

# TESTES PRELIMINARES PARA IMPLANTAÇÃO PIONEIRA DA TÉCNICA INDEPENDENTE DE CULTIVO FISH EM AMBIENTES AQUÁTICOS SUBTROPICAIS OLIGOTRÓFICOS (RESERVATÓRIOS DAS ANTAS E BORTOLAN) E ÁCIDO (CAVA DA MINA OSAMU UTSUMI) NO PLANALTO DE POÇOS DE CALDAS (MG)

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

## INTRODUÇÃO

Os ambientes aquáticos oligotróficos, com baixa concentração de nutrientes e matéria orgânica são foco de muitas pesquisas e trabalhos científicos. Nesses corpos d'água existem microrganismos que podem sobreviver à escassez de tais nutrientes, bem como em ambientes com elevada salinidade, grande quantidade de metais pesados, níveis extremos de pH (águas ácidas ou alcalinas), dentre outros fatores. Na Unidade de Tratamento de Minério das Indústrias Nucleares do Brasil (UTM-INB), encontra-se a Cava da Mina Osamu Utsumi (CM), uma mina de urânio em processo de descomissionamento. Neste ambiente, o pH varia de 3,0 a 4,5 e possui uma alta concentração de elementos químicos radioativos. Nas imediações da UTM-INB, situa-se a represa das Antas (RA), que recebe os efluentes tratados procedentes da mina de urânio e possui baixa concentração de nutrientes e matéria orgânica. A represa Bortolan (RB) é um ambiente aquático localizado em uma área urbanizada e recebe resíduos de indústrias alimentícias e de fertilizantes, o que propicia um maior aporte de nutrientes, elevando seu grau de trofia. Nesse contexto, analisaram-se esses corpos de água para identificação filogenética bacterioplanctônica utilizando o método de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH), o qual através de sondas com sequências de oligonucleotídeos (dos domínios *Bacteria* e *Archaea*) é possível detectar a presença de DNA ou RNA específicos, similares ao fragmento de ácido nucléico produzido sinteticamente na sonda marcada.

## OBJETIVO

Analisar e identificar microrganismos dos grandes domínios *Bacteria* e *Archaea* através do método FISH na RA (repesa das Antas), RB (represa Bortolan) e na Cava de Mina Osamu Utsumi (CM).

## METODOLOGIA

Foram analisadas as variáveis físicas e químicas: pH, temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade, concentração de urânio e tório. Os testes para o FISH foram realizados de acordo com [1] e [2], com algumas modificações. Foram testadas modificações no fixador utilizado na amostra da CM de paraformaldeído (PFA 4%) para formoldeído 35%, por se tratar de um ambiente com elevadas concentrações de elementos radioativos dissolvidos, além da introdução de lavagem da amostra no conjunto de filtração com um meio denominado Mackintosh com pH baixo. Foram realizados testes para determinar a estringência e especificidade da sonda EUB338 e ARC915, utilizando-se culturas de isoladas de *Escherichia coli* e amostras de água de três lagos decorativos localizados no LAPOC-CNEN. Tanto a cultura de *E. coli* quanto as amostras de água dos lagos foram utilizadas como teste devido suas características semelhantes a ambientes de água doce comuns em se tratando de qualidade físico-química da água.

## RESULTADOS

Com exceção da CM, a RA e RB, são classificados como corpos de água de Classe II. Na tabela 1 observam-se os resultados para as variáveis físicas e químicas.

**Tabela 1.** Variáveis físicas e químicas

Variáveis	CM	RA	RB	Conama (357/05)	Ofício CNEN nº 50/SLC 06/1997
pH	3,84	6,54	6,81	6,0 - 9,0	-
Temp.(°C)	21,93	21,08	21,43	< 40	-
Conductiv. ( $\mu\text{S.cm}^{-1}$ )	1347,38	298,50	78,73	-	-
OD ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	6,57	6,83	6,96	> 5,0	-
U ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	2,31	0,02	0,02	0,02	0,02
Th ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	0,09	0,02	0,02	-	0,07

Os valores obtidos para densidade bacterioplânctônica nas represas das Antas e Bortolan foram mais elevados quando comparados à CM. O ambiente aquático com maior quantidade de células registrado foi a RB ( $0,8 - 0,9 \times 10^9 \text{ ind.L}^{-1}$ ), seguida da RA ( $0,3 - 0,4 \times 10^9 \text{ ind.L}^{-1}$ ) e CM ( $0,1 - 0,2 \times 10^9 \text{ ind.L}^{-1}$ ). Tais resultados podem estar relacionados ao grau de trofia dos corpos de água ora estudados, levando-se em consideração que a CM possui baixos valores de pH, bem como elevada concentração de metais pesados e elementos químicos radioativos dissolvidos, como urânio e tório. Tais características podem ser um fator que poderia propiciar a presença de microorganismos do domínio *Archaea* nesse corpo d'água, por se adaptarem em qualquer tipo de ambiente. O sinal de fluorescência detectado pelas sondas utilizadas apresentou baixa fluorescência quando visualizados em microscopia de epifluorescência. Inúmeros fatores podem ser atribuídos a tais resultados, como: baixa especificidade das sondas, problemas com o fluoróforo devido ao tempo de armazenagem da sonda, às condições ambientais das represas das Antas e Bortolan e Cava da Mina, baixa

atividade metabólica das células bacterianas, entre outros. Porém, quando se observou a amostra de cultura isolada de *E. coli*, foram obtidos resultados positivos de hibridização, assim como nos lagos da CNEN, onde foram hibridizadas inúmeras células, com ambas as sondas EUB338 e ARCH915.

## CONCLUSÕES

A presença de células hibridizadas com a sonda ARCH915 corrobora com a idéia de que as archaeas podem habitar tanto em ambientes com características físicas e químicas extremas, quanto com características comuns de pH, pressão, temperatura, salinidade, devido à elevada adaptabilidade aos diferentes tipos de ambientes. A baixa especificidade da sonda pode estar relacionada ao tempo que as sondas foram armazenadas, propiciando que o marcador fluorescente se desconecte da sequência de oligonucleotídeos que compõem a sonda. Novos testes continuarão sendo realizados, a fim de padronizar a metodologia para os ambientes aquáticos estudados devido à peculiaridade nas suas características físicas, químicas e biológicas (grau de trofia).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Ferrari, AC. Comunidade de bactérias e de nanoflagelados ao longo de um gradiente trófico em ambientes subtropicais rasos. Dissertação de Mestrado. UFSCar, São Carlos. p. 110, 2002.
- [2] Pernthaler, J; Glöckner FO; Schönhuber W and Amann R. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Methods Microbiol.* 30:207-226. 2001

## APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

FAPEMIG