**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Localização *in situ* e caracterização molecular da bactéria endossimbionte de
*Pleurotus ostreatus***

Ricardo Yara

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas**

**Piracicaba
2006**

Ricardo Yara
Engenheiro Agrônomo

**Localização *in situ* e caracterização molecular da bactéria endossimbionte de
*Pleurotus ostreatus***

Orientador:
Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

**Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Agronomia. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas**

Piracicaba
2006

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DI VI SÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/ USP

Yara, Ricardo

Localização *in situ* e caracterização molecular da bactéria endossimbionte de
Pleurotus ostreatus / Ricardo Yara. - - Piracicaba, 2006.
86 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2006.
Bibliografia.

1. Bactérias aeróbicas gram-negativa 2. Cogumelo comestível 3. Endossimbiose
4. Fungo xilófago 5. Genética molecular 6. Microscopia eletrônica 7. Microscopia de
fluorescência I. Título

CDD 589.22

**“Permi t i d a a cópi a t o t a l o u p a r c i a l d e s t e d o c u m e n t o , d e s d e q u e c i t a d a a
f o n t e – O a u t o r ”**

Dedico este trabalho à minha família

*Ofereço aos amigos que incentivaram
para o retorno a um curso acadêmico e aqueles
que incentivaram para terminá-lo.*

AGRADECIMENTOS

“**Agradecimento.** *S. m.* **1.** Ato ou efeito de agradecer. **2.** Gratidão, reconhecimento. **3.** Palavras ou fatos com que a gratidão se manifesta.”

Aurélio Buarque de Holanda Ferreira

“... **Agradecimento(s)**

Página opcional na qual o autor agradece àqueles que realmente contribuíram de maneira relevante para a elaboração do trabalho”

Normas para Elaboração de Dissertações e Teses 3ª edição

Agradecimento.

De todos os elementos que compõem uma tese, certamente o Agradecimento é o elemento mais prazeroso de se elaborar, pois nele é aonde podemos expressar as alegrias destes quatro anos de doutorado, é nele também que retribuímos em palavras os gestos, os apoios e a solidariedade recebidos.

No Agradecimento celebramos as amizades, os momentos aprazíveis e os fins dos eventuais desencontros, que aconteceram tanto longe como próximo à bancada, mas que só puderam ocorrer porque tínhamos um vínculo em comum.

Nesta página saudamos os velhos amigos que nos foram solidários a milhares quilômetros de distância e aos novíssimos amigos, quase estranhos, que nos receberam de portas e corações abertos.

Neste espaço, o mundo fantasioso da cátedra dá lugar a um outro, humano e real, aquele mundo que não está descrito ou analisado nos artigos científicos nem faz parte do universo cartesiano, mas que foi o elemento condutor essencial para que este trabalho chegasse ao fim.

Este mundo invisível à ciência, mas real e por vezes extremamente duro, que nos faz refletir, avançar e superar obstáculos e é também aquele que nos faz amadurecer um pouco mais. Enfim, estas linhas são dedicadas e oferecidas aos meus familiares, e aos velhos e novos amigos e mestres que incansavelmente emprestaram sua ajuda para que esta aventura chegasse ao fim.

Meus sinceros agradecimentos às pessoas e instituições que tornaram possível a realização deste trabalho:

A minha família (Sr. Manoel, Dona Ana, Adriana e Kátia) que sempre apoiaram e pacientemente suportaram na minha longa jornada longe de casa.

A família Ikuta (Nilo, Agda, Mariana e Gabriel) que me acolheu e criou um espaço para eu poder redigir este trabalho, em especial ao Dr. Nilo que com sua incomparável amizade, persistência, persistência e persistência viabilizou a finalização deste trabalho, muito obrigado!

A família Tokeshi (Prof. Hasime, Dona Mitsue, filhos e netos) que me acolheu nesta última etapa de finalização da tese, em especial prof. Tokeshi que forneceu a fonte de inspiração inicial deste trabalho e que também foi e é o meu grande modelo de cientista.

Aos grandes amigos da família Gradeana (Pedro, Samuel, Silvio e Lino) e ao grande amigo Francisco Terasawa Jr. com quem sempre pude contar apesar da distância e do tempo decorrido desde a graduação.

Ao prof. Dr. João Lúcio de Azevedo pela orientação, apoio e estímulo e a profa. Dra Aline A. Pizzirani-Kleiner pela oportunidade do desenvolvimento deste trabalho no Laboratório de Genética de Microrganismos. A ambos meu sincero e profundo agradecimento pela oportunidade que me deram para voltar a vida acadêmica em 1999.

Ao casal Almeida (Dra. Cristina Vieira de Almeida e prof. Dr. Márcio de Almeida) pelo apoio, sugestões e principalmente amizade que manifestaram durante todos estes anos.

Ao prof. Dr. Jorge Horii, pelas inúmeras sugestões feitas durante a fase experimental e pelo entusiasmo dado ao longo do trabalho.

Aos Prof. Dr. Cláudio Lopes Souza Junior e Prof. Dr. Isaias Olívio Geraldi, que forneceram um apoio inestimável e fundamental sem o qual este trabalho não seria finalizado.

Ao prof. Dr. Anton Hartmann pela simpatia, recepção e acolhida e pela oportunidade de desenvolver parte essencial deste trabalho no GSF Alemanha.

A Profa. Dr. Elizabeth Ann Veasey pela oportunidade de desenvolver um gratificante trabalho na monitoria.

Aos colegas Uira e Giuliano, obrigado pela amizade e oportunidade dada participar de certa maneira dos respectivos trabalhos.

Aos colegas do laboratório: Adalgisa Torres, Ágata Giancoli, Pedro Alcioly, Fernando G.B., Rosimere Bueno, Aldo Procópio, Rudi Procópio, Maria Beatriz (Bia), Carlos Vildoso, Carlos Eduino (Kdu), Júlia Kuklinsky, Cristina Maki, Marcelo Gullo (D-vagar), Maria Clara, Cláudia Gai, Francisco Andreote (Mosk), Fernando Andreote, Jucimary, Antonio Sérgio, Leila Cecília, Manuella Dourado, Fernanda Souza, Fernanda Bueno, Marise Suzuki, Natalie Andreoli, Paulo Lacava, Leonardo Souza, Rodrigo Mendes, Tais Lana, Cecília, Viviane Colombari, Andréa Guelfi, Andréia Spessoto, Mayra Martins, Guilherme Tenório, Guilherme Valarini, José Antonio da Silva, Joelma Marcon, Aline Romão, Carolina Quecine, Carolina Almeida, André Lima, Vivian Pietrobon, Luciana Cursino, Priscilla Rossetto, Rodrigo Stuart, Sônia Minami, Claudia Sanchez, Anderson Ferreira, Fernanda Bueno e Ademir muito obrigado pelo companheirismo, colaboração e paciência manifestadas todos estes anos.

Aos funcionários do Departamento Léia, Berdan, Macedônio, Fernando, Valdir, Victor, Neusa e Glória que prestaram ajuda inestimável ao longo destes anos.

As grandes colegas latinas do GSF, Viviane Radl e Walkiria Levy que foram essenciais na minha adaptação na Alemanha.

Aos colegas do AG Hartmann/IBÖE/GSF: Michael Rothballer, Tatiana Binder, Katharina Buddrus, Soumitra Paul Chowdhury, Draženka Selesi, Michael Rohe, Claudia K., Silvia G., Brigitte Hai, Angelika Schulz, Michael Schmid, Daniela e Uli muito obrigado pela ajuda, recepção e momentos agradáveis especialmente nas pausas para o café. As colegas do IBÖE/GSF: Alexandra Hagn, Karin Kloos, Karl Heidrun, Karin Pritsch, Susanne Stein and Christine Loos muito obrigado pela ajuda e companheirismo.

Ao amigo bávaro Leo Rittel muito obrigado pela amizade, disposição de dividir um apartamento e grande ajuda dada neste período.

Ao Departamento de Genética ESALQ/USP (professores e funcionários), local onde iniciei e agora tenho a feliz oportunidade de completar a minha formação científica e responsável por grande parte da instrução acadêmica.

À CAPES, pela bolsa de estudo de doutorado e pelo auxílio financeiro concedido para o estágio no exterior.

“Cada um de nós, no momento da concepção, ganha um presente, que é a própria vida. Podemos pensar que ganhamos esse presente dos nossos pais, de Deus, das enzimas que permitem a fecundação do óvulo. Obviamente, a vida somente poderia ser um presente vivo. Uma das conseqüências de ganhar um presente vivo é ter que cuidar dele. Assim fazemos se ganhamos um bichinho ou uma planta...Temos de cuidar deles para que continuem vivos. A maneira como cuidamos desse presente vivo tem muita relação com as pessoas que nos deram este presente, como nossa disposição para cuidar e com o presente em si mesmo. Sua vida é um presente vivo. E, como tal, cabe a você cuidar dele...Compreender que essa dádiva é algo em permanente evolução e, portanto, algo para ser criado a cada momento. Sim, nós somos recriados a cada momento. É um presente completo, mas continuará sempre se completando.”

Roberto Shnyashiki

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Revisão bibliográfica.....	13
1.1.1 <i>Pleurotus ostreatus</i> e as suas aplicações biotecnológicas.....	13
1.1.2 A Versatilidade biológica do complexo <i>Burkholderia cepacia</i> (CBC).....	14
1.1.3 Endossimbiose	15
1.1.3.1 O processo evolutivo de um endossimbionte	16
1.1.4 O ciclo completo de análise do rRNA.....	19
1.1.4.1 Aplicações do ciclo completo de estudo do rRNA.....	23
Referências	24
2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ATÍPICAS PERTENCENTES AO COMPLEXO <i>Burkholderia cepacia</i> ASSOCIADA A <i>Pleurotus ostreatus</i>	30
Resumo	30
Abstract.....	30
2.1 Introdução.....	31
2.2 Desenvolvimento	31
2.2.1 Revisão Bibliográfica	31
2.2.2 Material e Métodos.....	33
2.2.2.1 Linhagem de <i>Pleurotus ostreatus</i>	33
2.2.2.2 Isolamento de bactérias.....	33
2.2.2.2.1 Por trituração	33
2.2.2.2.2 Por sistema de co-cultivo	33
2.2.2.3 Genética molecular.....	34
2.2.2.3.1 Extração de DNA	34
2.2.2.3.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR).....	34
2.2.2.3.3 Análise filogenética.....	34
2.2.2.3.4 Projetos de iniciadores e PCR aninhado	35
2.2.3 Resultados	36
2.2.3.1 Isolamento das bactérias	36

2.2.3.2 Similaridade do gene 16S rDNA e análise filogenética.....	36
2.2.3.3 Detecção da bactéria por PCR aninhado.....	37
2.2.4 Discussão.....	38
2.3 Conclusões	40
Referências	40
3 PROTOCOLO PARA HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> FLUORESCENTE (FISH) PARA	
DETECÇÃO DE ENDOBACTÉRIA ASSOCIADA A <i>Pleurotus ostreatus</i>	44
Resumo	44
Abstract.....	44
3.1 Introdução.....	45
3.2 Desenvolvimento	46
3.2.1 Revisão Bibliográfica	46
3.2.1.1 A parede celular bacteriana.....	46
3.2.1.2 Bactérias com parede celular deficiente (forma L)	46
3.2.1.3 Organismos bacterianos que evoluíram para formas sem parede celular	47
3.2.2 Material e Métodos.....	48
3.2.2.1 Microrganismos e condições de cultivo.....	48
3.2.2.2 Detecção de DNA por epifluorescência.....	48
3.2.2.3 Soluções utilizadas para FISH	49
3.2.2.4 Sondas de oligonucleotídeos utilizada nos ensaios de FISH	49
3.2.2.5 Fixação e hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH) bacteriana.....	50
3.2.2.6 Fixação e hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH) de endobactérias presentes em hifas de <i>P. ostreatus</i>	51
3.2.2.7 Observação em microscópio de epifluorescência e microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)	52
3.2.3 Resultados	52
3.2.3.1 Otimização do protocolo de FISH nos cultivos bacterianos.....	52
3.2.3.2 Otimização do protocolo de FISH para detecção da endobactéria de <i>P. ostreatus</i>	54
3.2.4 Discussão.....	56
3.3 Conclusões	59
Referências	59

4 ULTRAESTRUTURA E IDENTIFICAÇÃO *IN SITU* DE UMA *Burkholderia* sp.

ATÍPICA EM MICÉLIO DE <i>Pleurotus ostreatus</i> G2	63
Resumo	63
Abstract.....	63
4.1 Introdução.....	64
4.2 Desenvolvimento	65
4.2.1 Revisão Bibliográfica	65
4.2.2 Material e Métodos.....	67
4.2.2.1 Condições de cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	67
4.2.2.2 Microscopia de eletrônica de varredura (MEV)	68
4.2.2.3 Microscopia de eletrônica de transmissão (MET).....	68
4.2.2.4 Fixação do micélio e hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH)	68
4.2.2.5 Seleção e avaliação das sondas de oligonucleotídeos para FISH.....	69
4.2.2.6 Observações em microscópio confocal de varredura a laser (MCVL)	70
4.2.3 Resultados	71
4.2.3.1 Microscopia de eletrônica de varredura (MEV)	71
4.2.3.2 Microscopia de eletrônica de transmissão (MET).....	71
4.2.3.3 Seleção e avaliação das sondas de oligonucleotídeos para FISH.....	72
4.2.3.4 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente (FISH) em hifas	74
4.2.4 Discussão.....	79
4.3 Conclusões	81
Referências	81

LOCALIZAÇÃO *IN SITU* E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA BACTÉRIA ENDOSSIMBIONTE DE *Pleurotus ostreatus*

RESUMO

O fungo *Pleurotus ostreatus* pertence ao grupo de basidiomicetos que degradam madeira. Este cogumelo cultivado em todo mundo apresenta grande rusticidade e produtividade, e pode ainda ser usado em processos de biorremediação e biopolpação. Devido a seu potencial biotecnológico, torna-se interessante a compreensão da interação deste com outros microrganismos. Neste sentido, recentemente foi observada a presença de bactérias associadas a *P. ostreatus* em culturas *in vitro*, que apresentavam grande pleomorfismo. A partir desta observação foram elaborados ensaios que visaram a confirmação da presença de bactérias. Para tanto, foi utilizada a estratégia do “Ciclo Completo de Análise do rRNA” (full-cycle rRNA analysis) empregada em microrganismos não cultiváveis ou de crescimento fastidioso, além do emprego de técnicas de microbiologia básica, e de estudos de ultraestrutura. Os estudos de microbiologia básica indicaram que se tratava de um microrganismo fastidioso e que se desenvolvia melhor na presença do fungo em sistema de co-cultivo em meios contendo Tween 80 ou Tween 20. Por sua vez, a análise de ultraestrutura demonstrou a presença de estruturas pleomórficas, tanto internamente como externamente à hifa. Em relação ao “Ciclo completo de Análise do rRNA” este se iniciou pela amplificação e sequenciamento de parte do rDNA bacteriano, que revelou a proximidade desta bactéria com o Complexo *Burkholderia cepacia* (CBC). A partir desta sequência, foi realizado um estudo de bioinformática que indicou sondas específicas para este grupo de bactérias. Completando o Ciclo completo de Análise do rRNA, foram realizados ensaios de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para a confirmar a relação entre as estruturas bacterianas e a sequência obtida. Este método comprovou a presença das bactérias no interior das hifas de *P. ostreatus*. Este trabalho constitui o primeiro relato de bactérias pleomórficas pertencente ao complexo *B. cepacia* associados a *P. ostreatus*.

Palavras chaves: *Pleurotus ostreatus*, Complexo *Burkholderia cepacia*, ultraestrutura, hibridização *in situ* fluorescente

**IN SITU LOCALIZATION AND MOLECULAR
CHARACTERIZATION OF *Pleurotus ostreatus* ENDOSYMBIONT BACTERIA**

ABSTRACT

The fungus *Pleurotus ostreatus*, which belongs to white rot basidiomycete group, is a widely cultivated mushroom; this species has high productivity and rusticity, besides its use in biobleaching and bioremediation processes. This biotechnological potential justifies microbial interaction studies between this fungi and others microorganisms. In *P. ostreatus* mycelia, it has been observed pleomorphic bacteria growing on agar media. This research describes several assays to confirm bacterial presence in this sample. Therefore, the full-cycle rRNA analysis (described for unculturable or fastidious microorganism), ultrastructure and basic microbiology approaches were employed. Basic microbiology approaches indicated slow growing bacteria, which grown faster near to fungi colonies in solid media amended with Tween 80 or Tween 20 (co-culture system). Ultrastructure studies confirm the presence of intracellular and extracellular pleomorphic bacteria. The full-cycle rRNA analysis started with 16S rDNA amplification and sequencing. This approach demonstrated a relation between these bacteria with *Burkholderia cepacia* complex. By bioinformatics analysis was determinate which DNA probes can be use to identified this bacterial group. The last step for full-cycle rRNA analysis was applying fluorescent *in situ* hybridization (FISH). This technique confirmed the relationship between 16S rDNA bacterial sequence and bacterial forms. This is the first time that a pleomorphic bacteria from *B. cepacia* complex is found associated with *P. ostreatus*.

Key words: *Pleurotus ostreatus*, *Burkholderia cepacia* complex, ultrastructure, fluorescent *in situ* hybridization

1 INTRODUÇÃO

Pleurotus spp. são cogumelos comestíveis globalmente cultivados, possuem como importante característica a rusticidade e alta produtividade, podendo desenvolver em uma grande gama de substratos. Em *Pleurotus ostreatus* foram detectados compostos bioativos, alguns de ação anti-sarcoma e outros que diminuem a taxa de colesterol.

Vários aspectos da biologia e fisiologia do desenvolvimento de *P. ostreatus* foram investigados, todavia a interação deste com microrganismos foi pouco explorada, especialmente no que se refere a relações mutualísticas.

Observando-se hifas de *Pleurotus ostreatus* cultivadas *in vitro*, Yara et al. (1999) visualizaram em microscópio de luz um grande número de estruturas que se assemelhavam à bactérias, que não se desenvolviam em meios convencionais de fungos. Análises em microscopia eletrônica de transmissão demonstraram que estas estruturas estavam presentes no interior dos vacúolos das hifas, apresentando grande pleomorfismo.

Estes dados foram o ponto de partida para elaboração do presente trabalho, o qual visou confirmar se as estruturas observadas em microscopia de luz e eletrônica estavam relacionadas com estruturas bacterianas. Neste sentido utilizou-se a metodologia “Ciclo Completo de Análise do rRNA” (full-cycle rRNA analysis), empregada na avaliação de microrganismos não cultiváveis ou de crescimento fastidioso. A metodologia tem como princípio caracterizar uma estrutura bacteriana, correlacionando-a com uma sequência específica de ácidos nucleicos (rRNA utilizando-se a reação em cadeia da polimerase - PCR, com iniciadores universais). Com a obtenção desta sequência realiza-se uma análise filogenética, para determinação do grupo taxonômico, e paralelamente faz-se uma seleção de sondas específicas para este grupo. A confirmação da estrutura bacteriana com a sequência analisada é concluída por meio da hibridização *in situ* fluorescente (FISH).

Assim, este trabalho teve como objetivos explorar os seguintes temas:

- Confirmar e caracterizar bactérias associadas as culturas de *P. ostreatus* por técnicas de microbiologia clássica e molecular (capítulo 2 - “ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ATÍPICAS PERTENCENTE AO COMPLEXO *BURKHOLDERIA CEPACIA* ASSOCIADA A *PLEUROTUS OSTREATUS*”).

- Desenvolver a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) associada a microscopia de varredura confocal a laser (MCVL), para viabilizar o estudo das estruturas bacterianas nas hifas de *P. ostreatus* (capítulo 3 - “PROTOCOLO PARA HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH) PARA DETECÇÃO DE ENDOBACTÉRIA ASSOCIADA A *PLEUROTUS OSTREATUS*”).
- Combinar diversas técnicas de microscopia que validem os dados microbiológicos da primeira etapa do trabalho, com ênfase na abordagem do ciclo completo de análise do rRNA (capítulo 4 - “ULTRAESTRUTURA E IDENTIFICAÇÃO *IN SITU* DE UMA *BURKHOLDERIA* SP. ATÍPICA EM MICÉLIO DE *PLEUROTUS OSTREATUS* G2”).

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 *Pleurotus ostreatus* e as suas aplicações biotecnológicas

Os fungos xilófagos constituem o principal grupo com a capacidade de degradar madeira, e de forma geral são classificados em: os que mancham a madeira, os que causam a podridão mole, a podridão parda e a podridão branca. Esta classificação proposta por Martínez et al. (2005) considera o gênero *Pleurotus* como sendo um fungo xilófago causador de podridão branca; neste caso a madeira colonizada apresenta uma coloração desbotada em relação a original, o aspecto é úmido, mole e esponjoso, com perda da resistência após a colonização. Dentro do grupo dos fungos que causam podridão branca, existem aqueles, como o *Pleurotus*, que atacam tanto madeiras do tipo mole como dura, que se caracterizam por degradarem inicialmente a hemicelulose e lignina, e posteriormente a celulose. Neste caso, a lignina é atacada na lamela média e nas paredes secundárias, sendo que o mecanismo de degradação da lamela ocorre por difusão.

Estudos de biogeografia demonstram que o gênero *Pleurotus* possui ampla distribuição geográfica pelo mundo. Entretanto, o complexo de espécies relacionadas a *P. ostreatus* ocorre somente na América do Norte e norte da Eurásia (VILGALYS; SUN, 1994; BAO et al., 2004). No que tange as aplicações biotecnológicas, o cultivo de cogumelos representa uma das possibilidades para a utilização de resíduos da agricultura, pois estes transformam a biomassa caracterizada como agente poluente, em alimento, além de representar uma opção para pequenos agricultores. Entre os cogumelos mais cultivados no mundo, o *P. ostreatus* ocupa a segunda posição sendo apenas superado pela produção do cogumelo *Agaricus bisporus* (LARRAYA et

al., 2000). Neste sentido, Rajarantnam e Bano (1989) enfatizaram a viabilidade do cultivo de *Pleurotus* spp. pela sua habilidade de conversão de resíduos agro-industriais do tipo ligno-celulolítico. Além disso, *Pleurotus* apresenta algumas propriedades farmacológicas (BOBEK; OZDIN, 1994; WANG; GAO; NG, 2000). Outros estudos apontam ainda a possibilidade da utilização deste fungo em processos de biorremediação, como na degradação de hidrocarbonetos aromáticos (MARTENS et al., 1999).

1.1.2 A Versatilidade biológica do complexo *Burkholderia cepacia* (CBC)

O gênero *Burkholderia* foi sugerido por Yabuuchi et al. (1992), tendo *Burkholderia cepacia* como espécie padrão. Este gênero pertence à classe das Proteobactérias subclasse beta. Estas espécies em sua maioria estavam contidas na seção II de *Pseudomonas*, segundo a descrição feita no “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (PALLERONI, 1984).

Viallard et al. (1998), definem o gênero *Burkholderia* como sendo capaz de crescer utilizando-se das seguintes fontes de carbono: glicerol, D-arabinose, galactose, D-glicose, D-manose, inositol, manitol, sorbitol e gluconato, por outro lado este é incapaz de utilizar: metil b-D-xilosídeo, L-sorbose, metil a-D-manosídeo, metil a-D-glucosídeo, maltose, inulina, melezitose e D-turonose. Finalmente, os autores sugeriram o uso de D-manose, sorbitol e manitol para a diferenciação entre os gêneros *Ralstonia* e *Burkholderia*, sendo que a maior parte dos isolados do último, é capaz de crescer em meio contendo tais fontes de carbono.

A espécie padrão do gênero *B. cepacia* – que foi inicialmente descrita como fitopatogênica em aliáceas por Burkholder (1950) - sofreu um intenso estudo taxonômico nas últimas décadas, decorrente do fato que Vandamme et al. (1997) demonstrarem que os diversos isolados desta “espécie” possuíam pequeno grau de hibridização de DNA-DNA, muitas vezes abaixo de 30%, ou seja, o que foi inicialmente classificado como sendo uma única espécie, na realidade eram várias espécies filogeneticamente associadas com grande semelhança fenotípica.

A este grupo de espécies foi criada a expressão “complexo *Burkholderia cepacia*” (CBC), e a cada grupo distinto de isolados deste complexo foi empregado o termo genomovar (variante genômica). Atualmente, após vários estudos taxonômicos (COENYE; VANDAMME, 2003), são descritas nove espécies: *B. cepacia* (variante genômica I), *B. multivorans* (II), *B. cenocepacia* (III), *B. stabilis* (IV), *B. vietnamiensis* (V), *B. dolosa* (VI), *B. ambifaria* (VII), *B. anthina* (VIII), e *B. pyrrocinia* (IX). Estas espécies possuem moderados níveis de hibridização

DNA/DNA (30 a 50%) e alto nível de similaridade do 16S rDNA (98 a 99%) e do gene *recA* (94 a 95%) (RAMETTE; LiPUMA; TIEDJE, 2005).

Existem atualmente 8 projetos de sequenciamento genômico concluídos ou em andamento de espécies do CBC: *B. ambifaria* AMMD, *B. cenocepacia* AU 1054, *B. cenocepacia* HI2424, *B. cenocepacia* PC184, *B. cenocepacia* J2315, *B. dolosa* AUO158, *Burkholderia* sp. 383 e *B. vietnamiensis* G4 (NCBI, 2005). Desses, 5 projetos estão relacionados a isolados envolvidos com a Síndrome Cepacia que ocorre em portadores de Fibrose Cística (*B. cenocepacia* e *B. dolosa*), uma outra espécie relacionada a controle biológico de doenças de plantas (*B. ambifaria*), *B. vietnamiensis* com biorremediação e finalmente o projeto de *Burkholderia* sp. 383 com o estudo evolucionário do CBC.

Os diversos enfoques que os projetos de sequenciamento possuem, refletem a versatilidade biológica das espécies do CBC. Os microrganismos deste grupo podem crescer em mais de 200 compostos orgânicos diferentes, fixam nitrogênio e possuem resistência múltipla a antibióticos. Degradam uma grande quantidade de poluentes e promovem o controle biológico em raízes. Todavia, podem causar doenças em plantas, animais e humanos. As linhagens do CBC podem ser isoladas de diversos ambientes, incluindo solo, rizosfera, caules (como endófitos), além de tecidos doentes de plantas, animais e humanos, em especial de pacientes portadores de Fibrose Cística (COENYE; VANDAMME, 2003). Uma característica peculiar dos genomas do CBC está relacionada a presença incomum de dois a quatro replicons (cromossomos) de tamanho variável de 5 a 9 Mpb com grande quantidade de seqüências de inserções (LESSIE et al., 1996).

O CBC também possui a capacidade de se estabelecer intracelularmente em diversos eucariotos, como descrito em células humanas por Martin e Mohr (2000), Keig et al. (2002), em amebas como comensal (LAMOTHE, THYSEN; VALVANO, 2004; MAROLDA et al., 1999), e em fungos micorrízicos arbusculares (LEVY et al., 2003). Estes dados indicam, em última análise, que este grupo possui a capacidade de estabelecer processos endossimbióticos quase que indistintamente em diversos hospedeiros.

1.1.3 Endossimbiose

Os termos simbiose e endossimbiose têm sido conceituados de maneira diferente nos últimos anos. Alguns autores passaram a considerar que a simbiose abrangeria todo e qualquer relacionamento entre duas espécies, podendo ser esta de natureza mutualística, parasítica ou

neutra (MARGULIS; CHAPMAN, 1998; PARNISKE; 2000). Por sua vez, o termo endossimbiose é aplicado quando um dos organismos localiza-se intracelularmente em relação ao outro. Não obstante, este conceito foi ampliado para fungos micorrízicos arbusculares e fungos fitopatogênicos biotróficos por PARNISKE (2000), onde a condição intracelular seria apenas parcial, restrita aos arbúsculos e haustórios respectivamente.

Quanto a sua ocorrência, a endossimbiose está razoavelmente bem distribuída na natureza, ocorrendo desde bactérias e protozoários até mamíferos e plantas (CORSARO et al., 1999). Com relação a fungos, estas relações foram estudadas principalmente em Glomeromycota pelo grupo liderado por Paola Bonfante (BIANCIOOTTO et al., 2000). Em basidiomicetos, microrganismos semelhantes a micoplasmas também foram observados em *Coprinus*. Neste caso, foi verificado que bactérias presentes em ultrafiltrados de *C. congregatus* Cop I foram capazes de influenciar a meiose de alguns cruzamentos, causando a redução na produção de basidiósporos (ROSS; POMMERVILLE; DAMM, 1976). Outras observações puderam ser realizadas por Nurmiaho-Lassila et al. (1997) quando estudaram as interações entre bactérias e o fungo *Suillus bovinus* em *Pinus sylvestris*.

Não obstante, Bertaux et al. (2003) relataram a ocorrência de *Paenibacillus* spp. de forma críptica e intracelular em *Laccaria bicolor* S238N em culturas *in vitro*. Os autores observaram ainda a formação de interações endossimbiótica no campo e em viveiros de diversos grupos bacterianos diferentes e esta espécie (BERTAUX et al., 2005).

Yara et al. (1999) observaram endobactérias pleomórficas no fungo *P. ostreatus*, quando o hospedeiro foi crescido em bagaço de cana-de-açúcar esterilizado. Porém, em meios de cultivo de fungos convencionais nenhum indício macroscópico de crescimento bacteriano foi encontrado.

1.1.3.1 O processo evolutivo de um endossimbionte

Considerando o processo de endossimbiose, como um todo, observa-se uma grande variedade de organismos e tipos de interações, como por exemplo, as bactérias que interagem intracelularmente de forma transitória (intracelular facultativo), como Rizobiáceas em leguminosas e *Legionella pneumophila* em humanos, ou aqueles que são endossimbiontes obrigatórios (*Buchnera* em pulgões e *Rickettsia rickettsii* em humanos).

Poder-se-ia citar três eventos evolutivos distintos durante o estabelecimento deste processo em bactérias (DOOLITTLE, 1998, MARTIN, 2003; HACKER; KAPER, 2000;

OCHMAN; MORAN, 2001; WOOLFIT; BROMHAM, 2003; SELOSSE; ALBERT; GODELLE; 2001):

- Aquisição de ilhas de patogenicidade ou simbiose;
- Ação evolucionária da Catraca de Müller e redução do genoma;
- Transferência de genes para o núcleo do hospedeiro.

Ainda que existam trabalhos demonstrando a transferência de genes da bactéria *Wolbachia* para seu hospedeiro (KONDO et al., 2002), o último item citado, está basicamente ligado ao processo evolutivo de endossimbiontes que se transformaram em organelas (hidrogenossomos, mitocôndrias e cloroplastos) o que não será abordado nesta revisão (DOOLITTLE, 1998, MARTIN, 2003; SELOSSE; ALBERT; GODELLE; 2001).

A capacidade de estabelecimento depende de processos como adesão, ingresso, sobrevivência e multiplicação do endossimbionte no hospedeiro (DRAMSI; COSSART, 1998), contudo, as células eucarióticas apresentam uma série de defesas, como por exemplo, a presença de vacúolos líticos (lisossomos) que dificultam tal processo (SINAI; JOINER, 1997). O estabelecimento do endossimbionte é assegurado por meio de genes que promovem cada uma das etapas citadas e que também evitam a destruição da célula bacteriana pelo sistema de defesa celular (GOEBEL; KUHN, 2000; SINAI; JOINER, 1997). Muitas vezes estes genes estão localizados nas chamadas ilhas de patogenicidade (ou de simbiose) que se caracterizam por: possuir genes responsáveis por patogenicidade ou mutualismo; normalmente possuir teor de G+C diferente do resto do genoma, e serem adquiridos por transferência horizontal via fago ou plasmídios (HACKER; KAPER, 2000; OCHMAN; MORAN, 2001). Uma vez adquirida uma ilha de patogenicidade, esta pode sofrer um processo evolutivo de adaptação ao genoma da bactéria que é caracterizado por inativação e perdas progressivas de genes de mobilidade e também da adaptação do uso de codons da bactéria; este processo termina por descaracterizar a ilha de patogenicidade ou simbiose (HACKER; KAPER, 2000).

Uma vez adquiridos e adaptados os genes responsáveis pelo ingresso intracelular, a bactéria poderá estar sujeita a um processo de degeneração do seu genoma; este processo é razoavelmente conhecido em bactérias endossimbiontes obrigatórias. Como exemplos de bactérias patogênicas estão as *Rickettsia*, *Chlamydia* e *Anaplasma*, e, em relação as mutualísticas, a *Buchnera* endossimbionte de pulgões (FRANK; AMIRI; ANDERSSON, 2002). A degeneração do genoma, levando a um menor valor adaptativo pode ser explicada pelo modelo da catraca de

Müller. Este modelo pressupõe a existência de uma população haplóide de propagação assexuada, que é submetida a constantes derivas genéticas. Neste caso, as mutações que surgem espontaneamente e que são normalmente deletérias, são fixadas pela deriva genética ao invés de serem eliminadas pela seleção (WOOLFIT; BROMHAM, 2003). Além da catraca de Müller, os endossimbiontes obrigatórios também apresentam a diminuição dos seus genomas e a falta de inovações (Figura 1.1) como descrito por Lawrence; Hendrix e Casjens (2001); Silva; Latorre e Moya (2003); Frank; Amiri e Andersson (2002).

Figura 1.1 - Representação do esquema evolutivo de endossimbiontes (FRANK; AMIRI; ANDERSSON, 2002)

A partir da tecnologia de sequenciamento, foi possível analisar genomas de endossimbiontes obrigatórios, tanto de patogênicos como de mutualistas. Tais estudos constataram algumas características em comum, como por exemplo, a manutenção de genes de patogenicidade ou simbiose. No caso do *Buchnera* (simbionte), se constatou a presença de dois plasmídios que possuíam mais de uma cópia para a produção de aminoácidos essenciais para o hospedeiro (SHIGENOBU et al., 2000).

Outra característica foi a grande quantidade de pseudogenes encontrados, o que sugere muitas rotas metabólicas interrompidas, o que levaria a auxotrofia de diferentes compostos que passariam a ser supridos pelos hospedeiros. Tanto em *Anaplasma marginale* (BRAYTON et al.,

2005) como *Buchnera* sp. (SHIGENOBU et al., 2000) foi constatada a interrupção ou ausência de genes responsáveis pela biossíntese da parede celular, uma característica comum em várias bactérias que possuem íntima associação com células eucarióticas, como mollicutes (RAZIN, 2000) e simbionte primário em cochonilha de citros (DOHLEN et al., 2001).

Neste sentido, a aparente falta de parede celular e a dificuldade de crescimento em meio de cultura são traços em comum entre endobactérias que se encontram em processo evolutivo avançado na direção de uma endossimbiose obrigatória (e.g. *Mycobacterium* e mollicutes) e as bactérias observadas por Yara et al. (1999).

1.1.4 O ciclo completo de análise do rRNA

Com o advento das técnicas moleculares envolvendo clonagem, PCR, análise bioinformática e hibridização *in situ*, surgiu a possibilidade do estudo da diversidade de microrganismos não cultiváveis ou de difícil cultivo, que devido a sua natureza são tradicionalmente pouco pesquisados. Amann; Ludwig e Schleifer (1995) propõem uma sistematização no emprego das técnicas moleculares para o estudo destes microrganismos, denominando este procedimento como ciclo completo de análise do rRNA (full-cycle rRNA analysis).

Esta análise (Figura 1.2) se inicia pela extração de DNA ou RNA da amostra que contém o microrganismo de interesse. Em seguida, por meio de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) precedida ou não de uma reação da transcriptase reversa (RT), são amplificados os genes ribossomais ou seus transcritos. Os fragmentos de DNA obtidos são clonados, analisados e agrupados em haplótipos. Representantes de cada haplótipo são seqüenciados e avaliados por meio da bioinformática. A partir desta análise são selecionadas e/ou projetadas sondas específicas para as bactérias alvo. Como última etapa deste processo, novas amostras ambientais são coletadas e as sondas ensaiadas *in situ*. Com esta etapa é encerrado o círculo de análise. Assim, caso as sondas específicas localizem estruturas bacterianas, a seqüência obtida na primeira etapa é ratificada e confirma-se então a existência de uma bactéria que não poderia ser caracterizada por técnicas convencionais.

A importância deste roteiro de trabalho consiste na maior qualidade das informações obtidas pela combinação das técnicas. Neste sentido, a bioinformática também se desenvolveu, e programas de análise de seqüências como ARB (ARB, 2005) e sítios (sites) da rede de

computadores (web), como “Ribosomal Database Project-II Release 9” (RDP II, 2006) e probeBase (PROBEBASE, 2005), foram desenvolvidos facilitando o estudo de seqüências e dando acesso a base de dados específicas de genes ribossomais confiáveis.

Figura 1.2 – Representação esquemática do Ciclo completo de análise do rRNA, “full cycle rRNA analysis”

A técnica de hibridização *in situ* está baseada na formação duplex de um fragmento de ácido nucléico de fita simples modificado (sonda) e sua seqüência complementar (seqüência alvo) em um espécime biológico fixado. Aguiar-Perecin (2000) ressalta que em plantas, as técnicas de hibridização *in situ* permitiram a localização de seqüências de DNA diretamente em cromossomos mitóticos ou meióticos em preparações citológicas, sendo que a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) viabilizou a detecção simultânea de diversos sítios de hibridização DNA-DNA por diferentes sondas associadas a diferentes corantes fluorescentes, permitindo a

determinação da ordem física das várias seqüências de DNA em um cromossomo. Este fenômeno pode ser observado em microscópio de epifluorescência ou em microscopia confocal de varredura a laser (MCVL).

Como pode ser observado na Figura 1.3, a técnica de FISH em procariotos visa basicamente as moléculas do RNA ribossômico (rRNA), o que é diferente do que normalmente é empregado em estudos de células eucarióticas, onde as moléculas de DNA são geralmente as seqüências alvo. Esta característica faz com que os sítios que a sonda possa reconhecer em procariotos sejam da ordem de 10^3 a 10^5 em lugar de apenas 1 a 10 operons de rDNA encontrados em cada célula bacteriana (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995).

Figura 1.3 – Comparação esquemática entre o FISH normalmente empregado em eucariotos em relação àquele utilizado em procariotos. Nos eucariotos (esquema a esquerda) o enfoque maior é o DNA. Neste esquema, rDNA dos cromossomos está em vermelho. Em procariotos (esquema a direita) os alvos normalmente são os rRNA dos ribossomos, neste caso representados em amarelo

O emprego do MCVL facilita a observação de bactérias submetidas a FISH. A figura 1.4 representa esquematicamente o funcionamento de um MCVL. A principal característica observável neste aparelho é a presença de um diafragma (pinhole) na captação da luz emitida pela amostra. Este é responsável pelo efeito confocal, ou seja, por meio deste dispositivo a luz emitida de outros planos focais não é captada pelo equipamento (SCHMID et al., 2004). Como se observa (Figura 1.4), as luzes emitidas dos diferentes planos focais, que estão representadas pelas linhas amarelas e pretas, são bloqueadas pelo diafragma, o que não ocorre com luz emitida do plano de interesse representado pela linha azul. Assim, uma vantagem do MCVL consiste na pequena

profundidade do campo observado ($0,5\mu\text{m}$ a $15\mu\text{m}$). Deste modo, os cortes ópticos apresentam-se bem mais definidos em relação à microscopia de epifluorescência. As imagens fluorescentes desfocadas são eliminadas resultando em maior contraste, clareza na detecção da imagem.

Figura 1.4 – Esquema geral do princípio do funcionamento de um microscópio confocal de varredura a laser (adaptado de Confocal Microscopy BMS 524 course 1997, 2006)

Na Figura 1.5 observa-se como o efeito do diafragma age sobre a definição da imagem. A imagem de um tecido obtida por microscopia de epifluorescência está representada na Figura 1.5A, a mesma amostra, desta vez obtida utilizando MCVL, com o diafragma convenientemente fechado (Figura 1.5B). Na imagem seguinte (Figura 1.5C), observa-se o mesmo campo com o diafragma do MCVL totalmente aberto.

Figura 1.5 – Comparação entre qualidades de imagens geradas por microscópio de epifluorescência e MCVL: A) Imagem de microscópio de epifluorescência; B) Imagem de MCVL operando com diafragma regulado; C) MCVL operando com diafragma totalmente aberto. (adaptado de Nikon's MicroscopyU, 2006)

Outra característica do MCVL está no uso de lasers que possibilitam a varredura e digitalização da imagem, possibilitando assim o seccionamento óptico da amostra, e conseqüentemente eliminando os artefatos oriundos dos seccionamentos físicos observados na microscopia de luz e eletrônica, outra vantagem do seccionamento óptico é que pode ser realizado nos três eixos (x, y e z), o que permite observar uma célula em profundidade ou lateralidade, além da possibilidade de reconstrução virtual da imagem em três dimensões (SCHMID et al., 2004).

1.1.4.1 Aplicações do ciclo completo de estudo do rRNA

As técnicas ordenadas pelo ciclo completo de estudo do rRNA podem ser empregadas nos mais diversos modelos como, biorreatores (STOFFELS et al., 1998), solo (ASSMUS et al., 1995), biofilmes (NEEF et al., 1996), ambientes aquáticos marinhos (PERNTHALER; PERNTHALER; AMANN, 2002) e de água doce (BÖCKELMANN et al., 2002), entretanto, a eficiência das mesmas está relacionada em parte com a complexidade da amostra utilizada. Em sistema extremamente diversificado como solo, a análise se torna mais complexa, deste modo, em sistemas biológicos mais simples, a técnica revelou-se extremamente eficaz na elucidação de questões referentes à biologia destes microrganismos (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995).

Pela sua natureza, o processo de endossimbiose é relativamente menos complexo quando comparado ao solo ou biorreatores (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995). Neste sentido, endossimbiontes em diversos organismos foram estudados com sucesso usando esta estratégia, como por exemplo, bactérias celulolíticas em bivalves (DISTEL; DeLONG; WATERBURY, 1991), arqueas metanogênicas em protozoários (EMBLEY et al., 1992),

bactérias portadoras de fator “killer” em *Paramecium* spp. (BEIER et al., 2002), bactérias em cochonilha de citrus (DOHLEN et al., 2001) e *Paenibacillus* spp. fungos ectomicorrízicos (BERTAUX et al., 2003). Portanto, o emprego desta abordagem em culturas *in vitro* de *P. ostreatus* para o estudo de endosimbiontes descritos por Yara et al. (1999) poderia ser uma abordagem viável, no estudo deste microrganismo.

Referências

- AGUIAR-PERECIN, M. L. R. de. Análise da organização do genoma de plantas através do mapeamento físico de sequenciamento repetitivo de DNA por hibridação *in situ* fluorescente (FISH). In: ENCONTRO SOBRE TEMAS DE GENÉTICA E MELHORAMENTO, 17., 2000, Piracicaba. **Anais...** São Paulo: ESALQ/USP, 2000 p 1-10.
- AMANN, R.L.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, p. 143–169, 1995.
- ARB - THE ARB PROJECT. Disponível em: <<http://www.arb-home.de/>>. Acesso em: 15 mar. 2006.
- ASSMUS, B.; HUTZLER, P.; KIRCHHOF, G.; AMANN, R.; LAWRENCE, J.R.; HARTMANN, A. *In situ* localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, ribosomal-rna-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1013-1019, 1995.
- BAO, D.; ISHIHARA, H.; MORI, N.; KITAMOTO, Y. Phylogenetic analysis of oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) based on restriction fragment length polymorphisms of the 5' portion of 26S rDNA. **Journal of Wood Science**, Tokyo, v. 50, p. 169–176, 2004.
- BEIER, C.L.; HORN, M.; MICHEL, R.; SCHWEIKERT, M.; GORTZ, H.D.; WAGNER, M. The genus *Caedibacter* comprises endosymbionts of *Paramecium* spp. related to the Rickettsiales (Alphaproteobacteria) and to *Francisella tularensis* (Gammaproteobacteria). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 6043-6050, 2002.
- BERTAUX, J.; SCHMID, M.; HUTZLER, P.; HARTMANN, A.; GARBAYE, J.; FREY-KLETT, P. Occurrence and distribution of endobacteria in the plant-associated mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. **Environmental Microbiology**, Oxford, v.7, p. 1786-1795, 2005.
- BERTAUX, J.; SCHMID, M.; PREVOST-BOURE, N.C.; CHURIN, J.L.; HARTMANN, A.; GARBAYE, J.; FREY-KLETT, P. *In situ* identification of intracellular bacteria related to *Paenibacillus* spp. in the mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69 p. 4243–4248, 2003.

BIANCIOOTTO, V.; LUMINI, E.; LANFRANCO, L.; MINERDI, D.; BONFANTE, P.; PEROTTO, S. Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the family Gigasporaceae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, p. 4503–4509, 2000.

BOBEK, P.; OZDIN, L. The mushroom *Pleurotus ostreatus* accelerates plasma very-low-density lipoprotein clearance in hypercholesterolemic rat. **Physiological Research**, Praha v. 43, p. 205–206, 1994.

BÖCKELMANN, U.; MANZ, W.; NEU, T.R.; SZEWZYK, U. Investigation of lotic microbial aggregates by a combined technique of fluorescent in situ hybridization and lectin-binding-analysis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 49, p. 75-87, 2002.

BRAYTON, K.A.; KAPPMMEYER, L.S.; HERDON, D.R.; DARK, M.J.; TIBBALS, D.L.; PALMER, G.H.; McGUIRE, T.C.; KNOWLES Jr., D.P. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 102, p. 844-849, 2005.

BURKHOLDER, W.H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, St. Paul, v. 40, p. 115–117, 1950.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia*. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 719-729, 2003.

CONFOCAL MICROSCOPY BMS 524 COURSE 1997. Disponível em: <www.cyto.purdue.edu/class/bms524/524lect4.ppt>. Acesso em: 12 abr. 2006.

CORSARO, D.; VENDITTI, D.; PADULA, M.; VALASSINA, M. Intracellular life. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 25, p.39-79, 1999.

DISTEL, D.L.; DeLONG, E.F.; WATERBURY, J.B. Phylogenetic characterization and *in situ* localization of the bacterial symbiont of shipworms (Teredinidae: Bivalvia) by using 16S rRNA sequence analysis and oligodeoxynucleotide probe hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 2376– 2382, 1991.

DOHLEN, C.D. Von; KOHLER, S.; ALSOP, S.T.; McMANUS, W.R. Mealybug beta-proteobacterial endosymbionts contain gamma-proteobacterial symbionts. **Nature**, London, v. 412, p. 433-436, 2001.

DOOLITTLE, W.F. You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. **Trends in Genetics: TIG**, Amsterdam, v. 14, p. 307-311, 1998.

- DRAMSI, S.; COSSART, P. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v.14, p.137-166, 1998.
- EMBLEY, T.M.; FINLAY, B.J.; THOMAS, R.H.; DYAL, P.L. The use of rRNA sequences and fluorescent probes to investigate the phylogenetic positions of the anaerobic ciliate *Metopus palaeformis* and its archaeobacterial endosymbiont. **Journal of General Microbiology**, Reading, v.138, p.1479–1487, 1992.
- FRANK, A.C.; AMIRI, H.; ANDERSSON, S.G.E. Genome deterioration: loss of repeated sequences and accumulation of junk DNA. **Genetica**, s'-Gravenhage, v.115, p. 1-12, 2002.
- GOEBEL, W.; KUHN, M. Bacterial replication in the host cell cytosol. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 3, p. 49-53, 2000.
- HACKER, J.; KAPER, J.B. Pathogenicity island and the evolution of microbes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 54, p. 641-679, 2000.
- KEIG, P.M.; INGHAM, E.; VANDAMME, P.A.R.; KERR, K.G. Differential invasion of respiratory epithelial cells by members of the *Burkholderia cepacia* complex **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 8, p.47–49, 2002.
- KONDO, N.; NIKOH, N.; IJICHI, N.; SHIMADA, M.; FUKATSU, T. Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 99, p. 14280-14285, 2002.
- LAMOTHE, J.; THYSSEN, S.; VALVANO, M.A. *Burkholderia cepacia* complex isolates survive intracellularly without replication within acidic vacuoles of *Acanthamoeba polyphaga* **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 6, p.1127–1138, 2004.
- LARRAYA, L.M.; PÉREZ, G.; RITTER, E.; PISABARRO, A.G.; RAMÍREZ L. Genetic linkage map of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p.5290–5300, 2000.
- LAWRENCE, J.G.; HENDRIX, R.W.; CASJENS, S. Where are the pseudogenes in bacterial genomes? **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 9, p. 535-540, 2001.
- LESSIE, T.G.; HENDRICKSON, W.; MANNING, B.D.; DEVEREUX, R. Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 144, p. 117–128, 1996.
- LEVY, A.; CHANG, B.J.; ABBOTT, L.K.; KUO, J.; HARNETT, G.; INGLIS, T.J.J. Invasion of spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora decipiens* by *Burkholderia* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 6250–6256, 2003.
- MARGULIS, L.; CHAPMAN, M.J. Endosymbioses: Cyclical and permanent in evolution. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 6, p. 342-345, 1998.

- MAROLDA, C.L.; HAURÖDER, B.; JONH, M.A.; MICHEL, R.; VALVANO, M.A. Intracellular survival and saprophytic growth of isolates from the *Burkholderia cepacia* complex in free-living amoebae. **Microbiology**, Reading, v.145, p.1509-1517, 1999.
- MARTENS, R.; WOLTER, M.; BAHADIR, M.; ZADRAZIL, F. Mineralization of ¹⁴C-labelled highly-condensed polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by *Pleurotus* sp. Florida. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 1893-1899, 1999.
- MARTIN D.W.; MOHR C.D. Invasion and intracellular survival of *Burkholderia cepacia*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, p.24-29, 2000.
- MARTIN, W. Gene transfer from organelles to the nucleus: Frequent and in big chunks. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 100, p. 8612- 8614, 2003.
- MARTÍNEZ, Á.T; SPERANZA, M.; RUIZ-DUEÑAS, F.J.; FERREIRA, P.; CAMARERO, S.; GUILLÉN, F.; MARTÍNEZ, M.J.; GUTIÉRREZ, A.; DEL RÍO, J.C. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. **International Microbiology**, Barcelona, v. 8, p. 195-204, 2005.
- NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 14 dez. 2005
- NEEF, A.; ZAGLAUER, A.; MEIER, H.; AMANN, R.; LEMMER, H.; SCHLEIFER K.H. Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and *in situ* identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p.4329-4339, 1996.
- NIKON'S MICROSCOPYU. Disponível em: <<http://www.microscopyu.com/tutorials/java/virtual/confocal/index.html>>. Acesso em: 16 mar. 2006.
- NURMIAHO-LASSILA, E.L.; TIMONEM, S. HAAHTELA, K.; SEM, R. Bacterial colonization patterns of intact *Pinus sylvestris* mycorrhizospheres in dry pine forest soil: an electron microscopy study. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.43, p.1017-1035, 1997.
- OCHMAN, H.; MORAN, N.A. Genes lost and genes found: Evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. **Science**, Washington, v. 292, p. 1096-1098, 2001.
- PALLERONI, N.J. Gram-negative aerobic rods and cocci. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins. 1984, 1v, Section 4, p.140-407.
- PARNISKE, M. Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease? **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, p. 320-328, 2000.

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

PROBEBASE. Disponível em: <<http://www.microbial-ecology.net/probebase/default.asp?mode=probeset>>. Acesso em: 5 dez. 2005.

RAJARANTNAM, S.; BANO, Z. *Pleurotus* mushrooms. Part III Biotransformations of natural lignocellulosic wastes: Commercial applications and implications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.28, p. 31-113, 1989.

RAMETTE, A.; LIPUMA, J.J.; TIEDJE, J.M. Species Abundance and Diversity of *Burkholderia cepacia* Complex in the Environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 1193-1201, 2005.

RAZIN, S. The Genus Mycoplasma and Related Genera (Class Mollicutes). In: DWORKIN, M. (Ed.). **The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community**, Release 3.3 9/8/2000. Disponível em: <<http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaphtm/272/COMPLETE.htm>>. Acesso em: 29 dez. 2005.

RDP II- Ribosomal Database Project-II Release 9. Disponível em: <<http://rdp.cme.msu.edu/>>. Acesso em: 15 mar. 2006.

ROSS, I.K.; POMMERVILLE, J.C.; DAMM, D.L. A highly infectious “mycoplasma” that inhibits meiosis in the fungus *Coprinus*. **Journal of Cell Science**, London, v. 21, p.175-191, 1976.

SCHMID, M.; ROTHBALLER, M.; ABMUS, B.; HUTZLER, P.; SCHLOTTER, M.; HARTMANN, A. Detection of microbes by confocal laser scanning microscopy. In: KOWALCHUK, G.; DE BRUIJN, F.J.; HEAD, I.M.; AKKERMANS, A.D.L.; VAN ELSAS, J.D. (Ed.). **Molecular Microbial Ecology Manual**, 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. chap. 4.03, p. 875-910.

SELOSSE, M.A.; ALBERT, B.; GODELLE, B. Reducing the genome size of organelles favours gene transfer to the nucleus. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v.16, p. 135-141, 2001.

SHIGENOBU, S.; WATANABE, H.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y.; ISHIKAWA, H. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. **Nature**, London, v. 407, p 81-86, 2000.

SILVA, F.J.; LATORRE, A.; MOYA, A. Why are the genomes of endosymbiotic bacteria so stable? **Trends in Genetics : TIG**, Amsterdam, v. 19, p. 176-180, 2003.

SINAI, A.P.; JOINER, K.A. Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 51, p. 415-462, 1997.

- STOFFELS, M.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; HEKMAT, D.; SCHLEIFER, K.H. Bacterial community dynamics during start-up of a trickle-bed bioreactor degrading aromatic compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 930-939, 1998.
- VANDAMME, P.; HOLMES, B.; VANCANNEYT, M.; COENYE, T.; HOSTE, B.; COOPMAN, R.; REVETS, H.; LAUWERS, S.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; GOVAN, J.R.W. Occurrence of multiple Genomovars of *Burkholderia cepacia* in Cystic Fibrosis Patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 47, p.1188-1200, 1997.
- VIALARD, V.; POIRIER, I.; COURNOYER, B.; HAURAT, J.; WIEBKIN, S.; OPHEL-KELLER, K. *Burkholderia graminis* sp. nov., a rhizospheric *Burkholderia* species, and reassessment of [*Pseudomonas*] *phenazinum*, [*Pseudomonas*] *pyrrocinia* and [*Pseudomonas*] *glathei* as *Burkholderia*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 48, p. 549-563, 1998.
- VILGALYS, R.; SUN, B.L. Ancient and recent patterns of geographic speciation in the oyster mushroom *Pleurotus* revealed by phylogenetic analysis of ribosomal DNA sequences **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.91, p. 4599-4603, 1994.
- WANG, H.; GAO, J.; NG, T.B. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 275, p.810-816, 2000.
- WOOLFIT, M.; BROMHAM, L. Increased rates of sequence evolution in endosymbiotic bacteria and fungi with small effective population sizes. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 20, p. 1545-1555, 2003.
- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIKU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 36, p.1251-1275, 1992.
- YARA, R.; AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W. Jr.; KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. Mycoplasma associated with cultures of the ligno-cellulolytic fungus *Pleurotus* sp. **Acta Microscópica**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 851-852, 1999.

**2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS
ATÍPICAS PERTENCENTES AO COMPLEXO *Burkholderia cepacia*
ASSOCIADA A *Pleurotus ostreatus***

Resumo

Pleurotus ostreatus, é um cogumelo cultivado no mundo todo, pertence ao grupo de fungos que causam podridão branca da madeira. Devido a sua versatilidade enzimática, o *P.ostreatus* tem despertado interesse quanto aos aspectos biotecnológicos em biopolpação e biorremediação. Neste sentido, a sua interação com demais microrganismos pode ser um importante fator nestes processos. Este trabalho descreve a presença de uma bactéria associada a *P. ostreatus*. Esta espécie apresentou crescimento lento (por volta de 30 dias) em meio líquido e semi-sólido. Quando *P. ostreatus* foi inoculado em meio contendo Tween 80 ou Tween 20, microcolônias bacterianas foram detectadas junto a borda da colônia do fungo e posteriormente identificadas por análise de seqüenciamento parcial do 16rDNA. A bactéria pertence ao complexo *Burkholderia cepacia*, porém não apresenta proximidade com outras Burkholderiaceae associadas a fungos. Iniciadores de PCR foram projetados para a detecção da bactéria em culturas puras de *Pleurotus*. Este constitui o primeiro relato de bactéria pertencente ao complexo *B. cepacia* associado a *P. ostreatus*.

Palavras chaves: cogumelo, *Pleurotus ostreatus*, bactéria associada, interação fungo-bactéria, complexo *Burkholderia cepacia*, sequenciamento 16S rDNA.

Abstract

Pleurotus ostreatus is a widely cultivated white-rot fungus. Due to its great enzymatic versatility *P. ostreatus* has received increasing attention for its use in biobleaching and bioremediation. Interactions between microorganisms can be an important factor in those processes. This research describes the presence of a bacteria associated with *P. ostreatus* strain G2. These bacteria presented slowly growth (around 30 days), in the liquid and semi-solid media tested. When *P. ostreatus* was inoculated in solid media amended with Tween 80 or Tween 20 bacterial microcolonies were detected close to the fungal colonies and identified by analysis of a partial sequence of 16S rDNA; it was identified as belonging to the *Burkholderia cepacia* complex but was not closely related to other Burkholderiaceae isolated from fungi. New specific primers were designed and confirmed the presence of bacteria in pure cultures of *Pleurotus*. This is the first time that bacteria from *B. cepacia* complex is found associated with *P. ostreatus*.

Key words: mushrooms, *Pleurotus ostreatus*, associated bacteria, bacterial fungi interactions, *Burkholderia cepacia* complex, 16S rDNA sequence.

2.1 Introdução

Pleurotus ostreatus, fungo causador de podridão branca da madeira, é cultivado em vários países como cogumelo comestível e proporciona uma fonte barata de proteína (RANZANI; STURION, 1998). Fungos de podridão branca degradam a lignina de maneira rápida e eficaz quando comparados a outros organismos. Esse fato está relacionado as enzimas lignolíticas produzidas por esses fungos. Estas características, presentes também em *P. ostreatus*, habilitam o uso deste fungo em vários processos industriais, como biopolpação, branqueamento de fibras (HA et al., 2001) e processos de biorremediação (EICHLEROVÁ et al., 2000).

Com relação a interação fungos de podridão branca da madeira e bactérias, *Burkholderia fungorum* e outros membros de diferentes subdivisões de Proteobacteria, foram encontradas em associações com o fungo *Phanerochaete chrysosporium* (SEIGLE-MURANDI et al., 1996; COENYE et al., 2001c). Em *Ph. sordida* também foi isolada uma bactéria associada, denominada *B. sordidicola* (LIM et al., 2003).

Estudos que levem ao melhor entendimento da interação do *P. ostreatus* e outros microrganismos poderiam melhorar a sua performance em processos biotecnológicos. Neste aspecto, Yara et al. (1999) estudando a linhagem G2 de *P. ostreatus* sugerem a presença de bactérias intracelulares nos vacúolos.

O presente estudo teve como objetivo: a) demonstrar a existência desta bactéria associada à linhagem de *P. ostreatus*, empregando técnicas de microbiologia básica e de biologia molecular com ênfase no estudo de seqüências ribossomais e b) a partir das seqüências ribossomais analisar quais as espécies que apresentaram maior similaridade com a mesma.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Revisão Bibliográfica

A interação entre fungos e bactérias pode influenciar diversos processos biológicos e biotecnológicos. Por exemplo, a produção de antifúngicos e de enzimas quitinolíticas por bactérias como *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens* (HANDELSMAN; STABB, 1996), complexo *Burkholderia ambifaria* (COENYE et al., 2001b) e *Collimonas fungivorans* (BOER et al., 2004) habilitam-nas como agentes de controle biológico de fitopatógenos, em ambientes como a rizosfera.

Fungos micorrízicos também interagem com bactérias como descrito por Jargeat et al. (2004), Levy et al. (2003), Bertaux et al. (2003) e Bertaux et al. (2005). Destas investigações apenas o grupo liderado pela Dra. Paola Bonfante publicou trabalhos referentes a possíveis influências que tais bactérias exercem sobre os fungos e as plantas com as quais interagem (JARGEAT et al., 2004).

Champignon de Paris (*Agaricus bisporus*), cogumelo decompositor secundário de palha, sofre influência de diversos grupos bacterianos, sob vários aspectos, que vão desde a participação de actinomicetos termófilos na seletividade dos substratos de cultivo (GERRITS, 1988), passando pela indução do processo de frutificação, exercido pela ação de *P. putida* (VISSCHER, 1988) na camada de cobertura, e até por aspectos negativos como doenças bacterianas causadas por *P. tolaasii* (GEISS; GEIJN; RUTJENS, 1988). O cogumelo pode ainda ser beneficiado por agentes de controle biológico de doenças bacterianas, como por exemplo, o efeito supressivo de *Pseudomonas* spp. (NAIR; FAHY, 1976) e *Mycetocola tolaasinivorans* (TSUKAMOTO; MURATA; SHIRATA, 2002) sobre *P. tolaasii*.

Quando comparados aos demais grupos mencionados, o estudo das interações fungos causadores da podridão branca em madeira e bactérias, são menos extensos. Em relação a tal grupo, constatou-se a presença de bactérias crípticas em culturas *in vitro* de *Phanerochaete chrysosporium* e *Ph. sordida*, que posteriormente levaram a descrição de *Burkholdeia fungorum* (SEIGLE-MURANDI et al., 1996; COENYE et al., 2001c), e *B. sordidicola* (LIM et al., 2003).

Em relação a ocorrência de bactérias endossimbiontes, esta foi devidamente demonstrada em *Gigaspora margarita* por Bianciotto e Bonfante (2002) e Bianciotto et al. (2003), que constata a presença de genes envolvidos na absorção de nutrientes nestas bactérias (e.g. operon putativo *pst*, e o operon putativo *nif*). Em recente estudo Jargeat et al. (2004) confirmou a presença dos genes *pst*, *vacB* e o 16S, mas o operon *nif* não foi localizado.

Bertaux et al. (2003) demonstrou a presença de *Paenibacillus* spp. colonizando intracelularmente hifas de *Laccaria bicolor* S238N (basidiomicota ectomicorrízico). Entretanto, a função deste endossimbionte permanece desconhecida. Em recente trabalho do mesmo grupo, (BERTAUX et al., 2005) constatou-se a capacidade de *Laccaria bicolor* S238N em estabelecer interações com diversas endobactérias em viveiro e no campo. Os autores sugerem ainda que esta interação poderia ser freqüente e transitória.

Yara et al. (1999) sugerem, pela observação de micrografias de *P. ostreatus*, a presença de bactérias intracelulares. Não obstante, estudos que levem ao melhor entendimento da interação desta bactéria com *P. ostreatus*, poderiam esclarecer algumas das interações ecológicas deste cogumelo e melhorar a sua performance em processos biotecnológicos.

2.2.2 Material e Métodos

2.2.2.1 Linhagem de *Pleurotus ostreatus*

A linhagem utilizada neste estudo foi obtida por meio da remoção asséptica de tecidos de carpóforos de *P. ostreatus* obtidos em regiões de produtores em Mogi das Cruzes/São Paulo (23°31' de latitude sul, 26°11' longitude oeste), pela técnica descrita por Stamets e Chilton (1983). A linhagem foi identificada pela seqüenciamento da região ITS e foi denominada *P. ostreatus* G2.

2.2.2.2 Isolamento de bactérias

2.2.2.2.1 Por trituração

Culturas bacterianas foram obtidas por trituração asséptica em meio de cultivo líquido (como descritos abaixo) utilizando cadinho e pistilo de porcelana esterilizados. A fração líquida foi então filtrada através de filtros Millipore de 800µm e 450µm e incubados a 28°C com agitação (150rpm).

Os meios de culturas utilizadas foram: LB (Luria e Bertani), TSB (Tryptic Soy Broth), NB (Nutrient Broth), TST (TSB adicionado de 0,1% de Tween 80), BHIT (7,4% infusão de cérebro coração de bezerro adicionado de 0,1% de Tween 80), PWM [PW modificado por Araujo et al., (2001)] e meio descrito por Sierra (1957) modificado (1% peptona, 0,5% NaCl e 1,0% Tween 20). Após 30 dias as amostras foram transferidas para meio líquido, meio semi-sólido (acrescido de 0,1% de ágar) ou meio sólido (1,5% de ágar) e incubado por 30 dias como descrito acima. Em procedimento alternativo, amostras foram trituradas, filtradas e diretamente inoculadas em meio semi-sólido.

2.2.2.2.2 Por sistema de co-cultivo

Para esse isolamento aplicou-se um sistema alternativo que consistiu no cultivo de *P. ostreatus* em meios sólido de TST, BHIT e Sierra modificado. O desenvolvimento de pequenas

colônias ao redor da colônia do fungo foi avaliado e confirmado com reação de PCR aninhado, para o gene 16S rDNA.

2.2.2.3 Genética molecular

2.2.2.3.1 Extração de DNA

A extração de DNA de hifas e das bordas de colônias de fungos foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Raeder e Broda (1985). Em relação a culturas bacterianas, estas foram centrifugadas a 14.000g por 20min e submetidas ao protocolo descrito por Araujo et al. (2001).

2.2.2.3.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

A amplificação do fragmento de 843pb do gene 16SrDNA foi realizada segundo os seguintes parâmetros: o total do volume de amplificação foi de 50µL contendo os iniciadores SMY-F511 (5'-CTA TGT GCC AGC AGC CGC GGT A-3') e SMY-R1382 (5'-GGC GGT GTG TAC AAG ACC CGA G-3') na concentração de 0,5 mM cada, Taq DNA polimerase 1,5 U (Invitrogen) 0,2 mM de cada dNTP, 10x tampão (Invitrogen), 2,0 mM MgCl₂ e 1 µL de DNA molde. As condições de PCR foram as seguintes: Desnaturação inicial a 94°C por 3 min, seguidos de 40 ciclos de 20s a 94°C, 40s a 50°C para anelamento de iniciadores, 60s a 72°C para alongamento, e enlongamento final por 5min a 72°C. A amplificação foi realizada em termocicladores Gene Amp - PCR System 9700 (Perkin-Elmer).

Os produtos de PCR foram analisados em gel de 1,2% de agarose e corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador de ultravioleta (U.V.). Os produtos de PCR foram purificados com Sephaglas Band Prep Kit (Pharmacia Biotech, USA) e clonados com pGEM-T KIT (PROMEGA). Os plasmídios foram enviados a GENOMIC Ltda. (São Paulo, Brasil) onde foram seqüenciados.

A seqüência obtida foi submetida ao GenBank (NCBI, 2005), com o número de acesso de DQ163907.

2.2.2.3.3 Análise filogenética

A seqüência foi comparada com as obtidas do banco de dados do National Center for Biotechnology Information BLAST (NCBI, 2005). As seqüências obtidas nessas consultas foram

selecionadas e alinhadas por meio ClustalX (THOMPSON et al., 1997), e manualmente corrigidas usando o programa BIOEDIT (HALL, 1999). As matrizes de distâncias foram calculadas segundo Junkes e Cantor (1969) e árvores de distancias filogenéticas pela topologia do vizinho mais próximo (neighbor-joining) como descrito por Saitou e Nei (1987).

2.2.2.3.4 Projetos de iniciadores e PCR aninhado

Com a finalidade de confirmar a sequência obtida, foram projetados novos iniciadores para a detecção da *Burkholderia* sp. associada ao micélio de *P. ostreatus*. Para este fim, sequências obtidas no GenBank (NCBI, 2005) de *B. cepacia* X87275, *B. cepacia* AF097532, *Mycoplasma gallisepticum* M22441, *M. buccale* AF125586 e *M. faucium* AF125590 foram alinhadas usando o programa ClustalW 1.8 (BCM SEARCH LAUNCHER, 2005). Os novos iniciadores foram projetados para reconhecerem as sequências de Burkholderias selecionadas.

Os novos iniciadores denominados BUR-F587 (5'-GGT TTG CTA AGA CCG ATG TG-3') e BUR-R1127 (5'-TTA GAG TGC TCT TGC GTA GC-3'), foram usados em combinação com 1378R (5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3') iniciador universal 16S rDNA.

A primeira reação da PCR foi realizada com os iniciadores BUR-F587 e 1378R, utilizando-se os reagentes empregados no item 2.2.2.3.2 (com exceção dos iniciadores). Para a PCR fez-se a desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguido de 10 ciclos de 30s a 94°C, 60s a 65°C (decrecendo 1°C por ciclo), 60s a 72°C, seguidos de 15 ciclos de 30s a 94°C, 60s a 55°C, 60s a 72°C e extensão final de 5min a 72°C.

A segunda reação da PCR aninhado foi preparada utilizando os iniciadores BUR-F587 e BUR-R1378 acrescido de 1µL da solução da primeira reação. Os demais reagentes foram utilizados nas mesmas concentrações descritas no item 2.2.2.3.2. As condições da segunda reação foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 4 min, 26 ciclos de 94°C por 30s, 64,5°C por 60s e 72°C por 60s, a extensão final a 72°C por 5min. A presença de DNA do fungo foi verificada pela amplificação da região ITS como descrito por Rubini et al. (2005).

2.2.3 Resultados

2.2.3.1 Isolamento das bactérias

O crescimento bacteriano foi observado após 30 dias em todos os meios líquidos ensaiados. Em meio semi-sólido um crescimento bacteriano fastidioso foi observado após 25 dias (Figura 2.1A). Em meio sólido o crescimento bacteriano não foi observado.

Figura 2.1 - Crescimento fastidioso da bactéria em diversos meios; a) crescimento bacteriano em TSB em meio semi-sólido, ao longo da linha de inoculação; b) Sistema de co-cultivo, *P. ostreatus* crescendo em meio BHIT sólido; c) Microcolônias crescendo imersas em ágar próximo da colônia do fungo (aumento da foto anterior)

Em relação ao sistema de co-cultivo, quando *P. ostreatus* foi inoculado em meios contendo Tween (Figura 2.1B) observou-se a presença de estruturas que se assemelham a microcolônias nas bordas das colônias do fungo (Figura 2.1C). Estas estruturas lembram microcolônias de *Mycoplasma mobile* descritas por Miyata et al. (2000), que podem crescer imersas em meio de cultura e podem se deslocar por entre o meio, formando colônias menores ao redor de uma colônia inicial. Este padrão de crescimento de fungo e bactéria foi mais eficaz que o sistema de trituração pois as colônias puderam ser visualizadas de 15 a 20 dias após a inoculação.

2.2.3.2 Similaridade do gene 16S rDNA e análise filogenética

A análise molecular de parte da sequência do 16S rDNA obtida de cultura líquida e pelo sistema de co-cultura sugerem que este organismo esteja relacionado ao complexo *B. cepacia* (CBC), β -protoebactéria, com maior similaridade com *B. cepacia* ATCC 53933 (AY741357, Identidade = 842/844 99%, acesso em 25 junho de 2005).

Quando comparada com diferentes espécies de Burkholderias a análise filogenética confirma que o isolado pertence ao complexo *B.cepacia* (Figura 2.2). Foi observado também que

a bactéria não está filogeneticamente relacionada a *Candidatus Glomeribacter gigasporarum* descrito por Bianciotto et al. (2003), o que sugere que se trata de linha evolutiva distinta.

Figura 2.2 - Filograma que demonstra a relações entre a bactéria associada a *P. ostreatus* (DQ163907) com linhagens referencia do filo β -Proteobactéria baseado na sequência do gene 16S rDNA. Os valores de “bootstap” (1000 vezes) foram dispostos nos nós. A sequência de *Sinorhizobium meliloti* LMG 6133 (X67222) foi usada como grupo externo

2.2.3.3 Detecção da bactéria por PCR aninhado

A primeira reação do PCR aninhado utilizando os iniciadores BUR-F587 e 1378R produziu um fragmento de 811pb que não foi ou foi apenas pouco visualizado em gel de eletroforese. A segunda reação com os iniciadores BUR-F587 e BUR-R1127 produziu uma banda clara e visível de 562pb como predito pela análise da sequência. O sequenciamento do PCR aninhado confirmou a sequência obtida no primeiro ensaio demonstrando a capacidade de detecção da bactéria na amostra.

A técnica do PCR aninhado demonstrou a capacidade de detecção em diversas amostras contendo a bactéria. Como exemplo, é possível citar a detecção de DNA bacteriano em amostras oriundas do sistema de co-cultivo (Figura 2.3). Neste caso, amostras de duas regiões diferentes de uma cultura de *P. ostreatus* crescendo em meio Sierra modificado foram ensaiadas quanto a

presença da bactéria. A região (I) corresponde apenas ao halo de crescimento bacteriano sem a presença observável de hifas (Figura 2.3A I). A região (II) corresponde a áreas onde se constatou a presença hifas (Figura 2.3A II). Por meio de uma reação de PCR visando a região ITS do fungo, nenhuma banda foi observada na região I (Figura 2.3B canaleta 2), contudo, a presença de DNA fúngico foi detectada na região II (Figura 2.3B canaleta 5). Por outro lado, o PCR aninhado para detecção de DNA bacteriano foi eficaz em ambas regiões (Figura 2.3B canaletas 1 e 4).

Figura 2.3 - Amplificação do gene 16S rDNA e da região ITS do fungo; A) *P. ostreatus* crescendo no sistema de co-cultivo em meio Sierra modificado, os círculos representam as regiões onde as amostras foram retiradas; B) Gel de agarose das reações de PCR canaletas: M) marcador de peso molecular 1) amplificação do 16S rDNA da região I; 2) amplificação do ITS do fungo da região I; 3) vazio; 4) amplificação do gene 16S rDNA da região II e 5) amplificação do ITS do fungo da região II

2.2.4 Discussão

A presença de bactéria associada a *P. ostreatus*, como já tem sido descrito em outros fungos de podridão branca de madeira como *Ph. chrysosporium* (SEIGLE-MURANDI et al., 1996; COENYE et al., 2001c) e *Ph. sordida* (LIM et al., 2003). Contudo, tanto *B. fungorum* como *B. sordidicola* podem facilmente se desenvolver em meios como TSB, o que não ocorreu para a bactéria isolada neste trabalho a partir de *P. ostreatus*, pois a mesma apresentou desenvolvimento lento (por volta de 30 dias) neste e em outros meio de cultura ensaiados. Neste sentido, a bactéria não demonstrou crescimento quando inoculada a partir de triturados fúngicos em meio sólidos.

Em relação à utilização do sistema de co-cultivo (Figura 2.1b), este foi mais eficaz, pois acelerou o desenvolvimento da bactéria, indicando a provável necessidade de algum produto metabólico do fungo para o seu desenvolvimento.

A análise do gene ribossomal 16S demonstrou a identidade desta bactéria relacionada com o complexo *B. cepacia*. O sequenciamento dos produtos de PCR dos novos iniciadores projetados e empregados nas reações PCR aninhado (Figura 2.3), confirmou a relação existente entre a bactéria e o complexo *B. cepacia*. Vandamme et al. (2002) consideram que este grupo compreende pelo menos nove espécies distintas que compartilham alto grau de similaridade do gene 16s rDNA (98 a 100%). Apenas recentemente, a partir de uma abordagem polifásica, os problemas relacionados com a taxonomia do complexo foram esclarecidos (VANDAMME et al., 2003). Estes estudos demonstram, portanto, que a análise da sequência do gene 16S rDNA neste caso não é suficiente para definir o taxon de um isolado.

Os dados microbiológicos obtidos neste trabalho demonstram o caráter fastidioso da bactéria e corroboram a hipótese de que esta bactéria deva corresponder a uma a outra espécie diferente daquelas já descritas no complexo *B. cepacia*.

Uma das características de bactérias do complexo *B. cepacia*, está na habilidade de interação com células eucarióticas (COENYE et al., 2001a). Neste sentido, foi demonstrada por vários autores, a capacidade de bactérias do CBC em colonizar diversos organismos, como amebas (MAROLDA et al., 1999), macrófagos (SAINI et al., 1999) e fungos (LEVY et al., 2003). Ensaio realizado por Yara et al. (1999) na mesma linhagem utilizada neste trabalho, sugerem a presença de estruturas intracelulares semelhantes a bactérias presentes em vacúolos de *P. ostreatus*.

Os dados de Bianciotto e Bonfante (2002) e Bertaux et al. (2003) corroboram esses dados, uma vez que os autores constataram a presença de bactérias intracelulares em *Gigaspora margarita* e *Laccaria bicolor* S238N, respectivamente.

A presença de uma bactéria fastidiosa associada a *P. ostreatus* sugere a necessidade de novos estudos que explorem aspectos básicos da biologia deste microrganismo e suas implicações na biologia do fungo e conseqüentemente seus prováveis desdobramentos biotecnológicos.

2.3 Conclusões

Os resultados permitem concluir que: A) Os métodos microbiológicos empregados associados a técnicas moleculares, em especial a análise de sequência ribossomais 16S, demonstraram a presença de bactérias fastidiosas em culturas *in vitro* de *P. ostreatus*; B) Estas bactérias apresentam similaridade com espécies do complexo *Burkholderia cepacia*.

Referências

- ARAUJO, W.L.; MACCHERONI, W. Jr.; AGUILAR-VILOSIO, C.I.; BARROSO, P.A.V.; SARIDAKIS, H.O.; AZEVEDO, J.L. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks, **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 47, p. 229-236, 2001.
- BCM SEARCH LAUCHER- BAYLOR COLLEGE OF MEDICINE SEARCH LAUCHER. Disponível em: <<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>>. Acesso em: 16 dez. 2005.
- BERTAUX, J.; SCHMID, M.; PREVOST-BOURE, N.C.; CHURIN, J.L.; HARTMANN, A.; GARBAYE, J.; FREY-KLETT, P. *In situ* identification of intracellular bacteria related to *Paenibacillus* spp. in the mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 4243–4248, 2003.
- BERTAUX, J.; SCHMID, M.; HUTZLER, P.; HARTMANN, A.; GARBAYE, J.; FREY-KLETT, P. Occurrence and distribution of endobacteria in the plant-associated mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, p. 1786-1795, 2005.
- BIANCIOOTTO, V.; BONFANTE, P. Arbuscular mycorrhizal fungi: a specialized niche for rhizospheric and endocellular bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v.81, p. 365-371, 2002.
- BIANCIOOTTO, V.; LUMINI, E.; BONFANTE, P.; VANDAMME, P. ‘*Candidatus* Glomeribacter gigasporarum’, an endosymbiont of arbuscular mycorrhizal fungi. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p.121-124, 2003.
- BOER, W. de; LEVEAU, J.H.J.; KOWALCHUK, G.A.; KLEIN GUNNEWIEK, P.J.A.; ABELN, E.C.A.; FIGGE, M.J.; SJOLLEMA, K.; JANSE, J.D.; VEEN, J.A. van. *Collimonas fungivorans* gen. nov., sp. nov., a chitinolytic soil bacterium with the ability to grow on living fungal hyphae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, p. 857–864, 2004.
- COENYE, T.; VANDAMME, P.; GOVAN, J.R.W.; LIPUMA, J.J.. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 3427–3436, 2001a.

COENYE, T.; MAHENTHIRALINGAM, E.; HENRY, D.; LiPUMA, J.J.; LAEVENS, S.; GILLIS, M.; SPEERT, D.P.; VANDAMME, P. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p.1481-1490, 2001b.

COENYE, T.; LAEVENS, S.; WILLEMS, A.; OHLÉN, M.; HANNANT, W.; GOVAN, J.R.W.; GILLIS, M.; FALSEN, E.; VANDAMME, P. *Burkholderia fungorum* sp. nov. and *Burkholderia caledonica* sp. nov., two new species isolated from the environment, animals and human clinical samples. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p.1099–1107, 2001c.

EICHLEROVÁ I., L.HOMOLKA, F. NERUD, F. ZADRAZIL, P. BALDRIAN, AND J. GABRIEL. Screening of *Pleurotus ostreatus* isolates for their ligninolytic properties during cultivation on natural substrates **Biodegradation**, Dordrecht, v.11, p.279–287, 2000.

GEISS, F.P.; GEIJN, J. van de; RUTJENS, A.J. Pests and Diseases In: GRIENSVEN, L.J.L.D. van. **The cultivation of mushrooms**. Horst: Mushroom Experimental Station, 1988. chap. 13, p. 361-422.

GERRITS, J.P.G. Nutrition and compost. In: GRIENSVEN, L.J.L.D. van. **The cultivation of mushrooms**. Horst: Mushroom Experimental Station, 1988. chap. 2, p. 29-72.

HA, H.-C.; HONDA, Y.; WATANABE, T.; KUWAHARA, M. Production of manganese peroxidase by pellet culture of the lignin-degrading basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 55, p. 704–711, 2001.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, p. 95-98, 1999.

HANDELSMAN, J.; STABB, E.V. Biocontrol of soilborne plant pathogens. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 8, p. 1855-1869, 1996.

JARGEAT, P.; COSSEAU, C.; OLA'H, B.; JAUNEAU, A.; BONFANTE, P.; BATUT, J.; BÉCARD, G. Isolation, free-living capacities, and genome structure of "*Candidatus* Glomeribacter gigasporarum," the endocellular bacterium of the mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 186, p. 6876-6884, 2004.

JUKES, T.H.; CANTOR, C.R. 1969. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H.N. (Ed.), **Mammalian protein metabolism**. New York: Academic Press, 1969, v.3, chap. 24, p. 21-132.

LEVY, A.; CHANG, B.J.; ABBOTT, L.K.; KUO, J.; HARNETT, G.; INGLIS, T.J.J. Invasion of spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora decipiens* by *Burkholderia* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 6250–6256, 2003.

LIM, Y.W.; BAIK, K.S.; HAN, S.K.; KIM, S.B.; BAE, K.S. *Burkholderia sordidicola* sp. nov., isolated from the white-rot fungus *Phanerochaete sordida*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, p. 1631-1636, 2003.

- MAROLDA, C.L.; HAURÖDER, B.; JOHN, M.A.; MICHEL, R.; VALVANO, M.A. Intracellular survival and saprophytic growth of isolates from the *Burkholderia cepacia* complex in free-living amoebae. **Microbiology**, Reading, v. 145, p. 1509–1517, 1999.
- MIYATA, M.; YAMAMOTO, H.; SHIMIZU, T.; UENOYAMA, A.; CITTI, C.; ROSENGARTEN, R. Gilding mutants of *Mycoplasma mobile*, relationships between motility and cell morphology, cell adhesion and microcolony form and cell morphology, cell adhesion and microcolony formation. **Microbiology**, Reading, v. 146, p.1311-1320, 2000.
- NAIR, N.G.; FAHY, P.C. Commercial application of biological control of mushroom bacterial blotch. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v. 27, p. 415-422, 1976.
- NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 12 dez. 2005.
- RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 17-20, 1985.
- RANZANI, M.R.; STURION, G.L. Avaliação da composição em aminoácidos de *Pleurotus spp* cultivados em folha de bananeira. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 48, p. 339-348, 1998.
- RUBINI, M.R.; SILVA-RIBEIRO, R.T.; POMELLA, A.W.V.; MAKI, C.S.; ARAUJO, W.L.; SANTOS, D.R. dos; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicioso*, causal agent of Witches' Broom Disease. **International Journal of Biological Sciences**, Lake Haven, v.1, p. 24-33, 2005.
- SAINI, L.S.; GALSWORTHY, S.B.; JOHN, M.A.; VALVANO, M.A. Intracellular survival of *Burkholderia cepacia* complex isolates in the presence of macrophage cell activation. **Microbiology**, Reading, v.145, p. 3465-3475, 1999.
- SAITOU, N.; NEI, M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.4, p.406-425, 1987.
- SEIGLE-MURANDI, F.; GUIRAUD, P.; CROIZE, J.; FALSSEN, E.; ERIKSSON, K.L. Bacteria are omnipresent on *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2477–2481, 1996.
- SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 23, p.15–22, 1957.
- STAMETS P.; CHILTON, J.S. Sterilile technique and agar cultures In: _____. **The mushroom cultivator**: a practical guide to growing mushrooms at home. Olympia: Agarikon Press, 1983. chap. 2, p. 15-60.

THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J.; PLEWNIAC, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D.G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, London, v. 24, p.4876-4882, 1997.

TSUKAMOTO, T.; MURATA, H.; SHIRATA, A. Identification of non-pseudomonad bacteria from fruit bodies of wild agaricales fungi that detoxify tolaasin produced by *Pseudomonas tolaasii*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v. 66, p. 2201-2208, 2002.

VANDAMME, P.; HOLMES, B.; COENYE, T.; GORIS, J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; LIPUMA, J.J.; GOVAN, J.R. *Burkholderia cenocepacia* sp. nov.--a new twist to an old story. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, p. 91-96, 2003.

VANDAMME, P.; HENRY, D.; COENYE, T.; NZULA, S.; VANCANNEYT, M.; LIPUMA, J.J.; SPEERT, D.P.; GOVAN, J.R.; MAHENTHIRALINGAM, E. *Burkholderia anthina* sp. nov. and *Burkholderia pyrrocinia*, two additional *Burkholderia cepacia* complex bacteria, may confound results of new molecular diagnostic tools. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, 33, 143-149, 2002.

VISSCHER, H.R. Caising Soil. In: GRIENSVEN, L.J.L.D. van. **The cultivation of mushrooms**. Horst: Mushroom Experimental Station, 1988. chap. 3, p. 73-90.

YARA, R.; AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W. Jr.; KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. Mycoplasma associated with cultures of the ligno-cellulolytic fungus *Pleurotus* sp. **Acta Microscópica**, Rio de Janeiro, v.8, p. 851-852, 1999.

3 PROTOCOLO PARA HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH) PARA DETECÇÃO DE ENDOBACTÉRIA ASSOCIADA A *Pleurotus ostreatus*

Resumo

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) é uma técnica que utiliza sondas ligadas a fluorocromos que detectam seqüências específicas de ácidos nucleicos. Em estudos de microbiologia ambiental esta ferramenta é empregada na detecção e distribuição espacial de procariotos em seu habitat. Recentemente foi observada uma bactéria associada a hifas de *Pleurotus ostreatus* com características de crescimento fastidioso e sensível a variações de pressão osmótica. A visualização desta bactéria utilizando o protocolo FISH clássico não se mostrou eficiente. O presente trabalho descreve a monitoração da integridade das formas bacterianas por meio da coloração com SYTO orange 81. Neste sentido, foram identificados os passos críticos que danificavam estas bactérias, e assim, foram incorporados procedimentos que visaram preservar suas estruturas. As principais alterações no protocolo FISH estão relacionadas com a imobilização da célula com gelatina e sua fixação direta sobre as lâminas. Foram adicionados também procedimentos que otimizaram a visualização de células associadas ao micélio, dentre as quais: redução da camada de gelatina na lâmina, aumento do contraste da parede celular do fungo, diminuição da camada de hifas e utilização de agentes tensoativos.

Palavras chaves: hibridização fluorescente *in situ*, protocolo, *Pleurotus ostreatus*, endobactéria

Abstract

The fluorescent *in situ* hybridization (FISH) is a technology utilizing probes bound to fluorochromes that detect specific sequences of nucleic acids. In studies of the environmental microbiology, this tool is used for detection and spatial distribution of prokaryotes in their habitat. Bacteria associated with *Pleurotus ostreatus* hyphae which were observed recently, were characterized as slow growing microorganisms, fragile to osmotic pressure variation. The detection of these bacteria by using the classic FISH protocol did not show to be effective. This study described the employment of SYTO orange 81 for monitoring the integrity of the bacterial forms during FISH procedure. Thus, the critical steps, which damaged these bacteria, were identified, and new technique for preserving their structures were implemented. The main alterations in the FISH protocol concerned to immobilization of a cell with gelatin and its fixation directly on the slides. Concerning to detection of bacterial cells associated to fungi mycelia, the FISH procedure were adapted and some new steps were added, such as reduction of the gelatin layer, increase in the contrast of fungus cellular wall, decrease hyphae layer, and use of tensoactive agents.

Key words: fluorescent *in situ* hybridization, protocol, *Pleurotus ostreatus*, endobacteria

3.1 Introdução

A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) é uma técnica que utiliza um microscópio de epifluorescência para detecção de sondas ligadas a moléculas de RNA e DNA. Esta técnica tem sido amplamente utilizada na caracterização de microrganismos, sendo que o seu grande diferencial quando comparada a uma hibridização convencional, é a possibilidade de avaliar a morfologia, abundância, como também sua distribuição espacial (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995).

Manz et al. (1992), desenvolveram um protocolo para análise de proteobactérias cultiváveis, utilizando sondas que permitiram a discriminação dos três principais grupos deste filo (alfa, beta e gama-proteobactéria). Baseadas neste protocolo várias adaptações foram realizadas para pesquisa de microrganismos não cultiváveis, como o estudo de endossimbiontes (BEIER et al., 2002).

Entretanto, há indicativos de que formas bacterianas frágeis podem não suportar os diversos tratamentos durante o preparo para observação por FISH. Neste sentido, McLaughlin et al. (2002) estudando a presença de formas L em amostras de sangue verificaram a impossibilidade da aplicação de técnicas de FISH para este tipo de amostra e sugerem que a ineficácia da técnica estaria associada a fragilidade destas estruturas. Yara et al. (1999) observaram estruturas bacterianas pleomórficas de tamanho variável intracelular em hifas de *Pleurotus ostreatus*. Durante estes estudos foi observada certa fragilidade destas bactérias quanto variações de pressão osmótica no cultivo e no preparo de lâminas. Neste sentido em ensaios prévios utilizando FISH, foi observada a ineficácia desta técnica em visualizar estas estruturas bacterianas, sugerindo mais uma vez a fragilidade das mesmas.

Para contornar problemas oriundos da fragilidade de alguns tipos de células bacterianas, foram realizadas diversas adaptações em protocolos de microscopia convencional e eletrônica, como por exemplo, o uso de estabilizadores osmóticos (ROBERTSON; GOMERSALL; GILL, 1975) e agentes gelificantes (OWENS; NICKERSON, 1989).

Este estudo teve como objetivo desenvolver um protocolo para a visualização das formas bacterianas em *P. ostreatus* por hibridização *in situ* fluorescente (FISH) adaptando os protocolos descritos por Manz et al. (1992) e Bertaux et al. (2003).

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Revisão Bibliográfica

3.2.1.1 A parede celular bacteriana

A parede celular bacteriana é uma estrutura rígida que recobre a membrana citoplasmática e confere forma às bactérias (KOCH, 1988), além de proteger a célula, impedindo o seu rompimento em soluções hipotônicas (CSONKA, 1989).

Segundo Cabeen e Jacobs-Wagner (2005) a coloração das bactérias em Gram-positivas e negativas é decorrente das diferenças na composição e estrutura da parede celular. Uma macromolécula complexa denominada peptideoglicano forma a estrutura rígida da parede. As bactérias Gram positivas possuem uma quantidade maior de peptideoglicano, o que torna a parede dessas bactérias mais espessa e rígida. Possuem também ácidos teicóicos (cadeias de polifosfato com resíduos de ribitol e glicerol), e em geral são mais sensíveis a lisozimas e a penicilina G do que as bactérias Gram negativas.

Dmitriev, Toukach e Ehlers (2005) citam que as bactérias Gram negativas possuem a parede celular menos espessa e mais complexa. Apresentam uma camada fina de peptideoglicana e uma segunda membrana externa composta de fosfolipídeos, lipoproteínas e lipopolissacarídeos (LPS). Apresentam ainda o chamado espaço periplasmático que é delimitado pelas duas membranas. Os LPS estão localizados exclusivamente na camada externa da segunda membrana, enquanto que os fosfolipídeos estão presentes quase completamente na camada interna.

3.2.1.2 Bactérias com parede celular deficiente (forma L)

Segundo Madoff e Lawson (1999), todos os grupos bacterianos são passíveis de perderem a peptideoglicana, e estas são denominadas formas L ou bactérias com parede celular deficiente. A perda normalmente se dá pela inibição parcial ou total da síntese da parede celular. Mantidas as condições necessárias, as formas L se multiplicam e se mantêm nesta forma por longos períodos. Todavia, estas podem reverter para o estado original quando as condições de biossíntese são restabelecidas. Quando esta reversão raramente ocorre, esta passa a ser denominada de forma L estável.

Madoff e Lawson (1999) também citam que semelhantemente aos grupos que evoluíram para a ausência de parede celular (descritos no próximo subitem), as formas L originárias de bactérias Gram positivas e negativas caracterizam-se pela fragilidade osmótica, tendência de

formar pequenas colônias na forma de “ovo frito” em meio sólido e serem de cultivo fastidioso. Além disto, estas formas celulares podem variar morfológicamente apresentando desde pequenas estruturas de 0,2µm até formas alargadas (“large bodies”) maiores de 5,0µm, podendo chegar em condições excepcionais de 20 a 30µm. O formato também é variável podendo assumir formas que variam de cocóides a filamentosas.

As bactérias Gram negativas, que possuem duas membranas (plasmática e externa) separadas por uma camada de peptidoglicano, quando adquirem a forma L podem apresentar dois tipos de colônias (tipos A e B). O tipo B caracteriza-se por colônias maiores que reverterem facilmente para forma com parede celular e são compostas predominantemente por corpos alargados com duas membranas e resquícios da camada de peptidoglicano. As colônias do tipo A são de tamanho menor, com células também menores; estas células apresentam uma única membrana e são mais assemelhados a micoplasmas, além de serem de difícil reversão para forma com parede (DIENES; BULLIVANT, 1968).

3.2.1.3 Organismos bacterianos que evoluíram para formas sem parede celular

Ao contrário das formas L alguns grupos específicos evoluíram para formas desprovidas de parede celular. Estes grupos podem apresentar origens filogenéticas bem distintas como bactérias Gram positivas, Gram negativas e Archea. No passado, estes grupos foram classificados de maneira incorreta, principalmente devido a fenótipos semelhantes derivados da falta de parede celular.

Dentre estes grupos que perderam a parede celular, os representantes da classe dos Mollicutes são os mais bem estudados. Estes fazem parte do filo Firmicutes (Gram-positivas de baixo conteúdo de G+C) e caracterizam-se por serem parasitas intra e extracelulares de animais, plantas e insetos (RAZIN, 2000). Devido às características derivadas da ausência da parede celular os Mollicutes possuem métodos próprios para seu cultivo e estudo. Tais práticas estão relacionadas em publicações como “Methods in Mycoplasmaology” (RAZIN; TULLY, 1983), onde são descritos protocolos modificados especificamente para este grupo de bactéria.

A família *Anaplasmataceae* congrega três gêneros reconhecidos (*Aegyptianella*, *Anaplasma* e *Ehrlichia*), os quais estão filogeneticamente relacionada com as bactérias Gram negativas da família *Rickettsiaceae* (alfa-proteobactérias), Kreier et al. (1999) citam que estas se

caracterizam pela ausência da parede celular e pela necessidade do cultivo em células vivas, são parasitas do sangue e necessitam de artrópodes para serem transmitidos.

A ordem Thermoplasmatales (Archaea) possui três famílias representadas por um gênero cada: Thermoplasmaceae (gênero *Thermoplasma*), Picophilaceae (*Picrophilus*), e Ferroplasmaceae (*Ferroplasma*). Todos os representantes da ordem são acidófilos extremos crescendo em pH menores de 2, porém os gêneros *Thermoplasma* e *Picrophilus* apresentam temperatura ótima de crescimento ao redor de 60°C e não apresentam parede celular. Devido a esta característica até 1995 considerou-se *Thermoplasma* como pertencente a classe Mollicutes (HUBER; STETTER, 2002).

3.2.2 Material e Métodos

3.2.2.1 Microrganismos e condições de cultivo

Para o estoque das culturas fúngicas de *P. ostreatus* G2 foi utilizado o meio MEA (2,0% extrato de malte, 0,2% extrato de levedura e 1,8% ágar). Para ensaios de FISH o fungo foi cultivado em meio TSA (1,5% Triptona, 0,5% Soitona, 0,5% NaCl e 1,5% ágar pH 7,3). As culturas foram mantidas a 30°C.

Células de bactérias fastidiosas foram coletadas a partir de colônias localizadas nas bordas de culturas de *P. ostreatus*, cultivadas em meio descrito por Sierra (1957) modificado (10g/L Triptona, NaCl 5g/L, Tween-20 10ml/L, ágar 10g/L) e incubadas a 30°C.

Como controle nos ensaios de FISH foi utilizada a bactéria *Burkholderia vietnamiensis* LA3 cultivada em meio TSA a 30°C.

3.2.2.2 Detecção de DNA por epifluorescência

A detecção de DNA por microscopia de epifluorescência foi obtida pela adição de SYTO orange 81 (Molecular Probes /EUA) ou 4',6-diamidina-2 fenilindone - DAPI (3,5mg / 10mL de água mQ). As amostras coradas com SYTO orange 81 foram observadas em microscópio confocal de varredura a laser (MCVL). Os fluorocromos são agentes com afinidade por ácidos nucleicos, e assim, esta etapa foi utilizada previamente aos ensaios de FISH para avaliação da integridade celular das amostras.

3.2.2.3 Soluções utilizadas para FISH

As soluções utilizadas para a preparação da técnica de FISH para os cultivos bacterianos foram: 8,4% de gelatina previamente aquecida e filtrada em filtros Millipore 0,45 e 0,20µm, PBS (130mM NaCl, 7mM Na₂HPO₄, 3mM NaH₂PO₄: pH 7,3), 5% de para-formaldeído (PFA) diluído em tampão PBS (pH 7,3), tampão de hibridização (35% formamida ,900mM NaCl, 20mM Tris.HCl e 0,01% SDS), tampão de lavagem (80mM NaCl, 20mM Tris.HCl, 5mM EDTA e 0,01% SDS) e Citifluor AF1 (Citifluor / UK).

As soluções utilizadas para a preparação das amostras de *P. ostreatus* foram: solução tensoativa (0,5M sacarose, 0,05% Tween 80), 10% de gelatina previamente aquecida e filtrada em filtros Millipore 0,45 e 0,20µm. As soluções de PBS, PFA, do tampão de hibridização e tampão de lavagem foram utilizadas nas mesmas concentrações dos ensaios para cultivos bacterianos. Adicionalmente foi utilizada solução de poli-L-lisina (Sigma / Alemanha) e lecitina de germe de trigo (WGA) conjugado com Oregon Green 488 (Molecular Probes / EUA).

3.2.2.4 Sondas de oligonucleotídeos utilizada nos ensaios de FISH

As sondas de nucleotídeos utilizadas para a otimização do protocolo estão descritas na Tabela 3.1

Tabela 3.1 - Sondas de oligonucleotídeos utilizadas nos ensaios de FISH

Sonda	Seqüência (5'-3')	Alvo rRNA	Especificidade	Referência
EUB338 I	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S, 338–355	Maioria das bactérias	Amann et al. (1990)
EUB338 II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	16S, 338–355	Planctomycetales	Daims et al. (1999)
EUB338 III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	16S, 338–355	Verrucomicrobiales	Daims et al. (1999)
SUBU1237	CCCTCTGTTCCGACCATT	16S, 1237–1254	<i>Burkholderia</i> spp., <i>Sutterella</i> spp.	Stoffels et al. (1998)
Burcep	CTGTGCGCCGGTTCTCTT	16S, 1031–1048	Complexo <i>Burkholderia cepacia</i> (CBC)	Hogardt et al. (2000)
BET42a	GCCTTCCCACATCGTTT	23S, 1027–1043	Beta proteobacteria	Manz et al. (1992)
BET42a competidor	GCCTTCCCACATCGTTT	23S, 1027–1043	Competidor para BET42A	Manz et al. (1992)
ACA652 (ACA23A)	ATCCTCTCCCACTACTCTA	16S, 652- 669	<i>Acinetobacter</i>	Wagner et al. (1994)
GAM42a	GCCTTCCCACATCGTTT	23S, 1027–1043	Gama proteobacteria	Manz et al. (1992)
GAM42a competidor	GCCTTCCCACATCGTTT	23S, 1027–1043	Competidor para GAM42a	Manz et al. (1992)

Para o preparo da sonda EUBmix foi feita uma solução equimolar de EUB338 I, EUB338 II, e EUB338 III. As sondas de oligonucleotídios foram marcadas na extremidade 5' com indocarbocianina (Cy3), indodicarbocianina (Cy5), ou 5(6)-Carboxifluoresceína-N-hidroxissuccinimide éster (FLUOS).

3.2.2.5 Fixação e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) bacteriana

A partir do protocolo descrito por Manz et al. (1992) foi desenvolvido um procedimento para a fixação e hibridização *in situ* da endobactéria de *P. ostreatus* G2. Para tanto em cada passo do protocolo foi verificada a integridade da estrutura bacteriana por meio de coloração SYTO orange 81 ou DAPI. Como controle positivo da eficiência da hibridização foi utilizada a *B. vietnamiensis* LA3. O protocolo final está sumarizado na Tabela 3.2

Tabela 3.2 - Protocolo de fixação e hibridização de colônias bacterianas

Estágio	Passos	Descrição
Coleta	1	Bactérias foram cuidadosamente coletadas a partir colônias crescidas em sistema de co-cultura em meio descrito por Sierra (1957) modificado. Durante a coleta, procurou-se não transferir tanto micélio do fungo como ágar;
Embebição	2	As culturas foram colocadas em microtubos com 50µL de gelatina (8,4%) previamente filtrada e liquefeita;
	3	5µL da mistura cultura + gelatina foram aplicados em lâminas recobertas por epóxi. As lâminas foram colocadas em refrigerador a 4°C ate solidificar ;
Fixação em paraformaldeído (PFA)	4	45µL de solução de PFA foram aplicados na lâmina sobre a amostra. Posteriormente esta foi cuidadosamente colocada em câmara úmida com vapor saturado de PFA a 4°C a menos por menos 20h;
	5	Após a fixação por PFA, a lâmina foi lavada por pelo menos 3 vezes em solução de PBS e seco a 46°C;
Hibridização	6	As amostras foram submetidas a uma série de desidratação em etanol (50, 80 e 96%) por 3 min e em seguida secas a 46°C;
	7	Foi aplicado 8µL do tampão de hibridização mais 1µL de sonda;
	8	Incubou-se por 1 a 2 horas a 46°C;
	9	Foi retirado o excesso de sonda pela aplicação de 1mL de tampão de lavagem;
	10	As lâminas foram imersas em tampão de lavagem por no máximo 15 minutos a 48°C em posição horizontal;
	11	As lâminas foram secas a 46°C, lavadas cuidadosamente com água destilada, e secas novamente a 46°C;
	12	As lâminas foram montadas com Citifluor e observadas em microscópios de epifluorescência e MCVL;

3.2.2.6 Fixação e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) de endobactérias presentes em hifas de *P. ostreatus*

A partir do protocolo desenvolvido para bactérias, foi adaptado o protocolo para hifas de *P. ostreatus*. Para tanto, algumas modificações foram necessárias para visualização das endobactérias. O protocolo final está sumarizado na Tabela 3.3

Tabela 3.3 - Protocolo de fixação e hibridização de hifas de fungos

Estágio	Passos	Descrição
Coleta	1	<i>P. ostreatus</i> foi inoculado em meio TSA e incubado a 30°C por até 4 dias, e os fragmentos do micélio foram cuidadosamente retirados evitando-se a coleta de meio de cultura.
	2	Os fragmentos foram colocados em solução tensoativa de 0,05% Tween 80 e sacarose (0,5M) e submetidos a vácuo. Após alguns segundos o vácuo foi interrompido e observado o comportamento da amostra. O procedimento foi repetido até que nenhuma amostra flutuasse na solução.
Embebição	3	Os fragmentos de hifa foram cortados em fragmentos menores suficientes para serem acomodados em lâminas recobertas por epóxi, e em seguida as amostras foram imersas em solução de gelatina 10%. O excesso de gelatina foi retirado com auxílio de papel para limpeza de microscópio;
	4	Em seguida, as amostras foram fixadas nas lâminas com o auxílio de 3µL de solução de poli-L-lisina;
Fixação em paraformaldeído (PFA)	5	45µL de solução de PFA foram aplicados na lâmina sobre a amostra. Em seguida esta foi cuidadosamente colocada em câmara úmida com vapor saturado de PFA a 4°C, por pelo menos 20h;
	6	Após a fixação por PFA, a lâmina foi lavada ao menos por 3 vezes em solução de PBS e em seguida secou-se a 46°C;
Hibridização das sondas	7	As amostras foram submetidas a uma série de desidratação em etanol (50, 80 e 96%) por 3 min e secas a 46°C;
	8	Foi aplicado 8µL do tampão de hibridização mais 1µL de sonda;
	9	Incubou-se por 1 a 2 horas a 46°C;
	10	Retirou-se o excesso de sonda pela aplicação de 1mL de tampão de lavagem;
	11	As lâminas foram imersas em tampão de lavagem por no máximo 15 minutos a 48°C em posição horizontal;
Marcação da parede celular do fungo do com WGA	12	As lâminas foram secas a 46°C, lavadas cuidadosamente com água destilada, e secas novamente a 46°C;
	13	Foram aplicados 19µL de tampão de lavagem e 1µL de solução de WGA (1000µg/1000µL) conjugado com Oregon Green 488 (Molecular Probes / EUA). Manteve-se por 20min a temperatura ambiente;
	14	As lâminas foram lavadas cuidadosamente com água destilada e secas a 46°C.
	15	As lâminas foram montadas com Citifluor e observadas em microscópios de epifluorescência e MCVL.

3.2.2.7 Observação em microscópio de epifluorescência e microscopia confocal de varredura a laser (MCVL)

O microscópio Axioplan Zeiss foi utilizado para a observação de epifluorescência. As observações das amostras foram realizadas em MCVL, LSM 510 Axiovert 100M, Zeiss, equipado com laser de argônio (488nm), e dois laser de hélio-neon (543 e 633nm), apropriados para excitar FLUOS, Cy3 e Cy5, respectivamente. Lentes Apochromat 63x/1.2 de imersão em água foram usadas para observação das amostras. Imagens monocromáticas foram obtidas de cada comprimento de onda usado. Cores artificiais foram aplicadas para cada uma destas imagens monocromáticas. Assim, para o comprimento de onda 488nm foi usada a cor verde, para 543nm a cor vermelha e 633nm para a cor azul. A sobreposição de imagens foi feita a partir do pacote de software LSM 510, versão 3.0.

3.2.3 Resultados

3.2.3.1 Otimização do protocolo de FISH nos cultivos bacterianos

A integridade das formas bacterianas, durante o processamento das amostras, foi monitorada por meio de coloração de DNA por DAPI ou SYTO orange 81. Esta estratégia possibilitou a identificação dos passos onde as estruturas bacterianas poderiam ser danificadas.

Dentre as alterações realizadas no protocolo original proposto por Manz et al. (1992), algumas alterações foram realizadas, a partir da constatação que as estruturas bacterianas não foram preservadas na fixação em meio aquoso. Isto sugeriu a fragilidade das formas bacterianas estudadas, e dentre as modificações principais, estão a imobilização das estruturas bacterianas com gelatina a 8,4% e a sua fixação diretamente na lâmina com adição de paraformaldeído (PFA) sobre a amostra.

Com a finalidade de verificar possíveis alterações no comportamento das sondas e na determinação das formas bacterianas foi empregada a linhagem *B. vietnamiensis* LA3, utilizando o protocolo modificado descrito na Tabela 3.2. Constatou-se que não houve alteração da forma bacteriana nem da especificidade das sondas, como observado na Figura 3.1A. Os sinais azul, vermelho e verde correspondem respectivamente as sondas BET42A, SUBU1237 e EUBmix que detectam esta linhagem.

Em relação a possíveis falsos positivos, foram utilizadas as sondas GAM42A e ACA652, específicas para gamaproteobactérias e *Acinetobacter*, respectivamente. Como esperado, somente a sonda EUBmix (em verde) foi detectada como observado na Figura 3.1B.

Figura 3.1 - Hibridização em bactérias padrões. (A) Ensaio de FISH utilizando protocolo modificado com sondas específicas para *B. vietnamiensis* LA3 EUBmix FLUOS, BET42A Cy5, BET42A competidor e SUBU1237 Cy3; (B) Ensaio de FISH utilizando protocolo modificado utilizando *B. vietnamiensis* LA3, EUBmix FLUOS, GAM42A Cy5, GAM42A competidor e ACA652 Cy3

Quanto ao ensaio com as colônias de bactérias associadas a *P. ostreatus*, a técnica de FISH confirmou a hibridização e preservação das estruturas bacterianas (Figura 3.2A). Foi observado que a estratégia da imobilização das estruturas por gelatina não prejudicou o sinal emitido por FISH, semelhante ao que ocorreu nos ensaios utilizando *B. vietnamiensis* LA3.

Nos ensaios de FISH as bactérias apresentaram-se pleomórficas, e resultado semelhante foi observado durante a coloração de DNA por SYTO orange 81 e DAPI. A presença de grandes estruturas (Figura 3.2B) sugere a detecção de micro-colônias ou alternativamente de formas alargadas.

Figura 3.2- Hibridização por FISH (A) Vista geral da hibridização utilizando a sonda EUBmix FLUOS (B) Grandes estruturas observadas em maior aumento indicando a presença de micro-colônias ou alternativamente de formas alargadas

3.2.3.2 Otimização do protocolo de FISH para detecção da endobactéria de *P. ostreatus*

À semelhança do que foi observado durante os ensaios utilizando culturas bacterianas, a aplicação direta do protocolo de FISH descrito por Bertaux et al. (2003), não foi satisfatória para observação das estruturas bacterianas em hifas de *P. ostreatus* (Figura 3.3).

Figura 3.3 - FISH utilizando protocolo descrito por Bertaux et al. (2003). Sondas e oligonucleotídeos utilizados: EUBmixCy3, BET42A Cy5 e BET42A competidor

Durante a aplicação do protocolo desenvolvido para culturas bacterianas em hifas de *P. ostreatus* observou-se sucesso relativo da técnica. No processo de otimização da técnica algumas peculiaridades foram observadas e resumidas nos seguintes itens:

- a) camadas excessivas de hifas;
- b) processo ineficiente de fixação das amostras sobre as lâminas;
- c) hidrofobicidade das hifas;
- d) excesso da camada de gelatina sobre a amostra;
- e) reduzida autofluorescência da parede celular fúngica.

Com o intuito de contornar estas dificuldades foram incorporados ao protocolo passos adicionais como:

- a) cultivo de *P. ostreatus* em meio TSA (máximo 4 dias);
- b) uso de poli-L-lisina para fixação da amostra sobre a lâmina;
- c) pré-tratamento de hifas com vácuo e de tensoativo (Tween 80 + sacarose) para diminuição da hidrofobicidade das hifas;
- d) retirada do excesso de gelatina antes da fixação por PFA;

e) coloração da parede fúngica utilizando WGA conjugado com Oregon Green 488.

Na Figura 3.4 observa-se a detecção de estruturas bacterianas intracelulares. Esta imagem foi gerada a partir do protocolo final.

Figura 3.4 - Estrutura bacteriana (seta) no interior da hifa de *P. ostreatus* que foi observada a partir da aplicação do protocolo descrito neste trabalho utilizando as sondas Burcep Cy3, SUBU1237 Cy5 e WGA conjugado com Oregon Green 488

3.2.4 Discussão

O monitoramento da integridade das formas bacterianas, durante o processamento das amostras por meio de coloração por SYTO orange 81 e DAPI foram eficazes para a identificação dos passos onde as estruturas bacterianas poderiam ser danificadas. Pode-se observar que as estruturas bacterianas não foram preservadas durante a fixação em meio aquoso. Para contornar este fato foi incorporada ao protocolo a imobilização das bactérias em gelatina e a sua fixação diretamente na lâmina com adição de paraformaldeído (PFA) sobre a amostra.

Pernthaler; Pernthaler e Amann (2002) promoveram a preservação de estruturas em ensaio de FISH utilizando agarose de baixo ponto de fusão (“low melting point agarose”) como agente gelificante. Uma estratégia semelhante foi adotada pela aplicação de ágar sobre colônias de *Staphylococcus aureus* (formas L) em estudos de microscopia eletrônica de transmissão por Owens e Nickerson (1989). Este artifício também foi adotado em culturas líquidas de T-mycoplasmas (*Ureaplasma*) por Black; Birch-Andersen e Freundt (1972) adicionando ágar fundido em ensaios de micorsocopia eletrônica de transmissão.

Entre as formas bacterianas extremamente frágeis a microscopia, estão as formas L ou bactérias com parede celular deficiente. Segundo Madoff e Lawson (1999), todos os grupos bacterianos são passíveis de perderem a peptídeoglicana e adquirir forma L, esta perda normalmente se dá pela inibição parcial ou total da síntese da parede celular. Mantidas as condições necessárias, as formas L se multiplicam e nesta forma por longos períodos. Todavia, estas podem reverter para o estado original quando as condições de biossíntese são restabelecidas. Quando esta reversão raramente ocorre, esta passa a ser denominada de forma L estável.

Em bactérias em forma L, a osmolaridade possui papel chave durante o processo de fixação das amostras, como demonstrado por Lemcke (1972) e Robertson; Gomersall e Gill (1975), pois estas podem afetar a visualização e alterar significativamente o formato das estruturas. Além da osmolaridade, a força de centrifugação também pode alterar a formas destas bactérias (CLARK, 1965). McLaughlin et al. (2002) salientaram a falha na detecção de formas L por FISH e atribuíram a fragilidade destas estruturas como principal causa. Neste sentido adaptações de protocolo FISH especificamente voltadas para bactérias com parede celular deficiente, não foram descritas ainda na literatura.

A fixação de blocos de meio de cultura com ágar contendo colônias em formas L ou micoplasmas foi uma técnica eficaz para a visualização destas bactérias em microscopia de luz (DIENES, 1967), pois tal estratégia guarda certa semelhança àquela que foi utilizada neste trabalho, que utilizou a fixação das formas bacterianas diretamente sobre a lâmina.

Com a finalidade de verificar possíveis alterações no comportamento das sondas e na determinação das formas bacterianas foi empregada a linhagem *B. vietnamiensis* LA3 utilizando o protocolo modificado descrito na Tabela 3.2. Constatou-se que não houve alteração da forma nem da especificidade das sondas, como observado na Figura 3.1A. Os sinais azuis, vermelhos e verdes correspondem respectivamente as sondas BET42A, SUBU1237 e EUBmix que detectam esta linhagem. Em relação a possíveis falsos positivos, foram utilizadas as sondas GAM42A e ACA652, específicas para gamaproteobactérias e *Acinetobacter* respectivamente, e como esperado, somente a sonda EUBmix (em verde) foi detectada como observado na Figura 3.1B.

Quanto ao ensaio com as colônias de bactérias associadas a *P. ostreatus*, a técnica de FISH confirmou a hibridização e preservação das estruturas bacterianas (Figura 3.2A). Foi

observado que a estratégia da imobilização das estruturas por gelatina não prejudicou o sinal emitido por FISH, semelhante ao que ocorreu nos ensaios utilizando *B. vietnamiensis* LA3.

Nos ensaios de FISH as bactérias apresentaram-se pleomórficas, e resultado semelhante foi observado durante a coloração de DNA por SYTO orange 81. A presença de grandes estruturas (Figura 3.2B) sugere a detecção de micro-colônias ou alternativamente de formas alargadas (“large bodies”).

À semelhança do que foi observado durante os ensaios utilizando culturas bacterianas, a aplicação direta do protocolo de FISH descrito por Bertaux et al. (2003) não foi satisfatória para observação das estruturas bacterianas em hifas de *P. ostreatus* (Figura 3.3).

Durante a aplicação do protocolo desenvolvido para culturas bacterianas em hifas de *P. ostreatus*, observou-se sucesso relativo da técnica. No processo de otimização da técnica algumas peculiaridades que dificultavam a observação das bactérias foram constatadas.

Por exemplo, a camadas excessivas de hifas foi contornada pela incubação das culturas em meio de cultura mais favorável as bactérias (TSA) e pela diminuição do tempo de cultivo (por no máximo 4 dias). Outras, como o excesso da camada de gelatina aplicada sobre a amostra e o processo ineficiente de fixação das amostras sobre as lâminas, foram contornadas com medidas simples; e.g., retirada do excesso de gelatina com o auxílio de papel e aplicação de poli-L-lisina para a fixação das amostras sobre as lâminas.

Em relação a hidrofobicidade das hifas, estas são provavelmente decorrentes da hidrofobinas. Estes compostos foram descritos em vários fungos, inclusive *P. ostreatus* (PENAS et al., 2002), a presença destas substâncias levavam ao aumento da impermeabilidade das hifas, o que favorecia a ocorrência constante de bolhas de ar durante o processamento das amostras para FISH, prejudicando a penetração uniforme do fixador e das sondas e dificultando a visualização em microscopia.

Em *Aspergillus* a dispersão de esporos em solução aquosa é obtida por meio de Tween 80 (PIZZIRANI-KLEINER; PEREIRA; AZEVEDO, 1998). Neste trabalho, este composto foi investigado para diminuir a hidrofobicidade e facilitar a expulsão das bolhas de ar durante o processamento. Foi adotada então, uma solução contendo Tween 80 e um estabilizador osmótico (sacarose 0,5M) previamente descrito como eficaz para a manutenção de estruturas frágeis. Associado a este pré-tratamento foi utilizado vácuo para facilitar a expulsão das bolhas de ar.

A reduzida autofluorescência da parede fúngica apresentada por *P. ostreatus*, dificultou a localização intracelular das bactérias. Para contornar a situação procurou-se processos onde a parede celular fosse evidenciada. A aplicação de lecitina conjugada a fluorocromos foi descrita por diversos autores como ferramenta para observar diversas estruturas intra e extracelulares (HEROLD; KLYMENKO; IZAURRALDE, 2001; BÖCKELMANN et al., 2002). Especificamente em relação a aglutinina de germe de trigo (WGA) foi demonstrado que esta, possui afinidade à quitina podendo ser empregada na detecção de parede celular de fungos (MOLANO; BOWERS; CABIB, 1980). Com a finalidade de evidenciar a localização celular da bactéria associada a *P. ostreatus*, a WGA conjugada com Oregon Green 488 foi acrescida ao protocolo.

Por meio destas adaptações foi possível a observação por FISH de estruturas bacterianas não observáveis em protocolos convencionais. Na Figura 3.4 observa-se a detecção de estruturas bacterianas intracelulares, esta imagem foi gerada a partir do protocolo final.

3.3 Conclusões

Os resultados obtidos permitem concluir que: as estruturas bacterianas de *P. ostreatus* foram observadas por meio da adaptação do protocolo de hibridização *in situ* fluorescente (FISH), várias das alterações no protocolo concordam com a hipótese da fragilidade estrutural do microrganismo quando comparados à maioria das bactérias.

Referências

- AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, p. 143–169, 1995.
- AMANN, R.I.; BINDER, B.J.; OLSON, R.J.; CHISHOLM, S.W.; DEVEREUX, R.; STAHL, D.A. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p.1919-1925, 1990.
- BEIER, C.L.; HORN, M.; MICHEL, R.; SCHWEIKERT, M.; GORTZ, H.D.; WAGNER, M. The genus *Caedibacter* comprises endosymbionts of *Paramecium* spp. related to the Rickettsiales (Alphaproteobacteria) and to *Francisella tularensis* (Gammaproteobacteria). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 6043-6050, 2002.

- BERTAUX, J.; SCHMID, M.; PREVOST-BOURE, N.C.; CHURIN, J.L.; HARTMANN, A.; GARBAYE, J.; FREY-KLETT, P. *In situ* identification of intracellular bacteria related to *Paenibacillus* spp. in the mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 4243-4248, 2003.
- BLACK, F.T.; BIRCH-ANDERSEN, A.; FREUNDT, E.A. Morphology and ultrastructure of human T-mycoplasmas. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 111, p. 254-259, 1972.
- BÖCKELMANN, U.; MANZ, W.; NEU, T.R.; SZEWZYK, U. Investigation of lotic microbial aggregates by a combined technique of fluorescent *in situ* hybridization and lectin-binding-analysis. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.49, p. 75-87, 2002.
- CABEEN, M.T.; JACOBS-WAGNER, C. Bacterial cell shape. **Nature Reviews. Microbiology**, London, v. 3, p. 601-610, 2005.
- CLARK, H.W. Sedimentation counting and morphology of Mycoplasma. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 90, p. 1373-1386, 1965.
- CSONKA, L.N. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 53, p.121-147, 1989.
- DAIMS, H.; BRUHL, A.; AMANN, R.; SCHLEIFER, K.H.; WAGNER, M. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 22, p.434-444, 1999.
- DIENES, L. Permanent stained agar preparation of mycoplasma and of L forms of bacteria. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 93, p. 689-692, 1967.
- DIENES, L.; BULLIVANT, S. Morphology and reproductive processes of the L-forms of bacteria. II. Comparative study of L-forms and mycoplasma with the electron microscope. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 95, p. 672-682, 1968.
- DMITRIEV, B.; TOUKACH, F.; EHLERS, S. Towards a comprehensive view of the bacterial cell wall. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 13, p. 569-574, 2005.
- HEROLD, A.; KLYMENKO, T.; IZAURRALDE, E. NXF1/p15 heterodimers are essential for nuclear export in *Drosophila*. **RNA**, New York, v. 7, p. 1768-1780, 2001.
- HOGARDT, M.; TREBESIUS, K.; GEIGER, A.M.; HORNEF, M.; ROSENECKER, J.; HEESEMANN, J. Specific and rapid detection by fluorescent *in situ* hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.38, p. 818-825, 2000.
- HUBER, H.; STETTER, K.O. Thermoplasmatales Release. In: DWORKIN, M. (Ed.). **The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community**, 3.8 1/31/2002 This chapter replaces The Genus Thermoplasma, release 3.0. Disponível em: <<http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaphtm/367/COMPLETE.htm>>. Acesso em: 23 dez. 2005.
- KOCH, A. L. Biophysics of bacterial walls viewed as stress-bearing fabric **Microbiological Reviews**, Washington, v. 52, p. 337-353, 1988.

KREIER J.P.; GOTHE, R.; IHLER, G.M.; KRAMPITZ, H.E.; MERNAUGH, G.; PALMER, G.H. The Hemotrophic Bacteria: The Families Bartonellaceae and Anaplasmataceae. In: DWORKIN, M. (Ed.). **The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community**, Release 3.0 5/21/1999. Disponível em: <<http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaphtm/225/COMPLETE.htm>>. Acesso em: 23 dez. 2005.

LEMCKE, R.M. Osmolar concentration and fixation of mycoplasmas. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 110, p. 1154-1162, 1972.

MADOFF, S.; LAWSON, J W. The L-Forms of Bacteria. In: DWORKIN, M. (Ed.). **The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community**, Release 3.0, 5/21/1999. Disponível em: <<http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaphtm/230/COMPLETE.htm>>. Acesso em: 23 dez. 2005.

MANZ, W.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; WAGNER, M.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.1 5, p. 593-600, 1992.

McLAUGHLIN, R.W.; VALI, H.; LAU, P.C.; PALFREE, R.G.; De CICCIO, A.; SIROIS, M.; AHMAD, D.; VILLEMUR, R.; DESROSIERS, M.; CHAN, E.C. Are there naturally occurring pleomorphic bacteria in the blood of healthy humans? **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 4771-4775, 2002.

MOLANO, J.; BOWERS, B.; CABIB, E. Distribution of chitin in the yeast cell wall. An ultrastructural and chemical study. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 85, p.199-212, 1980.

OWENS, W.E.; NICKERSON, S.C. Morphologic study of *Staphylococcus aureus* L-form, reverting, and intermediate colonies *in situ*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 27, p.1382-1386, 1989.

PENAS, M.M.; RUST, B.; LARRAYA, L.M.; RAMIREZ, L.; PISABARRO, A.G. Differentially regulated, vegetative-mycelium-specific hydrophobins of the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p.3891-2898, 2002.

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

PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; J.O. PEREIRA; J.L. AZEVEDO. **Genética de fungos no laboratório**. Manaus: Universidade do Amazonas, 1998. 138 p.

RAZIN, S. The Genus *Mycoplasma* and Related Genera (Class Mollicutes). In: DWORKIN, M. (Ed.). **The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community**, Release 3.3, 9/8/2000 Disponível em: <<http://141.150.157.117:8080/prokPUB/chaphtm/272/COMPLETE.htm>>. Acesso em: 23 dez. 2005.

RAZIN S; J G. TULLY (Ed.) **Methods in mycoplasmaology**. New York: Academic Press, 1983 504 p.

ROBERTSON, J.; GOMERSALL, M.; GILL, P. Effect of preparatory techniques on the gross morphology of *Mycoplasma hominis*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 124, p. 1019-1022, 1975.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Wageningen, v. 23, p.15-22, 1957.

STOFFELS, M.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; HEKMAT, D.; SCHLEIFER, K.H. Bacterial community dynamics during start-up of a trickle-bed bioreactor degrading aromatic compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 930-939, 1998.

WAGNER, M.; ERHART, R.; MANZ, W.; AMANN, R.; LEMMER, H.; WEDI, D.; SCHLEIFER K.H. Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for *in situ* monitoring in activated sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 792-800, 1994.

YARA, R.; AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W. Jr.; KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. Mycoplasma associated with cultures of the ligno-cellulolytic fungus *Pleurotus* sp. **Acta Microscópica**, Rio de Janeiro, v. 8, p.851-852, 1999.

4 ULTRAESTRUTURA E IDENTIFICAÇÃO *IN SITU* DE UMA *Burkholderia* sp. ATÍPICA EM MICÉLIO DE *Pleurotus ostreatus* G2

Resumo

O complexo *Burkholderia cepacia* (CBC) constitui um conjunto de espécies que podem interagir com fungos, protozoários, espécies vegetais e humanos, podendo em alguns casos estabelecer interações intracelulares. Em relação a *Pleurotus ostreatus* foi constatada a presença de bactéria do CBC em cultura *in vitro* deste cogumelo, todavia, esta bactéria apresentou características atípicas em relação as outras espécies do CBC, como cultivo fastidioso. O isolado também apresentou estruturas bacterianas pleomórficas no interior de suas hifas. Neste trabalho, amostras de *P. ostreatus* crescidas em bagaço de cana-de-açúcar esterilizado foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET). Também foram observadas hifas em meio de cultura-ágar-água utilizando a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) associada à microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). As observações feitas por MEV e MET revelaram a presença de estruturas pleomórficas extracelulares, e a presença de estruturas bacterianas intracelulares. Quanto ao FISH, este demonstrou uma correlação entre as estruturas celulares pleomórficas com o CBC. Esta correlação foi obtida por meio de sondas específicas para este grupo. Os resultados deste trabalho indicam portanto, a presença de uma bactéria atípica do CBC de caráter pleomórfico associada às hifas de *P. ostreatus*.

Palavras chaves. hibridização *in situ* fluorescente, *Pleurotus ostreatus*, Complexo *Burkholderia cepacia*, ultraestrutura..

Abstract

The *Burkholderia cepacia* complex (Bcc) is a set of species that may interact with fungi, protozoans, plants and humans, and, in some cases, they are even able to establish intracellular interactions. As for *Pleurotus ostreatus*, the presence of the Bcc bacteria *in vitro* culture of this fungus was verified although this bacteria showed characteristics atypical to the other species of the Bcc as slow growing cultivation. The isolate also showed pleomorphic bacterial structures inside its hyphae. In this study, the samples of *P. ostreatus* grown in sterilized sugarcane bagasse were analyzed by the scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Besides, the hyphae were observed in an agar/water culture medium by using the fluorescent *in situ* hybridization technique (FISH) associated with the confocal laser scanning microscopy (CLSM). The SEM and TEM observations demonstrated the presence of extracellular pleomorphic structures and the TEM also confirming the presence of intracellular bacterial structures. With relation to the FISH, it showed the correlation between the pleomorphic cellular structures and the Bcc, this correlation having been obtained by means of specific probes for this group. The *in situ* hybridization also showed both extra- and intracellular location of the bacteria. Therefore, the results of this study show the presence of an atypical bacteria of the Bcc of pleomorphic character associated with the hyphae of *P. ostreatus*.

Key words: fluorescent *in situ* hybridization, *Pleurotus ostreatus*, *Burkholderia cepacia* complex, ultrastructure.

4.1 Introdução

As interações entre células eucarióticas e bactérias variam quanto a sua natureza, assumindo desde relações parasíticas até mutualísticas. Para que estas interações se estabeleçam, um complexo intercâmbio de sinais se dá entre os dois genomas podendo culminar com a colonização intracelular das células eucarióticas (MARGULIS; CHAPMAN, 1998).

Segundo Coenye e Vandamme (2003), o grupo denominado “complexo *Burkholderia cepacia*” (CBC) constitui um conjunto de espécies que podem interagir com fungos, protozoários, espécies vegetais (fitopatogênicos e fixadores de nitrogênio), humanos (patógenos em infecções hospitalares e a Síndrome Cepacia) etc. No caso de alguns protozoários, fungos e macrófagos já existem relatos de que estas interações podem ocorrer em nível intracelular.

A identificação de endossimbiontes (simbiontes intracelulares) é muitas vezes dificultada pelo fato destes microrganismos serem de difícil cultivo. Uma estratégia que vem sendo utilizada nestes casos é o ciclo completo de análise do rRNA (full-cycle rRNA analysis). Esta é uma combinação de técnicas que primeiramente identifica a sequência de genes ribossomais do endossimbionte por meio de PCR /seqüenciamento. Posteriormente realiza-se um exame computacional com estudo filogenético e projetos de sondas específicas. Numa última etapa é feita a confirmação da sequência em questão com a visualização do endossimbionte por meio de estudos *in situ* (FISH) com as sondas desenvolvidas (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995).

Pode se ainda, estabelecer correlações entre as estruturas reconhecidas pela hibridização *in situ* com outras observadas por meio de técnicas de microscopia diversas. Neste sentido, as microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e de transmissão (MET) possuem a vantagem de gerar imagens com uma grande riqueza de detalhes tanto de superfície (MEV) como de estruturas intracelulares (MET).

Yara (capítulo 2) constatou a presença de uma *Burkholderia sp.* do CBC em culturas de *Pleurotus ostreatus* G2, (Fungi; Basidiomycota) por meio de seqüenciamento do rDNA bacteriano. Este estudo demonstrou que a bactéria possui características atípicas se comparada com os demais membros do CBC, como por exemplo, crescimento fastidioso, sensibilidade a variações osmóticas e morfologia de colônias.

Além destas constatações, Yara et al. (1999), utilizando a microscopia eletrônica de transmissão (MET), demonstrou a presença de estruturas pleomórficas que sugerem a existência de bactérias intracelulares com parede celular fina ou mesmo sem parede celular em hifas de *P. ostreatus* G2. Assim o presente estudo teve como objetivos:

Confirmar se as estruturas pleomórficas observadas em microscopia eletrônica estão relacionadas com estruturas bacterianas.

Confirmar se as seqüências obtidas por PCR estão correlacionadas com as estruturas observadas em microscopia de transmissão, utilizando a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) associada à microscopia confocal de varredura a laser (MCVL).

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Revisão Bibliográfica

O gênero *Burkholderia* pertence a subdivisão β -proteobactéria, sendo que o complexo *Burkholderia cepacia* (CBC) representa um grupo de espécies distintas, porém fenotipicamente semelhantes, que congrega nove espécies bem definidas de bactérias. Estas espécies foram descritas inicialmente como genomovares, que possuem moderados níveis de hibridização DNA/DNA e alto nível de similaridade do 16S rDNA e do gene *recA* (COENYE; VANDAMME, 2003). Os genomas contem a presença incomum de dois a quatro replicons (cromossomos) de tamanho variável de 5 a 9 Mpb com grande quantidade de seqüências de inserções (LESSIE et al., 1996).

A primeira espécie foi descrita por Burkholder (1950) como agente fitopatogênico em *Allium cepa* (cebola) o qual originou o nome atual do complexo *Burkholderia cepacia*. As espécies deste complexo são ubíquas e estão relacionadas a vários processos como: a) processos infecciosos graves como a Síndrome Cepacia em pacientes portadores de fibrose cística (JONES; DODD; WEBB, 2001), b) colonização do solo de rizosfera de diversas espécies de plantas (BALANDREAU et al., 2001), c) potencial biotecnológico para controle biológico de fitopatógenos (COENYE et al., 2001), biorremediação (YEAGER; BOTTOMLEY; ARP, 2001) e produção de compostos bioativos (KANG et al., 1998).

De forma geral estas espécies são poucos exigentes do ponto de vista nutricional podendo se desenvolver em diversos meios de cultura (DSMZ, 2005; ATCC, 2005; BCCM, 2005). Gilligan e Whittier (1999) descreveram uma caracterização microbiológica do CBC, como

sendo bacilos Gram negativos aeróbicos, não formadores de esporos e não fermentadores. Nos meios seletivos PC e OFPBL ressaltam os autores, apresentam colônias de bordas lisas e ligeiramente elevadas após três dias de cultivo, além disso em meio MacConkey Ágar, as colônias caracterizam-se pela coloração rosa escuro a vermelho após 4 a 7 dias (oxidação da lactose), acrescentam os autores que a maioria dos isolados apresenta odor característico e suas colônias não são pigmentadas, porém em meios de cultivo contendo ferro podem produzir pigmento amarelo.

Uma das particularidades de membros deste complexo está na capacidade de interação com plantas e com animais. Isto ocorre devido a conservação de mecanismos de virulência necessários para a infecção (CAO; BALDINI; RAHME, 2001). O CBC também pode colonizar intracelularmente vários organismos eucariotos (CIERI et al., 2002; LAMOTHE; THYSSEN; VALVANO, 2004). Em relação a fungos, Levy et al. (2003) demonstraram a colonização intracelular destas bactérias em fungos micorrízicos Vesículo Arbuscular.

No que tange as técnicas de microscopia utilizadas para o estudo de interações, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite a visualização das interfaces entre as superfícies das bactérias e hospedeiros, e possibilita, por exemplo, a observação do processo de adesão mediada pelo flagelo em *B. pseudomallei* (INGLIS et al., 2003) ou a formação de biofilme em processos de patogênese de *Pseudomonas aeruginosa* em raízes (WALKER et al., 2004).

Por sua vez, a microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma ferramenta utilizada para a observação de estruturas intracelulares ou que demandem grande resolução. Por estas características, o MET é utilizado no estudo de bactérias endossimbiontes, pois permite a visualização intracelular da bactéria com detalhes, como por exemplo, se a colonização ocorre em vacúolos (CHU et al., 2004), no citoplasma (VAN KIRK; HAYES; HEINZEN, 2000), mitocôndrias (BENINATI et al., 2004) ou mesmo do núcleo das células (ALVERCA et al., 2002).

Além destas técnicas, a hibridização *in situ* fluorescente (FISH) associada a microscopia confocal de varredura a laser (MCVL) também pode ser usada nos ensaios de interação. Um exemplo do potencial da associação FISH/MCVL foi o estudo da localização precisa de dois endossimbiontes da cochonilha dos citros (DOHLEN et al., 2001). A boa qualidade de imagem do MCVL se deve ao fato que este permite a captação de um único plano focal, mapeando

precisamente as formas. Além de viabilizar a montagem virtual de estruturas 3D por meio de programas de computador que combinam os diversos planos focais gerados pelo microscópio (SCHMID et al., 2004).

A técnica de FISH relaciona as estruturas visualizadas com seqüências de sondas de DNA específicas para grupos de microrganismos. Este aspecto é relevante, pois fecha o ciclo completo de análise do rRNA para microrganismos não cultiváveis descrito por Amann; Ludwig e Schleifer (1995). Este tipo de abordagem inicia-se pela amplificação e sequenciamento de genes ribossomais de amostras ambientais, passa por análise computacional dos dados, que por sua vez viabiliza o projeto de sondas para FISH que podem ser utilizadas para validar as seqüências ribossomais obtidas na primeira fase do ciclo.

Yara (capítulo 2) constatou a presença de *Burkholderia* sp. atípica, isolada a partir de cultura *in vitro* de *P. ostreatus*. Neste trabalho também foi constatado que o isolado apresentava similaridade com o grupo do CBC. Todavia esta bactéria apresentou diferenças substanciais em relação aos demais membros do CBC, como por exemplo, quanto a taxa de crescimento e método de cultivo. Portanto, torna-se interessante esclarecer a interação *Burkholderia* sp. e *P. ostreatus*, que pode ser abordada por meio das diversas técnicas de microscopia como MET, MEV e FISH, além de correlacionar a seqüência obtida com estruturas observadas.

4.2.2 Material e Métodos

4.2.2.1 Condições de cultivo de *Pleurotus ostreatus*

Utilizou-se neste estudo o isolado G2 do cogumelo *P. ostreatus*, obtido por Yara (capítulo 2) que foi coletado em Mogi das Cruzes/ São Paulo /Brasil (23°31' latitude sul, 46°11' longitude oeste), região produtora de cogumelo. Os meios de cultura usados foram: a) MEA (extrato de malte 20g/L, extrato de levedura 2g/L, ágar 20g/L) para a manutenção do isolado; b) Meio de bagaço de cana-de-açúcar (bagaço de cana moído, lavado em água corrente e esterilizado a 120°C por 30min a 1atm) para estudos de microscopia eletrônica de varredura e transmissão; e c) Meio água-ágar (ágar 18g/L) para análise por FISH. As culturas do fungo foram mantidas a 28°C em incubadora B.O.D.

As linhagens bacterianas de referência utilizadas na otimização do FISH foram *B. anthina* tipo DSM 16086, (CBC), *B. fungorum* DSM 17061 e *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* tipo DSM 2402 da coleção do Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

und Zellkulturen GmbH (DSMZ / Alemanha). Estas foram cultivadas e mantidas de acordo com as recomendações do DSMZ (2005).

4.2.2.2 Microscopia de eletrônica de varredura (MEV)

Amostras de bagaço de cana-de-açúcar colonizado pelo fungo foram imersas por 24h em uma solução Karnovsky modificada (25g/L glutaraldeído, 25g/L formaldeído em solução tampão de cacodilato de sódio 0,05M, 0,001 M CaCl_2 , pH 7,2). Em seguida as amostras foram transferidas para uma solução de tetróxido de ósmio (10g/L) diluída em tampão de cacodilato de sódio por uma hora. Subseqüentemente as amostras foram desidratadas por 10min em uma série de soluções de acetona (30, 50, 70, e 100%) e os solventes foram removidos por vácuo (secagem ao ponto crítico). As amostras foram dispostas em suportes de alumínio (stubs) e cobertas com ouro- paládio em mineralizador Balzer “sputtering” SED030. O material foi observado no microscópio eletrônico de varredura LEO 435 VP (Leo Electron Microscopy, Cambridge, UK). As imagens geradas foram processadas usando o software Corel Photopaint 10.

4.2.2.3 Microscopia de eletrônica de transmissão (MET)

Para estudos de ultraestrutura, pequenas amostras de bagaço de cana-de-açúcar colonizadas pelo fungo foram embebidas em solução de gelatina (120g/L de gelatina e 0,1g/L azida sódica), fixada por uma hora em solução de Karnovsky modificada, pós-fixada por duas horas em solução de tetroxido de ósmio (10g/L). Em seguida as amostras foram tratadas durante uma noite em solução de acetato de uranila (5g/L), desidratadas em série de acetona e embebidas em resina Spurr de baixa viscosidade. Após a produção de cortes ultrafinos as amostras foram coradas em solução de acetato de uranila (30g/L) e em solução de Reynold (citrato de chumbo 35,2g/L, nitrato de chumbo 26,6g/L, pH 12). Os cortes foram posteriormente examinados em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 900.

4.2.2.4 Fixação do micélio e hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

A fixação do micélio para observação por FISH seguiu o protocolo descrito por Yara (capítulo 3).

Após a fixação as lâminas foram desidratadas em uma série de etanol (50, 80 e 96%) por 3min cada.

A hibridização foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido por Manz et al. (1992). As lâminas foram montadas com AF1 (Citifluor Ltd.) para a observação em microscopia confocal de varredura a laser.

4.2.2.5 Seleção e avaliação das sondas de oligonucleotídeos para FISH

A seleção de sondas de oligonucleotídeos foi realizada a partir da sequência rDNA (DQ163907) obtida por Yara (capítulo 2), que indicou que a bactéria possuía similaridade com espécies pertencentes ao CBC. Posteriormente a sequência foi submetida ao probe set (PROBEBASE, 2005) recurso disponibilizado pelo probeBase (LOY; HORN; WAGNER, 2003). O software sugeriu algumas sondas já descritas na literatura, destas foram selecionadas; SUBU1237, Burkho e Burcep. Além destas foram também selecionados as sondas EUBmix (uma mistura equimolar de EUB338, EUB338 II e EUB338 III, universal para todas bactérias) como controle positivo e NONEUB e GAM42a como controles negativos

Os oligonucleotídeos selecionados estão listados na Tabela 4.1 na qual pode-se observar também as demais características das sondas. A concentração de formamida para os ensaios de hibridização de hifas foi de 35% seguindo o protocolo sugerido por Manz et al. (1992).

Tabela 4.1 - Sondas de oligonucleotídeos utilizada nos ensaios de FISH

Sonda	Sequência (5'-3')	Alvo rRNA	Especificidade	Referência
EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	16S, 338–355	Maioria das bactérias	Amann et al. (1990)
EUB338 II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	16S, 338–355	Planctomycetales	Daims et al. (1999)
EUB338 III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	16S, 338–355	Verrucomicrobiales	Daims et al. (1999)
SUBU1237	CCCTCTGTTCCGACCATT	16S, 1237–1254	<i>Burkholderia</i> spp., <i>Sutterella</i> spp.	Stoffels et al. (1998)
Burkho	ACCCTCTGTTCCGACCAT	16S, 1236–1253	<i>Burkholderia</i> spp	Hogardt et al. (2000)
Burkho competidor	ACCCTCTGTCCCGACCAT	16S, 1236–1253	Competidor de Burkho	Neste trabalho
Burcep	CTGTGCGCCGGTTCTCTT	16S, 1031–1048	Complexo <i>Burkholderia cepacia</i> (CBC)	Hogardt et al. (2000)
NONEUB	ACTCCTACGGGAGGCAGC		Sequência complementar a EUB338 (controle negativo)	Wallner; Amann e Beisker (1993)
GAM42a	GCCTTCCCACATCGTTT	23S, 1027–1043	Gama proteobacteria	Manz et al. (1992)
GAM42a competidor	GCCTTCCCACATTCGTTT	23S, 1027–1043	Competidor para GAM42a	Manz et al. (1992)

Todas as sondas foram procedentes da Thermo Hybaid Division Interactiva GmbH (Alemanha). Foram utilizados os seguintes fluorocromos; indocarbocianina (Cy3), indodicarbocianina (Cy5), ou 5(6)-Carboxifluoresceína-N-hidroxissuccinimide ester (FLUOS), todos ligados na extremidade 5' dos oligonucleotídeos.

As condições de estrigência das sondas das Burkho/Cy3 e Burcep/Cy3 (hibridização *in situ*) foram determinadas em linhagens de referência. Para a sonda Burkho/Cy3, específicas para o gênero *Burkholderia*, o ensaio foi realizado utilizando mistura equimolar de Burkho/Cy3 e Burkho competidor, como controle negativo de hibridização para a sonda Burkho a linhagem *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* DSM 2402 e como controle positivo as linhagens *B. fungorum* DSM 17061 e *B. anthina* DSM 16086 .

A sonda Burcep reconhece membros do CBC, e portanto foi usada *B. anthina* DSM 1608, como controle positivo e como controle negativo as linhagens *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* DSM 2402 e *B. fungorum* DSM 17061.

O grau de estrigência foi feito com incrementos nas porcentagens de 0, 20, 35, 55 e 70% de formamida. O ajuste na quantidade de sais na solução tampão foi realizado de acordo com a fórmula de Lathe (1985).

A fluorescência da sonda foi realizada de modo semi-quantitativo de acordo com Neef et al. (1996). Como referência os ensaios foram realizados com a sonda EUBmix/FLUOS. A concentração de formamida escolhida foi baseada na observação de sinal claro no microrganismo alvo e ausência de sinal em microrganismos não alvos.

4.2.2.6 Observações em microscópio confocal de varredura a laser (MCVL)

As observações das amostras foram realizadas em MCVL, LSM 510 Axiovert 100M, Zeiss, equipado com laser de argônio (488nm), e dois lasers de hélio-néon (543 e 633nm), apropriados para excitar FLUOS, Cy3 e Cy5, respectivamente. Lentes Apochromat 63x/1.2 de imersão em água foram usadas para observação das amostras. Imagens monocromáticas foram obtidas de cada comprimento de onda usado. Cores artificiais foram aplicadas para cada uma destas imagens monocromáticas. Assim, para o comprimento de onda 488nm foi usada a cor verde, para 543nm a cor vermelha e 633nm a cor azul. A sobreposição de imagens foi feita a partir do pacote de software LSM 510, versão 3.0.

4.2.3 Resultados

4.2.3.1 Microscopia de eletrônica de varredura (MEV)

As imagens geradas por MEV revelaram uma grande quantidade de estruturas bacterianas extracelulares pleomórficas. Estas estruturas estavam preferencialmente junto à hifa de *P. ostreatus* G2 (Figura 4.1). Nelas foram observadas estruturas cocóides e filamentosas de tamanho variável (Figuras 4.1a e 4.1b, respectivamente).

Figura 4.1 - Estruturas bacterianas desenvolvendo em hifas de *P. ostreatus* G2; a) vista de estruturas arredondadas pleomórficas junto a hifas; b) estruturas filamentosas próximas a um grampo de conexão

4.2.3.2 Microscopia de eletrônica de transmissão (MET)

Em relação a MET, a técnica revelou a presença de estruturas bacterianas tanto intra como extracelulares (Figuras 4.2A e 4.2B, respectivamente). As bactérias encontradas no interior de vacúolos se mostraram extremamente pleomórficas e aparentemente não possuíam parede celular ou apresentavam parede extremamente fina (Figura 4.2A). Em relação as estruturas extracelulares foi observado que estas poderiam estar junto a hifa ou próxima ao bagaço (Figura 4.2B).

Figura 4.2 - Estruturas bacterianas desenvolvendo-se em hifas de *P. ostreatus* G2; a) Detalhes de hifas apresentando vacúolos com bactérias pleomórficas no seu interior, as estruturas variaram de cocóides (setas preta) até filamentosas (seta brancas), aparentemente não possuem parede celular; b) estruturas cocóides (setas pretas) localizadas junto a hifa ou próximas ao bagaço (estrela)

4.2.3.3 Seleção e avaliação das sondas de oligonucleotídeos para FISH

O ensaio de extringência envolvendo a mistura equimolar de Burkho/Cy3 e Burkho competidor revelou que a partir de 20% de formamida não havia hibridização entre a sonda e *A. xylooxidans* subsp. *xylooxidans* DSM 2402, sem a diminuição aparente do sinal dos controles positivos (*B. fungorum* DSM 17061 e *B. anthina* DSM 16086), como observado na tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Ensaio de aumento da estringência utilizando-se concentrações crescentes de formamida para mistura equimolar de Burkho/Cy3 e Burkho competidor

Linhagem	% Formamida					
	0		20		35	
	EUBmix/ FLUOS	Burkho/Cy3 Burkho/comp	EUBmix/ FLUOS	Burkho/Cy3 Burkho/comp	EUBmix/ FLUOS	Burkho/Cy3 Burkho/comp
<i>B. anthina</i> DSM 16086	++ ^a	++	++	++	++	++
<i>B. fungorum</i> DSM 17061	++	++	++	++	++	++
<i>A. xylooxidans</i> DSM 2402	++	++	++	-	++	-

Linhagem	% Formamida			
	55		70	
	EUBmix/ FLUOS	Burkho/Cy3 Burkho/comp	EUBmix/ FLUOS	Burkho/Cy3 Burkho/comp
<i>B. anthina</i> DSM 16086	+ ^b	+	- ^c	-
<i>B. fungorum</i> DSM 17061	+	+	-	-
<i>A. xylooxidans</i> DSM 2402	+	-	-	-

^a Claro sinal emitido pela sonda^b Sinal observável de baixa intensidade^c Nenhum sinal observável pela sonda

Por outro lado, Burcep/Cy3 apresentou sinal no controle positivo (*B. anthina* DSM 16086) até 55% de formamida e praticamente não apresentou sinal visível nos controles negativos (*B. fungorum* DSM 17061 e *A. xylooxidans* subsp. *xylooxidans* DSM 2402), como observado na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 - Ensaio de aumento da estringência utilizando-se concentrações crescentes de fomamida para Burcep/Cy3

Linhagem	% Formamida					
	0		20		35	
	EUBmix/ FLUOS	Burcep/Cy3	EUBmix/ FLUOS	Burcep/Cy3	EUBmix/ FLUOS	Burcep/Cy3
<i>B. anthina</i> DSM 16086	++ ^a	++	++	++	++	++
<i>B. fungorum</i> DSM 17061	++	-	++	-	++	-
<i>A. xyloxydans</i> DSM 2402	++	-	++	-	++	-

Linhagem	% Formamida			
	55		70	
	EUBmix/ FLUOS	Burcep/Cy3	EUBmix/ FLUOS	Burcep/Cy3
<i>B. anthina</i> DSM 16086	+ ^b	+	- ^c	-
<i>B. fungorum</i> DSM 17061	+	-	-	-
<i>A. xyloxydans</i> DSM 2402	+	-	-	-

^a Claro sinal emitido pela sonda^b Sinal observável de baixa intensidade^c Nenhum sinal observável pela sonda

4.2.3.4 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH) em hifas

Quanto a hibridização em hifas de *P. ostreatus* G2, as sondas EUBmix, SUBU1237, Burkho e Burcep apresentaram sinais visíveis. Por outro lado, os controles negativos (NONEUB e GAM42a) não emitiram qualquer sinal observável.

A combinação das sondas Burcep/Cy3 e SUBU1237/Cy5 demonstrou que as sondas reconhecem as mesmas estruturas celulares, sugerindo assim que tal estrutura possui seqüências 16S rRNA de CBC, neste caso o sinal observado é de cor magenta (combinação de vermelho e azul) (Figura 4.3A).

As combinações das cores primárias podem ser observadas na Figura 4.3B, onde os círculos representam as cores primárias e as combinações de cores estão representada pelas interseções dos círculos.

Figura 4.3 - A) Detecção de *Burkholderia* sp. atípica pelas sonda Burcep/Cy3 e SUBU1237/Cy5, sendo que os sinais magenta demonstram que as duas sondas hibridizaram no mesmo local; B) cores primárias e sua sobreposição

As análises por FISH associado a microscopia de varredura confocal a laser demonstra também a presença de bactérias pleomórficas de diversos tamanhos tanto extracelulares (Figura 4.4A), como intracelulares (Figura 4.4B).

Figura 4.4 - Estruturas bacterianas detectadas por FISH em hifas de *P. ostreatus* G2; A) estruturas extracelulares detectadas por EUBmix/Cy3; B) estruturas bacterianas intracelulares e cocóides detectadas por EUBmix/Cy3 e SUBU1237/Cy5

Neste sentido, a Figura 4.5 evidencia a localização intracelular das estruturas bacterianas, pela observação da montagem por computador de diversos cortes ópticos. As montagens dos cortes estão localizados nas bordas a cima e a direita da Figura 4.5, nelas pode-se observar o sinal ciano, que significa a combinação dos sinais de EUBmix/FLUOS (verde) e SUBU1237/Cy5 (azul).

Figura 4.5 - Bactérias intracelulares detectadas por EUBmix/FLUOS, SUBU1237. A parede celular foi evidenciada por lecitina de trigo (WGA) associada a TRITC (em vermelho) nas margens da figura a montagem da sobreposição de vários planos

Podem ser observadas as possíveis correspondências entre as estruturas observadas por FISH e MET (Figura 4.6). Por meio dessas técnicas foram observadas estruturas globosas aparentemente interligadas, filamentosas e grandes cocóides.

Figura 4.6 – Comparação entre estruturas bacterianas de *Burkholderia sp.* por FISH e MET; a) *Burkholderia sp.* observada com FISH EUBmix/Cy3 e SUBU1237/Cy5 no interior das hifas, b) *Burkholderia sp.* observada no interior de vacúolos

4.2.4 Discussão

As principais características observadas pelos três métodos de microscopia estão resumidas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Comparação das estruturas observadas pelos três métodos de microscopia utilizados (MET, MEV e FISH)

Característica observada	Método
Estruturas pleomórficas	MET, MEV e FISH
Localização intracelular da bactéria	MET e FISH
Localização extracelular da bactéria	MET, MEV e FISH
Aparentemente sem parede celular ou parede celular fina	MET
Bactéria possui seqüências 16S rDNA de CBC	FISH

Consensualmente, as três técnicas indicaram que a *Burkholderia* sp. possui estruturas pleomórficas, o que a diferencia de todas as outras bactérias do CBC até agora analisadas e até de outras *Burkholderias*, já que estas possuem forma bacilar típica (GILLIGAN; WHITTIER, 1999).

Um caráter atípico da *Burkholderia* sp. isolada de *P. ostreatus* em relação às outras bactérias CBC foi constatado no experimento por MET, onde aparentemente existe a falta da parede celular bacteriana, que tanto pode ser explicada pela ausência desta estrutura *per se*, como também pela eventual presença de uma parede celular de espessura extremamente fina, que impossibilitaria a observação desta por MET no aumento utilizado. Este dado corrobora os obtidos anteriormente por Yara et al. (1999). Por outro lado, o caráter pleomórfico das estruturas reforça a hipótese de ausência de parede celular, pois diversos autores correlacionaram a falta desta estrutura com o pleomorfismo, como descrito em bactérias em formas L (DIENES; BULLIVANT, 1968; DIENES, 1970), em *thermoplasmas* (EDWARDS et al., 2000, GOLYSHINA; TIMMIS, 2005) em *mollicutes* (BIBERFELD; BIBERFELD, 1970, BROWN; TEPLITZ; REVEL, 1974) e em *anaplasmas* (LIN; RIKIHISA, 2003). Além deste aspecto, características microbiológicas previamente observadas por Yara e colaboradores (capítulo 2), quanto a morfologia de colônia, velocidade de crescimento e sensibilidade osmótica podem ser explicados pela falta ou fragilidade da parede celular.

A diminuição da espessura da parede celular ou mesmo perda desta, já foi descrita em várias bactérias que interagem com células eucarióticas. Como exemplos podem ser citados, *Trypanosomatidae* (SOUZA; MOTTA, 1999), células animais (ROTTEM, 2003, SCHMITT-

SLOMSKA; BOUE; CARAVANO 1972), plantas (WALKER et al., 2002), insetos (DOHLEN et al., 2001; SHIGENOBU et al., 2000), cianobacterias em células vegetais (GORELOVA; KORZHENEVSKAYA, 2002), rizóbios em células de leguminosas (VASSE et al., 1990).

As três técnicas utilizadas demonstraram a presença extracelular da *Burkholderia* sp., este último resultado confirma as observações feitas anteriormente por Yara (capítulo 2), em que os autores detectam a presença extracelular da *Burkholderia* sp. por meio de PCR.

A localização intracelular da *Burkholderia* sp. foi constatada pelas técnicas de FISH e MET, confirmando assim os dados previamente obtidos por Yara et al. (1999). Foram também averiguadas algumas semelhanças entre as estruturas observadas nas duas técnicas (Figura 6), por exemplo, foi verificado o caráter pleomórfico das bactérias (variando desde filamentosos a cocóides) e também a correspondência de tamanhos entre as estruturas. Foi constatado ainda por MET que as estruturas estão localizadas no interior de vacúolos. Neste sentido, *B. pseudomallei* e CBC também são descritas como colonizadoras intracelulares em vacúolos de células eucarióticas tanto em amebas (MAROLDA et al., 1999), fungos (LEVY et al., 2003) como em células humanas (CHU et al., 2004, SCHWAB et al., 2002). O caráter inespecífico de colonização de animais e plantas por Burkholderias foi citado por Cao; Baldini e Rahme (2001) e Bernier et al. (2003) como exemplo de conservação de genes de interação bactéria/hospedeiro. Neste sentido, Berg; Eberl e Hartmann (2005) discutem a similaridades entre a colonização das raízes e a colonização de tecido humanos que gerariam então a capacidade de espécies do CBC em estabelecer relações íntimas com diversas células eucarióticas.

A técnica de FISH aliada a MCVL revelou que as sondas preditas pelo programa probe set (LOY; HORN; WAGNER, 2003) a partir da sequência do gene 16S rDNA determinada por Yara (capítulo 2) foram eficazes para a detecção da endobactéria *Burkholderia* sp. Além disso, esta técnica validou a sequência previamente obtida anteriormente por comprovar a capacidade de hibridização de quatro sondas (EUBmix, SUBU1237, Burkho e Burcep) que abrangem pelo menos três regiões distintas do gene 16S. O uso de FISH associado a CSLM, tem sido uma importante ferramenta para demonstrar o processo de endossimbiose de várias bactérias intracelulares em fungos (BIANCIOOTTO et al., 2000, BARBIERI et al., 2000, BERTAUX, et al., 2003), não obstante este é o primeiro relato da detecção de estruturas pleomórficas utilizando esta técnica, isto pode ser atribuído talvez pela adaptação do protocolo feito por Yara (capítulo 3), que foi especialmente desenvolvido para *Burkholderia* sp. atípica e utilizado neste trabalho.

A associação dos dados obtidos por MEV, MET e FISH indicaram que esta *Burkholderia* sp. isolada de *P.ostreatus* G2 é atípica, tendo o caráter pleomórfico uma constante. Poder-se-ia especular que esta *Burkholderia* sp. seria uma forma L de uma das espécies descritas do CBC, entretanto a não reversão a forma bacilar, bem como a tendência deste isolado em apresentar taxas de crescimento maiores em sistemas de cultivo que dependem da presença do fungo, como descrito por Yara (capítulo 2), sugerem algum tipo de especialização de isolado ou ainda uma nova espécie ainda não descrita.

Na literatura, endobactérias obrigadas foram descritas pelo grupo de Paola Bonfante, que demonstrou a transmissão vertical (BIANCIOOTTO et al., 2004) e também obteve evidências das possíveis funções destes endossimbionte (JARGEAT et al., 2004), por outro lado, Bertaux et al. (2005) demonstrou a presença de endobactérias facultativas em *Laccaria bicolor* S238N em amostras não axênicas. Endobactérias sem parede celular evidente, colonizando fungos, foram descritas em *Humicola* - Ascomycota (LEPIDI et al., 1975). Além destes relatos, também houve descrição em *Aphanomyces* - Oomycetes, stramenopiles por Heath e Unestam (1974). Entretanto, em nenhum destes relatos se aventou a possibilidade da existência de uma *Burkholderia* sp. colonizando estes organismos.

4.3 Conclusões

Os resultados obtidos nesse experimento permitiram concluir que as técnicas de microscopia empregadas (MET, MEV e FISH) indicam a presença de estruturas bacterianas pleomórficas de tamanho e forma variável, de localização extra e intracelular, associadas a hifas de *Pleurotus ostreatus*.

Além disso, o emprego do Microscópio Confocal a Laser (MCVL) associada a FISH permitiu correlacionar as estruturas bacterianas observadas por microscopia eletrônica transmissão com a seqüência do gene 16S rDNA de *Burkholderia* sp. obtida em trabalho anterior, demonstrando o caráter da bactéria estudada.

Referências

ALVERCA, E.; BIEGALA, I.C.; KENNAWAY, G.M.; LEWIS, J.; FRANCA, S. *In situ* identification and localization of bacteria associated with *Gyrodinium instriatum* (Gymnodiniales, Dinophyceae) by electron and confocal microscopy **European Journal of Phycology**, Cambridge, v. 37, p. 523-530, 2002.

AMANN, R.I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic Identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 59, p. 143–169, 1995.

AMANN, R.I.; BINDER, B.J.; OLSON, R.J.; CHISHOLM, S.W.; DEVEREUX, R.; STAHL, D.A. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, p.1919-1925, 1990.

ATCC - AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. Disponível em: <<http://www.atcc.org/Home.cfm>> Acesso em: 11 dez. 2005.

BALANDREAU, J.; VIALARD, V.; COURNOYER, B.; COENYE, T.; LAESENS, S.; VANDAMME, P. *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant-associated bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 982-985, 2001.

BARBIERI, E.; POTENZA, L.; ROSSI, I.; SISTI, D.; GIOMARO, G.; ROSSETTI, S.; BEIMFOHR, C.; STOCCHI, V. Phylogenetic characterization and *in situ* detection of a Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides phylogroup bacterium in *Tuber borchii* Vittad. ectomycorrhizal mycelium. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 5035-5042, 2000.

BCCM - BELGIAN CO-ORDINATED COLLECTIONS OF MICRO-ORGANISMS. Disponível em: <<http://bccm.belspo.be/index.htm>>. Acesso em: 11 dez. 2005.

BENINATI, T.; LO, N.; SACCHI, L.; GENCHI, C.; NODA, H.; BANDI, C. A novel alpha-Proteobacterium resides in the mitochondria of ovarian cells of the tick *Ixodes ricinus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p. 2596-2602, 2004.

BERG, G.; EBERL, L.; HARTMANN, A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, p.1673–1685, 2005.

BERNIER, S. P.; SILO-SUH, L.; WOODS, D. E.; OHMAN, D. E.; SOKOL, P. A. Comparative analysis of plant and animal models for characterization of *Burkholderia cepacia* virulence. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, p. 5306-5313, 2003.

BERTAUX, J.; SCHMID, M.; HUTZLER, P.; HARTMANN, A.; GARBAYE, J.; FREY-KLETT, P. Occurrence and distribution of endobacteria in the plant-associated mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 7, p. 1786-1795, 2005.

BERTAUX, J.; SCHMID, M.; PREVOST-BOURE, N.C.; CHURIN, J. L.; HARTMANN, A.; GARBAYE, J.; FREY-KLETT, P. *In situ* identification of intracellular bacteria related to *Paenibacillus* spp. in the mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 4243-4248, 2003.

BIANCIOOTTO, V.; GENRE, A.; JARGEAT, P.; LUMINI, E.; BECARD, G.; BONFANTE, P. Vertical transmission of endobacteria in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* through generation of vegetative spores. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, p.3600-3608, 2004.

- BIANCIOOTTO, V.; LUMINI, E.; LANFRANCO, L.; MINERDI, D.; BONFANTE, P.; PEROTTO, S. Detection and identification of bacterial endosymbionts in arbuscular mycorrhizal fungi belonging to Gigasporaceae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, p. 4503-4509, 2000.
- BIBERFELD, G.; BIBERFELD, P. Ultrastructural features of *Mycoplasma pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 102, p. 855-861, 1970.
- BROWN, S.; TEPLITZ, M.; REVEL, J. Interaction of mycoplasmas with cell cultures as visualized by electron microscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 71, p. 464-468, 1974.
- BURKHOLDER, W.H. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. **Phytopathology**, St. Paul, v. 40, p. 115-117, 1950.
- CAO, H.; BALDINI, R.L.; RAHME, L.G. Common mechanisms for pathogens of plants and animals. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 39, p. 259-284, 2001.
- CHU, K.K.; MacDONALD, K.L.; DAVIDSON, D.J.; SPEERT, D.P. Persistence of *Burkholderia multivorans* within the pulmonary macrophage in the murine lung. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, p. 6142-6147, 2004.
- CIERI, M.V.; MAYER-HAMBLETT, N.; GRIFFITH, A.; BURNS, J.L. Correlation between an in vitro invasion assay and a murine model of *Burkholderia cepacia* lung infection. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, p. 1081-1086, 2002.
- COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 5, p. 719-729, 2003.
- COENYE, T.; MAHENTHIRALINGAM, E.; HENRY, D.; LiPUMA, J.J.; LAEVENS, S.; GILLIS, M.; SPEERT, D.P.; VANDAMME, P. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p.1481-1490, 2001.
- DAIMS, H.; BRÜHL, A.; AMANN, R.; SCHLEIFER, K.H.; WAGNER, M. The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive probe set. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 22, p. 434-444, 1999.
- DIENES, L. Permanent alterations of the L-forms of *Proteus* and *Salmonella* under various conditions. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 104, p. 1369-1377, 1970.
- DIENES, L.; BULLIVANT, S. Morphology and reproductive processes of the L forms of bacteria. II. Comparative study of L forms and Mycoplasma with the electron microscope. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 95, p. 672-687, 1968.
- DOHLEN, C.D. Von; KOHLER, S.; ALSOP, S.T.; McMANUS, W.R. Mealybug beta-proteobacterial endosymbionts contain gamma-proteobacterial symbionts. **Nature**, London, v. 412, p. 433-436, 2001.
- DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Disponível em: <<http://www.dsmz.de/>> Acesso em: 4 dez. 2005.

EDWARDS, K.J.; BOND, P. L.; GIHRING, T.M.; BANFIELD, J.F. An archaeal iron-oxidizing extreme acidophile important in acid mine drainage. **Science**, Washington, v. 287, p. 1796-1799, 2000.

GILLIGAN, P.H.; WHITTIER, S. *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Brevundimonas*, *Comamonas*, and *Acidovorax*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E. J; PFALLER, M.A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN R.H. (Ed), **Manual of Clinical Microbiology**, 7th ed. Washington D.C.: ASM Press, 1999. chap. 34, p. 526-568.

GOLYSHINA, O.V.; TIMMIS, K.N. *Ferroplasma* and relatives, recently discovered cell wall-lacking archaea making a living in extremely acid, heavy metal-rich environments.

Environmental Microbiology, Oxford, v. 7, p. 1277-1288, 2005.

GORELOVA, O.A.; KORZHENEVSKAYA, T.G. Formation of giant and ultramicroscopic forms of *Nostoc muscorum* CALU 304 during cocultivation with rauwolfia tissues.

Microbiology, Moskva, v. 71 p. 563–569, 2002.

HEATH, I.B.; UNESTAM, T. Mycoplasma-like structures in the aquatic fungus *Aphanomyces astaci*. **Science**, Washington, v. 183, p. 434-435, 1974.

HOGARDT, M.; TREBESIUS, K.; GEIGER, A. M.; HORNEF, M.; ROSENECKER, J.; HEESEMANN, J. Specific and rapid detection by fluorescent *in situ* hybridization of bacteria in clinical samples obtained from cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, p. 818-825, 2000.

INGLIS, T.J.; ROBERTSON, T.; WOODS, D.E.; DUTTON, N.; CHANG, B.J. Flagellum-mediated adhesion by *Burkholderia pseudomallei* precedes invasion of *Acanthamoeba astronyxis*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, p. 2280-2282, 2003.

JARGEAT, P.; COSSEAU, C.; OLA'H, B.; JAUNEAU, A.; BONFANTE, P.; BATUT, J.; BÉCARD, G. Isolation, free-living capacities, and genome structure of "*Candidatus* Glomeribacter gigasporarum," the endocellular bacterium of the mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 186, p. 6876-6884, 2004.

JONES, A.M.; DODD, M.E.; WEBB, A.K. *Burkholderia cepacia*: current clinical issues, environmental controversies and ethical dilemmas. **The European Respiratory Journal**, Copenhagen, v. 17, p. 295-301, 2001.

KANG, Y.; CARLSON, R.; THARPE, W.; SCHELL, M. A. Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and their role in biological control of *Rhizoctonia solani*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 3939-3947, 1998.

LAMOTHE, J.; THYSSEN, S.; VALVANO, M.A. *Burkholderia cepacia* complex isolates survive intracellularly without replication within acidic vacuoles of *Acanthamoeba polyphaga*. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 6, p. 1127–1138, 2004.

LATHE, R. Synthetic oligonucleotide probes deduced from amino acid sequence data. Theoretical and practical considerations. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 183, p.1–12, 1985.

- LEPIDI, A.A.; FILIPPI, C.; GIOVANNETTI M.; NUTI, M.P. Sensitivity to UV treatment and nuclear size of mycoplasma-like organism infected *Hemicola* sp. **Experientia**, Basel, v. 31, p. 1155-1157, 1975.
- LESSIE, T.G.; HENDRICKSON, W.; MANNING, B.D.; DEVEREUX, R. Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 144, p.117-128, 1996.
- LEVY, A.; CHANG, B.J.; ABBOTT, L.K.; KUO, J.; HARNETT, G.; INGLIS, T.J.J. Invasion of spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora decipiens* by *Burkholderia* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 6250-6256, 2003.
- LIN, M.; RIKIHISA, Y. *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, p. 5324-5331, 2003.
- LOY, A.; HORN, M.; WAGNER, M. probeBase - an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Nucleic Acids Research**, London, v.31, p. 514-516, 2003.
- MANZ, W.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; WAGNER, M.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of Proteobacteria: problems and solutions. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 15, p. 593-600, 1992.
- MARGULIS, L.; CHAPMAN, M.J. Endosymbioses: Cyclical and permanent in evolution. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 6, p. 342-345, 1998.
- MAROLDA, C. L.; HAURÖDER, B.; JOHN, M. A.; MICHEL, R.; VALVANO, M.A. Intracellular survival and saprophytic growth of isolates from the *Burkholderia cepacia* complex in free-living amoebae. **Microbiology**, Reading, v. 145, p. 1509-1517, 1999.
- NEEF, A.; ZAGLAUER, A.; MEIER, H.; AMANN, R.; LEMMER, H.; SCHLEIFER, K.H. Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and *in situ* identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 4329-4339, 1996.
- PROBEBASE. Disponível em: <<http://www.microbial-ecology.net/probebase/default.asp?mode=probeset>>. Acesso em: 5 dez. 2005.
- ROTTEM, S. Interaction of mycoplasmas with host cells. **Physiological Reviews**, Washington, v. 83, p. 417-432, 2003.
- SCHMID, M.; ROTHBALLER, M.; ABMUS, B.; HUTZLER, P.; SCHLOTTER, M.; HARTMANN, A. Detection of microbes by confocal laser scanning microscopy. In: KOWALCHUK, G.; DE BRUIJN, F.J.; HEAD, I.M.; AKKERMANS, A.D.L.; VAN ELSAS, J.D. (Ed.). **Molecular Microbial Ecology Manual**, 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. chap. 4.03, p. 875-910.
- SCHMITT-SLOMSKA, J.; BOUÉ, A.; CARAVANO, R. Induction of L-variants in human diploid cells infected by Group A streptococci. **Infection and Immunity**, Washington, v. 5, p. 389-399, 1972.

- SCHWAB, U.; LEIGH, M.; RIBEIRO, C.; YANKASKAS, J.; BURNS, K.; GILLIGAN, P.; SOKOL, P.A.; BOUCHER, R. Patterns of epithelial cell invasion by different species of the *Burkholderia cepacia* complex in well-differentiated human airway epithelia. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70, p. 4547-4555, 2002.
- SHIGENOBU, S.; WATANABE, H.; HATTORI, M.; SAKAKI, Y.; ISHIKAWA, H. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. **Nature**, London, v. 407, p. 81-86, 2000.
- SOUZA, W. de; MOTTA, M.C. Endosymbiosis in protozoa of the Trypanosomatidae family. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 173, p. 1-8, 1999.
- STOFFELS, M.; AMANN, R.; LUDWIG, W.; HEKMAT, D.; SCHLEIFER, K.H. Bacterial community dynamics during start-up of a trickle-bed bioreactor degrading aromatic compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 930-939, 1998.
- VAN KIRK, L.S.; HAYES, S.F.; HEINZEN, R.A. Ultrastructure of *Rickettsia rickettsii* actin tails and localization of cytoskeletal proteins. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, p. 4706-4713, 2000.
- VASSE, J.; BILLY, F. de; CAMUT, S.; TRUCHET, G. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 172, p. 4295-4306, 1990.
- VERMIS, K.; COENYE, T.; LIPUMA, J.J.; MAHENTHIRALINGAM, E.; NELIS, H.J.; VANDAMME, P. Proposal to accommodate *Burkholderia cepacia* genomovar VI as *Burkholderia dolosa* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p.689-691, 2004.
- WALKER, R.; FERGUSON, C.M.; BOOTH, N.A.; ALLAN, E.J. The symbiosis of *Bacillus subtilis* L-forms with chinese cabbage seedlings inhibits conidial germination of *Botrytis cinerea*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 34, p. 42-45, 2002.
- WALKER, T.S.; BAIS, H.P.; DEZIEL, E.; SCHWEIZER, H.P.; RAHME, L.G.; FALL, R.; VIVANCO, J.M. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. **Plant Physiology**, Lancaster, v.134, p 320-331, 2004.
- WALLNER, G.; AMANN, R.; BEISKER, W. Optimizing fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. **Cytometry**, New York, v. 14, p. 136-143, 1993.
- YARA, R.; AZEVEDO, J.L.; MACCHERONI, W. Jr ; KITAJIMA, E.W.; LEITE, B. Mycoplasma associated with cultures of the ligno-cellulolytic fungus *Pleurotus* sp. **Acta Microscopica**, Rio de Janeiro, v. 8, p. 851-852, 1999.
- YEAGER, C.M.; BOTTOMLEY, P.J.; ARP, D.J. Requirement of DNA repair mechanisms for survival of *Burkholderia cepacia* G4 upon degradation of trichloroethylene. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 5384-5391, 2001.