

IMPLANTAÇÃO DE TÉCNICA MOLECULAR INDEPENDENTE DE CULTIVO PARA ANÁLISE DOS GRUPOS EUBACTERIA E ARCHAEA EM EFLUENTES DE MINA DE URÂNIO E SUAS BACIAS DE DRENAGEM (MINAS GERAIS, BRASIL)

Palvo Joubert Borba Júnior, Leilane Barbosa Ronqui e Heliana de Azevedo
Laboratório de Poços de Caldas – LAPOC

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 grupos *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 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 (UTM), represas das Antas (RA) e Bortolan (RB) em Poços de Caldas/MG.

METODOLOGIA

Foram coletadas amostras nos seguintes pontos: RA: P14 superfície, meio e fundo, P41 e Cabeceira e um ponto na RB. Na UTM foi coletada uma amostra no ponto cava da mina (CM). No Laboratório de Poços de Caldas, foram coletadas amostras de água em três lagos de peixes. A partir de cada amostra coletada, foram retiradas alíquotas para a análise do bacterioplâncton: contagem total (DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindole) [2] e análise filogenética dos domínios *Archaea* e *Bacteria* (FISH) [1]. A metodologia descrita foi seguida passo a passo para o início dos testes visando à implantação da técnica de FISH e padronização da metodologia. Após aplicação da metodologia padrão, foram registrados resultados não satisfatórios. Sendo assim, foram realizados

testes adicionais alterando as concentrações de reagentes, tempo de hibridização e tempo de armazenagem das amostras, como demonstrado nas Tabelas 1, 2, 3, 4 e 5.

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

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

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

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

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

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

TABELA 4. Amostras LAPOC 12/Mai/10:

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

TABELA 5. Amostras LAPOC 02/Jun/10:

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

RESULTADOS

Foram registrados baixos valores médios ($0,333.10^9$ ind.L⁻¹) de densidade bacterioplanctônica na RA quando comparados à RB ($0,819.10^9$ ind.L⁻¹). Tais valores provavelmente estiveram relacionados a fatores como: condição de oligotrofia na RA, possíveis efeitos do lançamento de efluentes da mina de Urânio na RA, bem como a menor qualidade química da água. Diferentemente do que acontece na RB, onde foi observada maior concentração de nutrientes e matéria orgânica, fato atribuído as indústrias em seu entorno. O menor valor médio de densidade total de bactérias ocorreu no ponto CM ($0,182.10^9$ ind.L⁻¹) na UTM quando comparado aos valores registrados na RA e RB. Tal resultado pode indicar que as condições ambientais da CM, ou seja, baixos valores de pH, elevado valor de condutividade elétrica e concentração de metais pesados [8] podem ter influenciado a ocorrência de menor densidade bacterioplanctônica em relação às represas. 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 *Eubacteria* 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], verificamos

que inúmeros fatores podem ter influenciado os resultados obtidos até o presente momento.

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 (M.G.). Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, pp. 136.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

FAPEMIG