

# Metodologia de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) Implantada em Ambientes Aquáticos Ácidos e com Baixo Índice Trófico

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

## INTRODUÇÃO

No planalto de Poços de Caldas/MG está localizada a primeira mina de extração e produção de concentrado de urânio do Brasil, atualmente em fase de descomissionamento. Neste planalto está localizada a Sub-bacia Hidrográfica do Ribeirão das Antas, que inicia-se na região da cabeceira do reservatório das Antas (RA). Além de fornecer água para o processo industrial da unidade de tratamento de minérios (UTM), a RA recebe efluentes radioativos ácidos tratados, procedentes da Cava da Mina de Urânio Osamu Utsumi (CM), localizada nas dependências da UTM. A jusante da RA, está localizado o reservatório Bortolan (RB) que também pode ser influenciado pela liberação dos efluentes da UTM. Esses três corpos de água (CM, RA e RB) foram foco de um estudo recente, realizado pelo Laboratório de Radioecologia/Laboratório de Poços de Caldas – Comissão Nacional de Energia Nuclear (LAPOC-CNEN), que visou avaliar a biota não humana e os possíveis efeitos causados pelos efluentes radioativos da UTM nesses ambientes. Para tanto, foi necessária a implantação da metodologia de FISH (Hibridização Fluorescente *in situ*), objeto do presente estudo, específica para a realização de análises dos domínios Bacteria e Archaea, em amostras de efluentes radioativos com drenagem ácida de mina (CM), bem como em amostras de água de bacia hidrográfica influenciada por mineração de urânio (RA e RB). A metodologia de FISH é utilizada em muitos estudos para determinar, filogeneticamente, microrganismos de grandes domínios ou grupos específicos, através de sondas sintetizadas a partir de sequências conservadas da região 16S do

DNA, neste caso para os domínios Bacteria e Archaea.

## OBJETIVO

Implantar metodologia de FISH para a detecção de microrganismos dos grandes domínios Bacteria e Archaea, em amostras de efluentes radioativos com drenagem ácida de mina (CM), bem como em amostras de água de reservatórios influenciados por mineração de urânio (RA e RB).

## METODOLOGIA

Foram coletadas amostras de água na CM, RA e RB.: No RA, foi realizada amostragem em local a montante do lançamento de efluentes radioativos tratados (CAB), no ponto 41, onde é lançado o efluente radioativo tratado e no ponto 14, a jusante do lançamento de efluentes. Na CM, foram coletadas amostras em apenas um local, assim como na RB. Para a implantação da metodologia de FISH, foram avaliadas 159 amostras, totalizando 318 preparações para a detecção de microrganismos dos domínios Bacteria e Archaea. Os testes laboratoriais foram realizados, seguindo diferentes literaturas científicas [1, 2, 3, 4, 5 e 6], as quais foram modificadas e adaptadas às amostras avaliadas neste estudo, devido às suas especificidades. Além disso, os autores citados acima foram contatados e seus conceitos utilizados como embasamento para a realização dos testes. Utilizou-se Formaldeído (4%) para fixar as amostras da CM e Paraformaldeído (2%) para as amostras das represas. Foram testados os corantes CY3 e Rodamina, bem como utilizados um mix de sondas EUB I, II e III, para maior abrangência de detecção de organismos no domínio Bacteria.

Também usou-se lisozima, juntamente com agarose e etanol, para facilitar a entrada da sequência de oligonucleotídeos nas células[2]. Pré-filtros de 20 µm de poro foram utilizados antes da filtração em membranas de 0,22 µm de poro, visando reter partículas maiores que interferiam na observação microscópica. Para concentrar maior número de células microbianas e realizar as análises dentro do limite de detecção do método, utilizou-se filtros de 47 mm de diâmetro (0,22 µm de poro). Em amostras da CM, foi adicionado um meio de lavagem no momento da filtração, chamado Mackintosh, indicado para a dissolução de metais em amostras de água com baixo valor de pH [5].

## RESULTADOS

As melhores condições metodológicas para a realização da FISH estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Metodologia padronizada de FISH para a CM, RA e RB

Fator	Valores
Tempo Hibridização (h)	2
Temperatura Hibridização (°C)	46
Concentração formamida (%)	30* / 20**
Pré-aquecimento câmara (h)	1,5
Temperatura lavagem (°C)	48
Tempo lavagem (min)	15
Concentração NaCl (mM)	1120* / 900**
Concentração DAPI (ug/ml)	100
Tempo DAPI (min)	10

RESULTADOS\* EUB/NON338  
RESULTADOS\*\* ARCH915

Com a metodologia padronizada para os três ambientes, houve aumento aparente no número de células hibridizadas, principalmente na CM, utilizando-se lisozima, agarose e etanol: permitindo que cápsulas de polissacarídeos comumente observadas nas células fossem dissolvidas e a sequência de oligonucleotídeos da sonda pudesse hibridizar com o DNA da célula. Bactérias filamentosas não foram hibridizadas com a sonda ARCH915.

\* Trabalho contemplado com prêmio de 1º lugar em Mostra de Iniciação Científica na sessão Poster Júnior do INAC 2011 (International Nuclear Atlantic Conference)

## CONCLUSÕES

Foi possível verificar nos testes, que as células foram hibridizadas em amostras de água da CM, RA e RB com sondas específicas para os domínios *Bacteria* e *Archaea*. A presença de células hibridizadas com a ARCH915 corrobora com informações da literatura, onde tem-se registrado que microrganismos do domínio *Archaea* podem habitar ambientes com características físicas e químicas extremas (CM), ou não extremas (RA e RB).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AMANN R. I. Fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes in the study of microbial ecology. *Molecular Ecology*, 4, 543 – 554, 1995.
- [2] SEKAR, R. et al. An improved protocol for quantification of freshwater actinobacteria by fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2928–2935, 2003
- [3] GONZÁLEZ-TORIL, E. et al. Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 69, n. 8, p. 4853-4865, 2003.
- [4] GLOCKNER, F. O. et al. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 65, n. 8, p. 3721-3726, 1999.
- [5] MACKINTOSH, M. E. Nitrogen Fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of General Microbiology*. v. 105, p. 215-218, 1978.
- [6] ALFREIDER, A. et al. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 62, n 6, p. 2138-2144, 1996.

## APOIO FINANCEIRO AO PROJETO

FAPEMIG