro-organismos em mostras ambientais. E isso ocorre devido à dificuldade de reproduzir *in vitro* as interações microbianas naturais (TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2011). Para solucionar este problema, técnicas moleculares têm permitido a detecção *in situ* dos micro-organismos ambientais, bem como biofilmes microbianos constituídos de várias cepas, espécies e gêneros em comunidades complexas (GANDRA et al., 2008; NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007; ZWIRGLMAIER, 2005), dispensando o cultivo prévio.

Adicionalmente, a caracterização molecular e a identificação através de técnicas de clonagem e sequenciamento mais modernas, têm favorecido o entendimento estrutural e funcional de muitas comunidades microbianas, possibilitando avanços significativos para a área biotecnológica, como por exemplo, o biomonitoramento e a biorremediação de ambientes impactados pela ação antrópica (BUSS; BAPTISTA; NESSIMIAN, 2003; GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2004).

A degradação de derivados do petróleo (SANTOS, A. F. J. et al., 2010), a utilização de indicadores da qualidade do solo (COSTA; SIQUEIRA, 2004; GRILO, 2009) e o tratamento de águas residuais (FORNEY; ZHOU; BROWN, 2004) são alguns exemplos de aplicações biotecnológicas que utilizam micro-organismos e/ou seus produtos para monitorar ou remediar problemas ambientais. Vale ressaltar que o desenvolvimento das aplicações biotecnológicas só foi possível com o acréscimo de informações geradas a partir de análises filogenéticas e dos elementos que compõem as comunidades microbianas, através das técnicas moleculares.

De acordo com Strunk e colaboradores (2000 apud MACHADO, 2006, p. 29), a subunidade 16S do rRNA foi qualificada por Carl Woese e colaboradores em 1980, como um poderoso marcador molecular capaz de identificar e classificar procariotos, possibilitando a observação das primeiras árvores filogenéticas. Desde então, a avaliação da molécula 16S rRNA composta por aproximadamente 1500 nucleotídeos tornou-se o método mais utilizado em estudos filogenéticos de micro-organismos (COUTINHO; MILITÃO NETO; VERDE, 2006; NISHIO, 2005).

Por outro lado, o desenvolvimento dos métodos moleculares foi impulsionado com o surgimento da técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase), descrita por Saiki e aprimorada por Kary Mullis em 1984 (MORENO, 2013). Mullis e colaboradores inovaram a técnica de PCR conferindo-lhe especificidade através da cópia de fragmentos de DNA, dando origem ao conceito dos *primers* e à utilização da DNA polimerase termoestável (SAIKI et al., 1988). Após a publicação dos experimentos que se referiam à amplificação do gene da β globina humana, na revista *Methods in Enzymology*, uma reconhecida empresa de insumos (Perkin-Elmer Cetus) comprou a patente dos experimentos de Mullis e, no ano de 1993, ele recebeu o prêmio Nobel de Química (SAIKI et al., 1985; ROCHE, 2015).

A PCR é uma técnica que permite a amplificação do DNA ou do cDNA, *in vitro* e que tem como princípio uma reação enzimática catalisada pela Taq DNA polimerase (COX; DOUDNA; O'DONNELL, 2012). A PCR apresenta algumas variações, dentre as quais se encontra a *real-time* PCR (qRT PCR), também conhecida como PCR quantitativo (qPCR), que se baseia na detecção e quantificação de compostos fluorescentes (fluorocromos), a exemplo de intercalantes como *SYBR® Green* ou sondas, como a *TaqMan®*, e difere da PCR convencional por monitorar o produto recém-sintetizado ao final de cada ciclo (BUSTIN; MUELLER, 2005; GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004; OLIVEIRA, 2010).

Em oposição às técnicas qPCR e PCR convencional, a Hibridização Fluorescente *in situ* — FISH — permite a visualização de micro-organismos em um ambiente natural (ZWIRGLMAIER, 2005), dispensando, desta forma, a necessidade de cultivo, extração do DNA ou até mesmo amplificação dos fragmentos de nucleotídeos (NISHIO, 2010). A técnica de FISH tem como princípio a construção de sondas de oligonucleotídeos que complementam a região específica do rRNA no micro-organismo de interesse, permitindo a contagem diferencial através da contagem de células totais em uma amostra e das células que hibridizam com a sonda (MACHADO, 2006; ZHANG et al., 2010; NEVES; GUEDES, 2012).

De acordo com Zhang e colaboradores (2010), a técnica de FISH também pode ser vinculada a métodos de coloração que possibilitam o acompanhamento do estado fisiológico das comunidades microbianas, a exemplo dos corantes Verde de Oregon e o Iodeto de Propídio.

Diversas publicações têm sido apresentadas utilizando marcadores moleculares com propósitos distintos. Alguns trabalhos também descrevem a caracterização de comunidades microbianas, bem como a dinâmica e a funcionalidade que envolvem tais comunidades (CHAGAS JUNIOR; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2009; MACHADO, 2006; SANTOS, G.O., 2011); não obstante, o presente trabalho tem como objetivo realizar a prospecção de técnicas moleculares que possam ser utilizadas para caracterizar micro-organismos ambientais e comparar as técnicas moleculares (qPCR e FISH), destacando a importância de cada técnica para a análise ambiental e funcional das comunidades microbianas. Tal trabalho leva ainda em consideração as vantagens e desvantagens que estão atribuídas a cada técnica, bem como as suas aplicações. Vale ressaltar que estudos comparativos como estes poderão contribuir para a escolha de metodologias que possam vir a ser aplicadas em pesquisas ambientais futuras e incentivar publicações e registros de patentes para a diversidade microbiana ainda inexplorada.

METODOLOGIA

Para a realização desta pesquisa, foram prospectados trabalhos em forma de artigos científicos, teses, dissertações, periódicos e textos técnicos, entre os meses de março de 2013 a novembro de 2015, que abordaram o tema deste estudo, no período de 10 anos (entre 2003 e 2013).

Entretanto, trabalhos com data de publicação anterior e que foram julgados relevantes para a pesquisa também foram considerados para a construção deste estudo.

Os dados obtidos foram selecionados e comparados levando em consideração as publicações que faziam referência às técnicas qPCR e FISH através de estudos de revisão de literatura, trabalhos de campo e estudos que associavam estas técnicas a outras técnicas moleculares que não utilizam marcadores fluorescentes.

Os tipos de amostras analisadas por qPCR e FISH, em experimentos de campo, também foram descritos, com a intenção de avaliar as possíveis aplicações destas técnicas em estudos ambientais.

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE TÉCNICAS MOLECULARES

Assim como demonstrado por Morris e colaboradores (2002), entre os anos de 1975 e 1999, o estudo da biodiversidade de micro-organismos sofreu um acréscimo exponencial, devido à disponibilidade de novos métodos moleculares. Através da difusão desses novos métodos, foi possível a investigação de algumas comunidades microbianas, antes limitadas pela ausência de estudos filogenéticos e pelo fato de que muitos agentes não poderiam ser cultivados (DORIGO; VOLATIER; HUMBERT, 2005).

Atualmente, existem inúmeras estratégias para detecção, monitoramento e caracterização da diversidade microbiana em amostras ambientais, a partir de métodos independentes de cultivo.

Ainda de acordo com Dorigo, Volatier e Humbert (2005), os métodos independentes de cultivo podem ser classificados como métodos baseados na amplificação do DNA ou cDNA através da PCR, sendo comumente descritos na literatura como métodos de *fingerprinting* ou métodos de impressão digital (Quadro 1).

Quadro 1 - Principais técnicas moleculares baseadas na amplificação de material genético, através da PCR convencional aplicadas em amostras ambientais, descritas na literatura entre os anos de 2004 a 2011		
Métodos de <i>fingerprinting</i>	Amostra	Referências
DGGE- Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante	Lagoas de estabilização	Nishio (2010)
TGGE- Eletroforese em Gel com Gradiente de Temperatura	Fungos em solo	Monteiro (2007)
RISA- Análise de Espaçador Intergênico Ribossomal	Solo, ambientes marinhos e rizosfera	Tonini, Rezende e Gravitol (2011)
ARISA- Análise de Espaçador Intergênico Ribossomal Automático	Diferentes ambientes marinhos	Danovaro et al. (2006)
SSCP- Polimorfismo de Conformação de fita simples	Abelhas sem ferrão da Amazônia	Souza e Carvalho-Zilse (2010)
AFLP- Polimorfismo de Comprimento de Fragmento Amplificado	Plantas dos gêneros <i>Trollius</i> e <i>Adrônis</i>	Després et al. (2003)
ARDRA- Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado	Gramíneas gênero <i>Brachiaria</i>	Reis Junior, Teixeira e Reis (2004)

Fonte: Autoria própria, 2015.

Coutinho, Neto e Verde (2006) relatam que os métodos *fingerprinting* dispensam a utilização de marcadores que hibridizam. Além disso, de acordo com Muyzer e Smalla (1989 apud MARZORATI et al., 2008, p. 1), os métodos *fingerprinting* são utilizados para fornecer, através de um gel de poliacrilamida ou agarose, um perfil que representa a variação genética e, conseqüentemente, a diversidade da comunidade microbiana.

Do mesmo modo, os métodos de clonagem e sequenciamento, posteriores à amplificação por PCR, também podem ser utilizados para determinar a variabilidade e as relações filogenéticas dos micro-

organismos. E além dessa finalidade, a clonagem e o sequenciamento possibilitam a construção de bibliotecas de genes, resultando no depósito de informações específicas em bancos de dados genéticos e contribuindo para o aumento de informações sobre os diversos tipos de micro-organismos (OLIVEIRA; SETTE; FANTINATTI-GARBOGGINI, 2006).

Em contrapartida, os métodos independentes de cultivo que não são baseados na amplificação do DNA ou cDNA por PCR, têm como princípio a hibridização através de sondas de oligonucleotídeos marcadas (Quadro 2) ou a desnaturação do DNA (DORIGO; VOLATIER; HUMBERT, 2005).

Quadro 2 - Principais técnicas moleculares baseadas em hibridização, descritas na literatura entre os anos de 2007 e 2011		
Métodos não baseados na PCR	Amostras	Referências
FISH- Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>	Amostras derivadas de petróleo	Santos, G.O. (2011)
TSA-FISH- Hibridização Fluorescente <i>in situ</i> Combinada com a Amplificação de Sinal de Tiramida	Algas marinhas	Not et al. (2007)
CARD-FISH- Decomposição Repórter Catalisada por Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>	Solo	Eickhorst e Tippkötter (2008)

Fonte: Autoria própria, 2015.

Inicialmente a qPCR foi desenvolvida para a detecção e identificação de micro-organismos patogênicos, tais como: *Vibrio cholerae*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Escherichia* spp. (ZHANG; FANG, 2006). Contudo, a sua aplicação foi ampliada com a projeção de conjuntos de *primers* e sondas universais que possibilitaram a avaliação de grupos de arqueobactérias, bactérias e fungos em amostras ambientais (MANERKAR; SEENA; BÄRLOCHER, 2008).

Desde então, diversos oligonucleotídeos e sondas específicas foram desenvolvidos, o que permitiu a identificação de inúmeras bactérias, além da quantificação de genes funcionais (ZHANG; FANG, 2006).

O desenvolvimento de *primers* e sondas utilizados na técnica qPCR foi de fundamental importância para a avaliação filogenética entre as comunidades microbianas, uma vez que os mesmos amplificam e hibridizam, respectivamente, sequências complementares presentes nas moléculas do DNA molde (SANTOS, G. O., 2011), Quadro 3.

Manerkar, Seena e Bärlocher (2008), por exemplo, utilizaram *primers* a partir da qPCR para estimar quantidades relativas de DNA bacteriano, de arqueobactérias e de fungos através da decomposição de discos foliares de *Tilia cordata* em riachos. A qPCR também foi utilizada para quantificar a população total de *Microcystis aeruginosa* e os genótipos potencialmente produtores da microcistina, uma hepatotoxina (YOSHIDA et al., 2007).

Para a identificação de bactérias metanotróficas, responsáveis pela oxidação do metano, foram desenvolvidos *primers* para o gene alvo *pmoA*, que tem como finalidade codificar a subunidade α metano monooxigenase presentes em *Methylococcus*, *Methylobacter* *Methylosarcina*, *Methylosinus* e *Methylocapsa* (KOLB et al., 2003).

De acordo com Hristova e colaboradores (2003), as bactérias degradadoras do éter metil terciário (MTBE) são possivelmente identificadas com o auxílio de *primers* e sondas específicas a partir do qPCR. A estirpe PM1, utilizada para o estudo citado, rapidamente mineraliza e cresce na presença do MTBE, servindo como um método eficiente de biorremediação em áreas impactadas.

A utilização da qPCR nos diversos estudos supracitados só foi possível em função do aprimoramento da técnica da PCR convencional proporcionada pela inovação de Kary Millus com a utilização dos *primers* e da DNA polimerase termoestável, o que possibilitou vantajosas variações nas técnicas de PCR (SAIKI et al., 1988; ROCHE, 2015).

Ao realizar uma busca por patentes em bancos de dados como o INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial), acessado no dia 16/11/15, apenas 2 (dois) resultados foram gerados para o termo qPCR. Um número maior de patentes (seis), utilizando a mesma palavra-chave, foi encontrado na base de dados de patentes de vários países da América Latina (LATIPAT). Já no registro de patentes dos países Europeus (Europeu Patent Office- EPO), 277 (duzentos e setenta e sete) resultados foram encontrados com o termo qPCR sob as mesmas condições das pesquisas anteriores.

Quadro 3 - Aplicações da técnica de real- time PCR, obtidas a partir de publicações, entre os anos de 2003 e 2010

Alvo	<i>Primers forward e Primers reverse</i>	Sondas TaqMan®	Amostras	Referências
Bactéria Archaea Fungos	E8F\ E533R ARCH21F\ ARCH958R ITS3F\ITS4R		Plantas (<i>Tilia cordata</i>)	Manerkar, Seena e Bärlocher (2008)
<i>Microcystis aeruginosa</i> PC – IGS Gen <i>mcyA</i>	188F 254R M1R – F M1R – R		Águas do lago Mikata	Yoshida et al. (2007)
<i>pmoA</i> <i>Methylobacter</i> <i>Methylosarcina</i>	A189F / Mb601R		Solo	Kolb et al. (2003)
PM1 ITS	1406F 1850R	963F 1076R	Águas subterrâneas contaminadas por MTBE	Hristova et al. (2003)

Fonte: Autoria própria, 2015.

Os resultados das consultas validam o exposto por Oliveira e colaboradores (2014), quando realizaram uma pesquisa para análise de patentes envolvendo plantas transgênicas mais tolerantes ao estresse abiótico, para o qual foi escolhido um documento de bases envolvendo a família de patentes WO2012061911 e PI1015903-7 que visa à utilização do gene CAHB12 do café, geneticamente modificado. Oliveira e colaboradores (2014) relatam que no Brasil o número de

depósito de patentes ainda é muito baixo e isso ocorre em função da falta de cultura de proteção, principalmente em universidades e institutos de pesquisas.

Assim como a qPCR, a técnica de FISH também pode ser aplicada em estudos ambientais utilizando diferentes tipos de amostras, citadas no Quadro 4. A técnica de FISH tem auxiliado muitos pesquisadores na detecção de micro-organismos não cultiváveis. A pesquisa elaborada por Machado (2006), por exemplo, objetivou a detecção de fungos filamentosos em água engarrafada. Para este mesmo experimento foi utilizada a sonda EUK516 ligada ao marcador fluorescente CY3 na extremidade 5'. Esta sonda tem como alvo a sequência de nucleotídeos 546-563 da subunidade 18S rRNA de *Saccharomyces cerevisiae*, que é idêntica em todos os organismos eucariontes. Já para a detecção de *Bacillus* spp., em amostras ambientais com presença de petróleo, foram utilizadas duas sondas: EUB338, que é comum ao Domínio bactéria, e a sonda BAC07, que é específica para o *Bacillus* spp., sendo que ambas complementam a região 16S rRNA (SANTOS, G. O., 2011).

Quadro 4 - Aplicações da técnica de Hibridização fluorescente <i>in situ</i> FISH, obtidas a partir de publicações entre os anos de 2005 e 2011			
Alvo	Sondas específicas e universais	Amostras	Referências
Fungos Filamentosos 18s rRNA (<i>Penicillium brevicompactum</i>)	EUK 516	Água engarrafada	Machado (2006)
<i>Bacillus</i> spp.	EUB338 e BAC07	Amostras ambientais com presença de petróleo	Santos, G.O. (2011)
Eubactérias 16S rDNA <i>Crenarchaeota</i> grupo marinha I <i>Euryarchaeota</i> grupo marinha II	EUB338 Cren537 Eury806	Águas das zonas profundas do oceano (mesopelágica e batial)	Herndl et al. (2005)

Fonte: Autoria própria, 2015.

Além da quantificação de micro-organismos, a técnica de FISH também é aplicada em estudos sobre a dinâmica de comunidades microbianas. Em 2006, pesquisadores que realizaram a avaliação da distribuição espacial de bactérias e arqueobactérias planctônicas (*Crenarchaeota* e *Euryarchaeota*) em zonas profundas do oceano, também utilizaram como ferramenta molecular a técnica de FISH (HERNDL et al. 2005). Para tal estudo, as sondas empregadas foram: EUB 338- para bactérias, Cren537- para *Crenarchaeota* grupo marinho I e Eury806- para *Euryarchaeota* grupo marinho II, como demonstrado no Quadro 4 (HERNDL et al., 2005).

A sonda EUB338 também foi utilizada por Santos e colaboradores (2010), bem como as sondas BRS385 (bactérias redutoras de sulfato), DSV698 (Família *Desulfovibrionacea*) e BRS129 (*Desulfobacter* spp.) em amostras de água produzida na indústria de petróleo.

Assim como descrito anteriormente, a Hibridização Fluorescente *in situ*- FISH é bastante utilizada em estudos ambientais. Porém, os pedidos de patentes encontrados para o termo Hibridização Fluorescente *in situ*, tanto no INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial), quanto no

LATIPAT, ainda são poucos, representando apenas 1 (um) pedido em cada banco de dados, quando acessados no dia 17/11/15, sendo estes de cunho clínico e não ambiental.

Surpreendentemente, quando a mesma consulta foi realizada no registro de patentes dos países europeus (Europeu Patent Office- EPO), não foi encontrado nenhum registro para o termo Hibridização Fluorescente *in situ*, contrapondo o que ocorreu para o termo qPCR nas mesmas bases de dados, onde o número de registros citados anteriormente foi representativo, como demonstra o Quadro 5.

De acordo com Oliveira (2010), a qPCR apresenta inúmeras vantagens, dentre as quais se destacam: (1) a rapidez no que diz respeito ao tempo para realização da análise (estima-se que todo o ensaio leve aproximadamente quatro horas e meia); (2) a detecção de quantidade relativamente pequena do DNA alvo (3 picogramas de material); (3) os protocolos são bem descritos e de fácil execução; (4) existe facilidade de quantificação dos micro-organismos pesquisados, uma vez que é possível monitorar os produtos da PCR em tempo real; e (5) a utilização de equipamentos com maior confiabilidade capazes de evitar possíveis contaminações nas amostras.

Quadro 5 - Número de patentes registradas, em bases de dados, para os termos qPCR e Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>, em novembro de 2015		
Termo Pesquisado	Base de dados	Nº de patentes
qPCR	INPI- Instituto Nacional de Propriedade Industrial	1
	LATIPAT (Países da América Latina e Espanha)	6
	EPO- Europeu Patent Office	277
Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>	INPI- Instituto Nacional de Propriedade Industrial	1
	LATIPAT (Países da América Latina e Espanha)	1
	EPO- Europeu Patent Office	0

Fonte: Autoria própria, 2015.

Por outro lado, a técnica de FISH permite a caracterização e a quantificação dos micro-organismos e também pode evidenciar arranjos espaciais destes no seu ambiente natural. Tal técnica permite ainda observar a morfologia celular e, adicionalmente, constitui um método relativamente rápido quando o objetivo é quantificar populações microbianas em diversos tipos de amostras (GODINHO, 2010).

Com relação às limitações referentes à técnica qPCR, são frequentemente relatados na literatura o custo elevado dos equipamentos e a dificuldade no manuseio, bem como a dificuldade na interpretação dos testes. Além disso, os fluorocromos utilizados podem se ligar a qualquer produto da dupla cadeia de DNA (ALONSO, 2008; OLIVEIRA, 2010), fazendo com que a padronização seja cara e bastante trabalhosa (GACHON; MINGAM; CHARRIER, 2004).

As limitações atribuídas à FISH geralmente estão associadas à dificuldade de entrada da sonda na célula devido à insuficiência da permeabilidade celular, o que impede o acesso das sondas ao sítio de destino (ZWIRGLMAIER, 2005). Ainda como dificuldade, a contagem microscópica sem o uso

do *software* de captura da imagem pode tornar a técnica de FISH bastante demorada e cansativa, exigindo experiência do observador (GODINHO, 2010).

Além disso, de acordo com Nishio (2010), amostras ambientais podem apresentar fluorescência natural (*background*), que dificulta a identificação por FISH, ou conter um teor ribossomal limitado, o que significa que quanto menor a célula, mais difícil vai ser a sua detecção (AMANN; FUCHS, 2008). Contudo, alterações na metodologia de FISH já foram realizadas (por exemplo, CARD-FISH) para suprir limitações referentes à intensidade do sinal (ZWIRGLMAIER, 2005).

Godinho (2010) ressalta ainda que o limite de detecção da técnica de FISH é elevado (10^3 a 10^4 células/ml) e descreve que as populações microbianas que estiverem abaixo desta concentração não serão detectadas por FISH, a menos que sejam coletados volumes grandes da amostra, aumentando a sua concentração.

PERSPECTIVAS FUTURAS

O estudo da diversidade microbiana em amostras ambientais foi limitado durante muito tempo somente às análises a partir dos métodos clássicos. Em contrapartida, após o surgimento das técnicas moleculares, algumas respostas sobre a diversidade dos micro-organismos e a funcionalidade das comunidades de micro-organismos ambientais têm sido evidenciadas, haja vista que a utilização da qPCR para a identificação e quantificação de genes específicos tem promovido um maior entendimento das árvores filogenéticas microbianas. A técnica de FISH, por sua vez, tem demonstrado de forma mais abrangente a estrutura destas comunidades à medida que quantifica o número de células e permite a visualização do micro-organismo de interesse *in situ*.

Deste modo, a escolha da técnica molecular a ser empregada em um estudo irá depender da estratégia de trabalho do pesquisador e, embora qPCR e FISH sejam descritas como técnicas capazes de avaliar a funcionalidade e a diversidade das comunidades microbianas, também apresentam limitações. A partir desta análise, é possível afirmar que entre as técnicas mencionadas não há uma técnica capaz de superar todas as restrições encontradas em pesquisas ambientais, uma vez que muitos pesquisadores as associam a outras técnicas moleculares, com o objetivo de garantir uma maior confiabilidade dos resultados. Almeja-se que no futuro avaliações entre as técnicas moleculares a partir de estudos comparativos sirvam de subsídios para contribuir com o aumento de registros de patentes, apoiando o avanço tecnológico para áreas ainda desconhecidas da ciência, como é o caso da área ambiental.

REFERÊNCIAS

ALONSO, C. E. S. **Pesquisa de *Cereulida* em isolados do grupo *Bacillus cereus***. 2008. 72f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) — Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

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

BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Caderno Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 2, p. 465-473, mar-abr. 2003.

BUSTIN, S.; MUELLER, R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. **Clinical Science**, London, v. 109, p. 365-379, set. 2005.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N. Caracterização genética de rizóbio isolados de solos no Amazonas baseada na técnica de PCR-RFLP. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 4, p. 841-846, out-dez. 2009.

CONTI, R.; GUIMARÃES, D. O.; PUPO, M. T. Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 64, n. 3, p. 43-47, 2012.

COSTA, M. C.; SIQUEIRA, E. R. Análise de DNA dos solos e atividade enzimática como bioindicadores de diversidade microbiana em sistemas de restauração florestal na Mata Atlântica. In: SEMINÁRIO DE PESQUISA FAP-SE, 2, 2004, Aracaju. **Anais...** Sergipe: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2004. p.1-3.

COUTINHO, H. D. M.; MILITÃO NETO, V.; VERDE, L. C. L. Técnicas com Marcadores Moleculares Usadas nas Ciências da Saúde. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, Cariri, v. 10, n. 2, p. 177-188, 2006. ISSN 1415-2177.

COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O'DONNELL, M. **Biologia Molecular: Princípios e Técnicas**. Tradução de Gaby Renard et al.. Porto Alegre: Armtmed, 2012. 216 p.

DANOVARO, R.; LUNA, G. M.; DELL'ANNO, A.; PIETRANGELI, B. Comparison of two fingerprinting techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. **Applied and environmental microbiology**, Ancona, v. 72, n. 9, p. 5982-5989, 2006.

DESPRÉS, L. GIELLY, L.; REDOUTET, B.; TABERLET, P. Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. **Molecular phylogenetics and evolution**, Grenoble, v. 27, n. 2, p. 185-196, 2003.

DITTAMI, S. M.; EDVARDBSEN, B. Culture conditions influence cellular rna content in ichthyotoxic flagellates of the genus pseudochattonella (dictyochophyceae). **Journal of Phycology**, Oslo, v. 48, n. 4, p. 1050-1055, 2012.

DORIGO, U.; VOLATIER, L.; HUMBERT, J.F. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. **Water Research**, Thonon-les-Bains, v. 39, p. 2207-2218, jun. 2005.

EICKHORST, T.; TIPPKÖTTER, R. Improved detection of soil microorganisms using fluorescence in situ hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition (CARD-FISH). **Soil Biology and Biochemistry**. Bremen, v. 40, n. 7, p. 1883-1891, 2008.

EPO. Europeu Patent Office. **Espace net**. Disponível em: <http://worldwide.espacenet.com/?locale=en_EP>. Acesso em: 16 e 17 de nov.2015.

FORNEY, L. J.; ZHOU, X.; BROWN, C. J. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. **Current opinion in microbiology**, Idaho, v. 7, n. 3, p. 210-220, jun. 2004.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies? **Journal of Experimental Botany**, Orsay, , v. 55, n. 402, p.1445-1454, abr. 2004.

GANDRA, E. A. GANDRA, T. K. V.; MELO, W. S.; GODOI, H. S. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**, Umuarama, v. 30, n. 1, p. 109-118, 2008.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n.34, p. 36-43, jan-jun. 2004.

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. 185 f. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) — Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GRILO, A. M. S. **Caracterização molecular de populações microbianas em reactores anaeróbios**. 2009. 42f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) — Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa.

HERNDL, G. J.; REINTHALER, T.; TEIRA, E.; VAN AKEN, H.; VETH, C.; PERNTHALER, A.; PENTHALER, J. Contribution of Archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic Ocean. **Applied and Environmental Microbiology**, Bremen, v. 71, n. 5, p. 2303-2309, mai. 2005.

HRISTOVA, K.; GEBREYESUS, B.; MACKAY, D.; SCOW, K. Naturally occurring bacteria similar to the methyl tert-butyl ether (MTBE)-degrading strain PM1 are present in MTBE-contaminated groundwater. **Applied and environmental microbiology**, California, v. 69, n. 5, p. 2616-2623, 2003.

INPI. Instituto Nacional da Propriedade Intelectual. **Base Patente**. Disponível em: <<https://gru.inpi.gov.br/pePI/servlet/PatenteServletControllerr>>. Acesso em: 16 e 17 de Nov. 2015.

KOLB, S.; KNIEF, C.; STUBNER, S.; CONARD, R. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel pmoA- targeted real-time PCR assays. **Applied and Environmental Microbiology**, Marburg, v. 69, n. 5, p. 2423-2429, mai. 2003.

LATIPAT. **Espace net**. Disponível em: < <http://lp.espacenet.com/>>. Acesso em: 16 e 17 nov. 2015.

MACHADO, S. P. A. **Uso de técnicas de detecção rápida de fungos filamentosos na água**. 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado em tecnologia do Ambiente) — Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Braga.

MANERKAR, M. A.; SEENA, S.; BÄRLOCHER, F. Q. RT-PCR for assessing archaea, bacteria, and ungi during leaf decomposition in a stream. **Microbial Ecology**, Sackville New Brunswick, v. 56, n. 3, p. 467-473, fev. 2008.

MARZORATI, M. et al. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. **Environmental Microbiology**, Gent, v. 10, n. 6, p. 1571-1581, mar. 2008.

MONTEIRO, G. G. **Análise da comunidade de fungos em solos da Amazônia por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)**. 2007. 48 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) — Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MORENO, A. C. A. **Diagnóstico Molecular na era da sequenciação de 3ª geração e da PCR digital**. 2013.69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) — Universidade Fernando Pessoa, Porto.

MORRIS, C. E.; BARDIN, M.; BERGER, O.; FREY-KLETT, P.; FROMIN, N.; GIRARDIN, H.; GUINEBRETIEREM, H.; LEBARON, P.; THIERY, J. M.; TROUSSELLIER, M. Microbial biodiversity: approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Montfavet, v. 66, n. 4, p. 592-616, dez. 2002.

NEVES, S. M. N.; GUEDES, R. M. C. Hibridização *in situ* fluorescente: princípios básicos e perspectivas para o diagnóstico de doenças infecciosas em medicina veterinária. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 79, n. 4, p. 627-632, out-dez. 2012.

NIKOLAEV, Y. A.; PLAKUNOV, V. K. Biofilm—“City of microbes” or an analogue of multicellular organisms? **Microbiology**, Moscow, v. 76, n. 2, p. 125-138, abr. 2007.

NISHIO, S. R. **Avaliação da comunidade microbiana procarionte através de técnicas moleculares – FISH, PCR/DGGE e sequenciamento em sistemas artificiais de redução de cargas: ênfase ao estudo de lagoa de estabilização facultativa**. 2010. 38f. Tese (Doutorado em Ciências) — Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade São Paulo, São Paulo.

NOT, F.; VALENTIN, K.; ROMATI, K.; LOVEJOY, C.; MASSANA, R.; TOBE, K.; VAULOT, D.; MEDLIN, L. K. Picobiliphytes: a marine picoplanktonic algal group with unknown affinities to other eukaryotes. **Science**, Barcelona, v. 315, n. 5809, p. 253-255, 2007.

OLIVEIRA, S. D.; LEITE, A. G.; HOSSY, B. H.; ANGELI, R. Monitoramento de tecnologias do café: um panorâma para o melhoramento genético. **Cadernos de Prospecção**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 3, p. 447-459, 2014.

OLIVEIRA, T. M. S. **PCR em tempo real: métodos e aplicações**. 2010.111f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) — Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro.

OLIVEIRA, V. M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos. **Multi Ciência**, São Paulo, n.7, p. 1-19, out. 2006.

REIS JUNIOR, F. B.; TEIXEIRA, K. R. S.; REIS, V. M. Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA) em estudo de diversidade intra-específica de *Azospirillum amazonense* isolados de diferentes espécies de Brachiaria. 41p. **Documentos/ EMBRAPA cerrados**, Planaltina, 2004.

ROCHE MOLECULAR DIAGNOSTICS. History of PCR. Disponível em: <<http://molecular.roche.com/pcr/Pages/History.aspx>>. Acesso em: 23 nov. 2015.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIQUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, San Diego, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.

SANTOS, A. F. J.; BATISTA, L. L. F.; LIMA, J. B. T.; ALMEIDA, R. C. C.; ROQUE, M. R. A.; SOUZA, E. R. Evaluation of the Fluorescence *in situ* Hybridization technique for detection of eubacteria and sulfate-reducing bacteria from samples of water in oil fields. **Chemical Engineering Transcriptions**. Bahia, v. 20, p.134-144, 2010. DOI: 10.3303/CET1020024.

SANTOS, G. O. **Aplicação da técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) para a detecção de *Bacillus ssp.*** 2011. 45f. Dissertação (Mestrado em Ciências) — Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SOUZA, M. T.; CARVALHO-ZILSE, G. A. **Identificação molecular de abelhas sem ferrão da Amazônia.** 2010. 57 f. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) — Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, Manaus.

TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Biodegradação bacteriana de petróleo e seus derivados. **Revista Virtual de Química**, Campos Dos Goytacazes, v. 3, n. 2, p. 78-87, jun. 2011.

YOSHIDA, M.; YOSHIDA, T.; TAKASHIMA, Y. Y.; HOSODA, N.; HIROISI, S. Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* populations is correlated with nitrate concentration in a Japanese lake. **FEMS Microbiology letter**, Obama-City, Fukui, v. 266, n. 1, p. 49-53, nov. 2007.

ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. **Applied microbiology and biotechnologina**, Hong Kong, v. 70, n. 3, p. 281- 289, fev. 2006.

ZHANG, X.; TANI, A.; KAWAI, F.; KIMBARA, K. Rapid and multiple *in situ* identification and analyses of physiological status of specific bacteria based on fluorescent *in situ* hybridization. **Journal of bioscience and bioengineering**, Okayama, v. 110, n. 6, p. 716-719, 2010.

ZILLI, J. É.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, set-dez. 2003.

ZWIRGLMAIER, K. Fluorescence *in situ* hybridisation (FISH) – the next generation. **FEMS Microbiology letters**, Coventry, v. 246, n. 2, p. 151-158, jan. 2005.