



## II-160 - AVALIAÇÃO DE SONDAS MOLECULARES PARA QUANTIFICAÇÃO DE *E. COLI* EM AMOSTRAS DE ESGOTO BRUTO E LAGOA DE POLIMENTO UTILIZANDO A TÉCNICA DE HIBRIDAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* - FISH

**Valéria Martins Godinho**

Bióloga pela PUC/MG. Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela UFMG, Doutoranda em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela UFMG.

**Silvana de Queiroz Silva**

Bióloga pela Universidade Federal de São Carlos, Mestre em Hidráulica e Saneamento pela USP São Carlos, Doutora em Microbiologia pela University of Essex, Inglaterra, Pós-doutoranda do Departamento de Ciências Biológicas da UFOP.

**Marcos von Sperling** <sup>(1)</sup>

Engenheiro civil, Doutor pela Imperial College – Universidade de Londres, Professor titular do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG.

**Endereço** <sup>(1)</sup>: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG; Av. do Contorno, nº 842 – 7º andar – Centro – Belo Horizonte – MG – Brasil – CEP 30.110-060– Tel: (31) 3409-1935 e-mail: (marcos@desa.ufmg.br; valgodinho@yahoo.com.br)

### RESUMO

As lagoas de polimento são processos de pós-tratamento utilizados no Brasil, e apresentam ótima capacidade de remover organismos patogênicos. Técnicas como o substrato cromogênico têm sido utilizadas para se detectar e quantificar *Escherichia coli* em amostras ambientais. As técnicas de biologia molecular vêm sendo empregadas nos últimos vinte anos para detectar e quantificar microrganismos em diversas amostras incluindo as ambientais, tais como, os esgotos domésticos. Dentre os métodos moleculares aplicados estão o da hibridação fluorescente *in situ* ou FISH (*Fluorescent In-Situ Hybridisation*). Essa ferramenta tem contribuído para a precisão das análises microbiológicas na quantificação de microrganismos. O objetivo do trabalho é avaliar duas sondas para a quantificação de *E. coli* em amostra de esgoto bruto e lagoa de polimento por FISH e verificar a influência do percentual de formamida (FA) na qualidade da hibridação do organismo alvo à sonda. Quanto à influência da FA, observou-se que com 40% de FA ambas as sondas mostraram fraca intensidade de brilho. Quando se usou 30% de FA, as células de *E. coli* hibridaram muito bem com a sonda ECO1167 e parcialmente com a uid-A. Para os percentuais de 20 e 50% de FA não se verificou a hibridação das células de *E. coli* com ambas as sondas. Quanto à avaliação das sondas ECO-1167 e uid-A, a sonda ECO-1167 mostrou-se mais eficaz em termos de hibridação e emissão de sinal fluorescente, possibilitando uma quantificação mais precisa que a sonda uid-A.

**PALAVRAS-CHAVE:** Esgoto bruto, lagoa de polimento, *Escherichia coli*, quantificação, sondas moleculares.

### INTRODUÇÃO

Os esgotos sanitários, quando não tratados, são responsáveis pela veiculação de diversos microrganismos, muitos deles patogênicos, ocasionando a contaminação das águas, o comprometimento dos seus diversos usos e podendo causar doenças aos animais e humanos. Para a avaliação da qualidade das águas e do tratamento dos esgotos, vários parâmetros deveriam ser considerados, dentre eles, os microrganismos patogênicos, pertencentes aos diversos grupos (bactérias, vírus, protozoários e helmintos). Porém na rotina dos laboratórios raramente é realizada uma avaliação de todos esses grupos, pois algumas metodologias para detecção e quantificação desses grupos são bastante trabalhosas.

Com isso, os indicadores de contaminação fecal têm sido utilizados na rotina do monitoramento. Tais indicadores de contaminação fecal são organismos preponderantemente não patogênicos, mas que fornecem suficiente indicação de quando uma água apresenta contaminação por fezes humanas ou de animais. Von Sperling (2005) relata que, usualmente, os indicadores de contaminação fecal mais tradicionalmente utilizados são os coliformes totais e termotolerantes, dos quais, *Escherichia coli* é a principal espécie representante, por ser a mais comum do trato intestinal de humanos e animais. Com isso é possível ser detectada em níveis



expressivos no esgoto bruto, em efluentes tratados e em coleções de água que estejam expostas a contaminação fecal. É ainda o microrganismo mais conhecido da microbiologia, e permanece como uma das ferramentas mais importantes para a pesquisa biológica. Nesse contexto *E. coli* é a única bactéria que dá garantia de contaminação exclusivamente fecal e há uma tendência atual em utilizá-la como o indicador mais adequado, embora sua detecção não dê garantia de contaminação especificamente humana, já que animais podem albergá-la, o que não nulifica seu conceito como indicador (von SPERLING, 2005).

As lagoas de polimento são processos de tratamento e pós-tratamento amplamente utilizadas no Brasil, e são reconhecidas pela sua capacidade de remover organismos patogênicos, representados por *E. coli*. As lagoas de polimento têm sido utilizadas como pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios tipo UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*) e exercem bem esta função, sendo esta uma das suas principais finalidades, possibilitando alcançar elevadas eficiências na remoção destes organismos (von SPERLING e CHERNICHARO, 2005).

Técnicas como os tubos múltiplos, membrana filtrante e substrato cromogênico têm sido usualmente utilizadas para se detectar e quantificar *E. coli* em amostras ambientais. Cada técnica apresenta vantagens e desvantagens, levando-se em conta a capacidade laboratorial em termos de rapidez, simplicidade, custos e necessidade de equipamentos e pessoal qualificado.

A utilização das técnicas de biologia molecular no conhecimento da ecologia de organismos ambientais vem sendo empregada nos últimos vinte anos. A sua utilização permite conhecer com precisão os grupos de organismos envolvidos no tratamento de esgotos. Seu uso vem se intensificando para detectar e quantificar microrganismos oriundos de diversas amostras ambientais, incluindo os esgotos domésticos brutos e tratados.

Dentre os métodos moleculares aplicados, objetivando-se o monitoramento da comunidade microbiana, estão os que empregam sondas moleculares para a quantificação dos microrganismos alvos. Um desses métodos é o da hibridação fluorescente *in situ* ou FISH (*Fluorescent In-Situ Hybridisation*) (AMANN, 1995). Trata-se de um método que permite identificar por microscopia microrganismos presentes em diversos ambientes. A técnica tem por base o uso de sondas moleculares (pequenas seqüências de RNA marcadas) e consiste no mesmo princípio da “impressão digital”, uma vez que os organismos podem ser identificados dentre uma população mista, por apresentarem uma região complementar à sonda aplicada. O limite de detecção da técnica reportado por Amann *et al.*, (1995) e Garcia-Arminsen e Servais, (2004) é de  $10^3$  a  $10^4$  célula/mL.

Essa ferramenta tem contribuído para a precisão das análises microbiológicas na pesquisa de diversos microrganismos e de sua quantificação com maior especificidade, uma vez que, como citado por Araki *et al.*, (1999) a quantificação de microrganismos pelo método do NMP é conhecida pela possibilidade de ser subestimada. Ainda que o FISH venha sendo utilizado há mais de uma década, uma limitação que por vezes se mostra difícil de superar é se a intensidade do sinal das células hibridizadas é suficientemente forte para ser detectável.

Baixas respostas do sinal fluorescente em amostras hibridizadas podem ser relacionadas a vários fatores como, por exemplo, i) baixo conteúdo ribossomal da célula, ii) difícil permeabilidade da parede celular, iii) a inacessibilidade do sítio marcado devido à estrutura espacial do ribossomo (YILMAZ e NOGUERA, 2004; De LONG *et al.*, 1989). Bouvier e del Giorgio (2003) também mencionam que é possível que a proporção de células possíveis de serem detectadas por FISH possa estar associada a condições fisiológicas inerentes à célula. Os mesmos autores avaliam a influência de seis fatores metodológicos que podem influenciar o rendimento do FISH, dentre os quais está a concentração da formamida adicionada ao tampão de hibridação.

O presente trabalho tem por objetivo avaliar duas sondas moleculares utilizadas na quantificação de *E. coli* em amostra de esgoto bruto e lagoa de polimento através da técnica de hibridação fluorescente *in situ* – FISH. Além disso, pretende-se verificar a influência do percentual de formamida na qualidade da hibridação do organismo alvo com a sonda.



## MATERIAL E MÉTODOS

### Descrição do aparato experimental

O aparato, em escala de demonstração, está implantado no CePTS/ (Centro de Pesquisas e Treinamento em Saneamento) UFMG/COPASA localizado junto à ETE Arrudas, em Belo Horizonte. É constituído de um reator UASB e 3 lagoas de polimento em série. A profundidade das lagoas 1 e 2 é em média de 0,80 m e da lagoa 3, de 0,60m. A vazão média é de 27 m<sup>3</sup>/d.

### Coleta e preparo da amostra

Os pontos avaliados compreendem amostra do esgoto bruto e da lagoa 1. Foram coletados 200 mL do afluente e do efluente da lagoa em quatro coletas ocorridas em novembro/2007, fevereiro/2008, abril/2008 e fevereiro/2009. A amostra da lagoa foi previamente filtrada em filtro de 8,0 µm seguido por filtro de 1,2 µm de porosidade com o objetivo de remover as algas e material particulado que poderia interferir na contagem das células de *E. coli*. Em seguida ambas as amostras foram concentradas por centrifugação a 4.000 rpm durante 30 minutos. O material sedimentado foi ressuspensionado em tampão PBS (Phosphate Buffered Salina), 1x e fixado em tampão de fixação contendo paraformaldeído 4% em PBS 1x e NaOH 1N, como proposto por Hanh *et al.* (2002). Culturas puras de *Escherichia coli* e de outra bactéria que não hibrida com a sonda foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente.

### Condições de hibridação e quantificação do número de células

O protocolo de hibridação é o mesmo proposto por Hanh *et al.* (1992) e consiste basicamente das seguintes etapas: aplicar 1 µL de amostra fixada no pocinho e espalhar; incubar a lâmina em estufa a 45 °C por 40 minutos; desidratar as amostras por imersão serial em etanol 50, 80 e 100% (3 minutos cada); adicionar em cada pocinho 9 µL de tampão de hibridação contendo o percentual de formamida almejado (Tabela 1) e 1 µL da sonda, espalhando com a ponteira; incubar a lâmina em câmara úmida escura (papel embebido em tampão de hibridação) em estufa a 46 °C por duas horas; lavar a lâmina em tampão de lavagem a 48° C por 20 minutos; mergulhar a lâmina em ddH<sub>2</sub>O por 10 segundos e secar em temperatura ambiente no escuro; adicionar 9 µL de ddH<sub>2</sub>O e 1 µL do corante DAPI a 0,001% e espalhar com a ponteira; incubar em temperatura ambiente por dez minutos; mergulhar a lâmina em ddH<sub>2</sub>O rapidamente e deixar secar; aplicar sobre cada pocinho 6 µL de uma solução com 80% glicerol e 20% PBS 1x e colocar a laminula.

A quantidade de formamida pode variar para a mesma sonda, possivelmente devido ao tipo de amostra a ser avaliada e das condições fisiológicas da célula. As sondas utilizadas neste trabalho assim como os percentuais de formamida testados estão descritos na Tabela 1. A quantificação de *E. coli* foi feita em duplicata para cada uma das quatro coletas. As amostras foram aplicadas em lâminas de teflon contendo 10 pocinhos de 8 mm de diâmetro. A preparação das lâminas incluía a adição de amostras de *E. coli* (controle positivo), uma alíquota de uma cultura de bactéria que não hibrida com a sonda (controle negativo), além de alíquotas das amostras do esgoto bruto e da lagoa, procedendo-se em seguida a hibridação com ambas as sondas separadamente.

**Tabela 1 - Descrição das sondas moleculares e percentuais de formamida (FA) avaliados**

Nome da sonda	Seqüência (5'-3')	Gene alvo	FA (%)	Cromóforo
ECO 1167 (ECO 45 a) uid-A	gcataagcgtcgctgccg ccgaacacctgggtggacgatca	23S rRNA uid-A	20, 30, 40 e 50	Cy3

As lâminas foram visualizadas em microscópio Olympus BX-50 em objetiva de 1000 vezes, sob epifluorescência. Foram utilizados filtros com espectro de absorção entre 510 a 550 nm e de 330 a 385 nm para captação de emissões de fluorescência da sonda e do DAPI respectivamente. A quantidade de campos microscópicos a serem contados varia entre autores. Araújo *et al.* (2000) mencionam que aproximadamente 500 a 1000 células coradas com o corante DAPI (4', 6' diamidino-2-phenylindole) são suficientes para uma quantificação representativa. No presente trabalho procedeu-se a contagem de 10 campos microscópicos aleatórios em que havia no mínimo 100 células DAPI por campo, totalizando 1000 células DAPI. As sondas foram checadas pelos programas Probase e NCBI/BLAST disponíveis em (<http://www.microbial-ecology.net/probase>; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

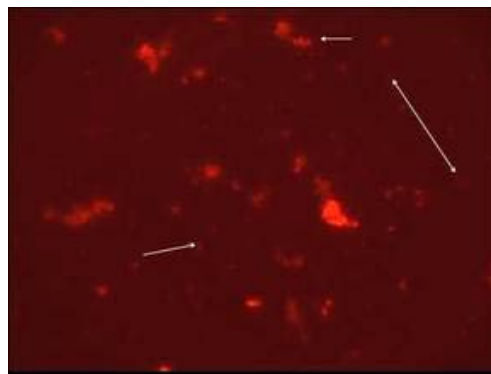
A formamida (FA) é um reagente que fortalece a ligação entre o RNA alvo e a sonda, permitindo a melhoria da hibridação e consequentemente a intensidade da emissão de brilho fluorescente. Alguns autores têm discutido a variação dos percentuais de formamida a serem acrescentados ao tampão de hibridação para uma mesma sonda, de forma a intensificar a qualidade da hibridação (Konuma *et al.*, 2001; Yilmaz e Noguera, 2004; Bouvier e del Giorgio, 2003). Pernthaler e Amann, (2004) também mencionam o uso da formamida para diminuir a temperatura ótima de hibridação, minimizando dano à célula e, como já mencionado, fortalecendo a ligação da sonda ao alvo.

Para a sonda ECO 1167 (Eco 45 a), Neef *et al.*, (1995) utilizaram percentuais de 40% de FA ao investigar *E. coli* em uma amostra que consistia de uma mistura de bioaerossóis. Para a sonda uid-A (Bej *et al.*, 2004) não foi especificado nenhum percentual de formamida. Para ambas as sondas testaram-se percentuais de 20 a 50% de formamida, a fim de verificar qual seria o melhor percentual de FA que proporcionaria uma intensidade de brilho fluorescente de melhor qualidade e nitidez possíveis.

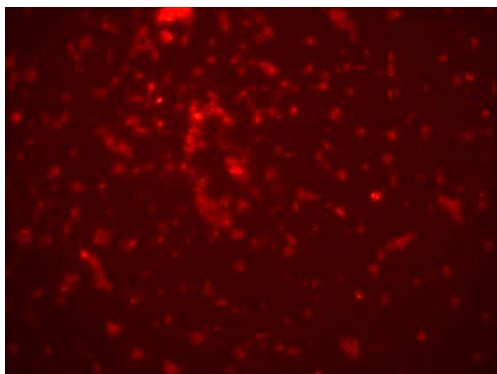
Quanto à influência do percentual de FA contido no tampão de hibridação, pode-se perceber pelas Figuras 1 e 2, que com 40% de FA ambas as sondas mostraram fraca intensidade do brilho fluorescente, e ainda “manchas brilhantes” quando ocorria um aglomerado de células, sugerindo um efeito de “background”, que poderia ocasionar ambiguidade ao se fazer a contagem. Quando se usou tampão de hibridação com 30% de FA, pode-se perceber que as células de *E. coli* hibridaram muito bem com a sonda ECO1167 e parcialmente com a uid-A, com a qual algumas células hibridavam e outras não (Figuras 3 e 4). Para os percentuais de 20 e 50% de FA (Figuras 5 a 8) não se verificou a hibridação das células de *E. coli* com nenhuma das duas sondas, indicando que esses percentuais não foram adequados para se conseguir uma boa hibridação da sonda com o alvo, não sendo possível proceder a contagem (todas as figuras são referentes a visualização microscópica em aumento de 1000 vezes).



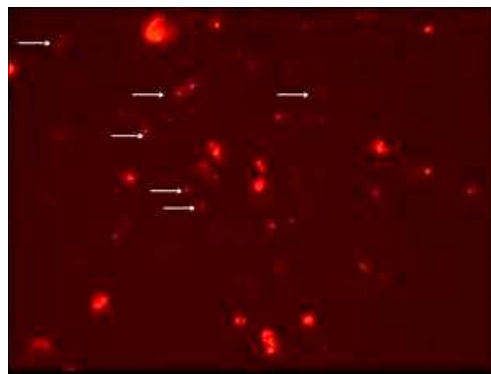
**Figura 1** – Células de *E. coli* hibridadas com a sonda **ECO 1167** sob 40% de FA.



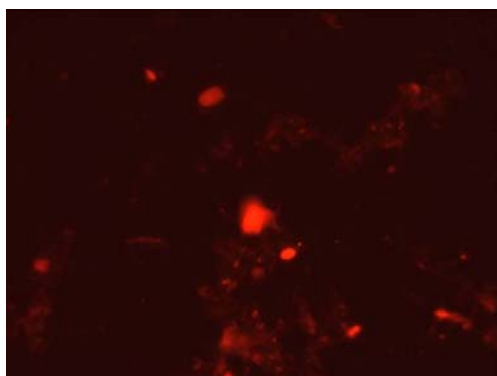
**Figura 2** - Células de *E. coli* hibridadas com a sonda **uid- A** sob 40% de FA.



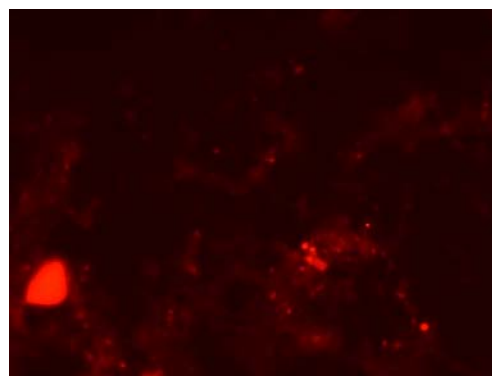
**Figura 3** - Células de *E. coli* hibridadas com a sonda **ECO 1167** sob 30% de FA.



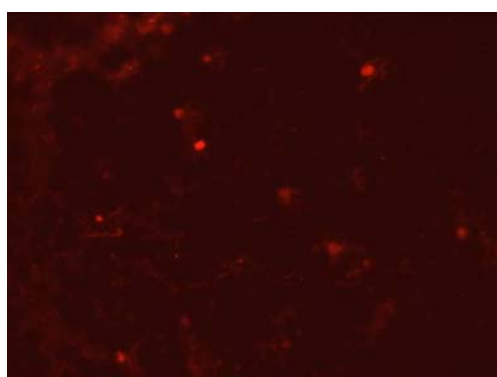
**Figura 4** - Células de *E. coli* hibridadas com a sonda **uid- A** sob 30% de FA.



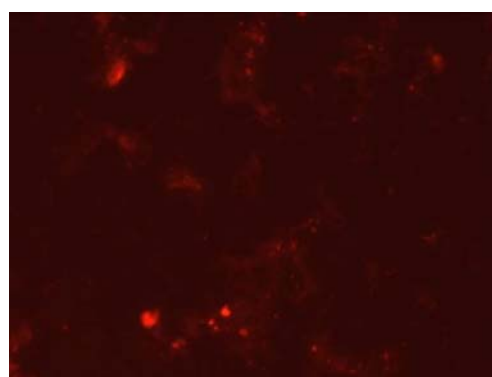
**Figura 5** – Campo microscópico para visualização de células de *E.coli* utilizando-se a sonda **uid-A** sob 20% de FA



**Figura 6** – Campo microscópico para visualização de células de *E.coli* utilizando-se a sonda **ECO 1167** sob 20% de FA



**Figura 7** – Campo microscópico para visualização de células de *E.coli* utilizando-se sonda **uid-A** sob 50% de FA



**Figura 8** – Campo microscópico para visualização de células de *E.coli* utilizando-se sonda **ECO 1167** sob 50% de FA

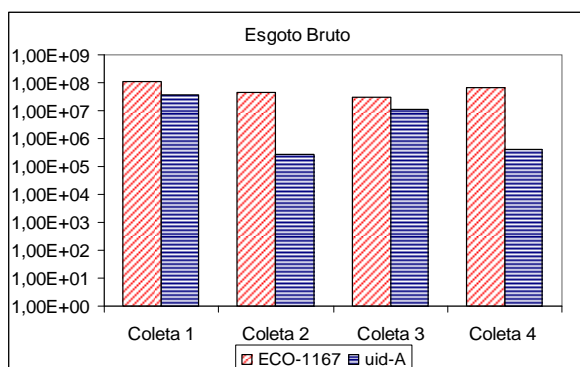
A influência do percentual de FA para cada sonda mostrou-se bastante importante e somente após essa verificação pôde-se proceder a quantificação de *E. coli* nas amostras de EB e da lagoa. Foram feitas quantificações de *E. coli* utilizando as sondas descritas na Tabela 1 adicionando-se 30% de FA ao tampão de hibridação para ambas as sondas. Os resultados estão apresentados na Tabela 2 e nas Figuras 9 e 10.

**Tabela 2 - Quantificação de *E.coli* em amostras de esgoto bruto e lagoa de polimento utilizando-se duas sondas e tampão de hibridação com 30% de formamida.**

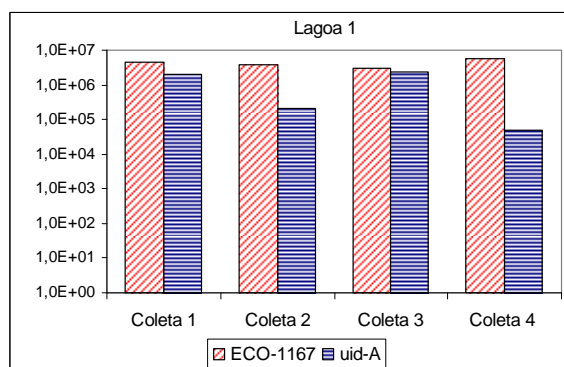
Campanha	Sonda	Ponto de coleta	<sup>(a)</sup> Média	<sup>(a)</sup> DP	<sup>(a)</sup> CV.
1	ECO-1167	Esgoto bruto	$1,1 \times 10^8$	$5,7 \times 10^6$	0,05
2			$4,4 \times 10^7$	$4,5 \times 10^6$	0,04
3			$2,9 \times 10^7$	$8,5 \times 10^5$	0,03
4			$6,5 \times 10^7$	$1,1 \times 10^6$	0,02
1	uid-A	Esgoto bruto	$3,8 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	0,4
2			$2,7 \times 10^5$	$3,8 \times 10^5$	1,4
3			$1,1 \times 10^7$	$5,7 \times 10^5$	0,1
4			$4,0 \times 10^5$	0,0	0,0
1	ECO-1167	Lagoa 1	$4,5 \times 10^6$	$3,5 \times 10^5$	0,08
2			$3,8 \times 10^6$	$5,0 \times 10^5$	0,13
3			$3,1 \times 10^6$	$8,0 \times 10^5$	0,26
4			$5,6 \times 10^6$	0,0	0,00
1	uid-A	Lagoa 1	$2,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$	0,2
2			$2,1 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	0,9
3			$2,4 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$	0,0
4			$4,8 \times 10^4$	0,0	0,0

Legenda: DP- desvio padrão; CV- coeficiente de variação / <sup>(a)</sup> valores de duplicatas (por 100 mL)





**Figura 9 - Quantificação de *E. coli* pela técnica de FISH – sonda ECO-1167.**



**Figura 10 - Quantificação de *E. coli* pela técnica de FISH - sonda uid-A.**

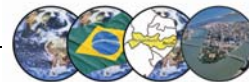
Os resultados consistem da média obtida da contagem, em duplicata, de 10 campos microscópicos em cada uma das campanhas e para cada sonda (já corrigidos para as diluições e concentrações às quais as amostras foram submetidas na etapa pré – fixação). Observando-se a Tabela 2 e as Figuras 9 e 10 percebe-se que com a sonda ECO1167 a quantificação de *E. coli* para o esgoto bruto apresentou valores da ordem de  $10^7$  a  $10^8$  por 100mL já para a lagoa, os valores verificados nas quatro campanhas permaneceram da ordem de  $10^6$  por 100mL. Ao passo que utilizando-se a sonda uid-A, os valores para o esgoto bruto variaram da ordem de  $10^7$  a  $10^5$  por 100mL e para a lagoa de  $10^6$  a  $10^4$  por 100mL. É possível verificar que quando se utilizou a sonda ECO 1167, a contagem foi mais expressiva do que quando as células foram hibridadas utilizando-se a sonda uid-A, diferença bastante perceptível principalmente para o esgoto bruto.

Para a lagoa de polimento, a sonda uid-A novamente mostrou-se menos eficiente na quantificação de *E. coli* em comparação à sonda ECO 1167. Os valores de *E. coli*, com base na técnica do Colilert, para o mesmo sistema situam-se entre  $10^8$  a  $10^7$  NMP/100mL no esgoto bruto e  $10^6$  a  $10^5$  NMP/100mL no efluente da lagoa (Godinho *et al.*, 2009). As variações dos resultados obtidas para cada sonda podem ser atribuídas a fatores associados não apenas às condições de hibridação, mas também às condições fisiológicas dos microrganismos. Com relação às condições de hibridação, pode-se verificar que o importante papel da formamida, de fortalecer a ligação do RNA alvo à sonda e melhorar a intensidade do brilho fluorescente não pôde ser observado com a sonda uid-A, sugerindo que outro fator pode ter influenciado os resultados.

Quanto à especificidade da sonda, esta foi confirmada através dos programas Probebase e NCBI/Blast, confirmando-se sua utilização para *Escherichia coli*, porém específicas para diferentes moléculas (Tabela 1). Na microbiologia, a molécula alvo mais comumente usada para FISH é o 16S rRNA, devido à sua estabilidade genética, à presença de regiões conservadas e variáveis e à produção de um elevado número de cópias (Woese, 1987; Fuchs *et al.*, 1998). Porém, outras regiões alvo, tais como o 23S e o 18S (Amann *et al.*, 1995; Fuchs *et al.*, 2001; Neef *et al.*, 1995; Nordentoft *et al.*, 1997) e ainda o mRNA (Wagner *et al.*, 1998; Moter e Göbel *et al.*, 2000) podem ser utilizadas para FISH.

A quantidade de RNA em uma célula é proporcional à sua atividade, uma vez que se trata de uma unidade de produção de proteínas, porém não é possível relacionar a informação da sonda 23S rRNA (ECO-1167) com atividade metabólica específica. Ao contrário, a hibridação com a sonda uid-A, cujo gene alvo está presente em quase todos os sorotipos de *Escherichia coli* (Martins *et al.*, 1993), significa que o gene está sendo expresso e que, portanto a célula encontra-se em atividade metabólica. Este gene codifica a enzima  $\beta$ -D-glucuronidase em *E. coli* e sua função é metabolizar o substrato 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucuronídeo (MUG) (Garcia-Arminsen *et al.*, 2005). O MUG ou seus similares cromogênicos têm sido amplamente utilizados em meios de cultura, para quantificação diferencial de *E. coli*, como por exemplo, o  $\text{Colilert}$ .

É possível que esta diferença de genes-alvo possa explicar a variação na quantificação de *E. coli* por FISH, uma vez que, quando se usou a sonda uid-A, somente as células de *E. coli* viáveis tenham hibridado à sonda, ao passo que a quantificação com a sonda ECO-1167 hibridou com todas as células de *E. coli*, viáveis ou não. Como o objetivo deste trabalho foi mostrar um método alternativo para contagem de *E. coli* como indicador



de eficiência de remoção de bactérias patogênicas em sistemas de tratamento de esgotos, acredita-se que a aplicação da sonda específica para o gene 23S rRNA seja a melhor opção, pois reflete o estado fisiológico (viável e não viável) da maioria das bactérias patogênicas presentes no sistema. Além disso, a sonda para o gene 23S rRNA (ECO-1167) mostrou-se mais eficaz em termos de hibridação e emissão de sinal fluorescente, possibilitando uma quantificação mais confiável e com maior precisão do que a sonda uid-A.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostram que o percentual de formamida adicionado ao tampão de hibridação pode influir incisivamente na hibridação da célula à sonda. Ainda que Neef *et al.*, (1995) tenham sugerido que seja adicionado 40% de FA ao tampão de hibridação quando se utiliza a sonda ECO 1167, nesta investigação o resultado não se mostrou satisfatório. Cabe ressaltar que também foram testadas as mesmas condições de hibridação sugeridas pelos autores (temperatura de hibridação, tampão contendo ou não EDTA, tempo de hibridação, etc.), além de terem sido testadas variações na temperatura de hibridação e ainda assim não se alcançaram resultados satisfatórios na intensidade do sinal. Somente quando o percentual de FA foi alterado de 40 para 30%, foi possível verificar hibridação das células com a sonda.

Recomenda-se, portanto que os percentuais de FA a ser adicionada ao tampão de hibridação quando se utiliza FISH para a quantificação de microrganismos devam ser testados, ainda que um determinado percentual tenha sido baseado em pesquisas de diferentes autores avaliando a mesma ou diferentes tipos de amostras. Um teste exploratório utilizando-se culturas puras e uma variação de percentuais de formamida (20 a 50%, dependendo do percentual de base) pode ajudar bastante, uma vez que dúvidas a respeito do sinal e consequentemente da qualidade da sonda podem ser dirimidas antes de se iniciarem as quantificações, evitando desperdícios de trabalho e de reagentes.

Quanto à avaliação das sondas ECO-1167 e uid-A utilizadas para quantificação de *E. coli* em amostras de esgoto bruto e tratado, para a presente pesquisa pode-se concluir que a sonda ECO-1167 mostrou-se mais eficaz em termos de hibridação e emissão de sinal fluorescente, com valores variando de  $1,1 \times 10^8$  a  $2,9 \times 10^7$  por 100mL para o esgoto bruto e  $5,6 \times 10^6$  a  $3,8 \times 10^6$  por 100mL para a lagoa, possibilitando uma quantificação mais confiável e com maior precisão do que a sonda uid-A, cujos valores variaram de  $3,8 \times 10^7$  a  $2,7 \times 10^5$  por 100mL para o esgoto bruto e  $4,8 \times 10^4$  a  $2,4 \times 10^6$  por 100mL para a lagoa.

Mesmo tendo sido realizadas quantificações bastante criteriosas, ressalta-se que a quantificação de *E. coli* em amostra efluente, oriunda de lagoas, é bastante difícil de se proceder pela técnica do FISH, devido à presença remanescente das algas, que algumas vezes são autofluorescentes e ao fato de que no efluente da lagoa, as bactérias são de dimensões bastante diminutas, talvez devido, principalmente, à escassez de nutrientes, o que em ambos os casos, dificulta sobremaneira a contagem das células. A técnica do FISH para quantificação de *E. coli* talvez seja mais apropriada para amostras ambientais mais concentradas, tais como lodo, biofilmes e solos contaminados, cujas concentrações de microrganismos sejam mais elevadas que o limite de detecção da técnica ( $10^3$  a  $10^4$  cels/mL).

Os autores agradecem à FAPEMIG, CNPq, PROSAB/FINEP.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMANN, R., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology. Reviews*. 59, p.143- 169.
2. ARAKI, N.; OHASHI, A.; HARADA, H.; MACHDAR, I. (2001). Direct cell counting and observation of spatial distribution of nitrifiers in aerobic biofilm by FISH (fluorescent in situ hybridization). *Journal J. Soc. Water Environmental*, v. 22, n. 2, pp. 152-159. 1999 *apud* KONUMA, S.; SATOH, H.; MINO, T.; MATSUO, T. Comparison of enumeration methods for ammonia-oxidizing bacteria. *Water Science and Technology*, v. 43, n. 1, p. 107-114.
3. ARAÚJO, J.C., BRUCHA, G., CAMPOS, J.R.; VAZOLLER, R.F. (2000). Monitoring the development of anaerobic biofilms using fluorescent in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Water Science and Technology*, v. 41, n. 12, p. 69-77.
4. BEJ, A.K. (2004). Detection of microbial nucleic acids by polymerase chain reaction in aquatic samples. Second Edition. In: *Molecular Ecology Manual*, p. 369-432.



5. BOUVIER, T.; del GIORGIO, P.A. (2003). Factor influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): a quantitative review of published reports. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 44, p. 3-15. ([WWW.fems-microbiology.org](http://WWW.fems-microbiology.org)).
6. De LONG, E.F.; WICKHAM, G.S.; PACE, N.R. (1989). Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, v.43, n. 4896, p. 1360-1364.
7. FUCHS, B.M.; SIUTSUBO, K.; LUDWING, W.; AMANN, R. (2001). In situ accessibility of *Escherichia coli* 23SrRNA to fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 2, p. 961-968.
8. FUCHS, B.M.; WALLNER, G.; BEISKER, W.; SCHWIPPL, I.; LUDWING, W.; AMANN, R. (1998). Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *E. coli* 16SrRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 12, p.4973-4982.
9. GARCIA-ARMISEN, T. e SERVAIS, P. (2004). Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by fluorescent in situ hybridisation. *Journal Microbiology Methods*, v. 58, p 269-279.
10. GODINHO, V.M., NASCIMENTO, F.M.S; SILVA, S.Q.; von SPERLING, M. Characterization of pathogenic bacteria in a UASB-polishing pond system using molecular techniques. In: 8<sup>th</sup>. IWA Specialist Group Conference on Waste Stabilization Ponds, 2<sup>a</sup> Conferencia Latinoamericana de Lagunas de Estabilizacion. April, 26 to 30. Belo Horizonte/Brazil: IWA. 2009.
11. HAHN, D. (2001). In Situ analysis of microbial populations. Workshop "Sediments and Biofilms" Limnological Research Center. Swiss Federal Institute for environmental science and Technology, EAWAG, Kastanienbaum, Switzerland, 10-14 sept.
12. KONUMA, S.; SATOH, H.; MINO, T.; MATSUO, T. (2001). Comparison of enumeration methods for ammonia-oxidizing bacteria. *Water Science and Technology*, v. 43, n. 1, p. 107-114.
13. MARTINS, M.T; RIVERA, I. G.; CLARK, D.L.; STEWART, M. H.; WOLFE, R.L.; OLSON, B.H. (1993). Distribution of *uidA* gene sequences in *E. coli* isolates in water sources and comparison with the expression of  $\beta$ -D-Glucuronide media. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, n. 7, p.2271-2276.
14. MOTER, A.; GÖBEL, U.B. (2000). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, v. 41, p. 85-112. apr.
15. NEEF, A., AMANN, R., SCHLEIFER K-H. (1995). Detection of Microbial cells in aerosol using nucleic acid probes. *Systematic Applied Microbiology*, v.18, p.113-122.
16. NORDENTOFT, S.; CHRISTENSEN, H.; WEGENER, H.C. (1997). Evaluation of a Fluorescence-labelled oligonucleotide probe targeting 23SrRNA for in situ detections of *Salmonella* serovars in paraffin-embedded tissue sections and their rapid identification in bacterial smears. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, n. 10, p. 2641-2648. oct.
17. PERNTHALER, A.; AMANN, R. (2004). Simultaneous fluorescence in situ hybridization of mRNA and rRNA in environmental bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, n. 9, p.5426-5433.
18. von SPERLING, M. (2005). Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 3<sup>a</sup>.ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG. 452 p. (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias,1). 2005.
19. von SPERLING, M., CHERNICHARO, C.A.L. (2005). *Biological wastewater treatment in warm climate regions*. Two volumes. IWA Publishing. 1496 p. 2005.
20. WAGNER, M.; SCHMID, M.; JURETSCHKO, S.; TREBESIU, K-H.; BUBERT, A.; GOEBEL, W.; SCHLEIFER, K-H. (1998). In situ detection of a virulence factor mRNA and 16S rRNA in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiology Letters*, v.60, p. 159-168.
21. WOESE, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiology Reviews*, v. 51, p. 221-271.
22. YILMAZ, S.F.; NOGUERA, D.R. (2004). Mechanistic approach to the problem of hybridization efficiency in fluorescent in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, n.12, p. 7126-7139.