

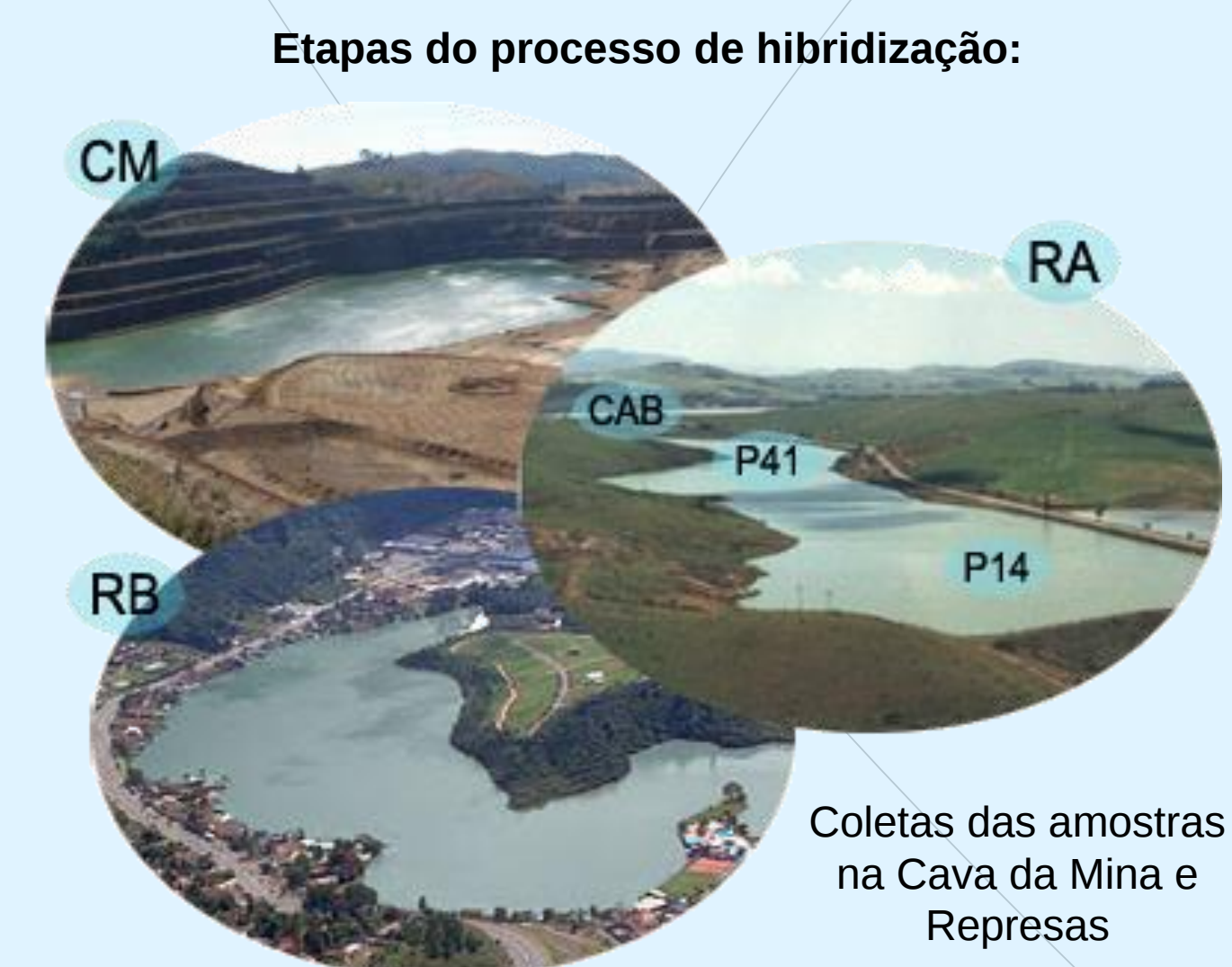
INTRODUÇÃO

Microorganismos como as bactérias (domínios: *Bacteria* e *Archaea*) podem viver em ambientes oligotróficos, a exemplo de efluentes radioativos de mina de urânio e suas bacias de drenagem. Dentre os métodos independentes de cultivo utilizados para verificar a ocorrência dos domínios *Bacteria* e *Archaea* em amostras ambientais está o FISH (Hibridização Fluorescente *In Situ*), que consiste numa técnica de identificação filogenética usada para detectar a presença ou ausência de sequências de DNA ou RNA específicas de cada tipo de organismo estudado [1]. O FISH utiliza-se de sondas, produzidas a partir de fragmentos isolados de DNA ou RNA, capazes de identificar sequências de oligonucleotídeos com alto grau de similaridade, sendo possível identificar tipos específicos de microorganismos em uma amostra.

OBJETIVO

Implantação da técnica independente de cultivo (FISH) para análise dos grupos *Bacteria* e *Archaea* em amostras de efluentes radioativos da Unidade de Tratamento de Minérios na Cava da Mina (CM), represas Antas (RA) nos pontos P14, P41 e CAB e Bortolan (RB) em Poços de Caldas/MG.

METODOLOGIA



Etapas do processo de hibridização:

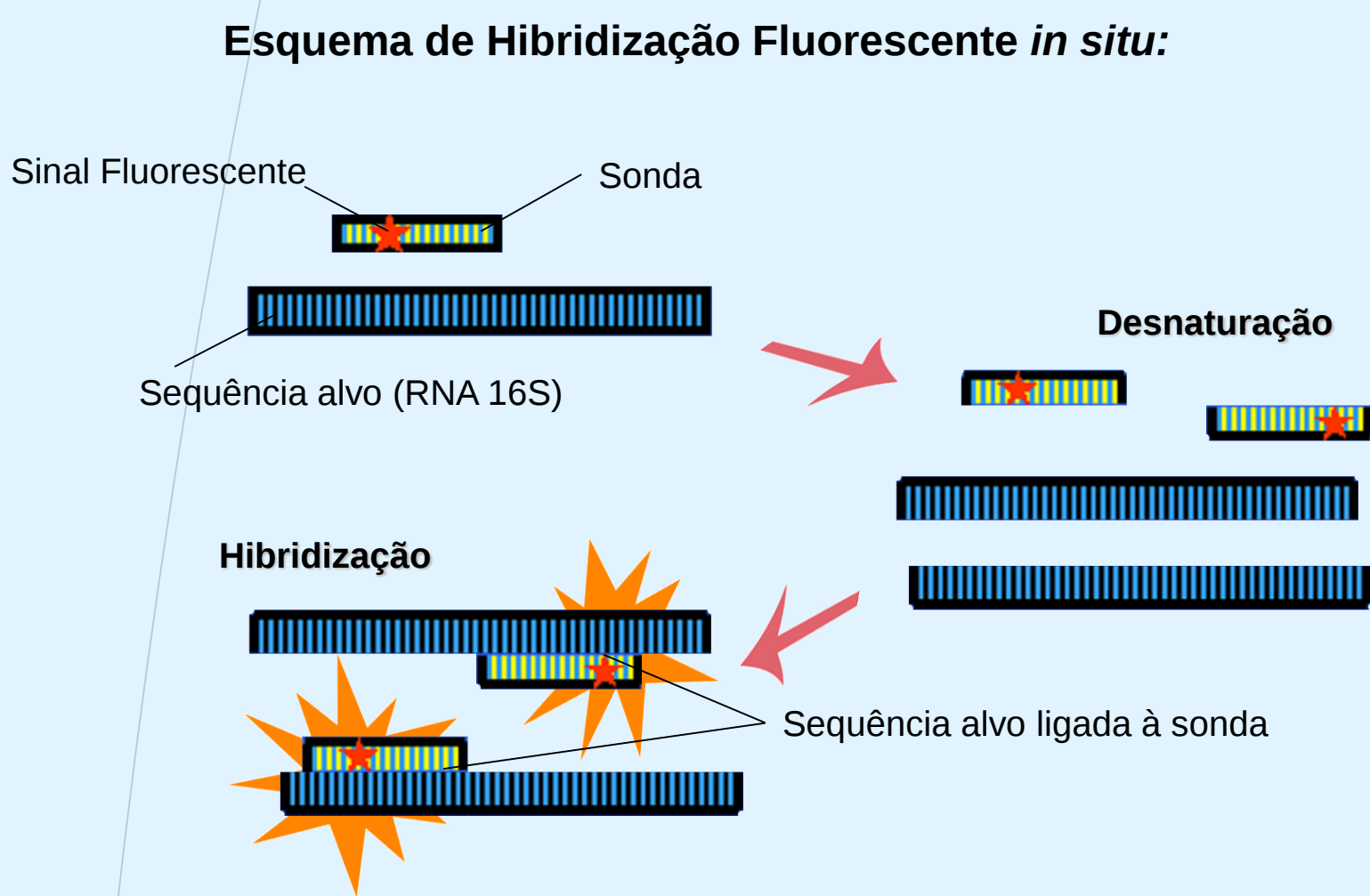


TABELA 1. Amostras (RA, RB e CM) de Jan/09 e Jun/09

Sonda	Hibridização	Formamida	Lavagem	NaCl	Referências
ARC915	45°C/2h	20%	48°C/20min	225mM	[3]
EUB338	46°C/1,5h	20%	48°C/15min	225mM	[4] [5]

TABELA 2. Amostras (RA, RB e CM) de Jan/09 e Jun/09:

Sonda	Hibridização	Formamida	Lavagem	NaCl	Referências
ARC915	46°C/2,5h	20%	48°C/15min	225mM	[1] [6] [7]
EUB338	46°C/2,5h	20%	48°C/15min	225mM	[1] [6] [7]
ARC915	46°C/2,5h	30%	48°C/15min	225mM	[1] [6] [7]
EUB338	46°C/2,5h	30%	48°C/15min	225mM	[1] [6] [7]

TABELA 3. Amostras (RA, RB e CM) de 20/Mai/10:

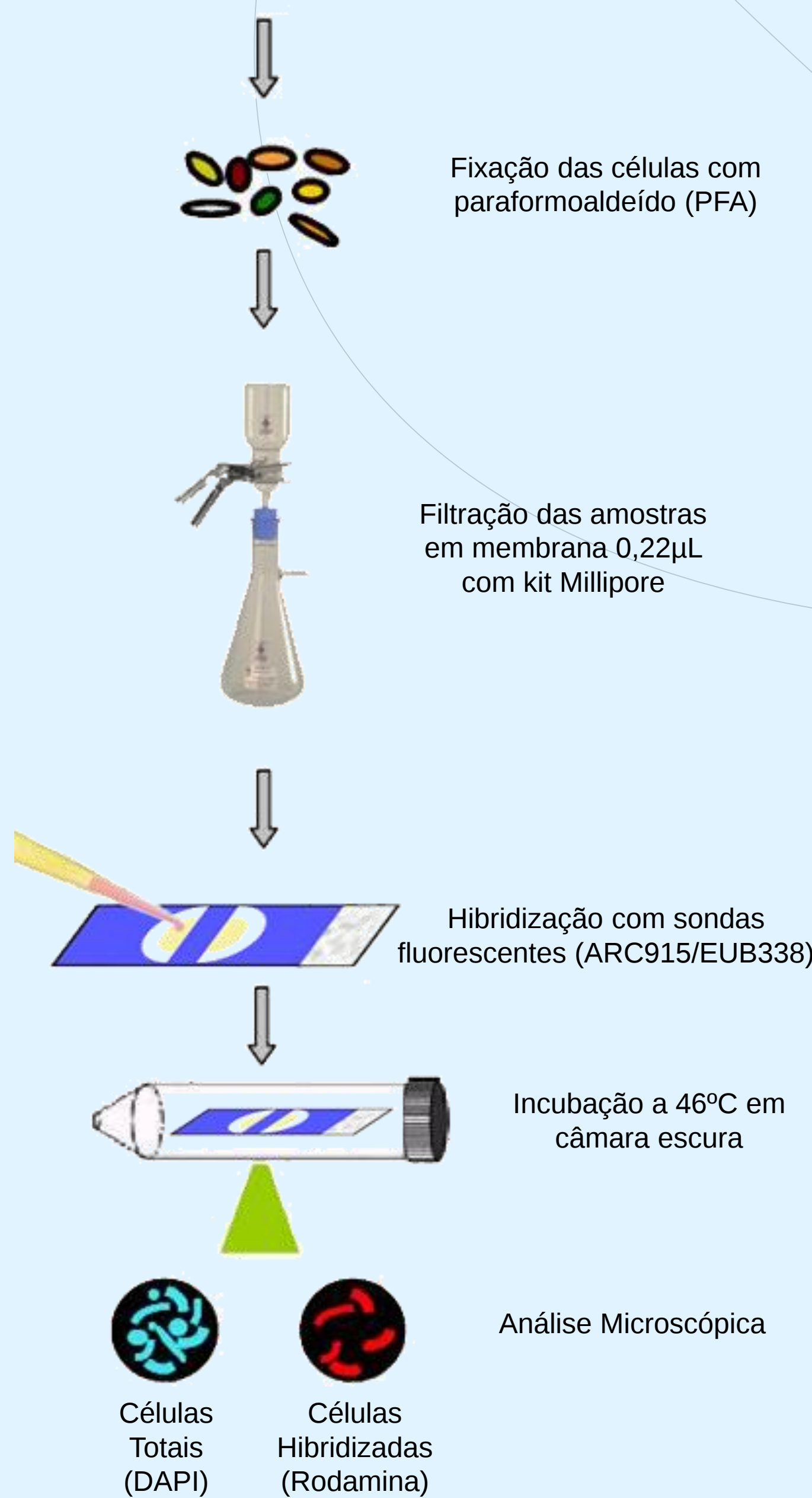
Sonda	Hibridização	Formamida	Lavagem	NaCl	Referências
ARC915	46°C/2,5h	20%	48°C/15min	225mM	[6] [7]
EUB338	46°C/2,5h	20%	48°C/15min	225mM	[6] [7]
ARC915	46°C/2,5h	30%	48°C/15min	225mM	[6] [7]
EUB338	46°C/2,5h	30%	48°C/15min	225mM	[6] [7]
ARC915	42°C/18h	30%	48°C/15min	225mm	[1]
EUB338	42°C/18h	30%	48°C/15min	225mm	[1]

TABELA 4. Amostras Lago LAPOC de 12/Mai/10:

Sonda	Hibridização	Formamida	Lavagem	NaCl	Referências
ARC915	46°C/2,5h	20%	48°C/15min	225mM	[6] [7]
EUB338	46°C/2,5h	20%	48°C/15min	225mM	[6] [7]

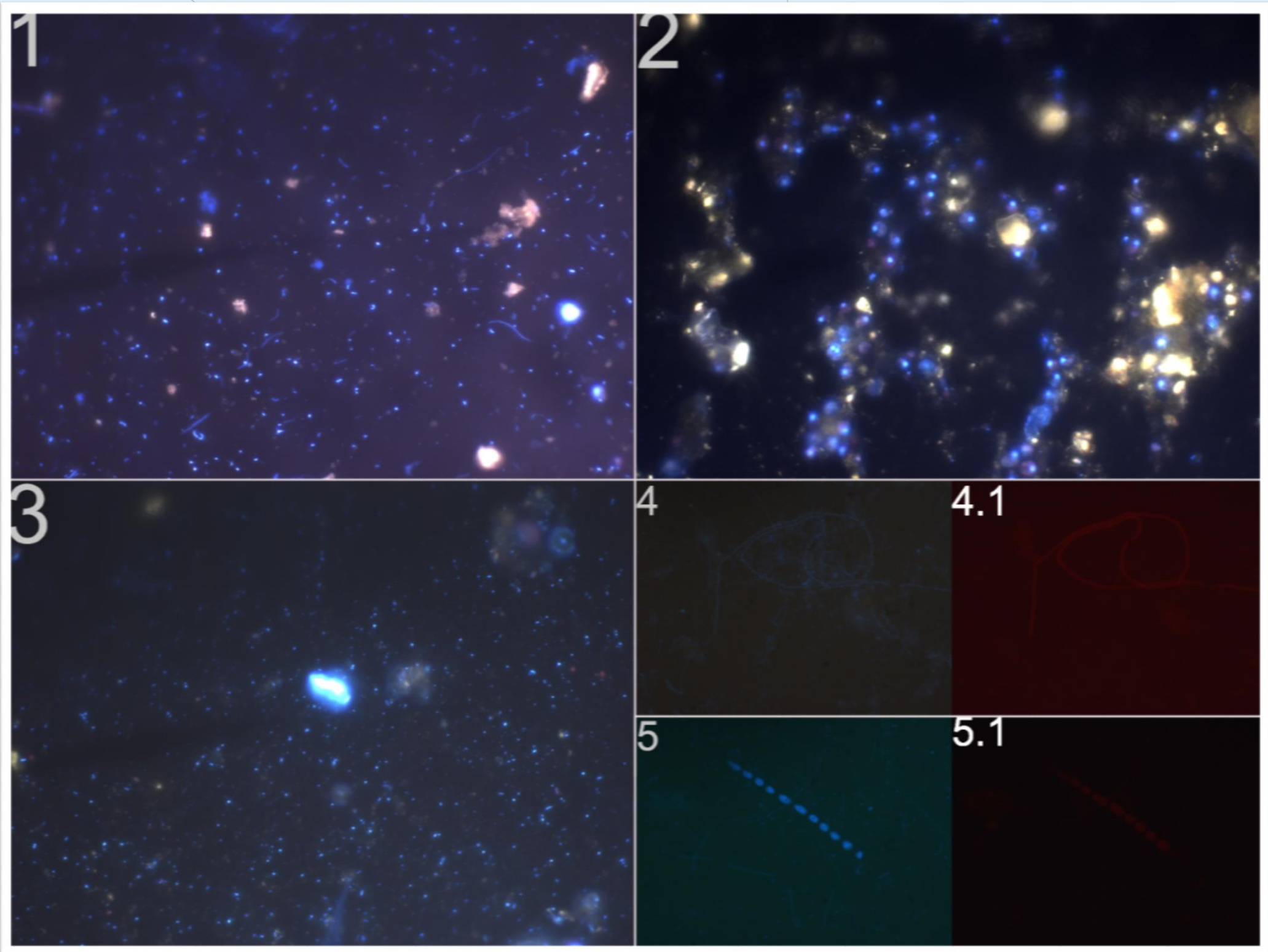
TABELA 5. Amostras Lago LAPOC de 02/Jun/10:

Sonda	Hibridização	Formamida	Lavagem	NaCl	Referências
EUB338	42°C/18h	30%	48°C/15min	225mM	[1]
EUB338	46°C/2,5h	30%	48°C/15min	225mM	[6] [7]



RESULTADOS

Os resultados obtidos utilizando-se a técnica de FISH puderam indicar que apesar da ausência de hibridização quando utilizadas sondas específicas para as seqüências de oligonucleotídeos dos Domínios *Bacteria* e *Archaea*, havia células bacterianas nas amostras de água procedentes dos ambientes aquáticos RA, RB e CM: comprovado pelo uso do corante Dapi. Sendo assim, pretende-se dar continuidade nos testes de implantação da técnica de FISH para amostras de água das represas das RA, RB e CM. De acordo com a literatura [1], inúmeros fatores podem ter influenciado os resultados obtidos até o presente momento.



Células bacterianas coradas com DAPI (azul) em microscópio de fluorescência na execução do método de FISH:

1. Represa das Antas: P14M.
2. Unidade de Tratamento de Minério: CM.
3. Represa Bortolan: RBF.
4. Lago LAPOC – DAPI.
- 4.1. Lago LAPOC – Hibridizado (Rodamina).
5. Lago LAPOC – DAPI.
- 5.1. Lago LAPOC – Hibridizado (Rodamina).

CONCLUSÕES

O método de FISH empregado nesse estudo não demonstrou bons resultados na maioria das amostras, sendo necessários novos testes, a fim de padronizar um protocolo de FISH para os ambientes aquáticos estudados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AMANN, R. I. (1995) In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. In: Molecular Microbial Ecology Manual 3.3.6: 1-15.
- [2] GASOL, J. M. et al (1997) Bacterial size structure as a method to analyze communities. Progress in Microbial Ecology. Brazilian Society for Microbiology. Santos – Brasil.
- [3] HAHN, D. et al. (1992) Detection of micro-organisms in soil after in situ hybridization with rRNA-targeted, fluorescently labeled oligonucleotides. J. Gen. Microbiol. 138, 879-887.
- [4] ABE, D. S. (1998) Desnitrificação e caracterização filogenética de bactérias de vida livre aderidas às partículas no hipolímnio do Lago Kizaki, Japão. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Carlos.
- [5] PERNTHALER, J. et al. (1998) Seasonal community and population dynamics of pelagic *Bacteria* and *Archaea* in a high mountain lake. Appl. Environ. Microbiol. 64:4299-4306.
- [6] SCHRENK, M. O. et al. (1998) Distribution of Thiobacillus ferrooxidans and Leptospirillum ferrooxidans: Implications for generation of acid mine drainage. Science 279, 1519-1522.
- [7] MANZ, W, et al. (1992) Phylogenetic oligonucleotide probe for the major subclasses of Proteobacteria: Problems and solutions. Syst. Appl. Microbiol. 15, 593-600.
- [8] RONQUI, L. B. (2008) Caracterização Limnológica e Avaliação de Efeitos Ambientais causados por Efluentes de Mina de Urânio sobre populações microbianas planctônicas da Represa das Antas, Caldas (MG). Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, pp. 136.