

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Kayo Cesar Bianco Fernandes

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO FECAL HOSPEDEIRO-  
ESPECÍFICO EM ÁGUAS DESTINADAS AO ABASTECIMENTO PÚBLICO**

Rio de Janeiro

2015

KAYO CESAR BIANCO FERNANDES

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO FECAL HOSPEDEIRO-  
ESPECÍFICO EM ÁGUAS DESTINADAS AO ABASTECIMENTO PÚBLICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Maysa Beatriz Mandetta  
Clementino

Rio de Janeiro

2015

BIANCO, KAYO

Detecção e quantificação de contaminação fecal hospedeiro-específico em águas destinadas ao abastecimento público.

Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2015. 138 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2015.

Orientadora: Dra. Maysa Beatriz Mandetta Clementino

Palavras Chaves: Contaminação Fecal, Água, Archaea, *Bacteroidales*, Rastreamento de Fonte Microbiana

Key Words: Fecal Contamination, Water, Archaea, *Bacteroidales*, Microbial Source Tracking

Kayo Cesar Bianco Fernandes

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO FECAL HOSPEDEIRO-  
ESPECÍFICO EM ÁGUAS DESTINADAS AO ABASTECIMENTO PÚBLICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Dra. Maria Regina Branquinho  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Dr. Alexander Machado Cardoso  
Centro Univesitário Estadual da Zona Oeste

---

Dra. Maysa Beatriz Mandetta Clementino - Orientador  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico esse trabalho aos meus pais,  
Elizabeth e Julio, que me apoiaram  
durante esta caminhada.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e meu irmão por me apoiarem em meus sonhos, mesmo que isso me faça morar bem longe deles;

À minha namorada, Meire, por estar sempre ao meu lado, não há um só dia que não agradeça por tê-la comigo;

À Dra. Maysa Beatriz Mandetta Clementino pela orientação plena, pelo estímulo à pesquisa, pelo exemplo de dedicação, persistência e consciência social e, acima de tudo, por ter confiado no meu trabalho;

À Cátia Aparecida Chaia Miranda ou simplesmente Catinha, uma amiga. Que sempre esteve disposta a me ajudar e a todos que sempre recorrem a ela. Você sempre ouviu meus infinitos pedidos de ajuda com uma paciência fenomenal e nunca hesitou em ajudar;

À Claudia Flores e Camila Barreto, vocês fizeram dessa caminhada uma comédia escrachada;

A todos do Laboratório de Microrganismos de Referência, Claudia, Jandira, Talita, Dalvin, Samara, Aline, Mariana e outros que não me lembrei de colocar os nomes, por fazerem todos os meus dias mais engraçados, agradáveis e felizes;

Ao Dr. Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso pelos seus ensinamentos e pela ajuda em sanar minhas dúvidas no desenvolvimento deste trabalho, pela disponibilidade de tempo para responder às perguntas, mesmo quando estava sentado em frente a inúmeras solicitações de cepas;

Ao Dr. Antônio Eugênio Castro Cardoso de Almeida, conhecido como Eugênio, pelos inesquecíveis momentos de alegria;

A Dra. Maria Regina Branquinho pelo auxílio na revisão deste trabalho;

Ao Instituto Nacional de Controle de qualidade em saúde, ao programa de pós-graduação em vigilância sanitária e ao Departamento de Microbiologia que possibilitaram a realização deste estudo; a CAPES e a FAPERJ pela concessão da bolsa de mestrado.

Por fim, obrigado a todos que contribuíram direta e indiretamente para conclusão deste trabalho.

Tenha em mente que tudo que você aprende na escola é trabalho de muitas gerações. Receba essa herança, honre-a, acrescente a ela e, um dia, fielmente, deposite-a nas mãos de seus filhos.

Albert Einstein (1879 -1955)

(Físico teórico alemão, laureado com o Prêmio Nobel de Física de 1921)

## RESUMO

A contaminação fecal de corpos hídricos é uma das principais causas de doenças entéricas veiculadas pela água no mundo, responsáveis pela morte de mais de dois milhões de crianças por ano. As águas das bacias do rio São Joao e do rio Guandu vêm sendo destinadas ao abastecimento público da Região dos Lagos e da região metropolitana do estado do Rio de Janeiro. Os indicadores de contaminação fecal usualmente empregados na avaliação da qualidade microbiológica da água quanto a presença de patógenos entéricos são os coliformes termotolerantes, representados pela *Escherichia coli*, os quais estão associados com matéria fecal humana e de outros animais de sangue quente. Entretanto, para um gerenciamento mais efetivo deve ser identificada a fonte de contaminação fecal. Microrganismos anaeróbios, como a ordem *Bacteroidales* e as archaeas metanogênicas, vêm sendo apontados como bioindicadores alternativos de contaminação fecal hospedeiro-específico. O presente estudo tem como objetivo avaliar a qualidade das águas das bacias do rio São João e do rio Guandu por meio da aplicação de biomarcadores moleculares capazes de revelar contaminações fecais suína, humana, equina e de ruminantes. Esta abordagem representa uma importante ferramenta na detecção de contaminação hospedeiro-específica de ambientes aquáticos, o que poderá contribuir para as ações preventivas de vigilância ambiental em saúde.

Palavras Chaves: Contaminação Fecal, Água, Archaea, *Bacteroidales*, Rastreamento de Fonte Microbiana



## ABSTRACT

Fecal contamination of water bodies is a major cause of waterborne enteric diseases in the world, responsible for the deaths of more than two million children per year. The waters from São João river basin and Guandu river basin have been intended for public supply of the Lakes Region and the metropolitan region of the State of Rio de Janeiro. Indicators of fecal contamination usually employed to evaluate the microbiological quality of water for the presence of enteric pathogens are coliforms, represented by *Escherichia coli*, which are associated with human faecal matter and other warm-blooded animals. However, for a more effective management the source of fecal contamination should be identified. Anaerobic microorganisms, such as the order *Bacteroidales* and methanogenic archaea, have been identified as alternative biomarkers for host-specific fecal contamination. The present study aims to evaluate the water quality of São João river basin and Guandu river basin through the application of molecular biomarkers able to reveal swine, human, equine and ruminants fecal contamination. This approach represents an important tool in the detection of host-specific contamination of aquatic environments, which may contribute to prevention efforts for environmental health surveillance.

Key Words: Fecal Contamination, Water, Archaea, *Bacteroidales*, Microbial Source Tracking

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Região hidrográfica Lagos São João.....	25
Figura 2: Região hidrográfica da Bacia do rio Guandu.....	27
Figura 3: Pontos de coleta da Bacia do rio São João.....	56
Figura 4: Pontos de coleta da bacia do rio Guandu.....	57
Figura 5: Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem <i>Bacteroidales</i> ) de contaminação fecal humana em material fecal.....	62
Figura 6: Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem <i>Bacteroidales</i> ) de contaminação fecal humana em material fecal.....	63
Figura 7: Detecção de biomarcadores do domínio Archaea ( <i>Methanobrevibacter smithii</i> ) de contaminação fecal humana em material fecal.....	63
Figura 8: Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem <i>Bacteroidales</i> ) de contaminação fecal bovina em material fecal.....	64
Figura 9: Detecção de biomarcadores do domínio Archaea ( <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> ) de contaminação fecal de bovinos em material fecal.....	64
Figura 10: Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem <i>Bacteroidales</i> ) de contaminação fecal suína em material fecal.....	65
Figura 11: Detecção de biomarcadores do domínio Archaea (clone P23-2) de contaminação fecal suína em material fecal.....	65
Figura 12: Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem <i>Bacteroidales</i> ) de contaminação fecal equina em material fecal.....	66
Figura 13: Detecção de biomarcadores do domínio Archaea ( <i>Methanobrevibacter gottschalkii</i> ) em material fecal.....	66
Figura 14: Detecção de biomarcadores do domínio Archaea ( <i>Methanobrevibacter smithii</i> ) de contaminação fecal humana em amostras de água da Bacia do rio São João.....	79
Figura 15: Detecção de biomarcadores do domínio Archaea ( <i>Methanobrevibacter smithii</i> ) de contaminação fecal humana em amostras de água da Bacia do rio Guandu.....	80
Figura 16: Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem <i>Bacteroidales</i> ) de contaminação fecal humana em amostras de água da Bacia do rio São João.....	80

Figura 17: Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem <i>Bacteroidales</i> ) de contaminação fecal humana em amostras de água da Bacia do rio Guandu .....	81
Figura 18: Detecção de biomarcadores do domínio Archaea ( <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> ) de contaminação fecal bovina em amostras de água da Bacia do rio São João. ....	82
Figura 19: Detecção de biomarcadores do domínio Archaea ( <i>Methanobrevibacter ruminantium</i> ) de contaminação fecal bovina em amostras de água da Bacia do rio Guandu.....	82
Figura 21: Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem <i>Bacteroidales</i> ) de contaminação fecal bovina em amostras de água da Bacia do Rio Guandu .....	83
Figura 20: Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem <i>Bacteroidales</i> ) de contaminação fecal bovina em amostras de água da Bacia do rio São João .....	83
Figura 22: Detecção de biomarcadores do domínio Archaea (Clone P23-2) de contaminação fecal suína em amostras de água da Bacia do rio São João .....	84
Figura 23: Detecção de biomarcadores do domínio Archaea (Clone P23-2) de contaminação fecal suína em amostras de água da Bacia do rio Guandu.....	85
Figura 24: Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem <i>Bacteroidales</i> ) de contaminação fecal suína amostras de água na Bacia do rio São João .....	85
Figura 25: Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem <i>Bacteroidales</i> ) de contaminação fecal suína amostras de água na Bacia do rio Guandu. ....	86
Figura 26: Detecção de biomarcadores do domínio Archaea ( <i>Methanobrevibacter gottschalkii</i> ) de contaminação fecal equina em amostras de água da Bacia do rio São João .....	87
Figura 27: Detecção de biomarcadores do domínio Archaea ( <i>Methanobrevibacter gottschalkii</i> ) de contaminação fecal equina em amostras de água da Bacia do rio São João .....	87

Figura 28: Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem <i>Bacteroidales</i> ) de contaminação fecal equina em amostras de água da Bacia do rio São João .....	88
Figura 29: Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem <i>Bacteroidales</i> ) de contaminação fecal equina em amostras de água da Bacia do rio Guandu .....	88
Figura 30: Padronização da curva-padrão para o IPC (A) Perfil de amplificação da curva padrão do IPC. (B) Curva padrão do IPC .....	91
Figura 31: Padronização da curva-padrão para o gene <i>nifH</i> de <i>M. smithii</i> (A) Perfil de amplificação da curva padrão com iniciador específico; (B) Curva padrão para quantificação do marcador de <i>M. smithii</i> .....	92
Figura 32: Padronização da curva-padrão para o gene <i>nifH</i> de <i>M. ruminantium</i> (A) Perfil de amplificação da curva padrão com iniciador específico; (B) Curva padrão para quantificação do marcador de <i>M. smithii</i> .....	93
Figura 33: Padronização da curva-padrão para o gene <i>mcrA</i> de <i>M. gottschalkii</i> (A) Perfil de amplificação da curva padrão com iniciador específico; (B) Curva padrão para quantificação do marcador de <i>M. gottschalkii</i> . .....	94
Figura 34: Padronização da curva-padrão para o gene <i>rrs</i> de <i>Bacteroidales</i> suínos (A) Perfil de amplificação da curva padrão com iniciador específico; (B) Curva padrão para quantificação do marcador de <i>Bacteroidales</i> suínos.....	95

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Classificação dos corpos d'água e principais requisitos de qualidade segundo Resolução CONAMA nº 357/2005.....	24
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para a PCR convencional.....	53
Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para a PCR em tempo real.....	59
Tabela 4: Distribuição de marcadores genéticos específicos do hospedeiro em amostras de fezes.....	68
Tabela 5: Sensibilidade e especificidade dos marcadores de contaminação fecal.....	68
Tabela 6: Parâmetros abióticos e microbiológicos da Foz do Rio São João. .	69
Tabela 7: Parâmetros abióticos e microbiológicos dos rios Bacaxá, Capivari e linha férrea do Capivari. ....	70
Tabela 8: Parâmetros abióticos e microbiológicos da represa de Juturnaíba e do rio São João. ....	71
Tabela 9: Parâmetros abióticos e microbiológicos da bacia do rio Guandu....	73
Tabela 10: Teor de metais em amostras dos seis pontos de coleta de água da bacia do rio São João.....	75
Tabela 11: Teor de metais em amostras dos seis pontos de coleta de água da bacia do rio São João.....	76
Tabela 12: Teor de metais em amostras dos seis pontos de coleta de água da bacia do rio Guandu .....	78

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Representação gráfica da detecção de contaminação fecal através da PCR convencional nas amostras de água da bacia do rio São João e da bacia do rio Guandu.....	89
Gráfico 2: Representação gráfica da quantificação do gene <i>nifH</i> de <i>M. smithii</i> , através de PCR em tempo real nas amostras de água da bacia do rio São João e em 1 grama de fezes do hospedeiro-alvo. ....	97
Gráfico 3: Representação gráfica da quantificação do gene <i>nifH</i> de <i>M. ruminantium</i> , através de PCR em tempo real nas amostras de água da bacia do rio São João e em 1 grama de fezes do hospedeiro-alvo. ....	98
Gráfico 4: Representação gráfica da quantificação do gene <i>mcrA</i> de <i>M. gottschalkii</i> , através de PCR em tempo real nas amostras de água da bacia do rio São João e em 1 grama de fezes do hospedeiro-alvo. ....	99
Gráfico 5: Representação gráfica da quantificação do gene <i>rrs</i> de <i>Bacteroidales</i> de origem suína, através de PCR em tempo real nas amostras de água da bacia do rio São João e em 1 grama de fezes do hospedeiro-alvo.....	100
Gráfico 6: Representação gráfica da quantificação de <i>M. smithii</i> , através de PCR em tempo real nas amostras de água da bacia do rio Guandu e em 1 grama de fezes do hospedeiro-alvo. ....	101
Gráfico 7: Representação gráfica da quantificação de <i>M. ruminantium</i> , através de PCR em tempo real nas amostras de água da bacia do rio Guandu e em 1 grama de fezes do hospedeiro-alvo. ....	102
Gráfico 8: Representação gráfica da quantificação de <i>M. gottschalkii</i> , através de PCR em tempo real nas amostras de água da bacia do rio São João e em 1 grama de fezes do hospedeiro-alvo. ....	102
Gráfico 9: Representação gráfica da quantificação de <i>Bacteroidales</i> de origem suína, através de PCR em tempo real nas amostras de água da bacia do rio Guandu e em 1 grama de fezes do hospedeiro-alvo. ....	103

**LISTAS DE SIGLAS**

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BFI	Bactéria Fecal Indicadora
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CEDAE	Companhia Estadual de Águas e Esgotos
CGR	Colegiados de Gestão Regional
CIB	Comissão Intergestores Bipartite
CIT	Comissão Intergestores Tripartite
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CONASS	Conselho Nacional de Secretários Estaduais de Saúde
COVAM	Coordenação de Vigilância Ambiental
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LACEN	Laboratórios Centrais
LMR	Laboratório de Micro-organismos de Referência
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	Oxigênio dissolvido
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RFM	Rastreamento de Fonte Microbiana
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
SINVSA	Subsistema Nacional de Vigilância em Saúde Ambiental
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
VIGISUS	Sistema Nacional de Vigilância em Saúde

**LISTA DE ABREVIATURAS**

°C	Grau Celsius
Ct	Ciclo threshold
dNTPs	Deoxinucleosídeos tri-fosfato
OD	Oxigênio Dissolvido
g	Grama
pb	Pares de bases
L	Litro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mM	Milimolar
mS	MiliSiemens
µM	Micromolar
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
Tm	Temperatura de melting



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	20
1.1.	VIGILÂNCIA SANITÁRIA.....	20
1.1.1.	VIGILÂNCIA AMBIENTAL EM SAÚDE .....	21
1.2.	ÁGUA .....	22
1.3.	LOCAIS DO ESTUDO .....	25
1.3.1.	Bacia hidrográfica do rio São João.....	25
1.3.2.	Bacia hidrográfica do rio Guandu .....	27
1.4.	QUALIDADE DA ÁGUA E A SAÚDE PÚBLICA.....	29
1.4.1.	O Monitoramento de Metais Pesados em Águas.....	33
1.4.2.	Parâmetros físico-químicos .....	35
1.4.3.	Parâmetros microbiológicos .....	36
1.5.	RASTREAMENTO DE FONTE MICROBIANA – RFM .....	39
1.5.1.	Ordem <i>Bacteroidales</i> .....	41
1.5.2.	Domínio Archaea.....	43
1.6.	PCR EM TEMPO REAL NA DETECÇÃO DE BIOINDICADORES .....	46
1.7.	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	48
2	OBJETIVO .....	49
	GERAL .....	49
	ESPECÍFICOS.....	49
3	METODOLOGIA .....	50
3.1.	AMOSTRAS FECAIS.....	50
3.2.	EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DAS FEZES.....	50
3.3.	OLIGONUCLEOTÍDEOS .....	51
3.4.	ESPECIFICIDADE, SENSIBILIDADE E LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) .....	54
3.5.	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DAS AMOSTRAS DE FEZES .....	54
3.6.	SEQUENCIAMENTO.....	55
3.7.	COLETA DE AMOSTRAS DE ÁGUA.....	56
3.8.	PARÂMETROS ABIÓTICOS E MICROBIOLÓGICOS .....	57

3.9. DETECÇÃO DE METAIS PESADOS.....	57
3.9.1. ICP-OES .....	58
3.9.2. ICP-MS .....	58
3.10. EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DAS AMOSTRAS DE ÁGUA.....	58
3.11. PCR E SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA.....	59
3.12. PCR EM TEMPO REAL.....	59
3.12.1. Desenho dos iniciadores e sondas.....	59
3.12.2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	59
3.12.3. Construção da curva-padrão para os ensaios de PCR em tempo real .....	60
4 RESULTADOS.....	62
4.1. DESENVOLVIMENTO DE INICIADORES PARA DETECÇÃO DE CONTAMINAÇÃO FECAL.....	62
➤ Iniciadores para contaminação fecal humana.....	62
➤ Iniciadores para contaminação fecal bovina.....	64
➤ Iniciadores para contaminação fecal suína.....	65
➤ Iniciadores para contaminação fecal equina.....	66
4.2. ESPECIFICIDADE, SENSIBILIDADE E LOD DOS INICIADORES .....	67
4.3. DOSAGEM DE PARÂMETROS ABIÓTICOS E MICROBIOLÓGICOS .....	68
4.3.1. Bacia Hidrográfica do rio São João .....	68
4.3.2. Bacia Hidrográfica do rio Guandu.....	72
4.4. DOSAGEM DE METAIS PESADOS .....	74
4.4.1. Bacia do rio São João .....	74
4.4.2. Bacia do rio Guandu.....	77
4.5. DETECÇÃO DE CONTAMINAÇÃO FECAL ATRAVÉS DA PCR CONVENCIONAL... 79	
➤ Contaminação fecal humana.....	79
➤ Contaminação fecal bovina .....	81
➤ Contaminação fecal suína .....	84
➤ Contaminação fecal equina .....	86
4.6. SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS RESULTADOS .....	89

4.7. PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL	
89	
4.7.1. Determinação quantitativa de contaminação fecal .....	95
5 DISCUSSÃO .....	104
6 CONCLUSÕES .....	109
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	110

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1. VIGILÂNCIA SANITÁRIA

A Vigilância Sanitária é conceituada como um conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e da circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde, abrangendo: 1 - o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas de processo, da produção ao consumo; 2 - o controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde (BRASIL, 1990). No que se referem ao meio ambiente, os recursos naturais representam uma relevante parcela, em especial a água.

Essa definição amplia o seu campo de atuação, pois, ao ganhar a condição de prática capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde, torna-se uma prática com poder de interferir em toda a reprodução das condições econômico-sociais e de vida, isto é, em todos os fatores determinantes do processo saúde–doença. A incorporação da noção de meio ambiente, que hoje significa mais do que o conjunto de elementos naturais físico-biológicos e de relações sociais do mundo construído pelo homem, abrange também o ambiente de trabalho (BRASIL, 1990).

A organização da Vigilância Sanitária no Brasil foi modificada com a edição da Lei 9.782 de 1999, que criou a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) – que substituiu a antiga Secretaria de Vigilância Sanitária integrante do Ministério da Saúde – e definiu o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), entrando em consonância com os ordenamentos jurídicos que organizam o sistema de saúde brasileiro, e se inserindo nas estratégias para se enfrentar os problemas da época, como a crise dos medicamentos falsificados no país (DALLARI, 2001; IVAMA & MELCHIOR, 2007).

O Sistema Nacional de Vigilância Sanitária é composto na Esfera Federal pela ANVISA, agência vinculada ao Ministério da Saúde, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), o Conselho Nacional de Secretários Estaduais de Saúde (CONASS), o Conselho

Nacional de Secretários Municipais de Saúde (CONASEMS), o Conselho Nacional de Saúde (CNS) e a Comissão Intergestores Tripartite (CIT). As Esferas Estaduais são compostas pelos órgãos de Vigilância Sanitária das Secretarias Estaduais de Saúde e do Distrito Federal que contam com os Laboratórios Centrais (LACEN) de Saúde Pública, pelos Conselhos Estaduais e Distrital de Saúde (CEDS) e pela Comissão Intergestores Bipartite (CIB) (RIBEIRO, 2010). As Esferas Municipais são compostas pelos órgãos de Vigilância Sanitária das Secretarias Municipais de Saúde (SMS), pelos Conselhos Municipais de Saúde (CMS) e Colegiados de Gestão Regional (CGR) (Rio Grande do Norte, 2007).

A definição atual da vigilância sanitária, como já foi visto, torna seu campo de abrangência vasto e ilimitado, pois poderá intervir em todos os aspectos que possam afetar a saúde dos cidadãos. Para facilitar a exposição, assumimos que seu campo de abrangência é composto por dois subsistemas, Bens e serviços de saúde e Meio Ambiente (EDUARDO E MIRANDA, 1998).

#### 1.1.1. VIGILÂNCIA AMBIENTAL EM SAÚDE

A Vigilância Ambiental em Saúde é um conjunto de ações que proporciona o conhecimento e a detecção de qualquer alteração nos fatores determinantes e condicionantes do meio ambiente que interferem na saúde humana, com a finalidade de identificar as medidas de prevenção e controle dos fatores de risco ambientais relacionados às doenças ou outros agravos à saúde (FUNASA, 2002). Desta forma, o Sistema de Vigilância Ambiental engloba as áreas de vigilância da qualidade da água, de vigilância e controle de fatores biológicos e de contaminantes ambientais (BARCELLOS E QUITÉRIO, 2006).

Os sérios problemas ambientais que afetavam o mundo levaram à convocação, pela Assembleia Geral da Organização das Nações Unidas (ONU) em 1968, da Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente Humano, em junho de 1972 em Estocolmo. Em 1988 a ONU aprovou uma Resolução determinando a realização, até 1992, de uma Conferência sobre o meio ambiente e desenvolvimento para avaliar como os países haviam promovido a proteção ambiental desde a Conferência de Estocolmo de 1972. A cidade do Rio de Janeiro

foi sede desse evento por duas vezes consecutivas, a ECO92, em 1992 e a RIO+20 em 2012.

As atividades humanas, cada dia mais intensas devido ao acentuado crescimento populacional e ao desenvolvimento industrial, têm resultado na produção de resíduos, na forma de energia ou de matérias sólidas, líquidas ou gasosas, os quais são lançados no ambiente, causando a poluição. Várias formas de poluição têm sido constatadas e, em função dos tipos de resíduos ou do ambiente onde os mesmos são lançados, podem ser classificadas como: poluição do solo, do ar, da água, acústica, radioativa, dos pesticidas, térmica, entre outras modalidades. O lançamento de esgotos domésticos ou industriais no solo, através de práticas inadequadas ou mesmo por meio de sistemas de tratamento tipo lagoas de estabilização ou de outras técnicas de aplicação de resíduos líquidos no solo, também pode resultar no carreamento de impurezas para águas superficiais ou subterrâneas, poluindo-as.

## 1.2. ÁGUA

A água é necessidade primordial para a vida, recurso natural indispensável ao ser humano e aos demais seres vivos, além de ser suporte essencial aos ecossistemas. Utilizada para o consumo humano e para as atividades socioeconômicas, é retirada de rios, lagos, represas e aquíferos, tendo influência direta sobre a saúde, a qualidade de vida e o desenvolvimento das populações (SOUZA, 2000). Cerca de 70% do planeta Terra é coberto por água, desta, 96,4 % é salgada e encontra-se nos oceanos e 3,6 % doce, aproximadamente 2,25 % estão localizados nas calotas polares e nas geleiras, enquanto apenas 0,75 % são encontrados na forma de água subterrânea, em lagos, rios e também na atmosfera, como vapor d'água.

O Brasil possui a maior disponibilidade hídrica do mundo, 12%, tendo em território nacional a produção hídrica de 182.170 m<sup>3</sup>/s. Porém a sua distribuição ocorre de forma irregular entre as regiões. No Norte estão concentrados aproximadamente 70% da água disponível para uso, onde habita apenas 7% da população nacional; enquanto os 30% restantes distribuem-se desigualmente pelo país, para atender a 93% da população (GALINDO E FURTADO, 2006; CARVALHO, 2012). O ciclo da água tem sofrido alterações em decorrência das

ações do homem e a escassez de água limpa já é um dos grandes desafios do século 21. Levando em conta que mais de 24% da população mundial não tem acesso à água tratada, o tema definitivamente entrou na agenda ambiental mundial (CAB AMBIENTAL, 2013).

Apesar de ser geralmente reconhecida a importância de manter pureza da água, na prática acontece que se fazem inúmeras descargas (industriais, urbanas, domésticas, hospitalares) de efluentes potencialmente causadores de poluição diretamente para os cursos de água e para lagos. Os dois aspectos mais frequentemente considerados quando existem problemas de qualidade da água são a eutrofização e a poluição. Com isso, a ocupação humana das bacias hidrográficas, de forma cada vez mais desordenada tem promovido uma deterioração da qualidade das águas naturais, com riscos de propagação de doenças de veiculação hídrica ao próprio ser humano.

De acordo com as Políticas de Recursos Hídricos, os corpos de água são enquadrados em classes. O enquadramento é o estabelecimento do nível de qualidade a ser alcançado e/ou mantido em um segmento de corpo de água ao longo do tempo. A Resolução do Conselho Nacional de Recursos Hídricos – CNRH, Nº 12/2000, define que as Agências de Água devem propor ao respectivo Comitê de Bacia Hidrográfica o enquadramento de corpos de água em classes segundo os usos predominantes, com base na legislação vigente. Na ausência de Agências de Água, as propostas poderão ser elaboradas pelos consórcios intermunicipais de bacias hidrográficas, com a participação dos órgãos gestores de recursos hídricos e de meio ambiente. A proposta de enquadramento deve ser desenvolvida em conformidade com os Planos de Recursos Hídricos (nacional, estadual e de bacia). A classificação dos corpos d'água e principais requisitos de qualidade segundo Resolução CONAMA nº 357/2005 estão dispostos na Tabela 1.

**Tabela 1:** Classificação dos corpos d'água e principais requisitos de qualidade segundo Resolução CONAMA nº 357/2005 (CONAMA, 2005).

<b>Águas doces (águas com salinidade igual ou inferior a 0,5 ‰)</b>				
<b>Classe</b>	<b>Destino</b>	<b>Valor mínimo</b>	<b>Valor máximo</b>	
		<b>OD<sup>a</sup> (mg/L)</b>	<b><i>E. coli</i> (NMP<sup>b</sup>/100mL)</b>	<b>Turbidez (UNT<sup>c</sup>)</b>
<b>Classe 1</b>	Abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado; Proteção das comunidades aquáticas; Recreação de contato primário; irrigação de hortaliças e frutas.	6,0	200	40
<b>Classe 2</b>	Abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional; Proteção das comunidades aquáticas; Recreação de contato primário; Irrigação de hortaliças. Aqüicultura e pesca.	5,0	1000	100
<b>Classe 3</b>	Abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado; Irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras; Pesca amadora; Recreação de contato secundário; Dessedentação de animais.	4,0	2500	100
<b>Classe 4</b>	Navegação e Harmonia paisagística.	2,0	-	-
<b>Águas salinas (águas com salinidade igual ou superior a 30 ‰)</b>				
<b>Classe 1</b>	Proteção das comunidades aquáticas; Recreação de contato primário; Aqüicultura e pesca; Irrigação de hortaliças.	6,0	1000	-
<b>Classe 2</b>	Pesca amadora; Recreação de contato secundário.	5,0	2500	-
<b>Classe 3</b>	Navegação e Harmonia paisagística.	4,0	4000	-
<b>Águas salobras (águas com salinidade superior a 0,5 ‰ e inferior a 30 ‰)</b>				
<b>Classe 1</b>	Proteção das comunidades aquáticas; Recreação de contato primário; Aqüicultura e pesca.	5,0	1000	-
<b>Classe 2</b>	Pesca amadora; Recreação de contato secundário.	4,0	2500	-
<b>Classe 3</b>	Navegação e Harmonia paisagística.	3,0	4000	-

<sup>a</sup> Oxigênio Dissolvido;

<sup>b</sup> Número Mais Provável;

<sup>c</sup> Unidades Nefelométricas de Turbidez.





diversos impactos ambientais. Sete municípios integram parcialmente o território da bacia Cachoeiras de Macacu, Rio Bonito, Casimiro de Abreu, Araruama, São Pedro da Aldeia, Cabo Frio e Rio das Ostras, enquanto o município de Silva Jardim esta integralmente nela inserido. A bacia faz limite a oeste com a bacia da baía da Guanabara, ao norte e nordeste com as bacias dos rios Macaé e das Ostras e ao sul com as bacias do rio Una e das lagoas de Araruama, Jacarepiá e Saquarema, totalizando uma área de aproximadamente de 2160 km<sup>2</sup>” (CBHLSJ, 2013).

No rio São João encontra-se a represa de Juturnaíba, que é a principal fonte de água para abastecimento público da Região dos Lagos do Rio de Janeiro. Quando cheia, o nível da água da represa atinge 8,4 m acima do nível do mar. Nesta situação, a superfície da represa é de 43 km<sup>2</sup>, perímetro de 85 km, largura máxima de 4,0 km e comprimento máximo de 15 km. A profundidade máxima atinge 8,0 m, enquanto que a média é de 2,3 m. Apesar do barramento, Juturnaíba é considerada por muitos como um santuário ecológico, em razão de sua proximidade com a Reserva Biológica Poço das Antas, além de possuir uma grande diversidade de peixes e pequenas ilhas que fazem da lagoa um viveiro natural de espécies nativas de animais. A represa tem capacidade de acumular um volume de 10 milhões de m<sup>3</sup>, sendo o tempo de residência da água (detenção hidráulica) estimado em 38 dias. Contam-se ainda dezenas de açudes, todos de pequeno tamanho, utilizados principalmente para dessedentação do gado e para irrigação” (CBHLSJ, 2013).

Ainda não há proposta de enquadramento dos corpos de água para a Bacia Hidrográfica do Rio São João. De acordo com a Resolução Conama 357/2005 em seu artigo 42, “enquanto não aprovados os respectivos enquadramentos, as águas doces serão consideradas classe 2, as salinas e salobras classe 1, exceto se as condições de qualidade atuais forem melhores, o que determinará a aplicação da classe mais rigorosa correspondente” (BRASIL, 2005; CBHLSJ, 2013).

Apesar da importância da bacia do Rio São João, pouco se sabe sobre a qualidade destas águas e o monitoramento da mesma é recente, iniciado em maio de 2011, além disso, não há registros do monitoramento da qualidade das águas da Represa de Juturnaíba, isso demonstra a necessidade de medidas mais consistentes para o controle da qualidade sanitária da bacia, a fim de diminuir possíveis impactos no ambiente e na saúde da população.

### 1.3.2. Bacia hidrográfica do rio Guandu

A bacia hidrográfica do Rio Guandu é formada pelos rios Guandu, da Guarda e Guandu-Mirim, está situada a oeste da bacia da Baía de Guanabara, contribuinte à Baía de Sepetiba, no Estado do Rio de Janeiro, e ocupa uma área de 3.600 km<sup>2</sup>, abrangendo 15 municípios onde vivem aproximadamente de 12 milhões de habitantes. (Figura 2). Grande parte do volume de água que a compõe tem origem na transposição de, em média, 120 m<sup>3</sup>/s do Rio Paraíba do Sul, no município de Barra do Pirai (SEMADS, 2001).

As águas da bacia abastecem a segunda maior região metropolitana do país, a região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro, sendo responsável pela subsistência e desenvolvimento da mesma.



**Figura 2:** Região hidrográfica da Bacia do rio Guandu. (Fonte: Comitê Guandu, 2012)

O problema do abastecimento da Região Metropolitana do Rio de Janeiro é histórico e estende-se desde os primórdios do Brasil Colônia até os dias atuais. A

bacia hidrográfica do rio Guandu teve sua vazão natural mínima extremamente ampliada com a transposição dos rios Piraí e Paraíba do Sul, no início do século XX, passando de 25 m<sup>3</sup>/s para 120 m<sup>3</sup>/s (Sondotécnica, 2007).

O rio Guandu possui como principais afluentes os rios dos Macacos, Santana, São Pedro, Poços/Queimados e Ipiranga, todos muito impactados negativamente em função de lançamentos de efluentes *in natura* (ANA, 2006).

Após a barragem da Estação de Tratamento de Água (ETA) do Guandu, uma parte será destinada a ETA para o tratamento e a outra parte do rio Guandu recebe as águas do rio Guandu-Mirim e é dividido em vários canais, sendo o principal deles o canal de São Francisco, que serve à importante zona industrial, em que se encontram a COSIGUA (Companhia Siderúrgica da Guanabara) e a termelétrica de Santa Cruz, terminando por desaguar na baía de Sepetiba.

Toda a poluição depositada nessa bacia poderia provocar um colapso no sistema de abastecimento de água dos municípios da região Metropolitana do Rio de Janeiro. Em meados da década de 1970, a Companhia Estadual de Águas e Esgotos (CEDAE) foi obrigada a desativar duas pequenas estações de tratamento de água, devida a grande quantidade de poluentes dispensados nessas águas, inviabilizando o tratamento das mesmas. No caso da ETA do Guandu, a presença de grande quantidade de esgoto é compensada pela diluição com o grande volume de água do rio Paraíba do Sul. Porém, a capacidade de fornecimento de água do rio Paraíba do Sul para o Guandu é limitada pela capacidade da elevatória de Santa Cecília e pelo abastecimento de água nas importantes cidades de São Fidélis, Cambuci e Campos dos Goytacazes (ABESA, 2013)

Outro grande problema são os areais, alguns clandestinos, que são locais em que se abrem grandes buracos para extração de areia do solo, retirando para isso a cobertura vegetal e, muitas vezes, a extração de areia que se dá no leito e ao longo das margens do rio Guandu. Embora seja uma prática ilegal, muitos areais ainda estão em funcionamento. A extração é proibida dentro da área de proteção ambiental do rio Guandu, que abrange uma faixa de terra de até quinhentos metros em ambas as margens do rio. Esta prática promove o assoreamento do rio, o que diminui a vazão da água e aumenta a concentração de poluição, facilita a ocorrência de enchentes e aumenta a quantidade de resíduos a serem retirados da água durante o tratamento.

#### 1.4. QUALIDADE DA ÁGUA E A SAÚDE PÚBLICA

Águas ambientais, incluindo lagos, córregos e marinhas costeiras são suscetíveis à contaminação fecal de uma variedade de fontes pontuais e difusas, como animais selvagens e domesticados, e/ou humanos. A poluição por animais domesticados pode incluir resíduos fecais de animais de estimação e animais de fazenda, incluindo o escoamento agrícola (BARCELLOS E QUITÉRIO, 2006).

A falta de saneamento básico no meio rural, independente da forma de ocupação, é um fator preocupante por se tratar de constante lançamento de poluentes no meio ambiente (RHEINHEIMER et al., 2003). Os resíduos rurais são a principal fonte de poluição fecal em lagos e rios, contribuindo com um terço da poluição fecal em estuários. Estes resíduos fecais podem ser transportados pelo escoamento durante chuvas afetando as bacias hidrográficas causando à eutrofização, o carreamento de sedimentos e a introdução de micro-organismos patogênicos. Essa contaminação pode ter origem em animais de criação, animais de estimação ou animais silvestres, sendo de maior relevância a contaminação proveniente de criações de alto impacto comercial, como por exemplo bovinos, caprinos, equinos, suínos e as avícolas, devido ao grande número de animais envolvidos (SIMPSON et al., 2002). Embora os riscos que essa contaminação da água por fezes animais em relação à saúde humana não seja muito divulgada, é importante a prevenção e remediação dessas fontes poluidoras (FIELD & SAMADPOUR, 2007).

A agricultura no Brasil é, historicamente, umas das principais bases da economia do país, desde os primórdios da colonização até o século XXI, evoluindo das extensas monoculturas para a diversificação da produção. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC), o Brasil é o 5º maior país do mundo em território com cerca de 20% da sua área (174 milhões de hectares) ocupada por pastagens (ABIEC, 2011). A grande variedade de sistemas produtivos em um território tão vasto também reflete na diversificação dos produtos. Em 2000, o Brasil foi consolidado como potência na produção e exportação de carne bovina, assumindo em 2004 a primeira colocação dentre os exportadores (ABIEC, 2011).

No Brasil, a criação de bovinos representa a principal e maior criação de ruminantes, que por sua vez proporcionam a produção de 10 a 15 kg/animal/dia de

dejetos (CRMV, 2011). Estudos revelam que bovinos saudáveis carregam cepas *E. coli Shiga-Like*. Cada vez mais, este sorotipo é identificado em animais não ruminantes, incluindo porcos, coelhos, gambás e aves aquáticas. Vale ressaltar que no Brasil, a primeira cepa de *E. coli Shiga-Like* foi isolada e identificada em Parelheiros, no município de São Paulo, a partir de uma amostra de água de poço (UFNAR *et al.*, 2007; BRASIL, 2011). Em adição, atualmente, o aumento das concentrações de hormônios em águas vem sendo associado ao uso desenfreado de hormônio do crescimento para o aumento da produção de leite, gerando um novo risco à saúde humana.

Outra atividade importante para a economia brasileira, a criação de suínos, gera emprego e renda para cerca de 2 milhões de propriedades rurais. A produtividade, por animal e por área, aumentou consideravelmente, passando-se a produzir grandes quantidades de dejetos em pequenas extensões de terra. A partir daí, iniciaram-se os problemas com o destino dos efluentes, além do uso dos antibióticos com diferentes finalidades, tais como: promotor de crescimento, terapêutica e "profilática" (KONZEN, 1983). No Brasil a suinocultura é uma atividade predominantemente de pequenas propriedades rurais, ocorrendo mais de 80% da produção em unidades de até 100 hectares (SCHMIDT *et al.*, 2007), porém um dos grandes entraves dessa atividade está relacionado a aspectos ambientais, devido à grande produção de dejetos pelos suínos - 2 a 3 kg/animal/dia de dejetos - principalmente, ao manejo que se dá ao mesmo. A contaminação ambiental causada pelos dejetos dos suínos é um problema sério devido ao elevado número de contaminantes, causando uma forte degradação do ar, do solo e principalmente dos recursos hídricos (águas superficiais e subterrâneas) (SEGANFREDO, 2000). Dejetos suínos são muito concentrados em matéria orgânica biodegradável (aproximadamente 55%), possuem número elevado de micro-organismos patogênicos e são ricos em nitrogênio e minerais (cobre, zinco e arsênico) (HOODA E EDWARDS, 2000; SCHMIDT *et al.*, 2007; SCANLON *et al.*, 2013).

Além disso, em regiões agrícolas e até mesmo regiões urbanas ainda podemos observar a criação de cavalos, que produz cerca de 7 a 8 kg/animal/dia de dejetos (20% urina e 80% material sólido), mais ricas em nitrogênio do que as fezes de suínos e bovinos (MATOS, 2005). A infecção de seres humanos por *Bacillus anthracis*, *Trichinella spirallis* e *Salmonella enterica*, vêm sendo associada à

contaminação de fezes de equinos. Além da contaminação fecal bovina, suína e equina, a contaminação fecal de humanos é umas das principais carreadoras de patógenos como *Bacteroides* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Candida* spp., *E. coli Shiga-Like*. Além de parasitas intestinais e seus ovos também carregam grande quantidade de antibióticos, hormônios e outras substâncias tóxicas (NOGUEIRA E MIGUEL, 2005).

As doenças veiculadas através da água têm sido apontadas constantemente como um problema nos diversos tempos históricos da humanidade. Problemas com a poluição fecal são comuns a todas as nações, independentemente de situação econômica, embora o nível de poluição e o tipo variem entre os países (STEWART *et al.* 2007). Estimativas globais sugerem que o contato com água contaminada com material fecal e consumo de moluscos colhidos a partir destas águas vêm resultando em cerca de 175 milhões de casos de doenças infecciosas a cada ano (SHUVAL 2003). Todos os anos, cerca de 1,8 milhões de crianças (4.900 mortes por dia) morrem em decorrência de diarreia e de outras doenças provocadas por água inadequada ao consumo humano e por más condições de saneamento (PNUD, 2006; BOMFIM *et al.*, 2007).

No Brasil, cerca de 43% dos municípios não possuem rede de esgoto, enquanto isso no Estado do Rio de Janeiro 35% do esgoto é tratado. A Região dos Lagos, no Estado do Rio de Janeiro, foi a região que mais avançou até agora no setor de saneamento, tendo sido alcançado o índice de 70% de esgoto tratado (SEA, 2015).

O primeiro relato descrito sobre doença de veiculação hídrica foi no ano de 1854 em Londres quando verificou-se que as áreas de Londres que eram abastecidas com água da Companhia Southpark, captação à jusante do lançamento de esgoto da cidade, registravam um número de óbitos e uma taxa de mortalidade muito superior à daquelas que recebiam a água da concorrente Lambeth com captação ao montante do ponto de lançamento de esgoto. O número de casos de cólera era elevado, em apenas 10 dias foram registradas mais de 500 mortes. A contaminação da água foi claramente comprovada por análises, ficando demonstrado então, que a água estava contaminada com fezes humanas e que era a origem da infecção por cólera (BRASIL, 2013). No Brasil, de maio a julho de 1999, a Agência Nacional das Águas relatou que em Pedra Azul, Minas Gerais, foram

contabilizados 25 casos suspeitos e uma morte causada pelo vibrião colérico veiculado pela água de consumo sem tratamento prévio (BRASIL, 2014).

A atenção das autoridades sanitárias para com os sistemas públicos de abastecimento de água, destino de dejetos, tratamento de esgoto, coleta e disposição de resíduos sólidos gerados, principalmente nos grandes centros urbanos, está tradicionalmente direcionada para as consequências que os problemas desse contexto são capazes de causar ao meio ambiente e à Saúde Pública. Essa situação tem se agravado nos últimos anos devido à contaminação frequente das águas de consumo humano, águas recreacionais e águas de irrigação por patógenos emergentes como *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *E. coli Shiga-Like*, entre outros (WHO, 2007).

A qualidade da água “in natura” é de grande importância nos sistemas de tratamento de águas superficiais, uma vez que uma falha no tratamento pode produzir água com risco à saúde dos consumidores. Em 1988 ocorreu um surto de doenças de veiculação hídrica, na Suécia, atingindo cerca de 11.000 pessoas em decorrência de uma falha na cloração da água. Com isso, podemos concluir que o monitoramento da qualidade da água que abastece as estações de tratamento é de extrema importância. A falta de estrutura sanitária e principalmente o manejo inadequado de dejetos humanos e de outros animais incorporadas ao solo são os fatores mais importantes de contaminação dos recursos hídricos (ANDERSSON & BOHAN, 2001; SILVA & MATTOS 2001).

Pesquisas realizadas pelo Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor nas cidades de São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná, constataram que a água fornecida para estas cidades, principalmente no Rio de Janeiro, tem entre seus principais problemas a contaminação por coliformes, o baixo teor de cloro na água e alterações de cor. Na cidade do Rio de Janeiro, dentre os locais avaliados, o que tem maior grau de contaminação é onde a água é fornecida pela CEDAE (Companhia de Águas e Esgotos do Rio de Janeiro). Tais parâmetros avaliados são de fundamental importância para a saúde do consumidor, pois alguns patógenos podem estar presentes na água podendo provocar surtos de doenças como cólera, gastroenterites sobretudo a diarreia (BRASIL, 2014).



#### 1.4.1. O Monitoramento de Metais Pesados em Águas

Metais pesados estão presentes nas águas devido, principalmente, às descargas de efluentes industriais (ANZECC/ARMCANZ, 2000). O chumbo, por exemplo, está presente no ar, no tabaco, nas bebidas e nos alimentos, nestes últimos, naturalmente, por contaminação. Constitui veneno cumulativo, provocando um envenenamento crônico denominado saturnismo, que consiste em efeito sobre o sistema nervoso central (MELVILLE AND BURCHETT, 2002).

Os metais pesados se acumulam no organismo e podem causar sérios problemas, como disfunções do sistema nervoso e aumento na incidência de câncer, em animais marinhos e também no homem. Devido as suas altas toxicidades, os níveis de metais pesados são duramente controlados nas Legislações vigentes como, por exemplo, a Portaria 2914 do Ministério da Saúde, que rege os parâmetros da Água Potável e o Decreto 8468 do Estado de São Paulo, que dispõe sobre o controle da Poluição do Meio Ambiente (BRASIL, 2011).

Os efeitos de metais pesados em organismos têm sido estudados há décadas, especialmente após os acidentes da Baía de Minamata e em Niigata, no Japão, nas décadas de 40 e 50, quando cerca de 1740 pessoas (além de gatos e ratos), após ingerirem peixe e mariscos com altas concentrações de metilmercúrio, vieram a adoecer, muitas ficando com sequelas (SALGADO, 1980; DIAS, 2004). Já a doença de Itai-itai (década de 60) foi provocada pelo cádmio concentrado nos grãos de arroz cultivado por inundação, que causava dor intensa nos ossos, daí o nome itai-itai ("dói-dói", em japonês) (THORNTON, 1995; DIAS, 2004).

Outro exemplo ocorreu em Hinkley, na Califórnia, EUA, onde uma empresa provocou a contaminação da água e do solo por uso indevido de cromo hexavalente. A fonte de contaminação foi uma estação de compressão de gás natural onde são usadas grandes torres de resfriamento para reduzir a temperatura dos equipamentos. O líquido utilizado nestas torres continha a substância para evitar a oxidação das máquinas. Este era armazenado em lagos artificiais, sem forro de contenção, o que permitiu a infiltração nos lençóis freáticos do agente químico em questão, desta forma muitos habitantes que usavam a água de poços artesianos foram contaminados (SANTOS, 2011). O cromo é largamente empregado nas indústrias, especialmente em galvanoplastias, onde a cromeação é um dos revestimentos de peças mais comuns. Pode ocorrer como contaminante de águas

sujeitas a lançamentos de efluentes de curtumes e de circulação de águas de refrigeração, onde é utilizado para o controle da corrosão. A forma hexavalente é mais tóxica do que a trivalente. Produz efeitos corrosivos no aparelho digestivo e nefrite (CETESB, 2007).

Um estudo feito em ratos de laboratório expostos a água contaminada com chumbo e arsénio durante 30, 90 e 180 dias, usando a avaliação dos efeitos observados nas dosagens mínimas mostrou nefrotoxicidade e stress oxidativo, houve um incremento da produção do ácido aminolevulínico pró-oxidante assim como o aumento de mecanismos de defesa celular tais como a glutathione (RIVIERE, 2006). O arsénio é facilmente absorvido no trato gastrointestinal e rapidamente transportados para os tecidos como pele, unhas, cabelos, ossos e músculos. Este composto está associado à inibição de enzimas responsáveis pelo metabolismo celular e respiração. Uma intoxicação crónica por arsénio normalmente resulta em perda de apetite, perda de peso, distúrbios gastrointestinais, hiperqueratose, entre outros sintomas (DESHPANDER, 2002). Traços deste metalóide são encontrados em águas naturais e em fontes termais. É usado como inseticida, herbicida, fungicida, na indústria da preservação da madeira e em atividades relacionadas com a mineração e com o uso industrial de certos tipos de vidros, tintas e corantes. Em moluscos, até 100 mg/Kg, sendo que a ingestão de 130 mg é fatal. Apresenta efeito cumulativo, sendo carcinogênico.

O mercúrio é largamente utilizado no Brasil nos garimpos, no processo de extração do ouro (amalgama). Este metal além de persistente no ambiente, é um dos metais mais perigosos na cadeia alimentar humana, estando relacionado com os alimentos de origem aquática. A contaminação das águas por mercúrio ocorre devido à atividade das indústrias e à atividade agrícola. Atualmente o mercúrio é utilizado em baterias, luzes fluorescentes, tintas fungicidas, entre outros itens. O mercúrio na sua forma pura não é absorvido pelo organismo, nem capaz de causar intoxicação, no entanto nas formas inorgânicas ou orgânicas é facilmente absorvido no trato gastrointestinal causando intoxicação (DIAS, 2004). Um dos seis xenobióticos ambientais mais perigosos é o metilmercúrio, sendo este eficientemente absorvido, transportado até à corrente sanguínea onde se liga às proteínas plasmáticas; é acumulado no cérebro e tem efeitos neurotóxicos. Os sinais de intoxicação por metilmercúrio variam entre distúrbios sensoriais nos membros,

língua e lábios, também o sistema nervoso central é afetado, manifestando ataxia, tremores e distúrbios visuais (COUTO, 1989; DESHPANDER, 2002).

O acelerado crescimento industrial e agrícola, a utilização, muitas vezes sem critério, de agrotóxicos e o lançamento de esgoto industrial, eventualmente sem tratamento adequado, em corpos d'água e no solo, tem provocado um incremento no conteúdo de metais pesados no ambiente, colocando em risco a saúde humana (THORNTON, 1995; MOURA, 2002). As atividades industriais, tipicamente, resultam na deposição de elevados níveis de chumbo, cádmio, mercúrio e zinco em rios e lagos, vindo a atingir os organismos aquáticos (JACKSON, 1991), razão porque estudos ligados à qualidade dos ambientes aquáticos devem levar em conta não apenas a qualidade da água, mas igualmente a vegetação, os organismos aquáticos, os sedimentos suspensos e de fundo (MOURA, 2002).

#### 1.4.2. Parâmetros físico-químicos

Águas ambientais podem conter uma grande variedade de constituintes que surgem naturalmente no seu ciclo hidrológico. A composição físico-química destas águas é constituída por uma grande variedade de solutos entre eles gases, produtos de arrastamento e da erosão das rochas e solos. Uma água natural não é uma água quimicamente pura.

Um dos principais parâmetros utilizados nas análises físico-química de água é a avaliação do potencial hidrogeniônico. A condição ácida ou básica da água refere-se à concentração de íons de hidrogênio ( $H^+$ ) em uma solução. Condições muito ácidas ou muito básicas da água afetam o desenvolvimento dos organismos nela contidos. A condutividade é a medida da habilidade de uma solução aquosa, para transportar uma corrente elétrica. Esta habilidade é indicada pela presença de sais, pois quanto maior a concentração total, e a valência desses íons, maior será a condutividade elétrica (COSTA et al., 2003). Outro parâmetro relevante é a turbidez que reflete a redução da transparência da água devido à presença de partículas sólidas em suspensão, que reduzem a transmissão da luz no meio. Ela pode reduzir a eficiência da cloração, pela proteção física dos micro-organismos do contato direto com os desinfetantes, além de transportar matéria orgânica absorvida que pode provocar alteração de sabor e odor. A turbidez pode ser avaliada numa escala de 0 a 1000 UNT (SANTOS et al., 1999). O oxigênio dissolvido (OD) é fundamental para

a sobrevivência dos organismos aeróbios presentes em ambientes aquáticos. Durante o processo de biodegradação e consumo da matéria orgânica, as bactérias fazem uso do oxigênio nos seus processos respiratórios, podendo causar uma redução acentuada da sua concentração no meio. A análise de OD é um importante teste para águas poluídas e para águas em processo de tratamento; ambientes pobres em oxigênio e ricos em matéria orgânica são propensos a proliferação de micro-organismos anaeróbios (COSTA et al., 2003). A temperatura é um parâmetro importante a ser analisado, pois está diretamente relacionado com o metabolismo dos micro-organismos. É importante o seu controle porque elevações da temperatura aumentam a taxa metabólica, aceleram o processo de biodegradação da matéria orgânica, a assimilação de nutrientes e o consumo do OD do corpo aquático, diminuem a solubilidade dos gases e aumentam a taxa de transferência de gases, o que pode causar odor desagradável (APHA, 2012; VON SPERLING, 2005). A salinidade que é a medida dos teores de sais na água, também é um fator importante porque interfere diretamente no desenvolvimento microbiano (ESTEVES, 1988).

#### 1.4.3. Parâmetros microbiológicos

As águas destinadas ao abastecimento apresentam o risco de serem poluídas por águas residuais e dejetos de origem animal ou humano, podendo, desta forma, conter micro-organismos patogênicos, tornando-se assim um veículo de transmissão de doenças. Por isso, há a necessidade de análises rotineiras, para determinar sua qualidade e seu grau de segurança do ponto de vista microbiológico. Como já foi dito, na avaliação da qualidade da água são utilizados métodos para a determinação da presença de coliformes, que atuam como indicadores de poluição fecal, já que estão sempre presentes no intestino humano e de outros animais, sendo eliminadas em grande quantidade pelas fezes. O conceito de indicador microbiológico, originalmente definido para avaliar a qualidade da água, é baseado na presença ou ausência de grupos ou de um único microrganismo indicador em ambientes aquáticos (MACÊDO, 2005).

A qualidade microbiológica da água é frequentemente avaliada por meio de bactérias fecais indicadoras, tais como *Escherichia coli* e *Enterococos*. A presença de níveis elevados desses indicadores sugere a presença de poluição fecal e

potenciais riscos para a saúde pública, no entanto, muitas vezes é difícil de vincular essas bactérias indicadoras a uma fonte de poluição específica devido à natureza ubíqua desses micro-organismos, o que dificulta a avaliação precisa dos riscos (STEWART *et al* 2007; FIELD AND SAMADPOUR, 2007). Além disso, já se sabe que as bactérias fecais indicadoras são capazes de persistirem tanto em sedimentos (DESMARAIIS *et al.*, 2002; ANDERSON *et al.*, 2005) quanto em macrófitas aquáticas submersas (BADGLEY *et al.*, 2010 a, b). Quando ocorre a suspensão destes sedimentos via turbulências naturais ou induzidas pelo homem, ressuspensões destas bactérias podem elevar as concentrações de bactérias fecais indicadoras e assim superestimar o nível de contaminação fecal em águas (GRACZYK *et al.*, 2007a, b; PHILIP *et al.*, 2009; STALEY *et al.*, 2012).

Coliformes totais, coliformes termotolerantes, enterococos e *E. coli* vêm sendo mundialmente utilizados como indicadores da qualidade microbiológica da água (APHA, AWWA & WEF, 2012), já que são micro-organismos presentes em grande número na flora intestinal de humanos e outros animais de sangue quente, e são fáceis de serem enumerados por métodos simples de cultivo (GRIFFITH *et al.*, 2009).

Os coliformes totais estão presentes no intestino e fezes de animais homeotérmicos são representados por *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Citrobacter* (BETTEGA *et al.*, 2006), porém, o grupo é mais heterogêneo e incluem uma ampla variedade de gêneros, tais como *Serratia* e *Hafnia* (GUERRA *et al.*, 2006), além de gêneros não entéricos, como *Aeromonas* spp. que, por não ser específica do trato gastrointestinal, sua enumeração em águas é menos representativa em relação a coliformes termotolerantes ou *E. coli* (MACÊDO, 2005). Os coliformes têm sido utilizados como indicadores de poluição fecal em águas há, aproximadamente, 90 anos. Durante este tempo, acumulou-se grande número de dados que permitem avaliação da sensibilidade e especificidade de tal indicador na presença de poluição de origem fecal. Análises nas fezes de animais, incluindo bovinos, suínos, ovinos, aves domésticas, cães, gatos e roedores, indicam que os coliformes termotolerantes contribuem com 93-98% do total de coliformes (GELDREICH, 1974).

Os coliformes termotolerantes são representados por três gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. A *E. coli* é considerada o principal indicador

da qualidade da água e de contaminação fecal (EDBERG *et al.*, 2000). A presença dessa bactéria em águas indica contaminação fecal, uma vez que uma série de patógenos pode ser veiculada através das fezes e requer ação imediata no que diz respeito ao controle de qualidade das águas nos seus mais diversos usos: consumo humano, recreação, irrigação, aquicultura, e outros (WHO, 2004). As legislações canadenses e europeias adotam os *Enterococos* e *E. coli* para avaliação da qualidade de águas recreacionais (HEALTH AND WELFARE CANADÁ, 1992, Directive 2006/7/EC). A resolução 357/2005 do CONAMA, que dispõe sobre a classificação de corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, utiliza os coliformes termotolerantes como padrão de qualidade microbiológica, mas permite sua substituição pela *E. coli*, de acordo com critérios estabelecidos pelo órgão ambiental competente (BRASIL, 2005).

Os coliformes de origem humana ou animal podem indicar a presença de patógenos de veiculação hídrica. No entanto, esses indicadores apresentam limitações quanto à discriminação da origem dessa contaminação fecal (humana e de animais domésticos, silvestres, aves e outros), o que é considerado um fator relevante na implementação de medidas efetivas de gerenciamento e remediação de águas superficiais (BLATCHLEY *et al.*, 2007). Outra limitação desses indicadores é a sua utilização em ambientes tropicais, onde esses micro-organismos sobrevivem em sedimentos e podem ser encontrados em áreas distantes da atividade humana. Hardina e Fujioka (1991) demonstraram que no Havaí, coliformes fecais depositados em solos foram capazes de sobreviver e serem transportados para corpos de água através de águas subterrâneas. Assim, a sua presença na coluna de água poderia não estar associada à contaminação fecal recente.

O monitoramento de todos os agentes patogênicos em ambientes aquáticos é inviável devido à grande diversidade de agentes conhecidos presentes nas fezes (incluindo vírus, bactérias e protozoários), no entanto, o monitoramento de um único ou um grupo de patógenos pode gerar resultados imprecisos no que se refere à qualidade da água. Além disso, muitos agentes patogênicos são difíceis de identificar e têm distribuições desiguais ou baixas nas águas (FIELD *et al.*, 2003; STOECKEL & HARWOOD, 2007).

Além disso, muitos estudos epidemiológicos não conseguiram associar os níveis de coliformes e os riscos à saúde humana, particularmente pela ausência da

identificação da origem da contaminação (PRIETO *et al.*, 2001; DWIGHT *et al.*, 2004; COLFORD *et al.*, 2007). A incapacidade de correlacionar a contaminação a um organismo fonte pode ser atribuída, pelo menos em parte, ao fato de que os coliformes são eliminados nas fezes de todos os animais homeotérmicos (HARWOOD *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 1999; LECLERC *et al.*, 2001). Compreender a origem da poluição fecal é essencial para a avaliação precisa dos riscos para a saúde humana, com a contaminação de fontes diferentes os níveis de risco também são diferentes.

### 1.5. RASTREAMENTO DE FONTE MICROBIANA – RFM

O rastreamento de fonte microbiana (RFM) é uma alternativa aos métodos tradicionais de detecção e tem como objetivo identificar a origem (s) da poluição fecal na água. Esses métodos baseiam-se em moléculas de assinatura (biomarcadores), tais como as sequências de DNA de micro-organismos associadas a diferentes espécies animais, permitindo a distinção entre as fontes de contaminações fecais (MIESZKIN *et al.*, 2009; SCOTT *et al.*, 2002). O RFM surgiu no final do século XX como uma tentativa para determinar as fontes dominantes de contaminação fecal em águas (BERNHARD & FIELD, 2000; SCOTT *et al.*, 2002; HARWOOD *et al.*, 2009). O impulso para o surgimento desta área de investigação deriva do esforço para determinar a extensão da fonte fecal (por exemplo, humano ou ruminante) apresenta maior risco à saúde humana. A premissa básica do RFM é que certos micro-organismos fecais são fortemente associados a hospedeiros específicos. Os métodos de RFM podem ser divididos em dependentes de cultivo e independentes de cultivo. Neste caso em particular uma "biblioteca" é uma coleção de micro-organismos de diferentes fontes potenciais, bem como do local em estudo.

Dentre os métodos independentes de cultivo e de biblioteca estão o DGGE e a PCR de sequências específicas de bioindicadores fecais como, vírus e bactérias. Os métodos dependentes de cultivo podem ser divididos em independentes de biblioteca e dependentes de biblioteca. Os métodos independentes de biblioteca consistem no enriquecimento do organismo alvo para posterior identificação, como por exemplo, a hibridização com genes específicos. Os métodos dependentes de biblioteca podem consistir em análises fenotípicas, como por exemplo, análise de resistência aos antibióticos (JIANG *et al.*, 2007; PRICE *et al.*, 2007), perfil de

utilização de fontes de carbono (HARWOOD *et al.*, 2003; MOUSSA e MASSENGALE, 2008) e MALDITOF/MS (SIEGRIST *et al.*, 2007), ou em análises genotípicas, como ribotipagem (PARVEEN *et al.*, 1999; NELSON *et al.*, 2008), PFGE (Pulse Field Gel Electrophoresis) (CASAREZ *et al.*, 2007). Os métodos dependentes de biblioteca permitem a identificação pela comparação entre os perfis encontrados na amostra teste e os padrões obtidos dos isolados das bibliotecas (SANTO DOMINGO *et al.*, 2007; FIELD e SAMADPOUR, 2007).

Na Europa, a Diretiva 2006/7/CE da União Europeia tem sido um impulso para estudos RFM na Europa, e estabeleceu claramente a importância de identificar as fontes de contaminação, como parte da gestão moderna medidas necessárias para melhorar a qualidade microbiológica de águas (SANTO DOMINGO *et al.*, 2007; UE, 2006). Exemplos de atividades recentes do RFM, além dos Estados Unidos estudos vêm sendo realizados no Canadá (CIMENTI *et al.*, 2005; MARTELLINI *et al.*, 2005; EDGE & HILL, 2007), Austrália (AHMED *et al.*, 2005; BARNES & GORDON, 2004), Nova Zelândia (GREGOR *et al.*, 2002; GILPIN *et al.*, 2003), Sudeste e leste da Ásia (ISOBE *et al.*, 2002; SAVICHTCHEVA & OKABE, 2006; PENG *et al.*, 2005; OKABE *et al.*, 2007), e Europa (SCHONNING *et al.*, 2002; REISCHER *et al.*, 2006; EBDON & TAYLOR, 2006; BLANCH *et al.*, 2007).

Nos Estados Unidos, recentemente, a necessidade do RFM, se tornou uma prioridade dos estados e territórios, em virtude do requerimento federal de desenvolvimento e execução da quantidade máxima de poluente (TMDL - total maximum daily load) que um corpo hídrico pode receber mantendo os padrões exigidos de qualidade (SANTO DOMINGO *et al.*, 2007). A TMDL é também utilizada para verificar as contribuições de fontes pontuais e não pontuais de poluição. Em geral, a contribuição das fontes pontuais, como estações de tratamento de esgoto ou efluentes industriais, é fixada por legislação específica, sendo de mais fácil controle. Por outro lado, as fontes não pontuais, que incluem agricultura, reflorestamento, animais silvestres e escoamento do solo urbano, são de difícil controle e na maior parte dos casos responsáveis por alterações na qualidade da água (SANTO DOMINGO *et al.*, 2007).

Atualmente, diversos marcadores microbianos humanos têm sido avaliados como *Bacteroides thetaiotamicron* (CARSON *et al.*, 2005), *Methanobrevibacter smithii* (UFNAR *et al.*, 2007), poliomavírus humano (MCQUAIG *et al.*, 2006) e



*Faecalibacterium* (ZHENG et al., 2009). No Brasil, as pesquisas nessa área são escassas e, dessa forma, a seleção de bioindicadores e o desenvolvimento de metodologias mais acuradas e sensíveis capazes de discriminar as diferentes fontes de contaminação fecal são de extrema relevância para assegurar a qualidade das águas e conseqüentemente evitar danos à saúde da população (FIELD & SAMADPOUR, 2007).

Um bioindicador de contaminação fecal para ser considerado ideal deve ser um microrganismo não patogênico; que pode ser detectado e enumerado por técnicas simples e rápidas; e que apresenta sobrevivência no meio ambiente similar aos patógenos. Além de permitir o rastreamento da fonte de contaminação microbiana, deve apresentar todas as características do indicador clássico e ter poder de discriminar a origem do hospedeiro (SCOTT *et al.*, 2002, USEPA, 2005). Até o momento, não existe um método único e universal para este tipo de análise, portanto a obtenção de biomarcadores moleculares que permitam a identificação de fontes de contaminação fecal humana e animal poderá ajudar na implantação de técnicas que possibilitem rastrear essas fontes de contaminação em águas superficiais. O uso desses bioindicadores para identificar a fonte de contaminação fecal é imperativo para preservar a integridade dos corpos hídricos e proteger a saúde da população.

Micro-organismos anaeróbicos constituem a maior parte da microbiota das fezes de humanos e de outros animais. Sendo assim, atualmente, os anaeróbios como *Bifidobacterium* spp., *Clostridium perfringens*, a ordem *Bacteroidales*, e *Methanobrevibacter* spp., vêm sendo apontados como bioindicadores alternativos ao grupo coliforme, uma vez que não apresentam capacidade para se adaptar ao meio aeróbio, além de correlacionar a contaminação fecal a hospedeiros específicos (BERNHARD & FIELD, 2000; BOWER *et al.* 2005). Ferramentas genômicas têm facilitado a detecção e quantificação desses micro-organismos em águas contaminadas e, assim expandindo os conhecimentos na área (RECHE *et al.*, 2010).

#### 1.5.1. Ordem *Bacteroidales*

A ordem *Bacteroidales* consiste de cinco famílias: *Bacteroidaceae*, *Rikenellaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Marinilabiliaceae* e *Prevotellaceae*, esta classificação foi baseada em análises filogenéticas do gene *rrs* do 16S rRNA

(KRIEG et al., 2010). Seus representantes são bacilos Gram-negativos, anaeróbios estritos, não esporulados. Representam uma fração substancial da flora gastrointestinal de muitos animais (BROOK, 1995; FERREIRA et al., 2003). Esta ordem tem sido proposta como um indicador alternativo da poluição fecal, em parte por causa da sua abundância nas fezes. A utilização de métodos moleculares torna mais viável a utilização de micro-organismos anaeróbicos, incapazes de sobreviverem fora do ambiente anaeróbio.

Um dos primeiros métodos desenvolvidos para a detecção de contaminação fecal foi baseado na detecção do gene *rrs* do 16S rRNA de *Bacteroidales* associados a humanos (BERNHARD & FIELD, 2000; CARSON et al., 2005; SEURINCK et al., 2005; LAYTON et al., 2006; KILDARE et al., 2007; REISCHER et al., 2007; OKABE et al., 2007; SHANKS et al., 2009; LEE AND LEE, 2010) e, mais recentemente, a aves (LU et al., 2007), alces (DICK et al., 2005), suínos (DICK et al., 2005; OKABE et al., 2007; MIESZKIN et al., 2009), cães (DICK et al., 2005; KILDARE et al., 2007) ruminantes (REISCHER et al., 2006; OKABE et al., 2007; SHANKS et al., 2008; DORAI-RAJ et al., 2009; MIESZKIN et al., 2010) e equinos (DICK et al., 2005; MIESZKIN et al., 2009). Micro-organismos da ordem *Bacteroidales* são considerados bons alvos, devido sua taxa de sobrevivência curta, uma vez liberados no ambiente natural (devido à sua baixa tolerância ao oxigênio) e sua abundância em fezes de animais de sangue quente (FIKSDAL et al., 1985; BERNHARD & FIELD, 2000; SAVICHTCHEVA E OKABE, 2006).

Estudos revelaram que *Bacteroidales* representam 20-52% da microbiota intestinal de humanos. As análises de bibliotecas gênicas (16S rRNA) sugerem menor abundância em outros hospedeiros. Outro estudo encontrou 11,2% dos filotipos relacionados a *Bacteroides* e *Prevotella* em suínos e 18% em equinos. As análises de fezes baseadas em sequências do gene *rrs* também têm revelado altas concentrações de *Bacteroidales* em bovinos (LESER et al., 2001).

A sobrevivência de *Bacteroidales* fecais em ambientes aeróbios varia entre as espécies, alguns, como *Bacteroides fragilis*, pode até mesmo crescer na presença de concentrações muito baixas de oxigênio (BAUGHN et al., 2004), enquanto a maioria *Bacteroidales* fecais sobrevivem apenas algumas horas em águas (SAVICHTCHEVA et al., 2005).

### 1.5.2. Domínio Archaea

O domínio Archaea apresenta um grande número de aspectos comuns aos domínios Bacteria e Eukarya, mas também possui características únicas (BEVERIDGE, 2001). Este domínio compreende, atualmente, cinco filos: Crenarchaeota, Thaumarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota e Nanoarchaeota (BROCHIER-ARMANET et al., 2008; PESTER et al., 2011). Crenarchaeota consiste de uma única classe, Thermoprotei, que contém organismos capazes de crescer em altas temperaturas (70 a 113°C), denominados termofílicos (KÖNNEKE et al., 2005; SALLOTO et al., 2012). O filo Thaumarchaeota possui um único representante isolado em cultura pura, o *Nitrosopumilus maritimus* isolado da água de aquário marinho (KÖNNEKE et al., 2005). O *Cenarchaeum symbiosum* (simbionte de esponjas) também é um Thaumarchaeota que habita temperaturas mais amenas, assim como outras Thaumarchaeotas mesofílicas dos ambientes marinhos (PRESTON et al. 1996).

O filo Euryarchaeota consiste de sete classes: Methanobacteria, Methanococci, Halobacteria, Thermoplasmata, Thermococci, Archaeoglobi e Methanopyri. Exceto para Methanococci, que é subdividido em três ordens, cada classe contém uma única ordem. O filo Korarchaeota engloba organismos hipertermofílicos pouco conhecidos, identificados a partir de sequências de DNA que codificam o gene ribossomal 16S rRNA, isoladas de fontes termais terrestres, porém somente são mantidas no laboratório na forma de culturas mista (Barns et al. 1996). Nanoarchaeota e *Thaumarchaeota*).

Pesquisas realizadas em uma fenda termal localizada no fundo do mar da Islândia, em 2002, levaram à identificação de uma nova espécie de archaea apresentando características bastante distintas, quando comparados aos demais membros desse domínio, sendo proposta a criação do filo Nanoarchaeota. A espécie *Nanoarchaeum equitans* (Huber et al. 2002) se diferencia das demais archaeas por ser aparentemente muito primitiva, sendo encontrada em associação com outra archaea (*Igniococcus* spp.). De acordo com seus descobridores, as grandes diferenças apresentadas por *Nanorachaeum* em relação à sequência de RNA ribossomal, sugerem que tal organismo seja classificado em um novo filo (Huber et al. 2002). Alguns autores propõem sua raiz evolutiva no filo Euryarchaeota (GAO E GUPTA, 2007), enquanto outros propõem a alocação de *N. equitans* em um ramo

que não emerge nem de Crenarchaeota e, nem de Euryarchaeota (Gribaldo & Brochier-Armanet 2006).

O filo *Euryarchaeota* é representado principalmente por archaea metanogênicas, porém, também possui um grupo distinto de organismos termo-acidófilos associados ao gênero *Thermoplasma*, que são caracterizados pela ausência de parede celular (CLEMENTINO et al. 2007). As archaeas metanogênicas são organismos obrigatoriamente anaeróbios e liberam gás metano (CH<sub>4</sub>) como resíduo metabólico. São encontradas em ambientes com ausência de oxigênio e abundância de matéria orgânica, como brejos, açudes, lagos, sedimentos marinhos e rúmen de bovinos. Elas retiram hidrogênio e gás carbônico desses ambientes e os utilizam em seu metabolismo. Vivem como simbioses de uma grande variedade de protozoários também anaeróbios, convertendo produtos finais de fermentação em gás metano ou CO<sub>2</sub>. São de grande importância no ambiente no qual vivem pela alta eficiência de sua enzima hidrogenase, que, mantendo uma baixa pressão parcial de H<sub>2</sub> – para que a metanogênese ocorra – permite que os demais organismos fermentadores façam reoxidação do NADH, o que corresponde a um maior rendimento de ATP e um aumento da biomassa. Esse fenômeno é conhecido como “*Transferência de Hidrogênio Interespecífica*” (CARDOSO et al., 2003).

O gênero *Methanobrevibacter* é um membro da ordem Methanobacteriales do domínio Archaea. Este gênero inclui 16 espécies conhecidas que habitam o trato intestinal animal, plantas em decomposição e lodo anaeróbico de estações de tratamento de esgoto. As espécies de *Methanobrevibacter* incluem *M. ruminantium* (intestino de ruminantes); *M. boviskoreani* e *M. millerae* (rumem bovino); *M. arboriphilus* encontrado em material de plantas em decomposição; *M. cuticularis*, *M. curvatus* e *M. filiformis* (intestino de cupim); *M. oralis* (cavidade bucal humana); *M. gottschalkii* e *M. thaueri* (intestino de cavalo e porco); *M. woesei* (intestino de rato e ganso); *M. acididurans* e *M. wolinii* (intestino de carneiro); *M. olleyae* (rumem ovino); *M. smithii* e *M. stadtmanae* (intestino humano) (LAI et al. 2004; LEE et al. 2013). As espécies de *Methanobrevibacter* são consideradas as metanogênicas dominantes nestes animais e ajudam na digestão da celulose. Poucas espécies ocorrem em mais de um organismo e por esse motivo podem ser utilizadas como bioindicadores de poluição fecal no ambiente. Atualmente, com o auxílio das técnicas de biologia

molecular vem se investigando as possíveis relações de prevalência de archaeas em diversas espécies de animais homeotérmicos.

Através do sequenciamento do gene *rrs* 16S rRNA, estudos confirmam a presença de *M. smithii* no intestino humano, com prevalência variável e baixa, enquanto *M. stadtmanae* apresenta menor detecção na maioria dos casos (UFNAR *et al.*, 2005). Segundo UFNAR *et al.* (2005), *M. smithii* é encontrado no trato gastrointestinal de aproximadamente um terço dos indivíduos que residem nos Estados Unidos e Reino Unido, podendo compreender até 10% de todos os anaeróbios encontrados no intestino de adultos saudáveis e altamente prevalente em esgoto misto. Entretanto, estudos demonstraram, através de otimizações no protocolo de extração de DNA de fezes humanas, dentre os 650 indivíduos analisados foi possível detectar uma elevada prevalência de *M. smithii* (95,5%) e *M. stadtmanae* (29,4%) no intestino humano (DRIDI *et al.*, 2011). Estudos em camundongos gnotobioticos (“germe-free”) indicam que o *M. smithii* afeta a especificidade e eficiência da digestão de polissacarídeos, influenciando, dessa maneira, a absorção de calorias e adiposidade do hospedeiro. O processo da metanogênese previne o acúmulo de H<sub>2</sub> no intestino humano, aumentando a eficiência da fermentação microbiana. Essas descobertas conduziram à hipótese de que *M. smithii* pode ser um alvo terapêutico para a redução da absorção de energia em humanos obesos (SAMUEL *et al.*, 2007).

Além disso, através do sequenciamento do gene *mcrA*, foi confirmada a presença de uma espécie ainda não cultivada *Methanobrevibacter* presente somente no intestino de suínos, o clone P23-2 foi considerado um bom alvo para a detecção de contaminação fecal suína (UFNAR *et al.*, 2007). Outras espécies do gênero *Methanobrevibacter* vêm sendo considerados bons alvos na detecção de contaminação fecal específicas incluem o *M. ruminantium*, isolada a partir do conteúdo do rúmen de bovinos (BRYANT, 1965), *M. thaueri*, isolada de fezes suínas, por Rolf K. Thauer e *M. gottschalkii*, isolada de fezes de equinos e nomeada em homenagem a Gerhard Gottschalk devido suas significantes contribuições na definição bioquímica da metanogênese, (KÖNIG, 1986; MILLER *et al.*, 1986, 2002).

## 1.6. PCR EM TEMPO REAL NA DETECÇÃO DE BIOINDICADORES

O surgimento de técnicas moleculares baseadas na amplificação de segmentos de DNA pela reação em cadeia da polimerase - PCR abriu inúmeras perspectivas em estudos taxonômicos e epidemiológicos envolvendo a detecção de sequências de genes conservados e funcionais, a detecção e identificação de agentes infecciosos, alterações genéticas, entre outras (GILL, 2008). A amplificação de DNA pela técnica da PCR convencional depende de diversos fatores, como a presença de inibidores, a concentração de DNA, presença de degradação do DNA, entre outros. Assim, a necessidade de monitorar simultaneamente a quantidade e qualidade do DNA amplificado levou ao desenvolvimento de uma variante da técnica da PCR convencional: a PCR em tempo real.

A PCR em tempo real, também conhecida como PCR quantitativa ou PCR em tempo real quantitativa ou simplesmente qPCR, foi descrita pela primeira vez em 1993, por HIGUCHI *et al.* O procedimento é semelhante ao da técnica da PCR convencional, diferindo essencialmente numa característica inovadora: a possibilidade de quantificação em tempo real do DNA amplificado, a cada ciclo de amplificação. Neste método, as fases de amplificação, detecção e quantificação são totalmente automatizadas, ocorrendo simultaneamente em tempo real (HEID *et al.*, 1996; AHMED, 2002; BRANQUINHO, 2010).

Os compostos fluorescentes e os equipamentos utilizados para gerar e monitorar as reações são responsáveis pela especificidade da técnica de PCR em tempo real. Os métodos de fluorescência são diversificados recorrendo sempre a um composto fluorescente, divididos em corantes intercalantes (SYBR Green®) e sondas de sequência específica (TaqMan®), de acordo com o tipo do composto fluorescente (MACKAY *et al.*, 2007; PELT-VERKUIL *et al.*, 2008). Esta abordagem vem sendo amplamente utilizada na quantificação do número de cópias de transgênicos, na resistência a antimicrobianos, na contaminação de alimentos, na detecção e quantificação de patógenos e contaminantes ambientais, entre outros (WEIGHARDT, 2004; GAŠPARIČ *et al.* 2010).

A reação de qPCR é dividida em 3 fases distintas: 1) A fase “lag” com flutuação correspondendo ao sinal do ruído de fundo (background), 2) A fase exponencial, onde a quantidade de produtos de amplificação dobra a cada ciclo, e 3) a fase onde ocorre a formação de um platô sem aumento do número de produtos de

amplificação. A quantificação na reação de PCR em tempo real ocorre na fase exponencial, onde há um acúmulo de produtos amplificados, conseqüentemente aumento da emissão de fluorescência (BRANQUINHO, 2010).

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos, para a detecção e quantificação de patógenos através da qPCR, como os micro-organismos causadores de pneumonia (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *L. pneumophila*, e *Streptococcus pyogenes*) (MOROZUMI et al., 2006), gastroenterites (*Vibrio parahaemolyticus*) (BLACKSTONE et al., 2003), infecções na corrente sanguínea (*E. aerogenes*, *S. marcescens*, *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* e *C. glabrata*) (LEHMANN et al., 2008).

Em relação aos indicadores de poluição fecal, uma variedade de micro-organismos anaeróbicos vem sendo apontados como alvos promissores, devido a sua maior abundância em comparação com indicadores tradicionais (BERNHARD AND FIELD, 2000; ECKBURG et al. 2005). Membros da ordem *Bacteroidales* estão presentes em altas concentrações nas fezes ( $10^8$  -  $10^{11}$  por grama) e não mantem a viabilidade por muito tempo quando liberados em águas doces ou salgadas devido sua intolerância ao oxigênio. Devido a estas características estes micro-organismos vêm sendo alvo frequente de ensaios de qPCR para o desenvolvimento de marcadores *Bacteroidales* humanos-, bovinos- e suínos-específico, baseados em regiões do gene *rrs* do 16S rRNA, (SEURINK et al., 2005a; KILDARE et al., 2007; REISCHER et al., 2007; REISCHER et al., 2006; OKABE et al., 2007; MIESZKIN, 2009; SCHRIEWER et al., 2010; MIESZKIN et al. 2010).

Em contrapartida, poucos estudos são relacionados à detecção e quantificação de *Methanobrevibacter* spp.. JONHSON e colaboradores (2010) descreveram o desenvolvimento de qPCR para detectar o gene *nifH* de *M. smithii* em água. Eles demonstraram alta especificidade, sensibilidade e rapidez na detecção do gene *nifH*, que foi considerado um bioindicador confiável de contaminação fecal humana em águas ambientais. Mais recentemente, estudos demonstraram a detecção de *M. oralis* por qPCR e sua correlação com a gravidade de periodontite sugerindo seu uso com biomarcador de periodontite e a detecção de *M. ruminantium* em amostras de fezes de ruminantes sugerindo marcador de contaminação fecal específica (BRINGUIER et al., 2013 CARBERRY et al., 2013).

## 1.7. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O monitoramento da qualidade da água destinada ao abastecimento público é de importância devido a capacidade de alguns micro-organismos resistirem ao tratamento, desta forma, sendo distribuídos a população. Além disso, estas mesmas águas não são somente para consumo humano, mas também para recreação, irrigação, aquicultura e dessedentação.

As metodologias utilizadas atualmente para análise microbiológica da água possuem limitações, tais como adaptação ou inibição de micro-organismos indicadores, e principalmente a não determinação do organismo fonte. Ferramentas moleculares podem ser uma solução para se contornar essas limitações. Tais ferramentas possuem elevada sensibilidade, especificidade, e fornecem resultados de forma mais rápida, sem a necessidade de cultivo e etapas adicionais de confirmação. Conseqüentemente, permitem a detecção específica de micro-organismos, cultiváveis ou não, ao contrário dos métodos tradicionais. Nesse contexto, uma metodologia baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR), como a PCR em tempo real para detecção e quantificação de bioindicadores hospedeiro-específicos pode ser promissora.

O homem e outros animais de sangue quente diferem quanto à composição de suas fezes, podendo liberar diferentes patógenos e substâncias, como antibióticos e hormônios, capazes de provocar danos à saúde da população. Portanto, determinar a origem da contaminação fecal é essencial na avaliação dos riscos à saúde que ela representa. Vale ressaltar, que no Brasil estudos de RFM ainda são escassos.

Sendo assim, o presente estudo teve como principal objetivo a identificação de fontes de contaminação fecal em águas destinadas ao abastecimento, através da detecção e quantificação de biomarcadores hospedeiro-específicos dos domínios Bacteria e Archaea, visando o rastreamento da contaminação e o monitoramento da qualidade da água, procurando prevenir possíveis riscos à saúde da população e do meio ambiente.



## 2 OBJETIVO

### GERAL

Identificar fontes de contaminação fecal em águas destinadas ao abastecimento, através da detecção e quantificação de biomarcadores hospedeiro-específicos dos domínios Bacteria e Archaea

### ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar as concentrações de coliformes totais e *E. coli* das amostras;
- ✓ Avaliar os parâmetros físico-químicos como: temperatura, pH, oxigênio dissolvido, salinidade e condutividade nas amostras;
- ✓ Determinar as concentrações de metais pesados pela espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS);
- ✓ Desenvolver iniciadores específicos para a detecção do gene *mcrA* de *Methanobrevibacter gottschalkii* e do gene *rrs* *Bacteroidales* humanos e equino pela PCR convencional;
- ✓ Determinar a especificidade e a sensibilidade dos iniciadores da PCR convencional para a detecção de *Bacteroidales* e *Methanobrevibacter* spp.
- ✓ Desenvolver iniciadores e sondas específicos para a detecção e quantificação do gene *rrs* de *Bacteroidales* suínos e *mcrA* *Methanobrevibacter smithii*, *M. ruminantium* e *M. gottschalkii*;
- ✓ Detectar e quantificar os genes marcadores de contaminação fecal específica nas amostras de água pela PCR em tempo real;
- ✓ Analisar os resultados e prever possíveis consequências para o meio ambiente e para a saúde da população;

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1. AMOSTRAS FECAIS

Para determinar a especificidade e sensibilidade dos marcadores, 49 amostras de fezes foram coletadas a partir de 6 grupos de hospedeiros. Amostras de fezes humanas (n = 12) foram coletadas de voluntários da equipe do laboratório. As amostras de fezes de cavalo (n = 12), suínos (n = 8), ovinos (n = 3), frango (n = 3) e vaca (n = 11) foram coletadas de duas diferentes fazendas no Mato Grosso do Sul. As amostras de fezes (2-20 gramas) foram coletadas em tubos estereis, refrigeradas e transportadas para o laboratório. Entre 0,3 e 0,5 g de material fecal foi lavado duas vezes com 1 mL de tampão de fosfato de sódio (PBS) (0,12 mol L<sup>-1</sup>, pH 8,0) e armazenada a -20°C para posterior extração de DNA.

#### 3.2. EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DAS FEZES

O procedimento utilizado para a extração do DNA foi de adaptado de protocolos descritos anteriormente por OGRAM *et al.*, 1987 e GROßKOPF *et al.*, 1998. O material obtido após a lavagem do material fecal foi suspenso em 1 mL de tampão PBS e centrifugados a 5.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado 2x em 1 mL de PBS, sendo centrifugado nas mesmas condições ditas anteriormente após cada ressuspensão. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram submetidas a *Freeze-Thaw*, alternando por 3x entre -70°C e 65°C a cada 2 min. Foram acrescentados 5mg de lisozima, e as amostras foram incubadas a 37°C por 1 hora. Após a incubação, foram acrescentados 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS) às amostras, que foram incubadas a 60°C por 10 min. Foram adicionados aproximadamente 250 mg de pérolas de vidro (0,1 mm de diâmetro). As amostras foram então agitadas por duas vezes no equipamento *Mini-Beadbeater-1* (BIOSPEC) por 80 segundos a velocidade máxima, e posteriormente centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi recolhido para novos microtubos de 2 mL e foram acrescentados 150 µL de solução CTAB/NaCl (10% CTAB/0,7M NaCl). As amostras foram homogeneizadas em vortex e incubadas à 65°C por 30 min e posteriormente armazenadas em freezer a -20°C overnight. Em seguida foi acrescentado de 80 µL de PBS com 1,5% BSA e 700 µL de fenol saturado com TE (pH = 7,5), sendo gentilmente misturados por 10 min e posteriormente centrifugadas a 8.000 rpm por 10 min. Após constatação da lise celular, com a formação de 3 fases,

Kayo Cesar Bianco Fernandes 2015

o sobrenadante foi recolhido para um novo tubo e foram acrescentados 800 µL de clorofórmio/isoamílico (24:1), agitando manualmente por 10 min. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min a 10°C. Foram acrescentados 250 µL de acetato de amônio (3 M) e as amostras foram colocadas no gelo por 15 min. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi recolhido para novo tubo e foram acrescentados 900 µL de isopropanol, agitando manualmente e incubando as amostras a -20°C *overnight*. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foram acrescentados 800 µL de etanol a 70 %, para lavagem do *pellet* por inversão. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram deixadas secando de 10 a 30 min. As amostras foram suspensas em água ultrapura Gibco® (DNase & RNase-free, INVITROGEN). A purificação do DNA foi realizada com Kit *DNeasy Blood & Tissue* (QIAGEN), de acordo com protocolo descrito no manual do fabricante.

Para verificar a integridade do DNA extraído, o mesmo foi visualizado num gel de agarose (SIGMA-ALDRICH) a 1% em tampão Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE) corado com 0,3 ng/mL de brometo de etídio. A análise foi realizada no equipamento de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE Healthcare). Em seguida o DNA foi quantificado em equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer (INVITROGEN) conforme o manual do fabricante.

### 3.3. OLIGONUCLEOTÍDEOS

As reações de PCR para a detecção de *Bacteroidales* humanos bem como equinos-associado foram realizadas de acordo com protocolos anteriormente descritos (Bernhard e Field, 2000; Dick et al., 2005). No entanto, não foi observado o fragmento esperado, mesmo depois de vários procedimentos de otimização. A fim de contornar este problema, novos oligonucleotídeos específicos para *Bacteroidales* equinos e humanos foram desenhados com base em sequências do gene *rrs* do 16S rRNA (AY212554 e AF233411, respectivamente) disponíveis no GenBank. Também foi desenhado um novo conjunto de iniciadores para a detecção de *M. gottschalkii* baseado no gene *mcrA* (EU919431). Os iniciadores foram desenhados usando software Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e sintetizados pela Invitrogen (Co., Carlsbad, CA, EUA). A análise de especificidade

iniciador foi realizada primeiramente *in silico* utilizando o programa BLASTn contra o banco de dados NCBI e por PCR-In Silico contra o DNA genómico de Archaea e Bacteria (<http://insilico.ehu.es/PCR>).

**Tabela 2:** Oligonucleotídeos utilizados para a PCR convencional.

Iniciadores	Sequências (5'-3')	Alvo	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Temp. Anelamento (°C)	Tamanho do produto (pb)	Referência
HuM113F HuM403R	ACTCTTGGCCAGCCTTCTGA ACCCATAGGGCAGTCATCCT	16S rRNA / <i>Bacteroidales</i> humano	1,5	57	291	Neste Estudo
Mnif-342F Mnif-363R	AACAGAAAACCCAGTGAAGAG ACGTAAAGGCACTGAAAAACC	<i>nifH</i> / <i>Methanobrevibacter smithii</i>	2	58	222	Ufnar (2006)
CF128F CF592R	CCAACYTTCCCGWTACTC AYMTCCCGTCTACGCTCC	16S rRNA / <i>Bacteroidales</i> bovinos	1,5	56	464	Bernhard (2000) Liu (2012)
Mrnif-F Mrnif-R	AATATTGCAGCAGCTTACAGTGAA TGAAAATCCTCCGCAGACC	<i>nifH</i> / <i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	2	56	336	Ufnar (2007a)
PF163F PF548R	GCGGATTAATACCGTATGA CCCAATAAATCCGGATAACG	16S rRNA / <i>Bacteroidales</i> suínos	1,5	55	385	Dick (2005) Neste Estudo
P23-2 F P23-2 R	TCTGCGACACCGGTAGCCATTGA ATACACTGGCGACATTCTTGAGGATTAC	<i>mcrA</i> / Clone P23-2	2	60	258	Ufnar (2007b)
HoR201F HoR442R	TGGGGATGCGTCTGATTAGC CCCACACGTGGGTCACCTTTA	16S rRNA / <i>Bacteroidales</i> equinos	1,5	53	242	Neste Estudo
GoT285F GoT404R	GCACAAACTGGTTTAAGCGGA GGAGAATACGTTAGCAGCACCA	<i>mcrA</i> / <i>Methanobrevibacter gottschalkii</i>	1,5	54	120	Neste Estudo

### 3.4. ESPECIFICIDADE, SENSIBILIDADE E LIMITE DE DETECÇÃO (LOD)

A sensibilidade (r) e especificidade (s) dos iniciadores foi testada usando o DNA fecal de humanos, porcos, cavalos, vacas, carneiros e frangos. Os valores de r e s foram calculados de acordo com as seguintes fórmulas:  $r = [TP/(TP + FN)]$  e  $s = [TN/(TN + FP)]$ , onde TP é o número de amostras que foram positivas para a PCR do marcador da espécie (verdadeiro positivo); FN é o número de amostras que foram negativas para a PCR do marcador da espécie (falsos negativos); TN é o número de amostras que foram negativas para a PCR do marcador de uma outra espécie (verdadeiro negativo); e FP é o número de amostras que eram positivas para um marcador de uma outra espécie (falsos positivos). Para determinar o LOD de *Bacteroidales* associados a equinos e humanos e o marcador de *Methanobrevibacter* associado a equinos, foram feitas diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) do DNA das amostras de fezes.

### 3.5. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DAS AMOSTRAS DE FEZES

A mistura para a reação PCR das amostras de fezes e água teve o volume final de 50 uL contendo 1X de tampão de PCR; 5% de dimetil-sulfóxido (DMSO), 200  $\mu$ M de desoxirribonucleotídeos fosfatados; concentração adequada de cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) (Tabela 1); 2U *Taq Platinum DNA* polimerase (Invitrogen®); 50  $\mu$ M (de cada) do iniciador; cerca de 25 ng de DNA molde e água Gibco® completando o volume. As condições de ciclo consistem de um passo inicial de 95°C durante 5 min, e 35 ciclos de amplificação a 95°C durante 1 minuto, temperatura de anelamento adequado (Tabela 1) durante 1 minuto e 72°C durante 1 minuto. E um alongamento final a 72°C durante 6 minutos. A amplificação foi realizada em termociclador *Mastercycler EP* (EPPENDORF). Os produtos da PCR foram visualizados num gel de agarose (SIGMA-ALDRICH) a 2% em tampão Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE) corado com 0,3 ng/mL de brometo de etídio. O primeiro poço foi reservado para a adição do padrão de peso molecular (100 bp DNA Ladder, INVITROGEN). A análise foi realizada no equipamento de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE Healthcare). Após confirmar a amplificação, os produtos foram purificados utilizando kit *QIAquick® PCR Purification* (QIAGEN), de acordo com o manual do fabricante.

O DNA das cepas de referência *Methanobrevibacter smithii* INCQS A45D (DSM 11975), *Methanobrevibacter ruminantium* INCQS A36D (DSM 1093), *Methanobrevibacter gottschalkii* INCQS A49D (DSM 11977) foram empregados como controles positivos da reação de detecção de bioindicadores do domínio *Archaea*. Os fragmentos amplificados na detecção de bioindicadores do domínio *Bacteria* foram sequenciados e após confirmação da identidade, os mesmos foram empregados como controles positivos nas reações para tal domínio. Como controle negativo, foram utilizadas as cepas de *Escherichia coli* INCQS 00043/ATCC 23229, *Klebsiella pneumoniae* INCQS 00629/ATCC BAA-1706, *Neisseria gonorrhoeae* INCQS 00604/IAL1894 (WHO-D) e *Pantoea agglomerans* INCQS 00721/ATCC 33243. Além disso, também foi adicionada uma alíquota de água deionizada estéril (Gibco®) para avaliar a ausência de DNA contaminante na mistura de PCR.

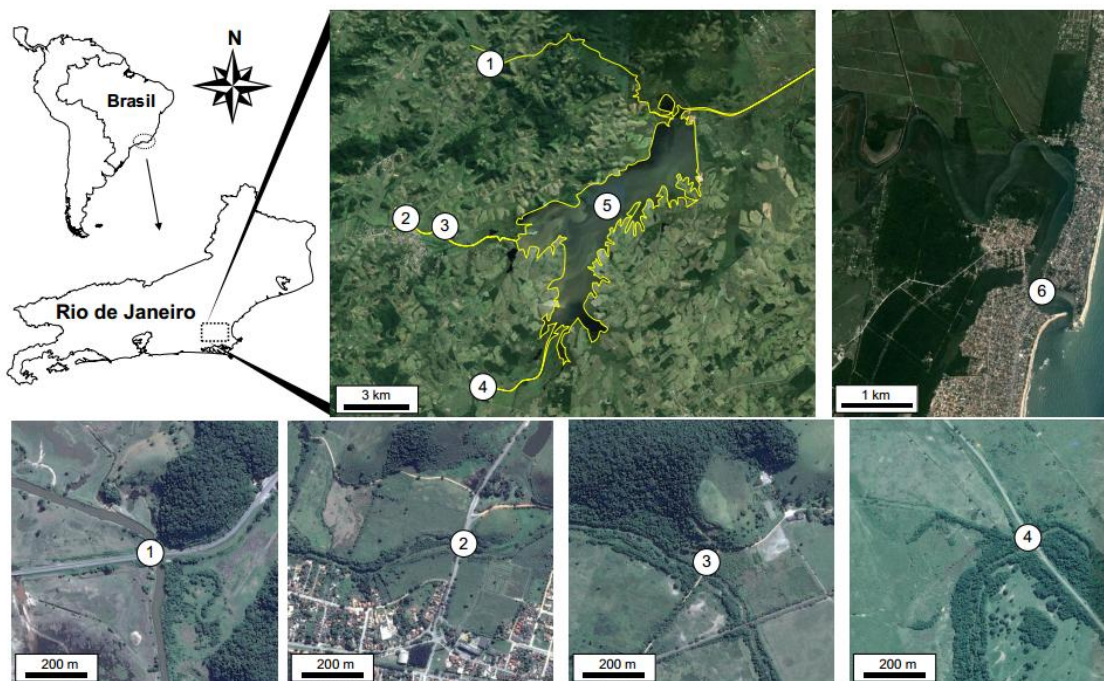
### 3.6. SEQUENCIAMENTO

Os produtos purificados foram submetidos ao sequenciamento com objetivo de confirmar a identidade dos fragmentos amplificados. Em cada poço foi adicionado 3,2 µM dos respectivos iniciadores (Tabela 1) e cerca de 200 ng dos produtos foram distribuídos em placa de 96 poços *MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate* (APPLIED BIOSYSTEMS). A placa foi submetida a uma reação de amplificação em termociclador *Mastercycler EP* (EPPENDORF), nas seguintes condições: 40 ciclos de 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. As reações de sequenciamento foram realizadas usando o kit *Big Dye Terminator* por eletroforese capilar em aparelho *ABI 3730 DNA Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) (Plataforma PDTIS/FIOCRUZ). As sequências com “Phred score” maior ou igual a 20 foram consideradas boas e incluídas nas análises subsequentes.

Os cromatogramas obtidos foram convertidos para o formato “fasta” através do software *Sequencher 3.0* (Gene Codes Corporation, Ann Harbor, MI). A análise de similaridade das sequências foi realizada pelo programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), no GenBank (National Center for Biotechnology Information-NCBI).

### 3.7. COLETA DE AMOSTRAS DE ÁGUA

Foram coletadas amostras de água (5 L de cada ponto) da Represa de Juturnaíba, Rio São João, Foz do Rio São João, Rio Capivari, Linha Férrea Capivari e Rio Bacaxá em diferentes períodos de tempo (Maio/2013, Novembro/2013, Maio/2014). Para cada amostra, 4 L foram filtrados através de sistema Stericup® 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore) posteriormente o DNA total foi extraído usando um método descrito no item 4.2. As amostras de água para detecção de metais pesados foram coletadas em frascos com capacidade para armazenar 500 mL de amostra contendo 1 mL de ácido nítrico P.A. e conservadas em caixa de isopor com gelo até chegarem ao laboratório.

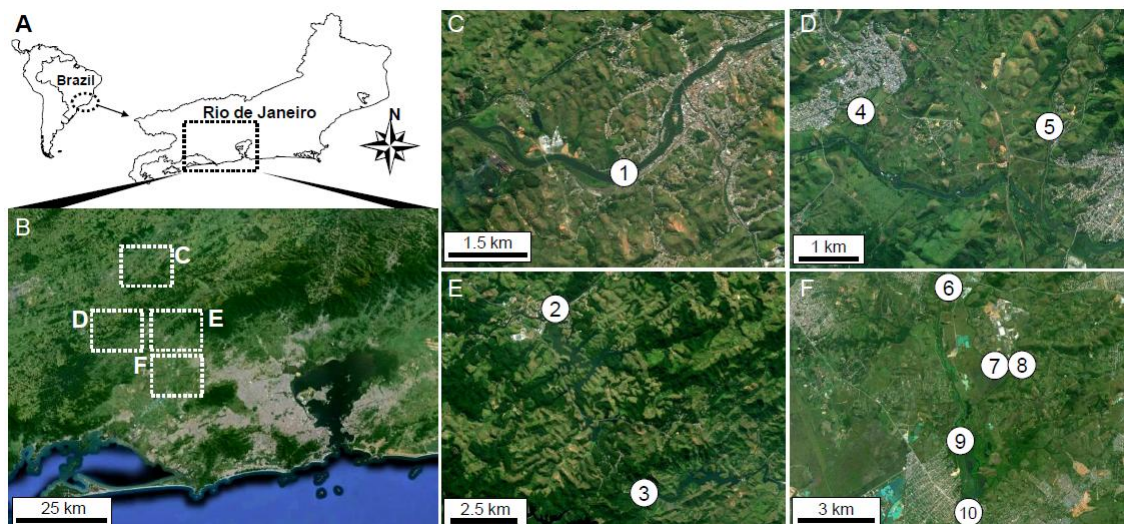


**Figura 3:** Pontos de coleta da Bacia do rio São João. (1) Rio São João -  $22^{\circ}33'52.85''\text{S}$  e  $42^{\circ}21'49.68''\text{O}$ , (2) Rio Capivari -  $22^{\circ}38'33.31''\text{S}$  e  $42^{\circ}24'0.87''\text{O}$ , (3) Linha Férrea Capivari -  $22^{\circ}38'48.15''\text{S}$  e  $42^{\circ}22'35.88''\text{O}$ , (4) Rio Bacaxá -  $22^{\circ}42'44.56''\text{S}$  e  $42^{\circ}21'37.18''\text{O}$ , (5) Represa de Juturnaíba -  $22^{\circ}38'26.98''\text{S}$  e  $42^{\circ}18'16.97''\text{O}$ , (6) Foz do Rio São João -  $22^{\circ}35'41.08''\text{S}$  e  $41^{\circ}59'43.85''\text{O}$ .

Também foram coletadas amostras de água (5 L de cada ponto) da bacia do rio Guandu (Agosto/2014). Para cada amostra, 4 L foram filtrados através de sistema Stericup® 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore) posteriormente o DNA total foi extraído usando um método descrito no item 4.2. As amostras de água para detecção de metais pesados



foram coletadas em frascos com capacidade para armazenar 500 mL de amostra contendo 1 mL de ácido nítrico P.A. e conservadas em caixa de isopor com gelo até chegarem ao laboratório.



**Figura 4:** Pontos de coleta da bacia do rio Guandu. (1) Barragem de Santa Cecília - 22°28'56.81"S 43°50'20.45"O, (2) Rio Pirai - 22°37'41.90"S 43°53'49.22"O, (3) Calha de Ribeirão das Lajes - 22°41'31.43"S 43°51'44.38"O, (4) Rio dos Macacos - 22°38'5.99"S 43°42'17.79"O, (5) Rio Santana - 22°38'13.87"S 43°40'5.58"O, (6) Rio Guandu - 22°43'40.35"S 43°38'26.18"O, (7) Rio Poços - 22°45'35.51"S 43°36'57.70"O, (8) Rio Queimados - 22°45'35.33"S 43°36'56.53"O, (9) Final da Lagoa - 22°47'8.43"S 43°37'48.04"O, (10) Barragem Principal - 22°48'31.69"S 43°37'39.44"O.

### 3.8. PARÂMETROS ABIÓTICOS E MICROBIOLÓGICOS

Um litro de cada amostra foi analisado e os seguintes parâmetros abióticos foram aferidos: temperatura, pH, condutividade, oxigênio dissolvido (OD), turbidez e salinidade. As dosagens foram realizadas através do equipamento Water Quality Checker U-10 (HORIBA). A determinação do número mais provável (NMP) para detecção de coliformes totais e de *E. coli* foi realizada através do método do substrato definido (COLILERT, IDEXX), conforme protocolo descrito em Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA & WEF 2012).

### 3.9. DETECÇÃO DE METAIS PESADOS

As análises foram realizadas no Setor de Elementos Inorgânicos do Laboratório de Alimentos - Departamento de Química, INCQS. As concentrações de metais pesados foram determinadas utilizando as técnicas de espectrometria de

emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).

### 3.9.1. ICP-OES

O ICP-OES, muitas vezes conhecido simplesmente como ICP, é uma técnica de análise multi-elemento que utiliza uma fonte de plasma indutivamente acoplado para dissociar a amostra em seus átomos ou íons constituintes, excitando-os a um nível em que eles emitem luz de um comprimento de onda característico. Um detector mede a intensidade da luz emitida e calcula a concentração de um determinado elemento na amostra. O instrumento ICP simultâneo pode identificar até 60 elementos em uma única amostra em menos de um minuto, sem nenhum compromisso de limites de precisão ou de detecção (Thermo Elemental, 2001). Esta técnica foi usada para determinar e quantificar Manganês (Mn), Alumínio (Al), Bário (Ba), Cromo (Cr), Fluor (F), Cobre (Cu), Zinco (Zn), Lítio (Li), Prata (Ag), Níquel (Ni), Cobalto (Co), Selênio (Se) e Urânio (U).

### 3.9.2. ICP-MS

ICP-MS é uma técnica multi-elemento que também usa uma fonte de plasma ICP para dissociar a amostra em seus átomos constituintes ou íons. No entanto, neste caso, os próprios íons são detectados, em vez das luzes que estes emitem. Os íons são extraídos do plasma e passam para o espectrômetro de massa, onde são separados com base em sua relação atômica massa-carga, por um analisador quadrupolo ou setor magnético. O elevado número de íons produzidos, combinado com fundos muito baixos, oferece os melhores limites de detecção disponíveis para a maioria dos elementos, normalmente em partes por trilhão (Thermo Elemental, 2001). Esta técnica foi usada para determinar e quantificar Cadmio (Cd), Cobre (Cu), Zinco (Zn), Chumbo (Pb) e Mercúrio (Hg).

## 3.10. EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

O DNA total das amostras foi extraído, purificado e quantificado de acordo com o protocolo descrito no item 3.2.

### 3.11. PCR E SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA

A PCR e o sequenciamento das amostras de água foram realizados de acordo com protocolos descritos previamente nos itens 3.5 e 3.6, respectivamente.

### 3.12. PCR EM TEMPO REAL

#### 3.12.1. Desenho dos iniciadores e sondas

Após a detecção, através da PCR convencional, e confirmação das identidades, foram determinados os alvos a serem utilizados na PCR em tempo real. Novos iniciadores e sondas foram desenhados com base nas sequências obtidas na PCR convencional utilizando o software “OligoArchitect™ Online” disponível em <http://www.oligoarchitect.com> (Tabela 3). Inicialmente as amplificações de PCR foram realizadas *in silico* através do site <http://insilico.ehu.es/> e no programa BLASTn, com objetivo de avaliar a especificidade dos iniciadores. Após a avaliação, foram determinados os kits a serem utilizados.

**Tabela 3:** Oligonucleotídeos utilizados para a PCR em tempo real.

Iniciadores	Sequências (5'-3')	Alvo	Tamanho do produto (pb)
qMnif12F qMnif143R qMnifProbe	CAGTGAAGAGGATATTATTGTA ACACCTAAGTTTTCAAGTC (FAM) AGCTACTATTACACCACGTCCG (BHQ-1)	<i>nifH</i> / <i>Methanobrevibacter smithii</i>	131
qMr181-F qMr325-R qMr201-P	ATGTGTTGAAAGCGGAGGTC GCAGACCACATCCCCTAAAA (Cy5) CTGAACCTGGAGTGGGATGT (BHQ-2)	<i>nifH</i> / <i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	145
qPF191F qPF276R qPFProbe	CAGCAGTGAGGAATATTG GCAGTTTACAACCCATAG (TET) CACGCTACTTGGCTGGTTCA (BHQ-1)	16S rRNA / <i>Bacteroidales</i> suínos	86
qGot23F qGot103R qGotProbe	GGTACTTATCCATGTA CT TAC CACCACATTGATCTTGTA A (Cy3.5) CGAAACCGTAGAAACCTAATCTGGAAT (BHQ-1)	<i>mcrA</i> / <i>Methanobrevibacter gottschalkii</i>	80

#### 3.12.2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real

O DNA de referência de *Methanobrevibacter smithii* INCQS A45D (DSM 11975), *Methanobrevibacter ruminantium* INCQS A36D (DSM 1093),

*Methanobrevibacter gottschalkii* INCQS A49D (DSM 11977) foram empregados como controles positivos da reação de detecção e quantificação de bioindicadores do domínio Archaea. O fragmento amplificado na detecção do bioindicador de contaminação fecal suína do domínio Bacteria foi sequenciado e após confirmação da identidade, o mesmo foi empregado como controle positivo nas reações para tal domínio. Como controle negativo, foram utilizadas as cepas de *Escherichia coli* INCQS 00043/ATCC 23229, *Klebsiella pneumoniae* INCQS 00629 (ATCC BAA-1706), *Neisseria gonorrhoeae* INCQS 00604 (IAL1894 (WHO-D)), *Pantoea agglomerans* INCQS 00721 (ATCC 33243), *Haloferax volcanii* INCQS A1 (DSM 3757) e *Halococcus morrhuae* INCQS A12 (DSM 1307). Além disso, também foi adicionada uma alíquota de água deionizada estéril (Gibco®) para avaliar a ausência de DNA contaminante na mistura de PCR.

A mistura para a reação de PCR em tempo real teve o volume final 20 µL, contendo 0,25 µM de cada iniciador e 0,2 µM de sonda (Tabela 3). Também compõem a mistura: 1X de MasterMix QuantiNova Probe (Qiagen®), cerca de 25 ng de DNA da amostra e água Gibco® completando o volume nas seguintes condições: 5 minutos a 95 °C, 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C. A amplificação foi realizada em termociclador Rotor-Gene Q 5PLEX HRM PLATFORM. Para visualização dos resultados e análises dos parâmetros das reações, como *Threshold Cycle* (Ct) e  $\Delta Rn$  foi utilizado o software Rotor-Gene ScreenClust HRM Software fornecido pelo fabricante.

### 3.12.3. Construção da curva-padrão para os ensaios de PCR em tempo real

As concentrações de DNA foram determinadas pelo Qubit® 2.0 Fluorometer quantitates (Life Technologies). Todas as reações foram realizadas em duplicata. A inclinação da curva-padrão para cada alvo foi calculada por regressão linear, segundo as diluições seriadas, pelo programa incorporado no sistema de detecção Rotor-Gene Q 5PLEX HRM PLATFORM (Rotor-Gene Q Series Software v.2.1. As curvas-padrão foram construídas para determinar o número de cópias amplificadas do gene marcador de cada alvo. O número de cópias foi calculado conforme manual do equipamento.

Foi utilizado também o kit *Exogenous Internal Positive Control TaqMan®* (IPC) (Integrated DNA Technologies) para verificar a presença de inibidores, de acordo

com instruções do fabricante. Após a construção da curva do IPC, foram realizadas reações com o kit do IPC e com uma mistura do DNA das amostras e uma concentração conhecida de IPC. Onde foram observados *Ct* (*Cycle threshold*) diferentes do esperado, foi calculada a inibição de acordo com a seguinte fórmula:

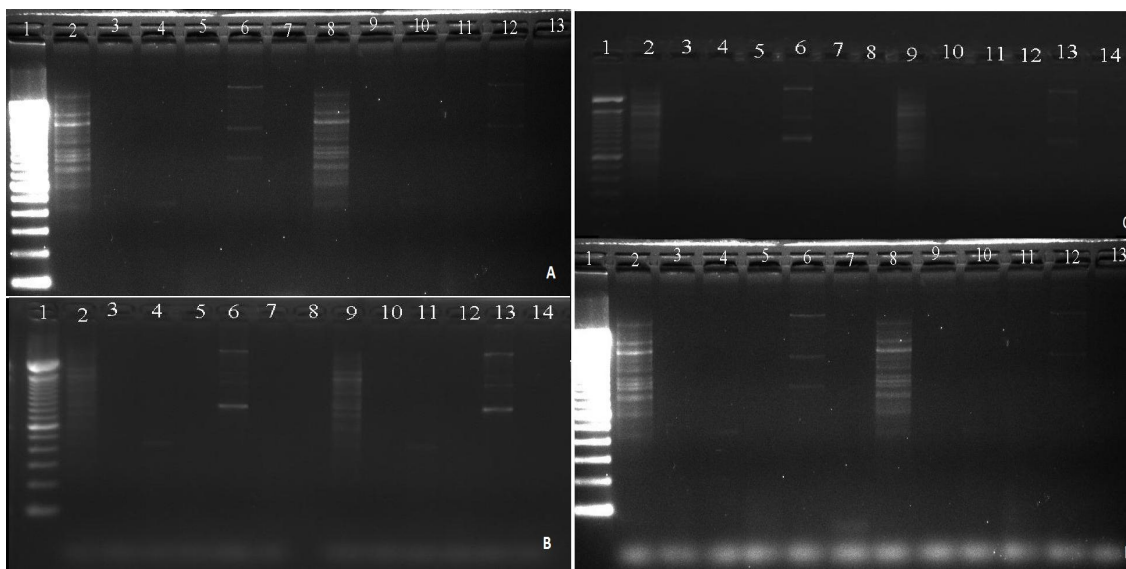
$$2^{(Ct \text{ Amostra} + \text{IPC} - Ct \text{ IPC})}$$

## 4 RESULTADOS

### 4.1. DESENVOLVIMENTO DE INICIADORES PARA DETECÇÃO DE CONTAMINAÇÃO FECAL

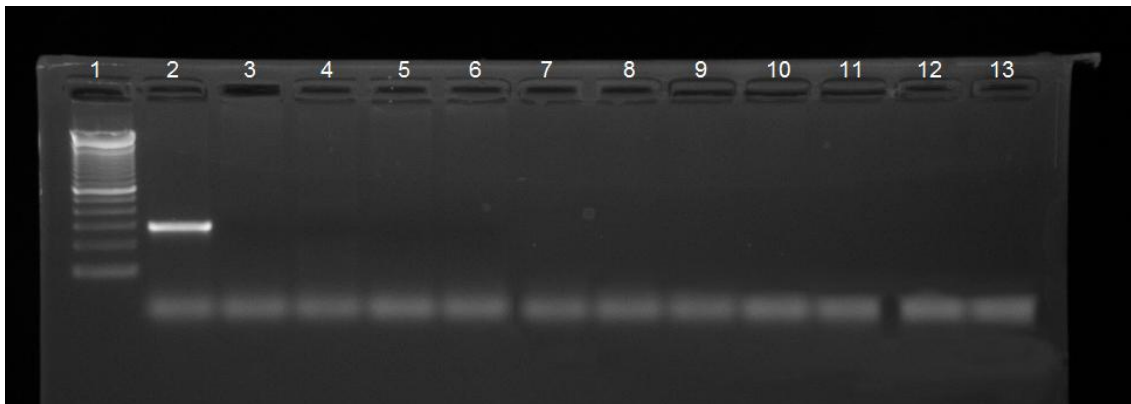
#### ➤ Iniciadores para contaminação fecal humana

Iniciadores para o gene *rrs* de *Bacteroidales* para a determinação de contaminação fecal humana (HF183F e HF183R) foram testados inicialmente, porém apresentaram inespecificidade. Em seguida foram realizadas curvas de concentração de MgCl<sub>2</sub> (1,0, 1,5, 2,0, 2,5 mM) e de temperatura de anelamento (50°C, 52°C, 55°C, 57°C), porém as inespecificidades permaneceram (Figura 5).



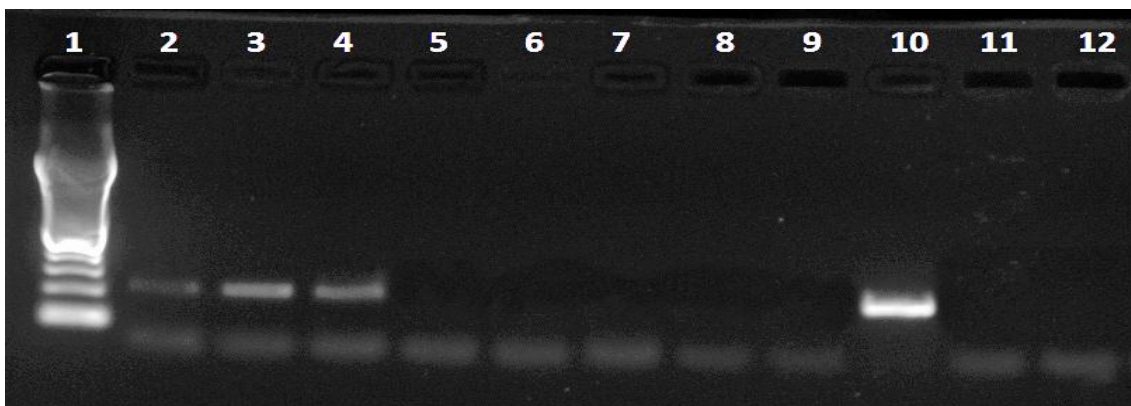
**Figura 5:** Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem *Bacteroidales*) de contaminação fecal humana em material fecal. **(A)** Ciclo da PCR descrito por BERNHARD AND FIELD (2000), Linha (1) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (2) Água de curral; Linha (3) Fezes equinas; Linha (4) Fezes suínas; Linha (5) Fezes de carneiro; **Linha (6,7,8) Fezes humanas**; Linha (9) Fezes de galinha; Linha (10) Fezes bovinas; Linha (11) Fezes de carneiro; Linha (12) *K. pneumoniae* INCQS 00629/ATCC BAA-1706; Linha (13) Água Gibco®. **(B)** Ciclo da PCR descrito por SEURINCK et al. (2005). Linha (1) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (2) Água de curral; Linha (3) Fezes equinas; Linha (4) Fezes suínas; Linha (5) Fezes de carneiro; **Linha (6,7,8) Fezes humanas**; Linha (9) Fezes de galinha; Linha (10) Fezes bovinas; Linha (11) Fezes de carneiro; Linha (12) *K. pneumoniae* INCQS 00629/ATCC BAA-1706; Linha (13) Água Gibco®. **(C)** Curva de concentração de MgCl<sub>2</sub>, Linha (1) Peso molecular (100 pb Invitrogen); **Linha (2 a 11) Material fecal humano**; Linha (12) *K. pneumoniae* INCQS 00629/ATCC BAA-1706; Linha (13) Água Gibco®. **(D)** Curva de temperatura de anelamento, Linha (1) Peso molecular (100 pb Invitrogen); **Linha (2 a 11) Material fecal humano**; Linha (12) *K. pneumoniae* INCQS 00629/ATCC BAA-1706; Linha (13) Água Gibco®.

Novos iniciadores para o gene *rrs* de *Bacteroidales* humanos (HuM113F e HuM403R) foram desenhados a fim de eliminar a inespecificidade. Os novos iniciadores foram testados frente ao material fecal de diversos hospedeiros e apresentaram especificidade frente ao material fecal humano, a reação de PCR resultou na amplificação de fragmento único de aproximadamente 291 pb (Figura 6).



**Figura 6:** Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem *Bacteroidales*) de contaminação fecal humana em material fecal. Linha (1) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (2) Fezes humanas; Linha (3-4) Fezes suínas; Linha (5-6) Fezes bovinas; Linha (7-8) Fezes equinas Linha (9) Fezes de galinha; Linha (10) *K. pneumoniae* INCQS 00629/ATCC BAA-1706; Linha (11) Água Gibco®.

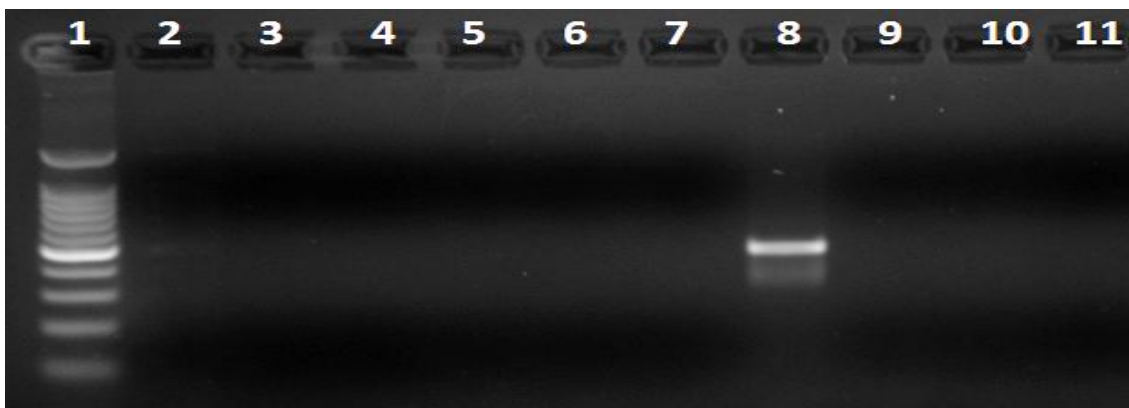
Os iniciadores para o gene *nifH* de *Methanobrevibacter smithii* (Mnif-342F e Mnif-363R) foram avaliados segundo o protocolo descrito pelo autor frente ao DNA total extraído das fezes de diferentes hospedeiros e apresentaram especificidade frente ao material fecal humano, a reação de PCR resultou na amplificação de um fragmento único de aproximadamente 222 pb (Figura 7).



**Figura 7:** Detecção de biomarcadores do domínio Archaea (*Methanobrevibacter smithii*) de contaminação fecal humana em material fecal. Linha (1) Peso molecular (100 pb Invitrogen); **Linha (2-4) Fezes humanas**; Linha (5-6) Fezes suínas; Linha (7-8) Fezes bovinas; Linha (9) Fezes equinas **Linha (10) *M. smithii* INCQS A45D/DSM 11975**; Linha (11) *K. pneumoniae* INCQS 00629/ATCC BAA-1706; Linha (12) Água Gibco®.

➤ Iniciadores para contaminação fecal bovina

Os iniciadores para o gene *rrs* da ordem *Bacteroidales* específicos para a detecção de contaminação fecal bovina (CF128F e CF592R) e para o gene *nifH* de *Methanobrevibacter ruminantium* (Mrnif-F e Mrnif-R) foram testados segundo os protocolos descritos pelos autores com DNA total extraído de fezes de diferentes hospedeiros. A reação de PCR resultou na amplificação de um fragmento único de aproximadamente 464 pb para a ordem *Bacteroidales* (Figura 8) e aproximadamente 336 pb para o *M. ruminantium* (Figura 9).



**Figura 8:** Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem *Bacteroidales*) de contaminação fecal bovina em material fecal. Linha (1) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (2-3) Fezes humanas; Linha (4) Fezes equinas; Linha (5) Fezes de galinha; Linha (6) Fezes suínas; Linha (7) Fezes de carneiro; **Linha (8) Fezes bovinas**; Linha (9) Água de curral; Linha (10) *K. pneumoniae* INCQS 00629/ATCC BAA-1706; Linha (11) Água Gibco®.

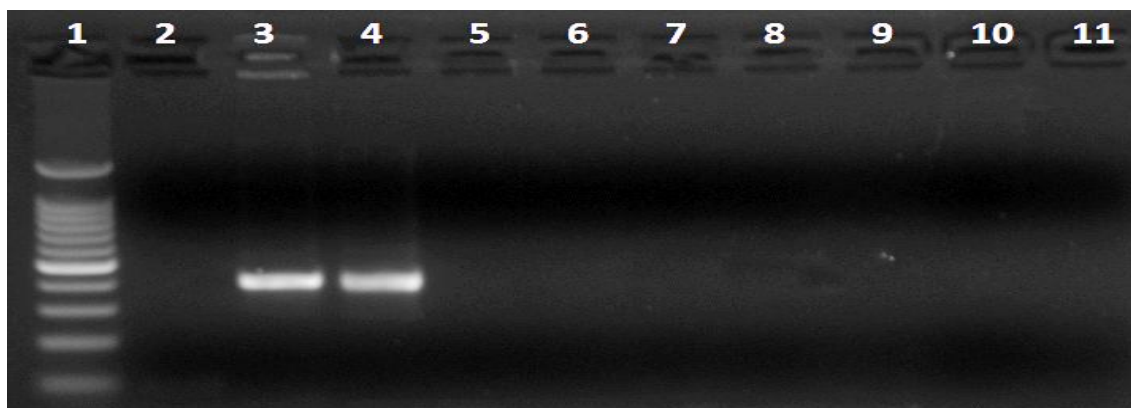


**Figura 9:** Detecção de biomarcadores do domínio Archaea (*Methanobrevibacter ruminantium*) de contaminação fecal de bovinos em material fecal. Linha (1) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (2) Água de curral; **Linha (3) Fezes bovinas**; Linha (4) Fezes de galinha; Linha (5) Fezes equinas; Linha (6) Fezes suínas; Linha (7-8) Fezes humanas; **Linha (9) *M. ruminantium* INCQS A36D/DSM 1093**; Linha (10) *K. pneumoniae* INCQS 00629/ATCC BAA-1706; Linha (11) Água Gibco®.

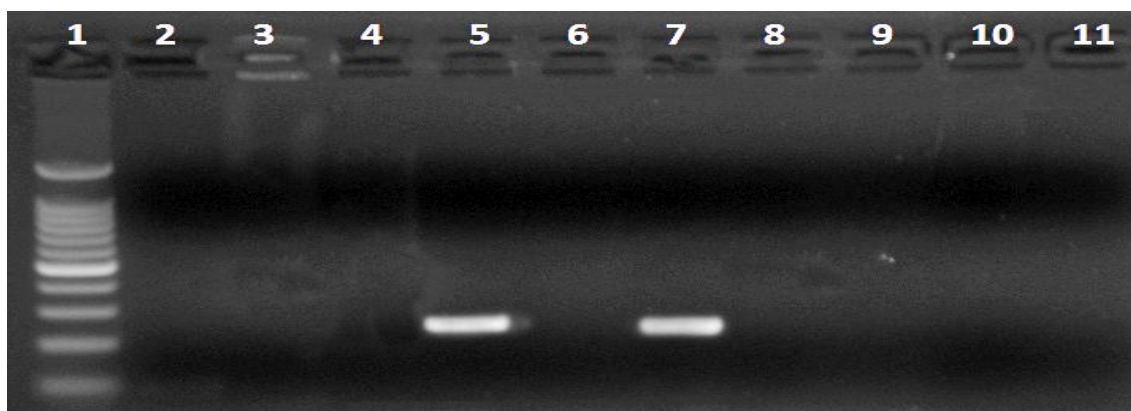


➤ Iniciadores para contaminação fecal suína

Os iniciadores para organismos da ordem *Bacteroidales* específicos para a detecção de contaminação fecal de suína (PF163F e PF548R) e para o clone P23-2 (P23-2 F e P23-2 R) foram testados segundo os protocolos descritos pelos autores com DNA total extraído de fezes de diferentes hospedeiros. A reação de PCR resultou na amplificação de um fragmento único de aproximadamente 385 pb para a ordem *Bacteroidales* (Figura 10) e aproximadamente 258 pb para o P23-2 (Figura 11).



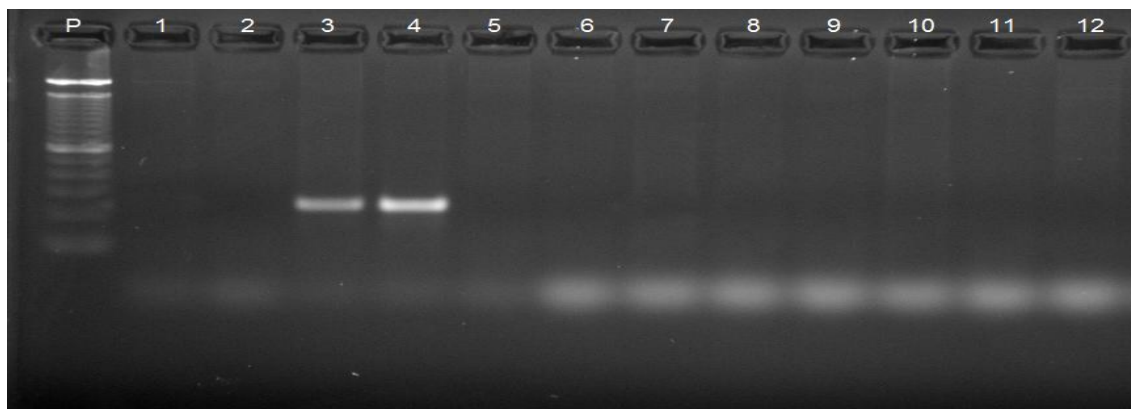
**Figura 10:** Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem *Bacteroidales*) de contaminação fecal suína em material fecal. Linha (1) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (2) Fezes humanas; **Linha (3,4) Fezes suínas**; Linha (5) Fezes equinas; Linha (6) Fezes de galinha; Linha (7) Fezes suínas; Linha (8) Fezes de ruminante; Linha (9) Fezes de carneiro Linha (10) *K. pneumoniae* INCQS 00629/ATCC BAA-1706; Linha (11) Água Gibco®.



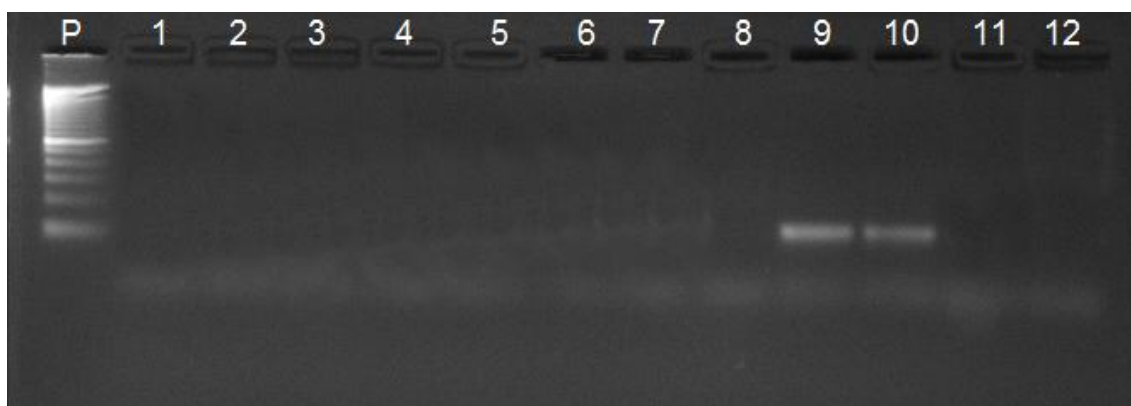
**Figura 11:** Detecção de biomarcadores do domínio Archaea (clone P23-2) de contaminação fecal suína em material fecal. Linha (1) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (2) Água de curral; Linha (3) Fezes bovinas; Linha (4) Fezes equinas; **Linha (5) Fezes suínas**; Linha (6) Fezes humanas; **Linha (7) Fezes suínas**; Linha (8) *K. pneumoniae* INCQS 00629/ATCC BAA-1706; Linha (9) Água Gibco®.

➤ Iniciadores para contaminação fecal equina

Os iniciadores para organismos da ordem *Bacteroidales* específicos para a detecção de contaminação fecal de suína (HoR201F e HoR442R) e para *Methanobrevibacter gottschalkii* (GoT285F e GoT404R) foram testados com DNA total extraído de fezes de diferentes hospedeiros. A reação de PCR resultou na amplificação de um fragmento único de aproximadamente 242 pb para a ordem *Bacteroidales* (Figura 12) e aproximadamente 120 pb para o *M. gottschalkii* (Figura 13).



**Figura 12:** Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem *Bacteroidales*) de contaminação fecal equina em material fecal. Linha (P) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (1-2) Fezes humanas; **Linha (3-4) Fezes equinas**; Linha (5-6) Fezes suínas; Linha (7-8) Fezes bovinas; Linha (9) Fezes de galinha; Linha (10) *K. pneumoniae* INCQS 00629/ATCC BAA-1706; Linha (11) Água Gibco®.



**Figura 13:** Detecção de biomarcadores do domínio Archaea (*Methanobrevibacter gottschalkii*) em material fecal. Linha (P) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (1-3) Fezes humanas; Linha (4-5) Fezes suínas; Linha(6-8) Fezes bovinas; **Linha (9) Fezes equinas**; **Linha (10) *M. gottschalkii* INCQS A49D/DSM 11977**; Linha (11) *K. pneumoniae* INCQS 00629/ATCC BAA-1706; Linha (12) Água Gibco®.

#### 4.2. ESPECIFICIDADE, SENSIBILIDADE E LOD DOS INICIADORES

A especificidade e sensibilidade dos marcadores humanos, bovino, equino e suínos foram avaliados pela triagem 49 amostras fecais de 6 grupos de hospedeiros. O marcador humano do domínio Archaea foi detectado em todas (12/12) amostras de DNA de fezes humanas testadas e não foi observado em grupos não-alvo (0/37). No entanto, *Bacteroidales* associado a humanos foram observados em 8 de 12 amostras humanas e 1 de 37 amostras de DNA de fezes de outros animais. O marcador bovino archaeano foi detectado em 10 de 11 amostras de DNA fecal de bovinos, enquanto *Bacteroidales* bovinos foi detectado em todas as amostras de fezes bovinas analisados (11/11). O marcador archaeano suíno foi detectado em todas as amostras de fezes de suínos (8/8), enquanto o marcador do mesmo domínio para equinos foi amplificado em todas as amostras de equinos (12/12). Por outro lado, *Bacteroidales* suínos e equinos foram detectados em 7 de 8, e 10 de 12 das amostras de cada hospedeiro-alvo, respectivamente (Tabela 4). A sensibilidade do marcadores do domínio Archaea associados a humanos, suínos e equinos para diferenciar entre seu próprio grupo e outras amostras de fezes de animais foi de 1 (valor máximo de 1), como foi observado no marcador bacteriano associado à bovinos. *Bacteroidales* associados a humanos, equinos e suínos apresentaram valores de sensibilidade de 0,67, 0,83 e 0,88, respectivamente, enquanto que para o marcador archaeano associado a bovinos foi de 0,91. O valor da especificidade para todos os marcadores archaeanos e para *Bacteroidales* associados a suínos e equinos foi de 1 (valor máximo de 1). O valor especificidade para *Bacteroidales* tanto humanos quanto bovino foi de 0,97. Todos os resultados de sensibilidade e especificidade são apresentadas na Tabela 5. O marcador archaeano equino foi capaz de amplificar um único fragmento visível até uma diluição de  $10^{-5}$  de DNA fecal de cavalo. O LOD dos biomarcadores restantes foi estabelecido na diluição  $10^{-2}$  do DNA. Para determinar a reprodutibilidade dos ensaios, várias repetições ( $n = 5$ ) de DNA genômico diluído seriadamente foram testados.

**Tabela 4:** Distribuição de marcadores genéticos específicos do hospedeiro em amostras de fezes.

Alvo	N. de amostras testadas	N. de resultados positivos na PCR							
		Marcadores humanos		Marcadores bovinos		Marcadores suínos		Marcadores equinos	
		Archaea	Bacteria	Archaea	Bacteria	Archaea	Bacteria	Archaea	Bacteria
Humano	12	12/12 (100%)	8/12 (67%)	-	-	-	-	-	-
Suíno	8	-	-	-	-	8/8 (100%)	7/8 (91%)	-	-
Bovino	11	-	-	(10/11) 91%	11/11 (100%)	-	-	-	-
Equino	12	-	-	-	-	-	-	12/12 (100%)	10/12 (83%)
Frango	3	-	-	-	-	-	-	-	-
Ovino	3	-	1/3 (33%)	-	-	-	-	-	-

**Tabela 5:** Sensibilidade e especificidade dos marcadores de contaminação fecal

Valor	Marcadores humanos		Marcadores bovinos		Marcadores suínos		Marcadores equinos	
	Archaea	Bacteria	Archaea	Bacteria	Archaea	Bacteria	Archaea	Bacteria
Sensibilidade (r)	1	0.67	0.91	1	1	0.88	1	0.83
Especificidade (s)	1	0.97	1	0.97	1	1	1	1

### 4.3. DOSAGEM DE PARÂMETROS ABIÓTICOS E MICROBIOLÓGICOS

#### 4.3.1. Bacia Hidrográfica do rio São João

O valor de pH mais baixo foi apresentado na 1ª coleta na Linha Férrea do Capivari com valor igual a 6,25 e o mais alto também na 1ª coleta na Foz do Rio São João com valor igual a 8,70 (Tabela 7 e 6, respectivamente). Os valores de condutividade ficaram entre 43,4 mS/cm na 2ª coleta na Foz do Rio São João e 0,040 mS/cm na 1ª coleta no Rio Capivari (Tabela 6 e 7, respectivamente). Em relação a turbidez o valor encontrado na 1ª coleta do Rio Bacaxá de 202 NTU foi considerado elevado e o menor valor foi na 2ª coleta na Represa de Juturnaíba com 1 NTU (Tabela 8 e 6, respectivamente). Os níveis de oxigênio dissolvido apresentaram-se em sua maioria dentro do preconizado pela legislação, entretanto a 1ª coleta nos rios Bacaxá e Capivari e na Linha Férrea do Capivari apresentaram valores abaixo do esperado, 4,40, 3,27 e 3,05 mg/L, respectivamente (Tabela 7). As temperaturas variaram entre 22,8 e 33 °C, 1ª coleta na Foz do rio São João e na 2ª coleta na Represa de Juturnaíba, respectivamente (Tabela 5 e 7, respetivamente).

Os parâmetros microbiológicos também foram considerados dentro do limite preconizado na maioria dos pontos, com exceção da 3ª coleta da Foz do Rio São João com >2500 NMP/100mL de *E. coli* e 2ª coleta do Rio Capivari com 1119,9 NMP/100mL (Tabela 6 e 7, respectivamente).

**Tabela 6:** Parâmetros abióticos e microbiológicos da Foz do Rio São João.

Parâmetro	Padrão CONAMA 357/05 classe I Águas Salobras	Foz do Rio São João		
		1ª Coleta (Maio/2013)	2ª Coleta (Novembro/2013)	3ª Coleta (Maio/2014)
pH	6,5 a 8,5	8,70	7,5	6,98
Condutividade (µS/cm)	-	18,9	43,4	23,9
Turbidez (NTU)	<100	15	5	48
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	>5,0	11,14	5,3	5,91
Temperatura (°C)	-	22,8	27	25
Salinidade (‰)	≥0,5 a 30	1,13	2,86	1,44
Coliformes Totais (NPM/100ml)	-	>2500	>2500	>2500
<i>E. coli</i> (NPM/100ml)	<1000	1203,3	517,4	>2500

**Tabela 7:** Parâmetros abióticos e microbiológicos dos rios Bacaxá, Capivari e linha férrea do Capivari.

Parâmetro	Padrão CONAMA 357/05 classe II Águas Doces	Rio Bacaxá		Rio Capivari		Rio Capivari (Linha Férrea)	
		1ª Coleta (Novembro/2013)	2ª Coleta (Maio/2014)	1ª Coleta (Novembro/2013)	2ª Coleta (Maio/2014)	1ª Coleta (Novembro/2013)	2ª Coleta (Maio/2014)
pH	6,0 a 9,0	6,76	6,93	6,53	6,95	6,25	7,34
Condutividade (µS/cm)	-	0,064	0,078	0,040	0,048	0,041	0,050
Turbidez (NTU)	<100	202	35	66	10	79	12
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	>5,0	4,40	5,40	3,27	5,40	3,05	5,71
Temperatura (°C)	-	26	30	30	26	31	28
Salinidade (‰)	≤0,5	0,00	0	0,00	0,00	0,00	0
Coliformes Totais (NPM/100ml)	-	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500	>2500
<i>E. coli</i> (NPM/100ml)	<1000	597,4	82	547,5	920,8	435,2	1119,9

**Tabela 8:** Parâmetros abióticos e microbiológicos da represa de Juturnaíba e do rio São João.

Parâmetro	Padrão CONAMA 357/05 classe II Águas Doces	Represa de Juturnaíba			Rio São João		
		1ª Coleta (Maio/2013)	2ª Coleta (Novembro/2013)	3ª Coleta (Maio/2014)	1ª Coleta (Maio/2013)	2ª Coleta (Novembro/2013)	3ª Coleta (Maio/2014)
pH	6,0 a 9,0	8,10	6,90	7,34	7,55	7,70	7,60
Condutividade ( $\mu\text{S/cm}$ )	-	0,071	0,057	0,062	0,654	0,310	0,349
Turbidez (NTU)	<100	6	1	3	12	78	20
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	>5,0	7,03	5,15	5,84	6,03	5,40	5,2
Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	-	25	33	28	25	27	25
Salinidade ( $\text{‰}$ )	$\leq 0,5$	0,00	0,00	0	0,00	0,00	0,01
Cloro Residual (ppm)	0,01	0	0	0	0	0	0
Coliformes Totais (NPM/100ml)	-	549,3	98,7	1553,1	1011,2	>2500	>2500
<i>E. coli</i> (NPM/100ml)	<1000	1	0	4,1	6,2	597,4	307,6

#### 4.3.2. Bacia Hidrográfica do rio Guandu

O valor de pH mais baixo foi apresentado no rio Pirai e na Calha de ribeirão das Lajes com valor igual a 6,4 e o mais alto também no final da Lagoa com valor igual a 7,8. Os valores de condutividade ficaram entre 586 mS/cm no rio Poços e 33 mS/cm na calha de Ribeirão das Lajes. Em relação a turbidez os valores encontrados foram considerados dentro do limite preconizado. Os níveis de oxigênio dissolvido apresentaram-se em sua maioria dentro do preconizado pela legislação, entretanto o rio Pirai, Macacos e Poços apresentaram valores abaixo do preconizado, 4,8, 2,4 e 2,3 mg/L. Vale ressaltar que o rio Queimados apresentou zero mg/L. As temperaturas variaram entre 20,2 e 22,8 °C, na barragem de Santa Cecilia e no rio Macacos, respectivamente. Os parâmetros microbiológicos foram considerados dentro do limite preconizado na maioria dos pontos, com exceção dos rios Macacos e Queimados com >25000 NMP/100mL de *E. coli* (Tabela 9).



**Tabela 9:** Parâmetros abióticos e microbiológicos da bacia do rio Guandu.

	Padrão CONAMA 357/05 classe II Águas Doces	Barragem Santa Cecilia	Rio Pirai	Calha de R. Lajes	R. Macacos	R. Santana	R. Guandu	R.Poços	R. Queimados	Final Lagoa	Barragem Principal
pH	6,0 a 9,0	6,6	6,4	6,4	6,7	6,7	6,6	7	6,8	7,8	7
Condutividade (µS/cm)	-	93	91	33	322	60	89	586	238	335	84
Turbidez (NTU)	<100	2,9	2,6	2,2	7,1	5,8	2,8	20,1	13	24,8	3,6
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	>5,0	7,1	4,8	8,7	2,4	9,3	8,8	2,3	0	8,3	8,2
Temperatura (°C)	-	20,2	20,6	21,7	22,8	22,6	21,7	22	22,2	21,3	21,5
Salinidade (%)	≤0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coliformes Totais (NPM/100ml)	-	9804	6131	6488	>25000	>25000	2909	816,4	>25000	>25000	410,6
<i>E. coli</i> (NPM/100ml)	<1000	120	97	<10	>25000	426	52	41	>25000	248,1	35,5

#### 4.4. DOSAGEM DE METAIS PESADOS

##### 4.4.1. Bacia do rio São João

A concentração de Mn mais alta foi apresentada no Rio Bacaxá com valor igual a  $0,209 \pm 0,0027$  mg/L, superior ao permitido pela legislação, e a mais baixa no Rio São João com valor igual a  $0,027 \pm 0,0002$  mg/L. Os valores de Al ficaram entre  $1,01 \pm 0,013$  mg/L, na Foz do Rio São João e  $0,059 \pm 0,0103$  mg/L na Represa de Juturnaíba. Em relação ao Fluor os valores apresentados se elevados com menor concentração de  $0,290 \pm 0,0079$  mg/L na Represa de Juturnaíba e maior concentração de  $1,95 \pm 0,034$  mg/L no Rio Bacaxá. Os níveis de Cr apresentaram-se em acima do limite preconizado pela legislação que é inferior a 0,05 mg/L, variando de  $0,065 \pm 0,00$  mg/L no Rio Capivari e  $0,067 \pm 0,0001$  mg/L no Rio Bacaxá. Todas as concentrações de U apresentarem muito acima do limite permitido pela legislação variando entre  $0,124 \pm 0,0023$  e  $0,850 \pm 0,0079$ , na Represa de Juturnaíba e na Foz do Rio São João, respectivamente. As concentrações de Li, Ag, Co, Cu, Zn, Pb, As, Cd se encontram dentro do padrão preconizado pela legislação. Os valores encontrados para Hg encontram-se dentro da legislação, com exceção do Rio Bacaxá que apresentou valor igual a  $0,00046$  mg/L (Tabela 10 e 11).

**Tabela 10:** Teor de metais em amostras dos seis pontos de coleta de água da bacia do rio São João. Resultado médio de 3 leituras.

Elemento	Padrão CONAMA 357/05 classe II Águas Doces	Rio Bacaxá	Represa de Juturnaíba	Linha Férrea do Capivari	Rio Capivari	Rio São João
Mn	0,1 mg/L	0,209±0,0027	<0,02	0,036±0,0010	0,058±0,0022	0,027±0,0002
		0,203±0,0019	<0,02	0,049±0,0007	0,058±0,0013	0,028±0,0009
Al	0,1 mg/L	0,118±0,0083	0,069±0,0076	0,091±0,0111	0,127±0,0467	0,108±0,0032
		0,125±0,0122	0,059±0,0103	0,096±0,0023	0,098±0,0067	0,133±0,0031
F	0,3 mg/L	1,95±0,034	0,317±0,0034	1,35±0,034	1,53±0,035	0,6±0,0128
		1,89±0,030	0,290±0,0079	1,37±0,031	1,50±0,021	0,641±0,0141
Ba	0,7 mg/L	0,047±0,0007	0,020±0,0003	0,055±0,0011	0,056±0,0004	<0,01
		0,045±0,0005	0,019±0,0004	0,055±0,0011	0,055±0,0001	<0,01
Ni	0,025 mg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
		<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Cr	0,05 mg/L	0,067±0,0001	0,065±0,0002	0,065±0,0002	0,065±0,00	0,065±0,0004
		0,066±0,0002	0,065±0,0003	0,065±0,0003	0,065±0,0001	0,065±0,0004
U	0,02 mg/L	0,751±0,0075	0,132±0,0029	0,561±0,003	0,623±0,0102	0,236±0,0029
		0,738±0,0151	0,124±0,0023	0,557±0,0081	0,616±0,005	0,257±0,0066
Li	2,5 mg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
		<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ag	0,01 mg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
		<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Se	0,01 mg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
		<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Co	0,05 mg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
		<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Cu	0,009 mg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
		<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Zn	0,18 mg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ar	0,01 mg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Hg	0,0002 mg/L	0,00046	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Pb	0,01mg/L	0,0006	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Cd	0,001 mg/L	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

**Tabela 11:** Teor de metais em amostras dos seis pontos de coleta de água da foz do rio São João. Resultado médio de 3 leituras.

Elemento	Padrão CONAMA 357/05 classe I Águas Salobras	Foz do Rio São João
Mn	0,1 mg/L	0,047±0,0013
		0,050±0,0004
Al	1,5 mg/L	0,866±0,0195
		1,01±0,013
F	0,3 mg/L	1,37±0,020
		1,64±0,023
Ba	1,0 mg/L	<0,01
		<0,01
Ni	0,025 mg/L	<0,1
		<0,1
Cr	0,05 mg/L	0,065±0,0002
		0,065±0,0002
U	0,5 mg/L	0,692±0,0087
		0,850±0,0079
Ag	0,005 mg/L	<0,1
		<0,1
Se	0,01 mg/L	<0,1
		<0,1
Cu	0,005 mg/L	1,09±0,014
		1,43±0,012
Zn	0,09 mg/L	<0,1
Ar	0,01 mg/L	<0,1
Hg	0,0002	0,0001
Pb	0,01	0,0005
Cd	0,005	<0,0001

#### 4.4.2. Bacia do rio Guandu

Foram encontrados valores elevados de Al (0,266 e 0,272 mg/L) no rio Queimados, seguido da final da lagoa (0,186 e 0,16 mg/L), barragem principal (0,137 mg/L), rio Santana (0,118 e 0,119 mg/L) e barragem de Santa Cecília (0,114 e 0,113 mg/L). Em relação aos outros elementos não foi possível detectá-los devido a sua baixa concentração nas amostras (Tabela 12).

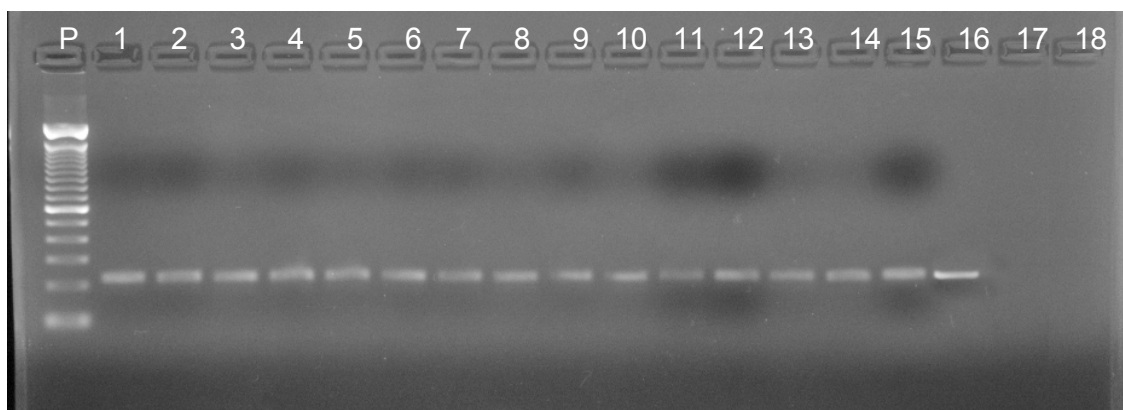
**Tabela 12:** Teor de metais em amostras dos seis pontos de coleta de água da bacia do rio Guandu. Resultado médio de 3 leituras.

Elemento	Padrão CONAMA 357/05 classe II Águas Doces	Barragem Santa Cecília	Rio Pirai	Calha Rib. das Lajes	Rio Macacos	Rio Santana	Rio Guandu	Rio Poços	Rio Queimados	Final Lagoa	B. Principal
Al	0,1 mg/L	0,114	0,071	0,037	0,1	0,118	0,085	0,079	0,266	0,186	0,137
		0,113	0,07	0,048	0,09	0,119	0,082	0,091	0,272	0,16	0,137
Ba	0,7 mg/L	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Ni	0,025 mg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Cr	0,05 mg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
U	0,02 mg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Li	2,5 mg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Ag	0,01 mg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Se	0,01 mg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Co	0,05 mg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Cu	0,009 mg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Zn	0,18 mg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
As	0,01 mg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Pb	0,01mg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Cd	0,001 mg/L	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

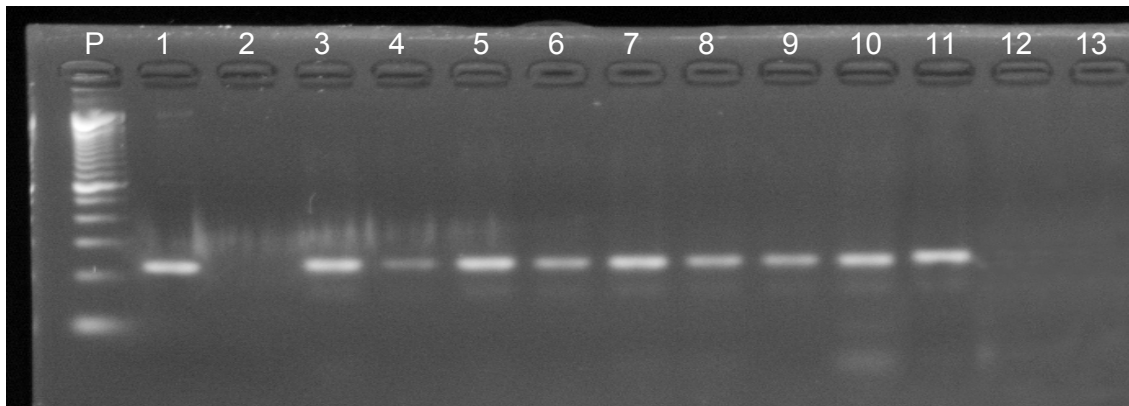
#### 4.5. DETECÇÃO DE CONTAMINAÇÃO FECAL ATRAVÉS DA PCR CONVENCIONAL

##### ➤ Contaminação fecal humana

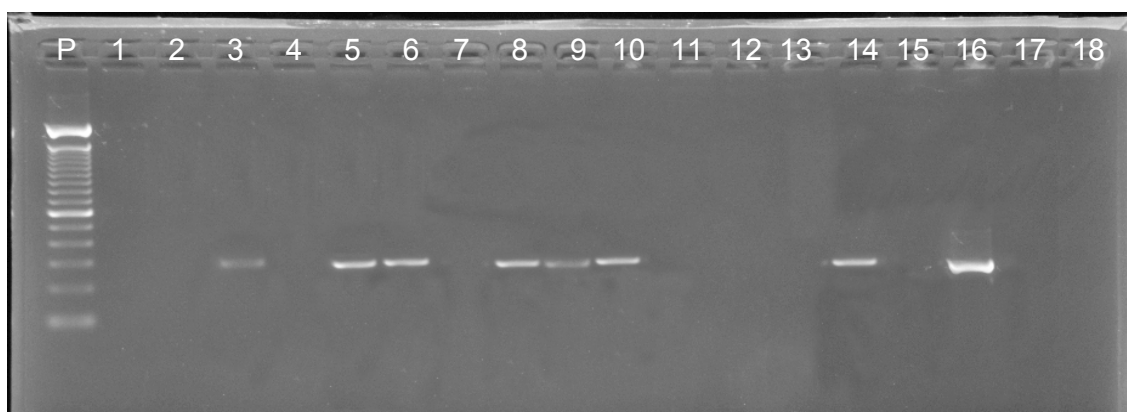
Os iniciadores para os genes *nifH* de *Methanobrevibacter smithii* (Mnif-342F e Mnif-363R) e *rrs* de *Bacteroidales* humanos (HuM113F e HuM403R) foram utilizados segundo o protocolo descrito previamente no item 3.4 com DNA total extraído das amostras de água (n=25). Vinte e quatro amostras analisadas apresentaram um único fragmento de aproximadamente 222 pb (Figura 14 e 15), compatível com o fragmento detectado no *M. smithii* (INCQS A45D/DSM 11975) utilizado como controle positivo da reação e 14 amostras apresentaram um fragmento único de aproximadamente 291 pb (Figura 16 e 17), compatível com o fragmento detectado no DNA de *Bacteroidales* Humano.



**Figura 14:** Detecção de biomarcadores do domínio Archaea (*Methanobrevibacter smithii*) de contaminação fecal humana em amostras de água da Bacia do rio São João. Linha (P) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (1) Represa de Juturnaíba (1ª Coleta); Linha (2) Represa de Juturnaíba (2ª Coleta); Linha (3) Represa de Juturnaíba (3ª Coleta); Linha (4) Rio São João (1ª Coleta); Linha (5) Rio São João (2ª Coleta); Linha (6) Rio São João (3ª Coleta); Linha (7) Foz do Rio São João (1ª Coleta); Linha (8) Foz do Rio São João (2ª Coleta); Linha (9) Foz do Rio São João (3ª Coleta); Linha (10) Rio Capivari (1ª Coleta); Linha (11) Rio Capivari (2ª Coleta); Linha (12) Linha Férrea Capivari (1ª Coleta); Linha (13) Linha Férrea Capivari (2ª Coleta); Linha (14) Rio Bacaxá (1ª Coleta); Linha (15) Rio Bacaxá (2ª Coleta); **Linha (16) *M. smithii* INCQS A45D/DSM 11975**; Linha (17) *Pantoea agglomerans* INCQS 00721/ATCC 33243; Linha (18) Água Gibco®.

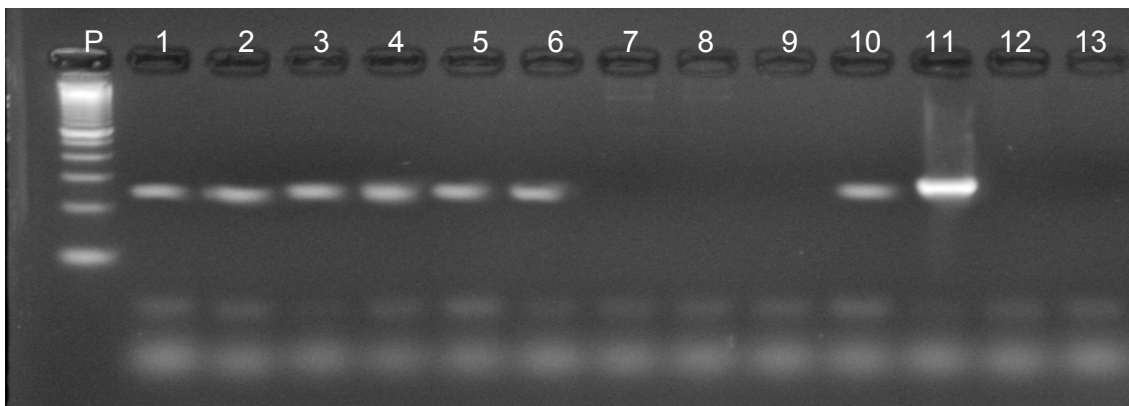


**Figura 15:** Detecção de biomarcadores do domínio Archaea (*Methanobrevibacter smithii*) de contaminação fecal humana em amostras de água da Bacia do rio Guandu. Linha (P) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (1) Final da Lagoa; Linha (2) Barragem de Santa Cecilia; Linha (3) Rio Santana; Linha (4) Rio Guandu; Linha (5) Ribeirão das Lajes; Linha (6) Rio Macacos; Linha (7) Rio Poços; Linha (8) Rio Pirai; Linha (9) Barragem Principal; Linha (10) Rio Queimados; Linha (11) *M. smithii* INCQS A45D/DSM 11975; Linha (12) *Pantoea agglomerans* INCQS 00721/ATCC 33243; Linha (13) Água Gibco®.



**Figura 16:** Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem *Bacteroidales*) de contaminação fecal humana em amostras de água da Bacia do rio São João. Linha (P) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (1) Represa de Juturnaíba (1ª Coleta); Linha (2) Represa de Juturnaíba (2ª Coleta); Linha (3) Represa de Juturnaíba (3ª Coleta); Linha (4) Rio São João (1ª Coleta); Linha (5) Rio São João (2ª Coleta); Linha (6) Rio São João (3ª Coleta); Linha (7) Foz do Rio São João (1ª Coleta); Linha (8) Foz do Rio São João (2ª Coleta); Linha (9) Foz do Rio São João (3ª Coleta); Linha (10) Rio Capivari (1ª Coleta); Linha (11) Rio Capivari (2ª Coleta); Linha (12) Linha Férrea Capivari (1ª Coleta); Linha (13) Linha Férrea Capivari (2ª Coleta); Linha (14) Rio Bacaxá (1ª Coleta); Linha (15) Rio Bacaxá (2ª Coleta); **Linha (16) DNA de *Bacteroidales* Humanos**; Linha (17) *Pantoea agglomerans* INCQS 00721/ATCC 33243; Linha (18) Água Gibco®.

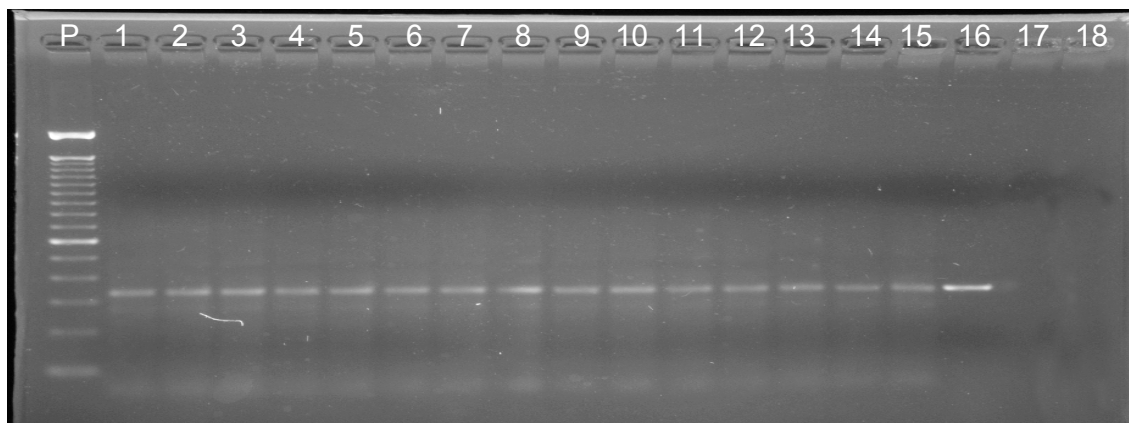




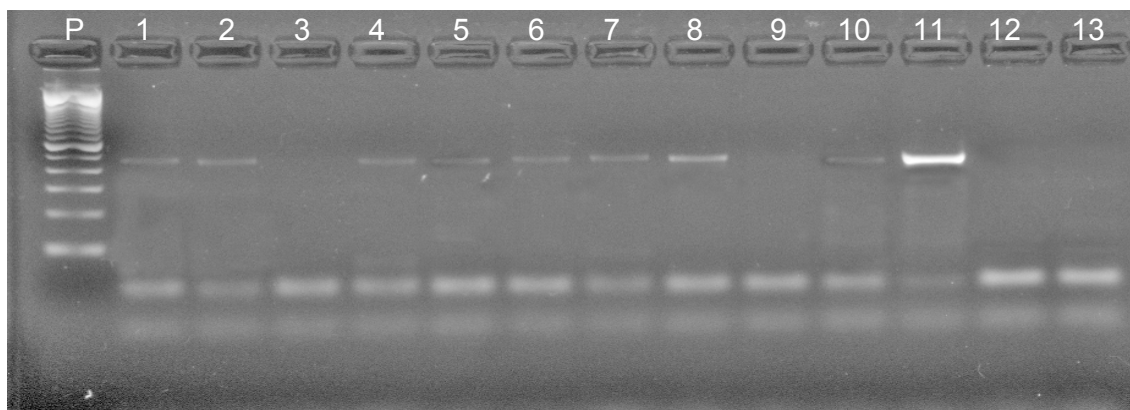
**Figura 17:** Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem *Bacteroidales*) de contaminação fecal humana em amostras de água da Bacia do rio Guandu. Linha (P) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (1) Final da Lagoa; Linha (2) Barragem de Santa Cecília; Linha (3) Rio Santana; Linha (4) Rio Guandu; Linha (5) Ribeirão das Lajes; Linha (6) Rio Macacos; Linha (7) Rio Poços; Linha (8) Rio Pirai; Linha (9) Barragem Principal; Linha (10) Rio Queimados; **Linha (11) DNA de *Bacteroidales* Humano**; Linha (12) *Pantoea agglomerans* INCQS 00721/ATCC 33243; Linha (13) Água Gibco®.

#### ➤ Contaminação fecal bovina

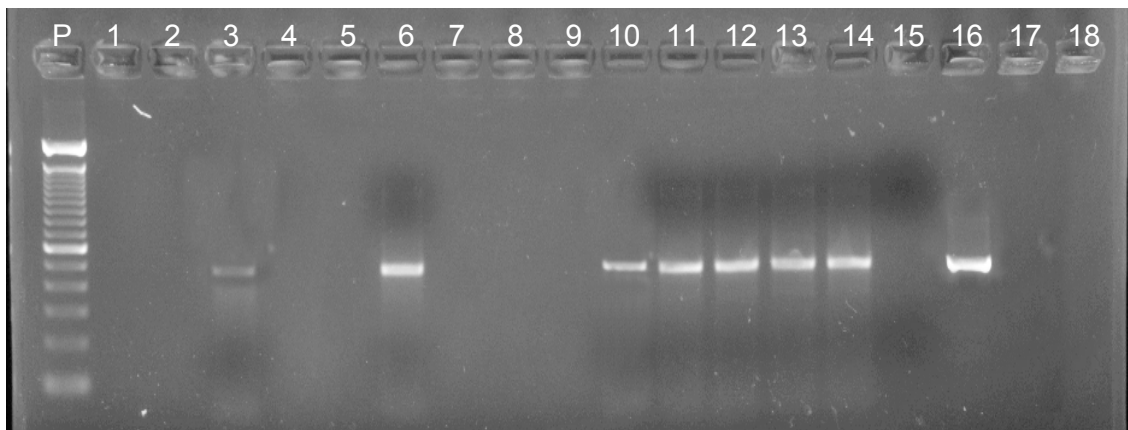
Os iniciadores para os genes *nifH* de *Methanobrevibacter ruminantium* (Mrnif-F e Mrnif-R) e *rrs* de *Bacteroidales* bovinos (CF128F e CF592R) foram utilizados segundo o protocolo descrito previamente no item 3.4 com DNA total extraído das amostras de água (n=25). Vinte e três amostras de água analisadas apresentaram um fragmento único de aproximadamente 336 pb (Figura 18 e 19), compatível com o fragmento detectado no *M. ruminantium* (INCQS A36D/DSM 1093) utilizado como controle positivo da reação e 8 amostras apresentaram um fragmento único de aproximadamente 464 pb, compatível com o fragmento detectado no DNA de *Bacteroidales* Bovino (Figura 20 e 21).



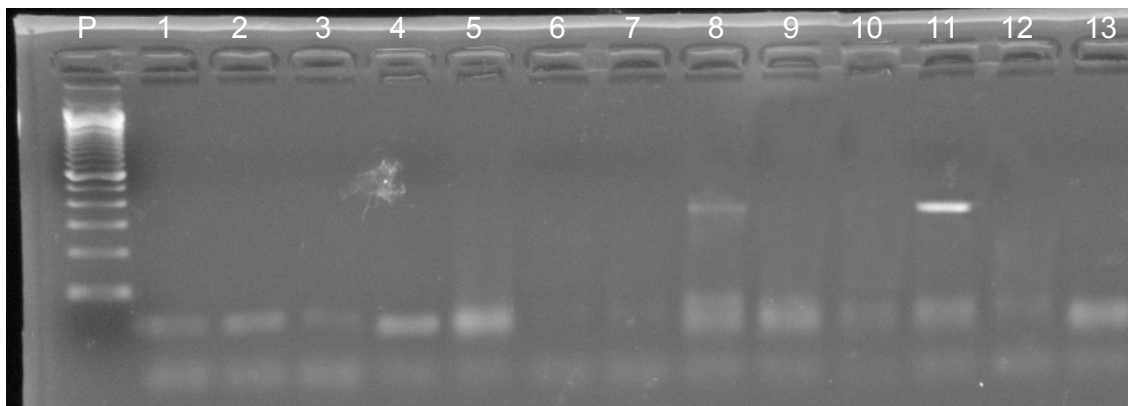
**Figura 18:** Detecção de biomarcadores do domínio Archaea (*Methanobrevibacter ruminantium*) de contaminação fecal bovina em amostras de água da Bacia do rio São João. Linha (P) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (1) Represa de Juturnaíba (1ª Coleta); Linha (2) Represa de Juturnaíba (2ª Coleta); Linha (3) Represa de Juturnaíba (3ª Coleta); Linha (4) Rio São João (1ª Coleta); Linha (5) Rio São João (2ª Coleta); Linha (6) Rio São João (3ª Coleta); Linha (7) Foz do Rio São João (1ª Coleta); Linha (8) Foz do Rio São João (2ª Coleta); Linha (9) Foz do Rio São João (3ª Coleta); Linha (10) Rio Capivari (1ª Coleta); Linha (11) Rio Capivari (2ª Coleta); Linha (12) Linha Férrea Capivari (1ª Coleta); Linha (13) Linha Férrea Capivari (2ª Coleta); Linha (14) Rio Bacaxá (1ª Coleta); Linha (15) Rio Bacaxá (2ª Coleta); **Linha (16) *M. ruminantium* INCQS A36D/DSM 1093**; Linha (17) *Pantoea agglomerans* INCQS 00721/ATCC 33243; Linha (18) Água Gibco®.



**Figura 19:** Detecção de biomarcadores do domínio Archaea (*Methanobrevibacter ruminantium*) de contaminação fecal bovina em amostras de água da Bacia do rio Guandu. Linha (P) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (1) Final da Lagoa; Linha (2) Barragem de Santa Cecília; Linha (3) Rio Santana; Linha (4) Rio Guandu; Linha (5) Ribeirão das Lajes; Linha (6) Rio Macacos; Linha (7) Rio Poços; Linha (8) Rio Piraf; Linha (9) Barragem Principal; Linha (10) Rio Queimados; **Linha (11) *M. ruminantium* INCQS A36D/DSM 1093**; Linha (12) *Pantoea agglomerans* INCQS 00721/ATCC 33243; Linha (13) Água Gibco®.



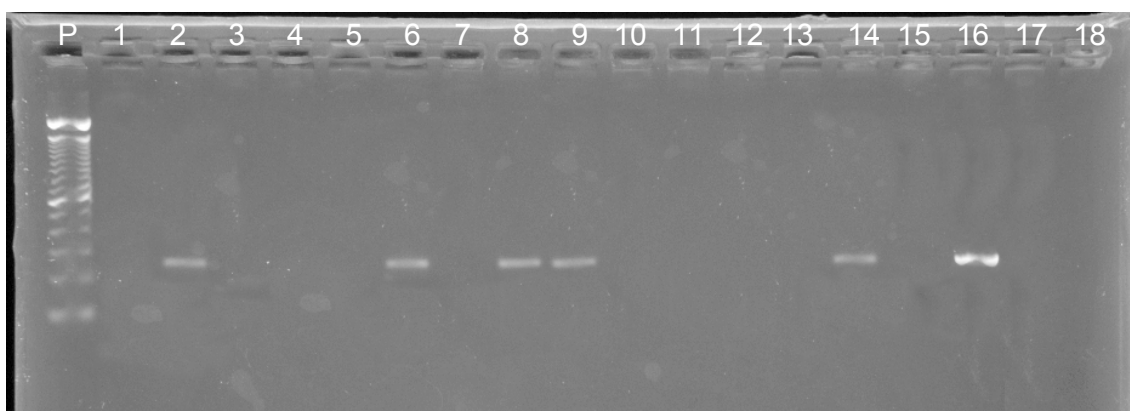
**Figura 20:** Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem *Bacteroidales*) de contaminação fecal bovina em amostras de água da Bacia do rio São João. Linha (P) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (1) Represa de Juturnaíba (1ª Coleta); Linha (2) Represa de Juturnaíba (2ª Coleta); Linha (3) Represa de Juturnaíba (3ª Coleta); Linha (4) Rio São João (1ª Coleta); Linha (5) Rio São João (2ª Coleta); Linha (6) Rio São João (3ª Coleta); Linha (7) Foz do Rio São João (1ª Coleta); Linha (8) Foz do Rio São João (2ª Coleta); Linha (9) Foz do Rio São João (3ª Coleta); Linha (10) Rio Capivari (1ª Coleta); Linha (11) Rio Capivari (2ª Coleta); Linha (12) Linha Férrea Capivari (1ª Coleta); Linha (13) Linha Férrea Capivari (2ª Coleta); Linha (14) Rio Bacaxá (1ª Coleta); Linha (15) Rio Bacaxá (2ª Coleta); **Linha (16) DNA de *Bacteroidales Bovinos***; Linha (17) *Pantoea agglomerans* INCQS 00721/ATCC 33243; Linha (18) Água Gibco®.



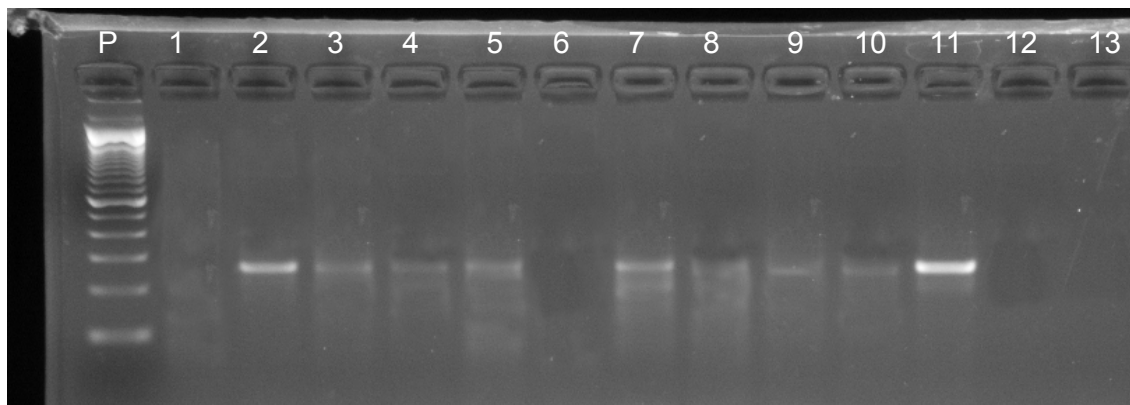
**Figura 21:** Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem *Bacteroidales*) de contaminação fecal bovina em amostras de água da Bacia do Rio Guandu. Linha (P) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (1) Final da Lagoa; Linha (2) Barragem de Santa Cecília; Linha (3) Rio Santana; Linha (4) Rio Guandu; Linha (5) Ribeirão das Lajes; Linha (6) Rio Macacos; Linha (7) Rio Poços; Linha (8) Rio Pirai; Linha (9) Barragem Principal; Linha (10) Rio Queimados; **Linha (11) DNA de *Bacteroidales Bovinos***; Linha (12) *Pantoea agglomerans* INCQS 00721/ATCC 33243; Linha (13) Água Gibco®.

➤ Contaminação fecal suína

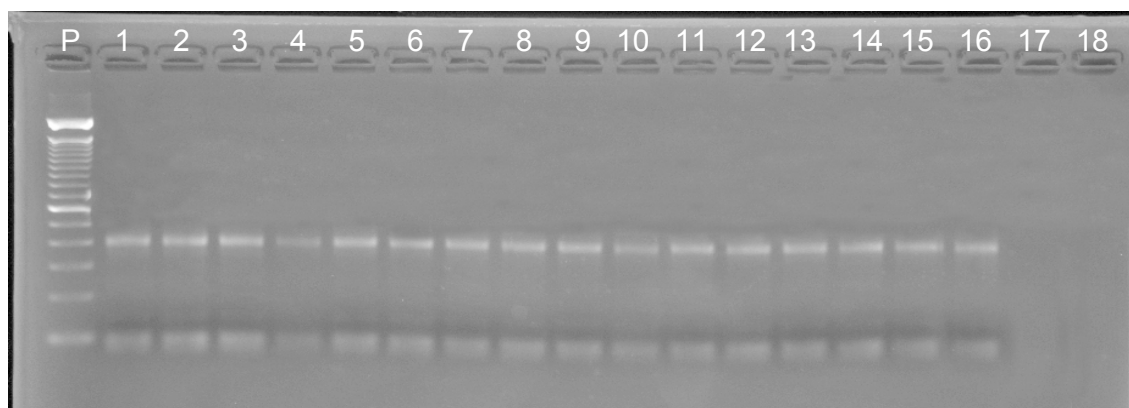
Os iniciadores para os genes *mcrA* do clone P23-2 (P23-2F e P23-2R) e do gene *rrs* de *Bacteroidales* suínos (PF163F e PF548R) foram utilizados segundo o protocolo descrito previamente no item 3.4 com DNA total extraído das amostras de água (n=25). Doze amostras apresentaram um fragmento único de aproximadamente 258 pb (Figura 22 e 23), compatível com o fragmento detectado no controle positivo da reação e 15 amostras apresentaram um fragmento único de aproximadamente 385 pb, compatível com o fragmento detectado no DNA de *Bacteroidales* suíno (Figura 24 e 25).



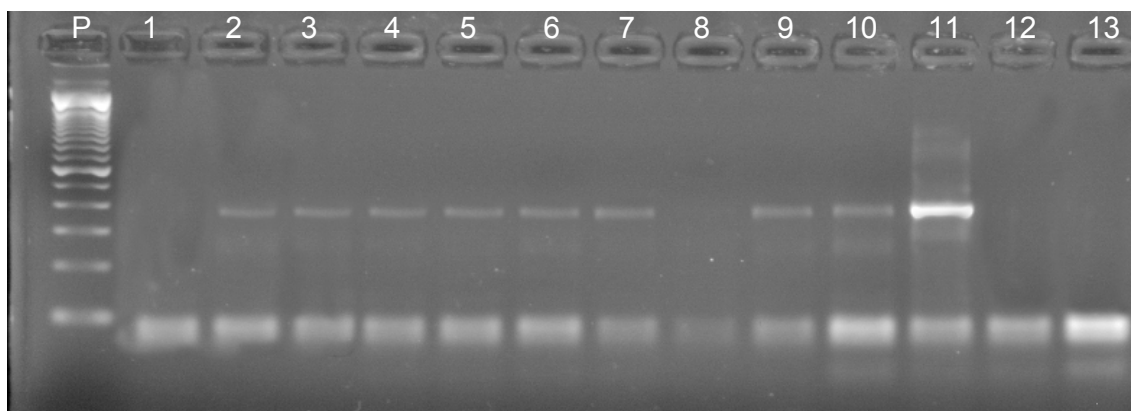
**Figura 22:** Detecção de biomarcadores do domínio Archaea (Clone P23-2) de contaminação fecal suína em amostras de água da Bacia do rio São João. Linha (P) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (1) Represa de Juturnaíba (1ª Coleta); Linha (2) Represa de Juturnaíba (2ª Coleta); Linha (3) Represa de Juturnaíba (3ª Coleta); Linha (4) Rio São João (1ª Coleta); Linha (5) Rio São João (2ª Coleta); Linha (6) Rio São João (3ª Coleta); Linha (7) Foz do Rio São João (1ª Coleta); Linha (8) Foz do Rio São João (2ª Coleta); Linha (9) Foz do Rio São João (3ª Coleta); Linha (10) Rio Capivari (1ª Coleta); Linha (11) Rio Capivari (2ª Coleta); Linha (12) Linha Férrea Capivari (1ª Coleta); Linha (13) Linha Férrea Capivari (2ª Coleta); Linha (14) Rio Bacaxá (1ª Coleta); Linha (15) Rio Bacaxá (2ª Coleta); **Linha (16) Clone P23-2**; Linha (17) *Pantoea agglomerans* INCQS 00721/ATCC 33243; Linha (18) Água Gibco®.



**Figura 23:** Detecção de biomarcadores do domínio Archaea (Clone P23-2) de contaminação fecal suína em amostras de água da Bacia do rio Guandu. Linha (P) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (1) Final da Lagoa; Linha (2) Barragem de Santa Cecilia; Linha (3) Rio Santana; Linha (4) Rio Guandu; Linha (5) Ribeirão das Lajes; Linha (6) Rio Macacos; Linha (7) Rio Poços; Linha (8) Rio Pirai; Linha (9) Barragem Principal; Linha (10) Rio Queimados; **Linha (11) Clone P23-2**; Linha (12) *Pantoea agglomerans* INCQS 00721/ATCC 33243; Linha (13) Água Gibco®.



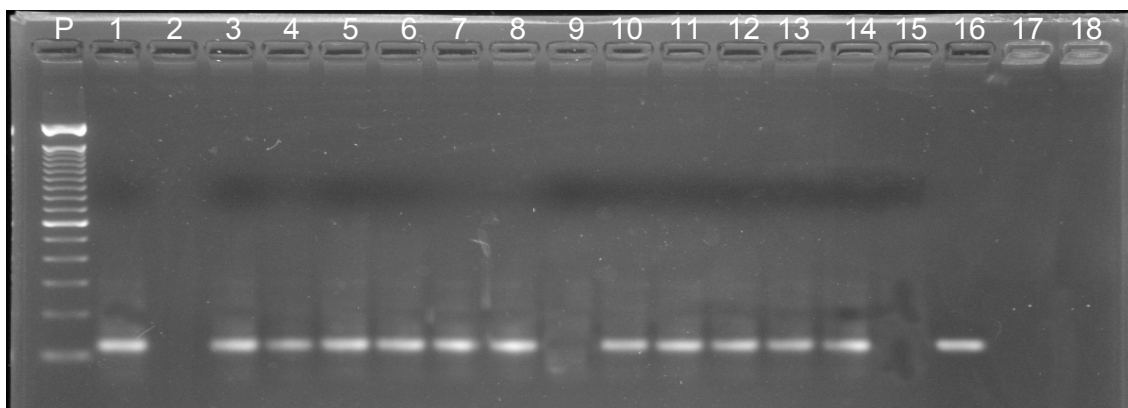
**Figura 24:** Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem *Bacteroidales*) de contaminação fecal suína amostras de água na Bacia do rio São João. Linha (P) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (1) Represa de Juturnaíba (1ª Coleta); Linha (2) Represa de Juturnaíba (2ª Coleta); Linha (3) Represa de Juturnaíba (3ª Coleta); Linha (4) Rio São João (1ª Coleta); Linha (5) Rio São João (2ª Coleta); Linha (6) Rio São João (3ª Coleta); Linha (7) Foz do Rio São João (1ª Coleta); Linha (8) Foz do Rio São João (2ª Coleta); Linha (9) Foz do Rio São João (3ª Coleta); Linha (10) Rio Capivari (1ª Coleta); Linha (11) Rio Capivari (2ª Coleta); Linha (12) Linha Férrea Capivari (1ª Coleta); Linha (13) Linha Férrea Capivari (2ª Coleta); Linha (14) Rio Bacaxá (1ª Coleta); Linha (15) Rio Bacaxá (2ª Coleta); **Linha (16) Bacteroidales Suíno**; Linha (17) *Pantoea agglomerans* INCQS 00721/ATCC 33243; Linha (18) Água Gibco®.



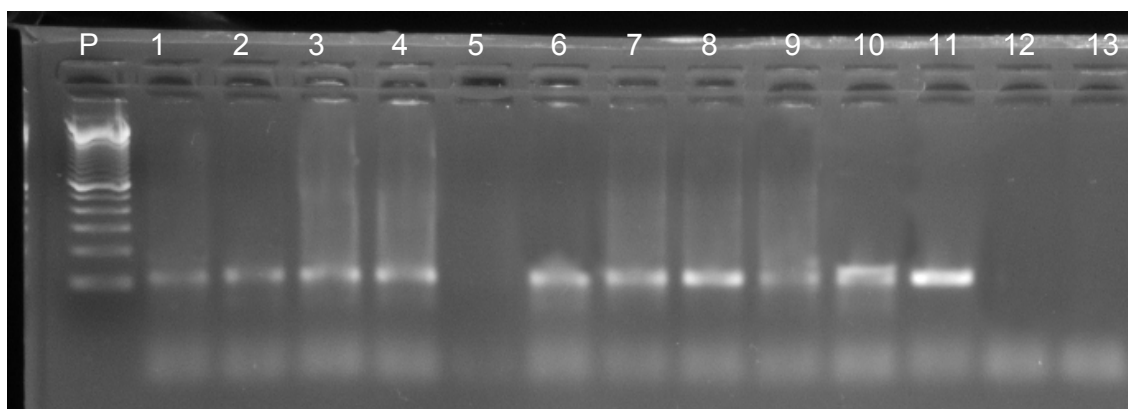
**Figura 25:** Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem *Bacteroidales*) de contaminação fecal suína amostras de água na Bacia do rio Guandu. Linha (P) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (1) Final da Lagoa; Linha (2) Barragem de Santa Cecília; Linha (3) Rio Santana; Linha (4) Rio Guandu; Linha (5) Ribeirão das Lajes; Linha (6) Rio Macacos; Linha (7) Rio Poços; Linha (8) Rio Pirai; Linha (9) Barragem Principal; Linha (10) Rio Queimados; **Linha (11) *Bacteroidales* Suíno**; Linha (12) *Pantoea agglomerans* INCQS 00721/ATCC 33243; Linha (13) Água Gibco®.

#### ➤ Contaminação fecal equina

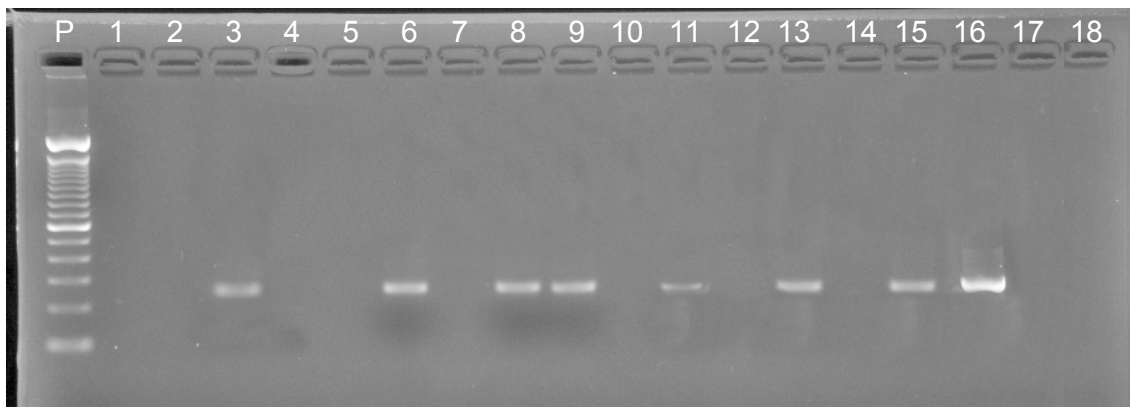
Os iniciadores para os genes *mcrA* de *Methanobrevibacter gottschalkii* (GoT285F e GoT404R) e *rrs* de *Bacteroidales* equinos (HoR201F e HoR442R) foram utilizados segundo o protocolo descrito previamente no item 3.4 com DNA total extraído das amostras de água (n=25). Foi observado em 21 amostras apresentaram um fragmento único de aproximadamente 120 pb (Figura 26 e 27), compatível com o fragmento detectado no *M. gottschalkii* (INCQS A49D/DSM 11977) utilizado como controle positivo da reação e 17 amostras apresentaram um fragmento único de aproximadamente 242 pb, compatível com o fragmento detectado no DNA de *Bacteroidales* equino (Figura 28 e 29).



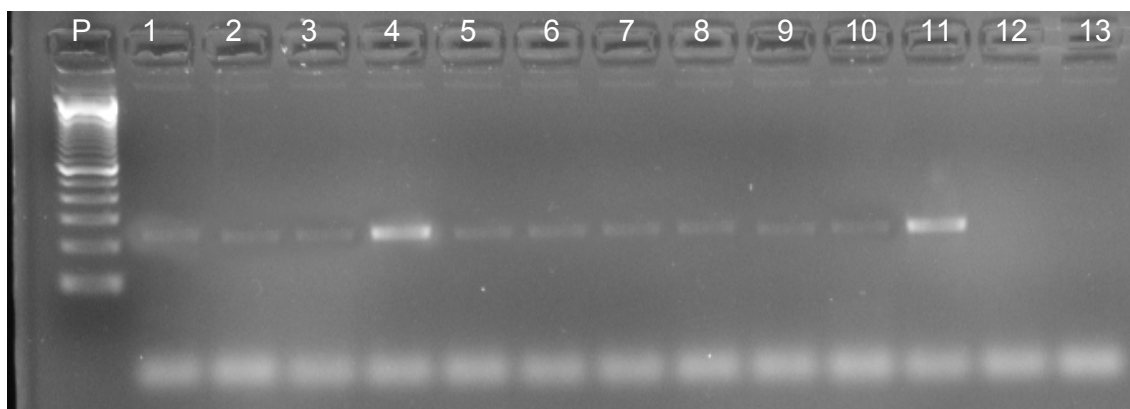
**Figura 26:** Detecção de biomarcadores do domínio Archaea (*Methanobrevibacter gottschalkii*) de contaminação fecal equina em amostras de água da Bacia do rio São João. Linha (P) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (1) Represa de Juturnaíba (1ª Coleta); Linha (2) Represa de Juturnaíba (2ª Coleta); Linha (3) Represa de Juturnaíba (3ª Coleta); Linha (4) Rio São João (1ª Coleta); Linha (5) Rio São João (2ª Coleta); Linha (6) Rio São João (3ª Coleta); Linha (7) Foz do Rio São João (1ª Coleta); Linha (8) Foz do Rio São João (2ª Coleta); Linha (9) Foz do Rio São João (3ª Coleta); Linha (10) Rio Capivari (1ª Coleta); Linha (11) Rio Capivari (2ª Coleta); Linha (12) Linha Férrea Capivari (1ª Coleta); Linha (13) Linha Férrea Capivari (2ª Coleta); Linha (14) Rio Bacaxá (1ª Coleta); Linha (15) Rio Bacaxá (2ª Coleta); **Linha (16) *M. gottschalkii* INCQS A49D (DSM 11977)**; Linha (17) *Pantoea agglomerans* INCQS 00721/ATCC 33243; Linha (18) Água Gibco®.



**Figura 27:** Detecção de biomarcadores do domínio Archaea (*Methanobrevibacter gottschalkii*) de contaminação fecal equina em amostras de água da Bacia do rio São João. Linha (P) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (1) Final da Lagoa; Linha (2) Barragem de Santa Cecília; Linha (3) Rio Santana; Linha (4) Rio Guandu; Linha (5) Ribeirão das Lajes; Linha (6) Rio Macacos; Linha (7) Rio Poços; Linha (8) Rio Pirai; Linha (9) Barragem Principal; Linha (10) Rio Queimados; **Linha (11) *M. gottschalkii* INCQS A49D (DSM 11977)**; Linha (12) *Pantoea agglomerans* INCQS 00721/ATCC 33243; Linha (13) Água Gibco®.



**Figura 28:** Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem *Bacteroidales*) de contaminação fecal equina em amostras de água da Bacia do rio São João. Linha (P) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (1) Represa de Juturnaíba (1ª Coleta); Linha (2) Represa de Juturnaíba (2ª Coleta); Linha (3) Represa de Juturnaíba (3ª Coleta); Linha (4) Rio São João (1ª Coleta); Linha (5) Rio São João (2ª Coleta); Linha (6) Rio São João (3ª Coleta); Linha (7) Foz do Rio São João (1ª Coleta); Linha (8) Foz do Rio São João (2ª Coleta); Linha (9) Foz do Rio São João (3ª Coleta); Linha (10) Rio Capivari (1ª Coleta); Linha (11) Rio Capivari (2ª Coleta); Linha (12) Linha Férrea Capivari (1ª Coleta); Linha (13) Linha Férrea Capivari (2ª Coleta); Linha (14) Rio Bacaxá (1ª Coleta); Linha (15) Rio Bacaxá (2ª Coleta); **Linha (16) DNA *Bacteroidales* de equinos**; Linha (17) *Pantoea agglomerans* INCQS 00721/ATCC 33243; Linha (18) Água Gibco®.

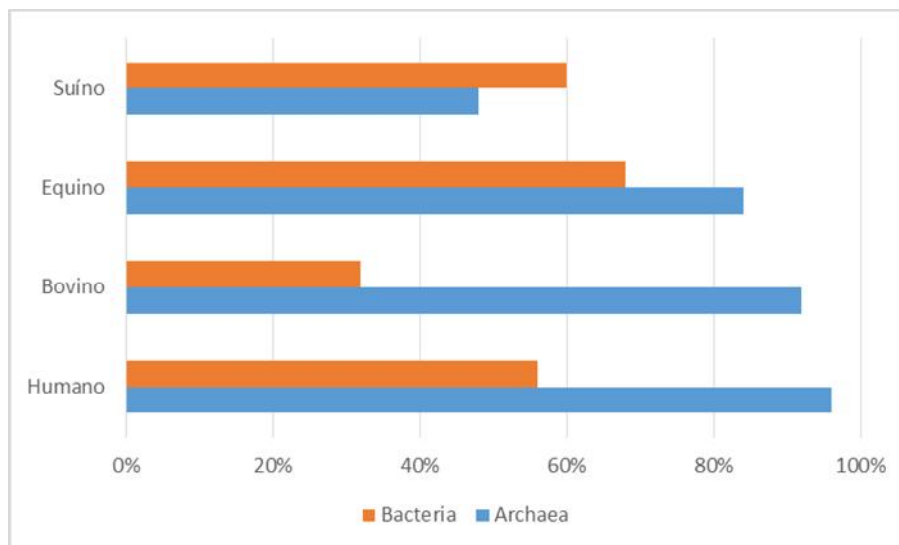


**Figura 29:** Detecção de biomarcadores do domínio Bacteria (ordem *Bacteroidales*) de contaminação fecal equina em amostras de água da Bacia do rio Guandu. Linha (P) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (1) Final da Lagoa; Linha (2) Barragem de Santa Cecilia; Linha (3) Rio Santana; Linha (4) Rio Guandu; Linha (5) Ribeirão das Lajes; Linha (6) Rio Macacos; Linha (7) Rio Poços; Linha (8) Rio Pirai; Linha (9) Barragem Principal; Linha (10) Rio Queimados; Linha (11) DNA *Bacteroidales* de equinos; Linha (12) *Pantoea agglomerans* INCQS 00721/ATCC 33243; Linha (13) Água Gibco®.

A partir desses resultados foi possível observar a maior prevalência de biomarcadores do domínio Archaea na detecção de contaminação humana (24/25), bovina (23/25) e equina (12/25). Entretanto os biomarcadores bacterianos demonstraram maior prevalência na detecção de contaminação fecal suína ((Tabela 13).



**Gráfico 1:** Representação gráfica da detecção de contaminação fecal através da PCR convencional nas amostras de água da bacia do rio São João e da bacia do rio Guandu.



#### 4.6. SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS RESULTADOS

Após o sequenciamento dos fragmentos do domínio Bactéria a análise de identidade das sequências pelo BLASTn mostrou valores de similaridade entre 98-99% com o gene *rrs* de *Bacteroidales* bovino, humano, equino e suíno. Desta forma, as sequências foram depositadas no GenBank com número de acesso KM924823, KM924824, KM924825, KM924826, respectivamente.

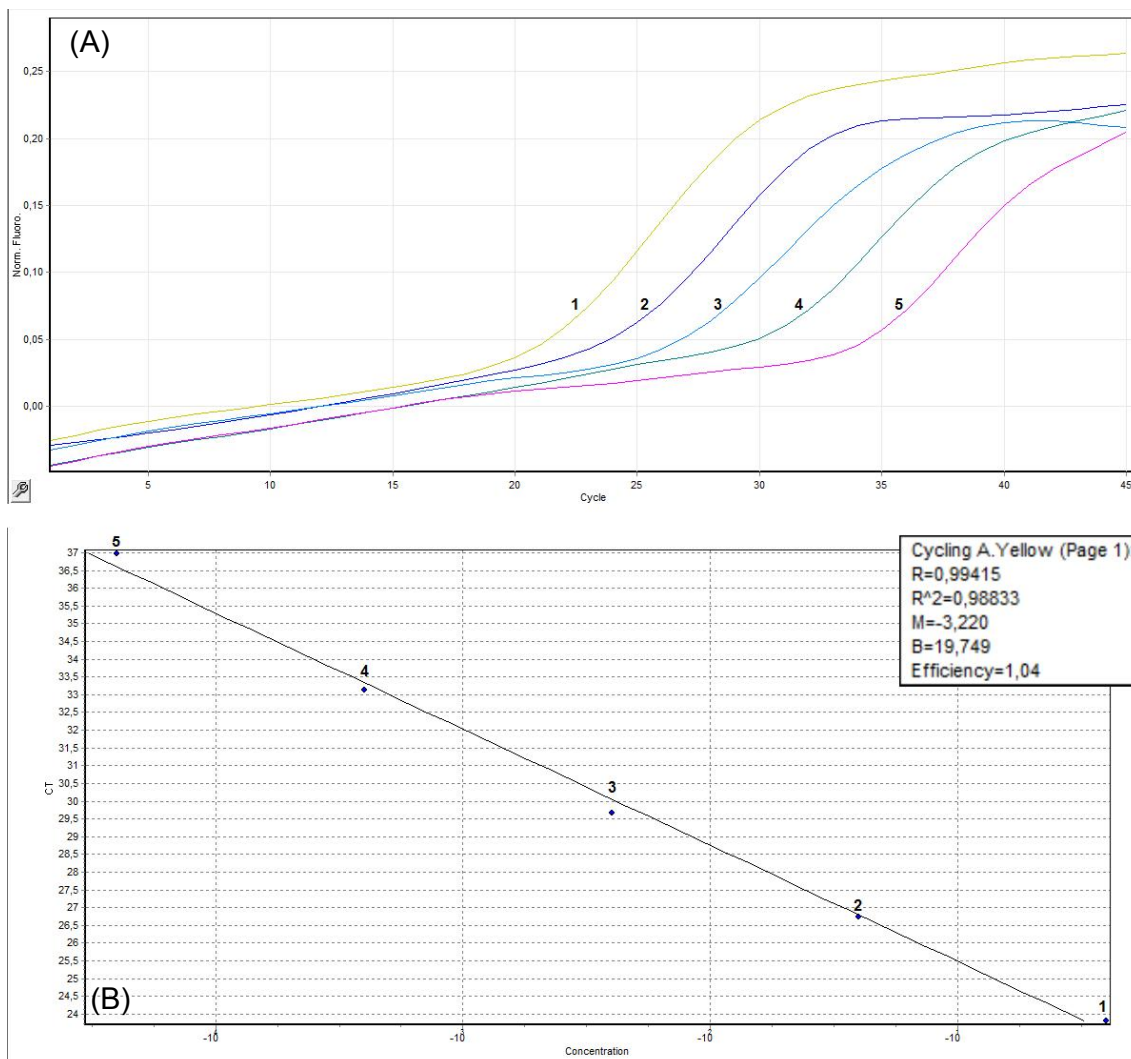
A análise de identidade das sequências dos fragmentos do domínio Archaea mostrou valores de similaridade entre 96-99% com os genes *mcrA* de *M. gottschalkii* e *nifH* de *M. ruminantium* e *M. smithii*.

#### 4.7. PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE QUANTIFICAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL

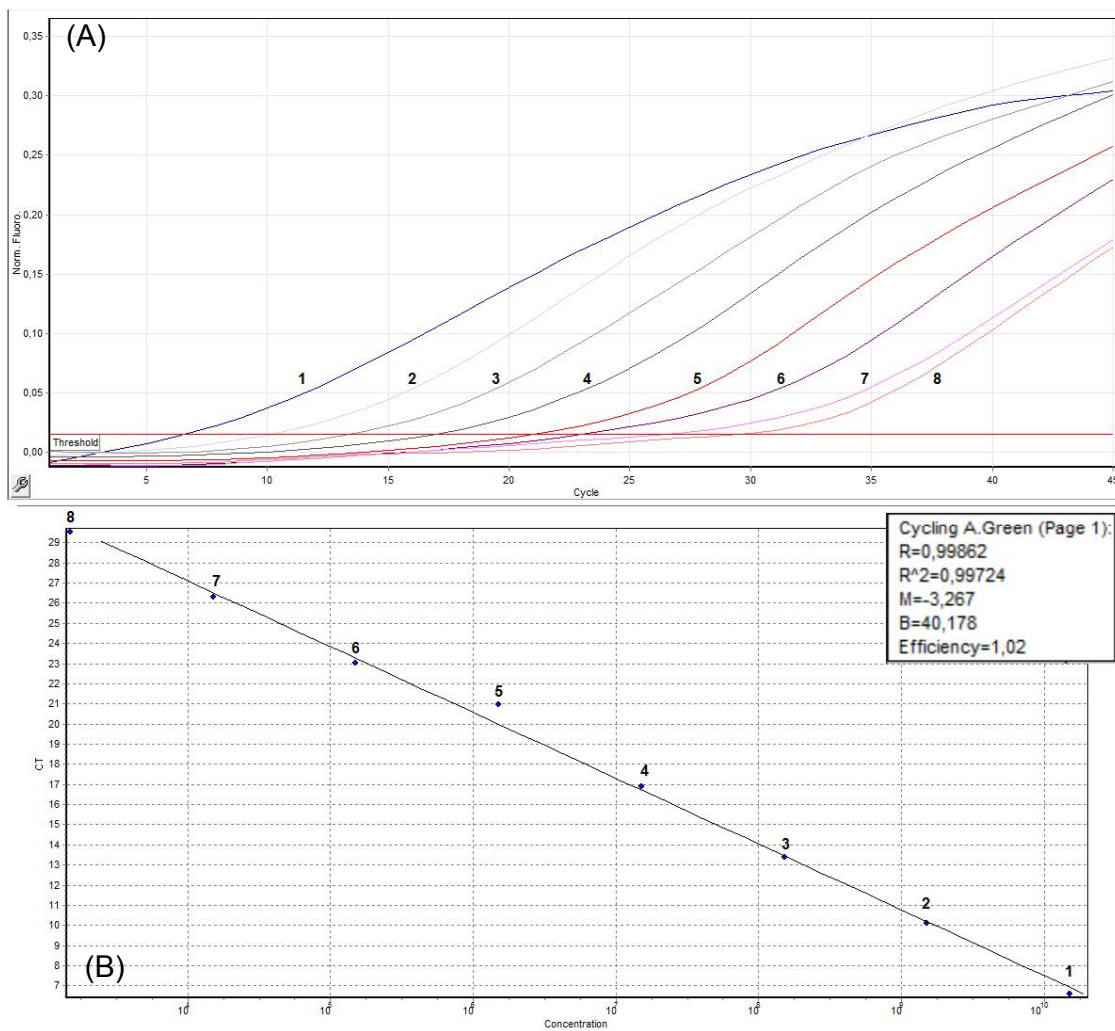
Foram padronizadas as reações de PCR em tempo real para a quantificação de *M. smithii*, *M. ruminantium*, *M. gottschalkii* e *Bacteroidales* suínos. A concentração dos iniciadores foi determinada para atingir uma eficiência entre 90 e 110% e a reação otimizada para um volume final de 20  $\mu$ L, sendo 5  $\mu$ L de amostra. Essa padronização permitiu definir as concentrações de iniciadores em 250 nM e 200 nM para a sonda. A curva do IPC teve concentração inicial de 0,4 ng/mL, a

reação produziu a curva representada na figura 30. Diluições decimais seriadas de cada DNA foram utilizadas na construção de suas respectivas curvas padrão. Para a construção das curvas-padrão para quantificação do gene *nifH* de *M. smithii* e *M. ruminantium* foram utilizadas 8 diluições decimais seriadas com concentrações iniciais de  $1,51 \times 10^{10}$  e  $4,04 \times 10^8$  cópias/ $\mu\text{L}$ , respectivamente (Figura 31 e 32).

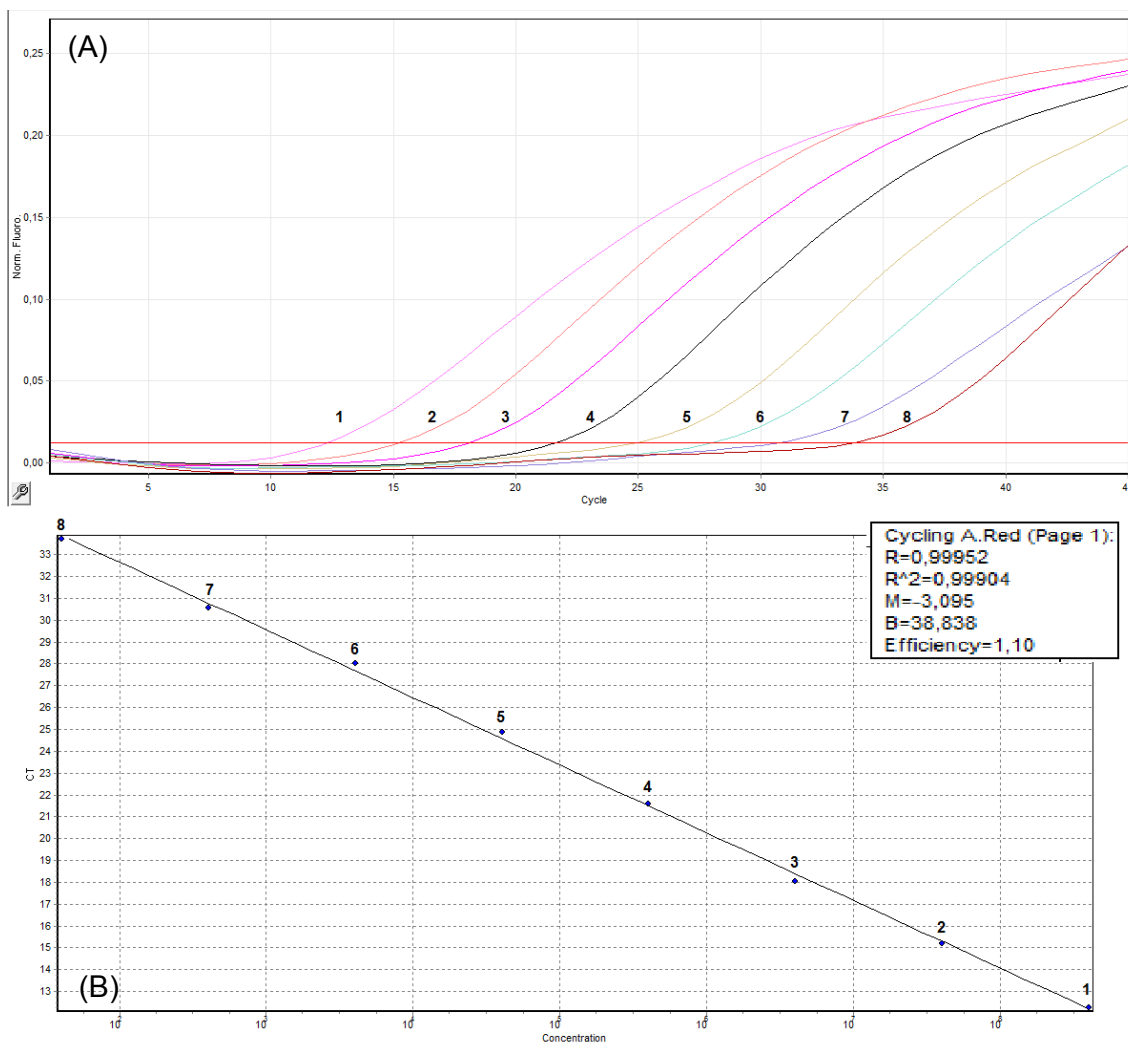
Para a construção da curva padrão para quantificação do gene *mcrA* de *M. gottschalkii* foram utilizadas 7 diluições decimais seriadas, com concentração inicial de  $2,32 \times 10^{10}$  cópias/ $\mu\text{L}$  (Figura 33). Para a construção da curva padrão para quantificação do 16S rRNA de *Bacteroidales* suínos foram usadas 8 diluições decimais seriadas, com concentração inicial de  $1,29 \times 10^{10}$  cópias/ $\mu\text{L}$  (Figura 34).



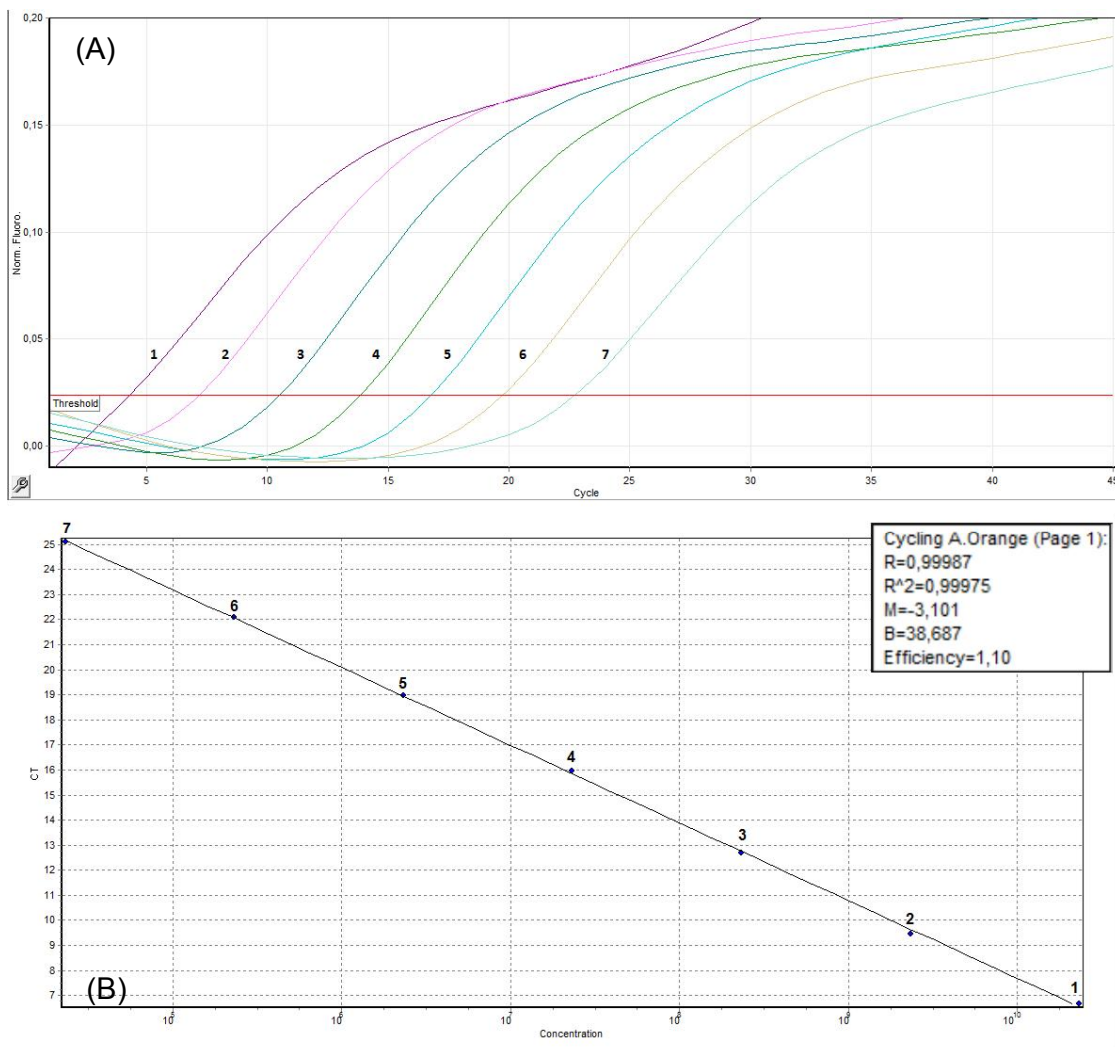
**Figura 30:** Padronização da curva-padrão para o IPC **(A)** Perfil de amplificação da curva padrão do IPC. **(B)** Curva padrão do IPC. (1) Diluição  $10^0$ ; (2) Diluição  $10^{-1}$ ; (3) Diluição  $10^{-2}$ ; (4) Diluição  $10^{-3}$ ; (5) Diluição  $10^{-4}$ .



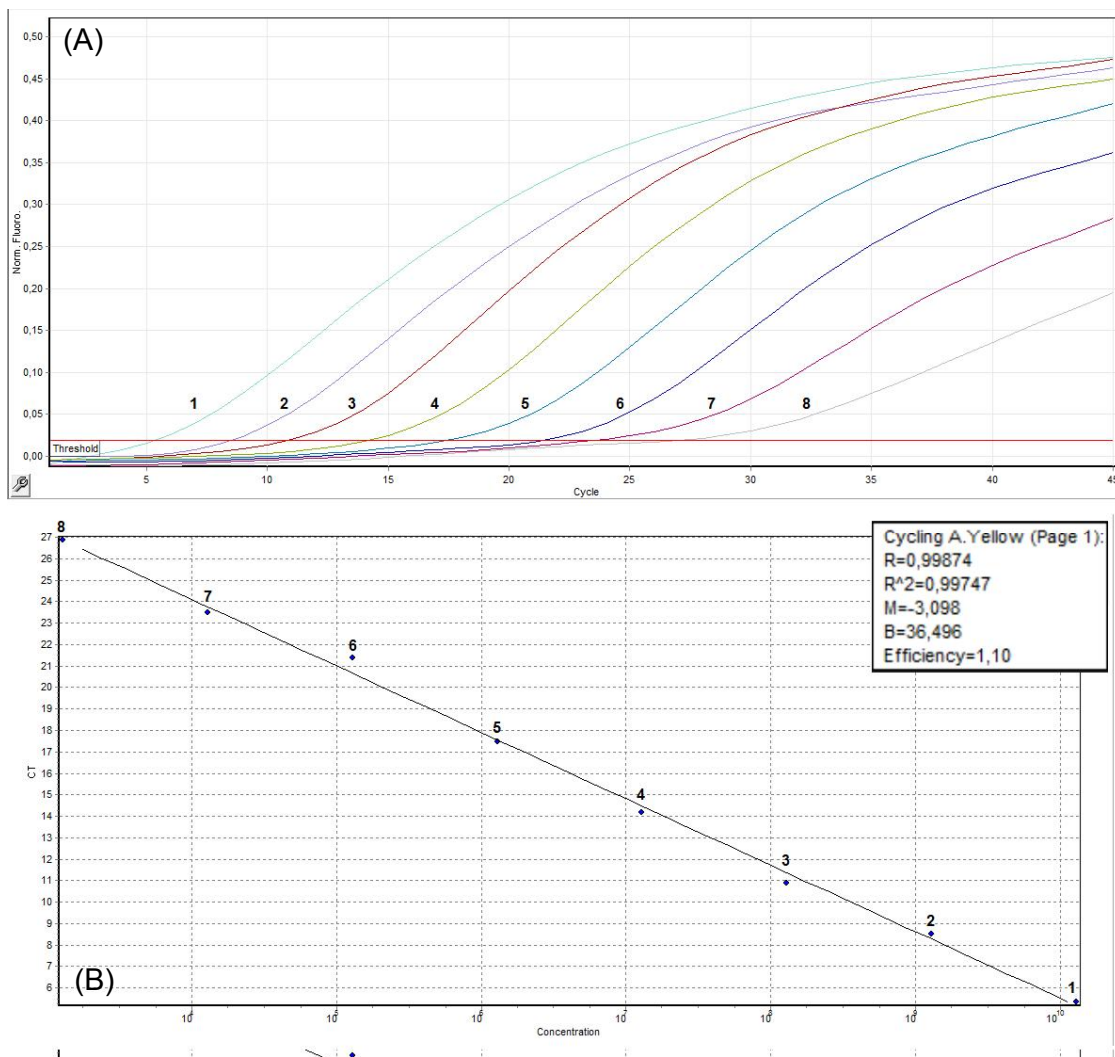
**Figura 31:** Padronização da curva-padrão para o gene *nifH* de *M. smithii* **(A)** Perfil de amplificação da curva padrão com iniciador específico; **(B)** Curva padrão para quantificação do marcador de *M. smithii*. (1) Diluição  $10^0$ ; (2) Diluição  $10^{-1}$ ; (3) Diluição  $10^{-2}$ ; (4) Diluição  $10^{-3}$ ; (5) Diluição  $10^{-4}$ ; (6) Diluição  $10^{-5}$ ; (7) Diluição  $10^{-6}$ ; (8) Diluição  $10^{-7}$ .



**Figura 32:** Padronização da curva-padrão para o gene *nifH* de *M. ruminantium* (A) Perfil de amplificação da curva padrão com iniciador específico; (B) Curva padrão para quantificação do marcador de *M. smithii*. (1) Diluição  $10^0$ ; (2) Diluição  $10^{-1}$ ; (3) Diluição  $10^{-2}$ ; (4) Diluição  $10^{-3}$ ; (5) Diluição  $10^{-4}$ ; (6) Diluição  $10^{-5}$ ; (7) Diluição  $10^{-6}$ ; (8) Diluição  $10^{-7}$ .



**Figura 33:** Padronização da curva-padrão para o gene *mcrA* de *M. gottschalkii* (A) Perfil de amplificação da curva padrão com iniciador específico; (B) Curva padrão para quantificação do marcador de *M. gottschalkii*. (1) Diluição 10<sup>0</sup>; (2) Diluição 10<sup>-1</sup>; (3) Diluição 10<sup>-2</sup>; (4) Diluição 10<sup>-3</sup>; (5) Diluição 10<sup>-4</sup>; (6) Diluição 10<sup>-5</sup>; (7) Diluição 10<sup>-6</sup>; (8) Diluição 10<sup>-7</sup>.



**Figura 34:** Padronização da curva-padrão para o gene *rrs* de *Bacteroidales* suínos (A) Perfil de amplificação da curva padrão com iniciador específico; (B) Curva padrão para quantificação do marcador de *Bacteroidales* suínos. (1) Diluição  $10^0$ ; (2) Diluição  $10^{-1}$ ; (3) Diluição  $10^{-2}$ ; (4) Diluição  $10^{-3}$ ; (5) Diluição  $10^{-4}$ ; (6) Diluição  $10^{-5}$ ; (7) Diluição  $10^{-6}$ ; (8) Diluição  $10^{-7}$ .

#### 4.7.1. Determinação quantitativa de contaminação fecal

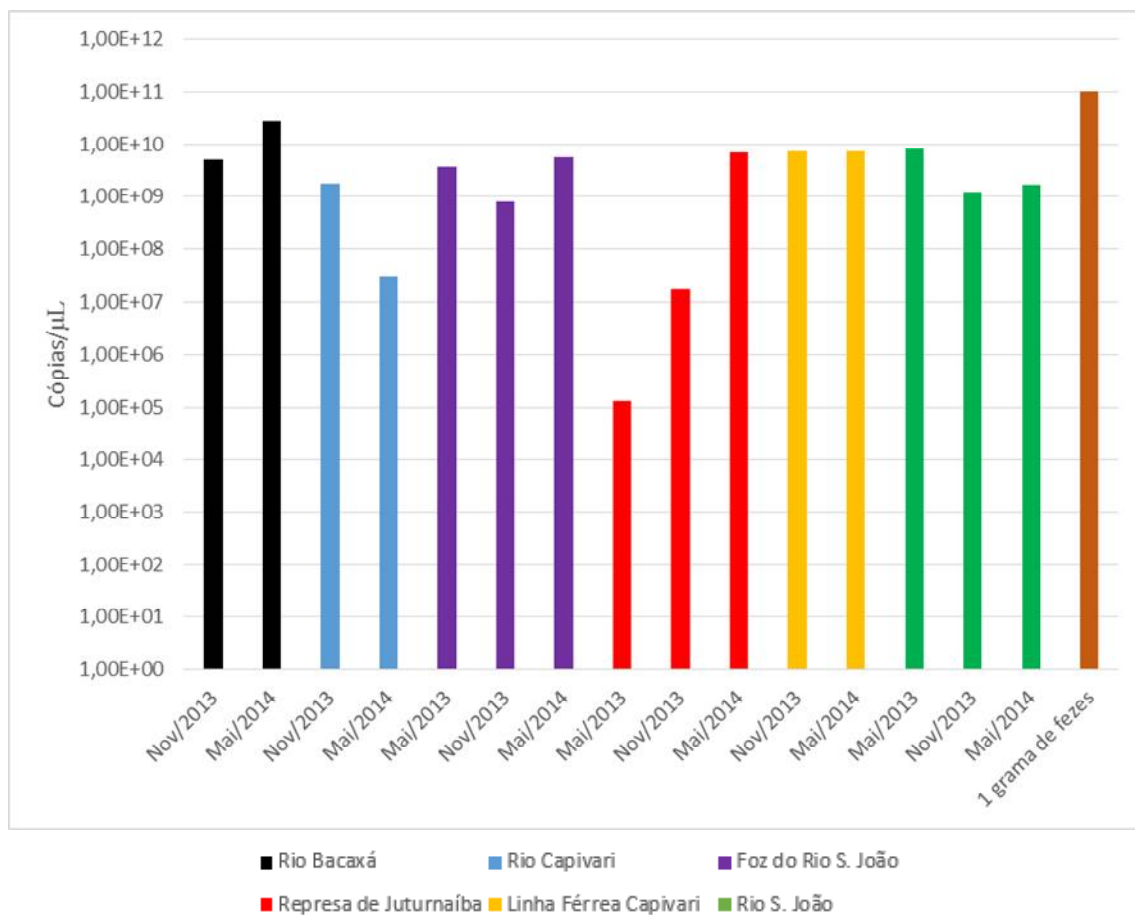
##### 4.7.1.1. Bacia Hidrográfica do rio São João

Foi quantificado o número de cópias do gene *nifH* de *M. smithii* existentes em 1 grama de fezes de humanos, foram encontrados valores de aproximadamente  $1,02 \times 10^{11}$ . O gene alvo foi detectado e quantificado em 15 das 15 amostras da Bacia do rio São João analisadas, variando entre  $1,35 \times 10^5$  e  $2,70 \times 10^{10}$  cópias/ $\mu$ l, na primeira coleta na represa de Juturnaíba e no rio Bacaxá, respectivamente (Gráfico 2). O número de cópias do gene *nifH* de *M. ruminantium* quantificadas em 1 grama de fezes bovinas foi de aproximadamente  $4,35 \times 10^7$ . O gene alvo foi detectado e

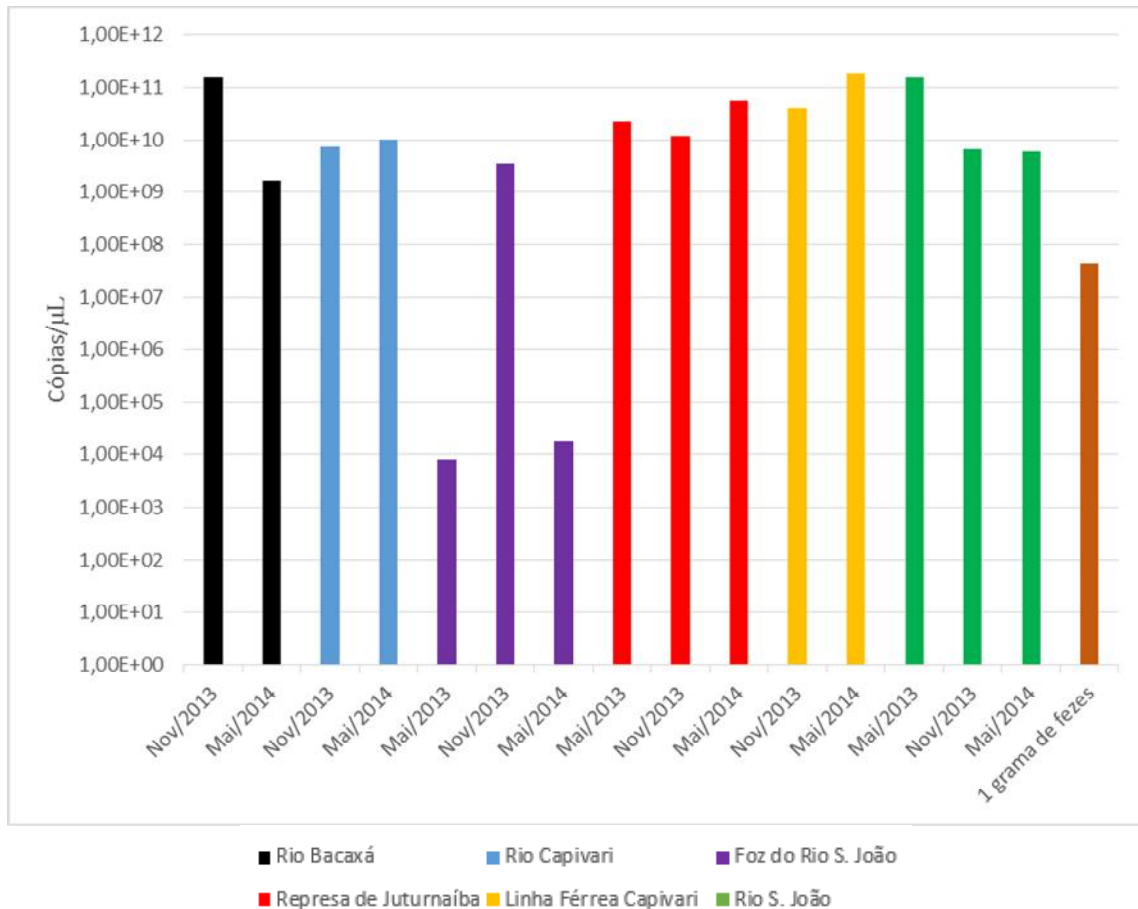
quantificado em 15 das 15 amostras analisadas, variando entre  $8,19 \times 10^3$  e  $1,81 \times 10^{11}$  cópias/ $\mu$ l, na primeira coleta na Foz do rio São João e na segunda coleta na Linha Férrea do Capivari, respectivamente (Gráfico 3).

O número de cópias do gene *mcrA* de *M. gottschalkii* quantificados em 1 grama de fezes equinas foi de aproximadamente  $7,79 \times 10^4$ . O gene alvo foi detectado e quantificado em 12 das 15 amostras analisadas, variando entre  $1,39 \times 10^2$  e  $8,41 \times 10^8$  cópias/ $\mu$ l, na terceira coleta no Rio São João e na primeira coleta do mesmo ponto, respectivamente (Gráfico 4). O número de cópias do gene *rrs* de *Bacteroidales* suínos existentes em 1 grama de fezes suínas foi de aproximadamente  $3,06 \times 10^8$ . O gene alvo foi detectado e quantificado em 15 das 15 amostras analisadas, variando entre  $1,49 \times 10^6$  e  $1,80 \times 10^{10}$  cópias/ $\mu$ l, na segunda coleta do rio Bacaxá e na primeira coleta do mesmo ponto, respectivamente (Gráfico 5). Todas as amostras apresentaram inibição e tiveram seus valores ajustados conforme a formula do item 3.12.3.

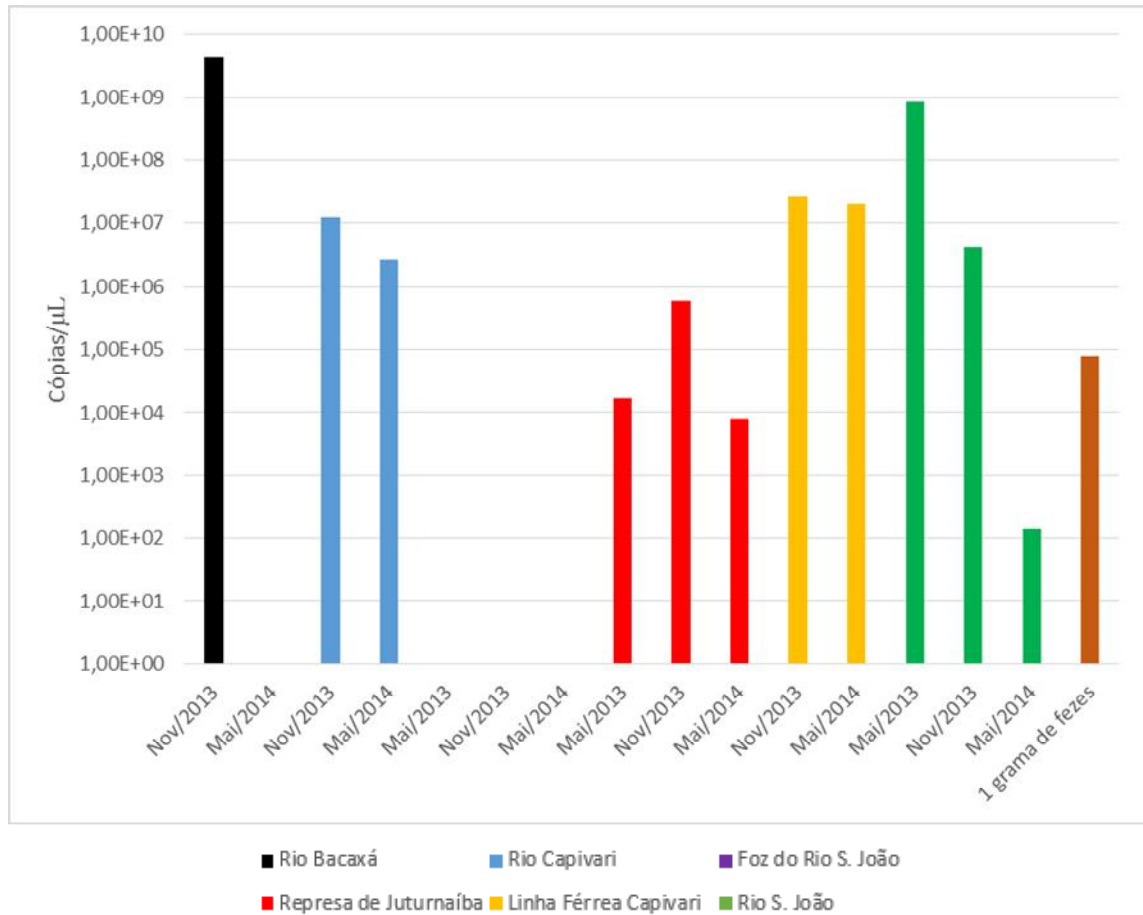




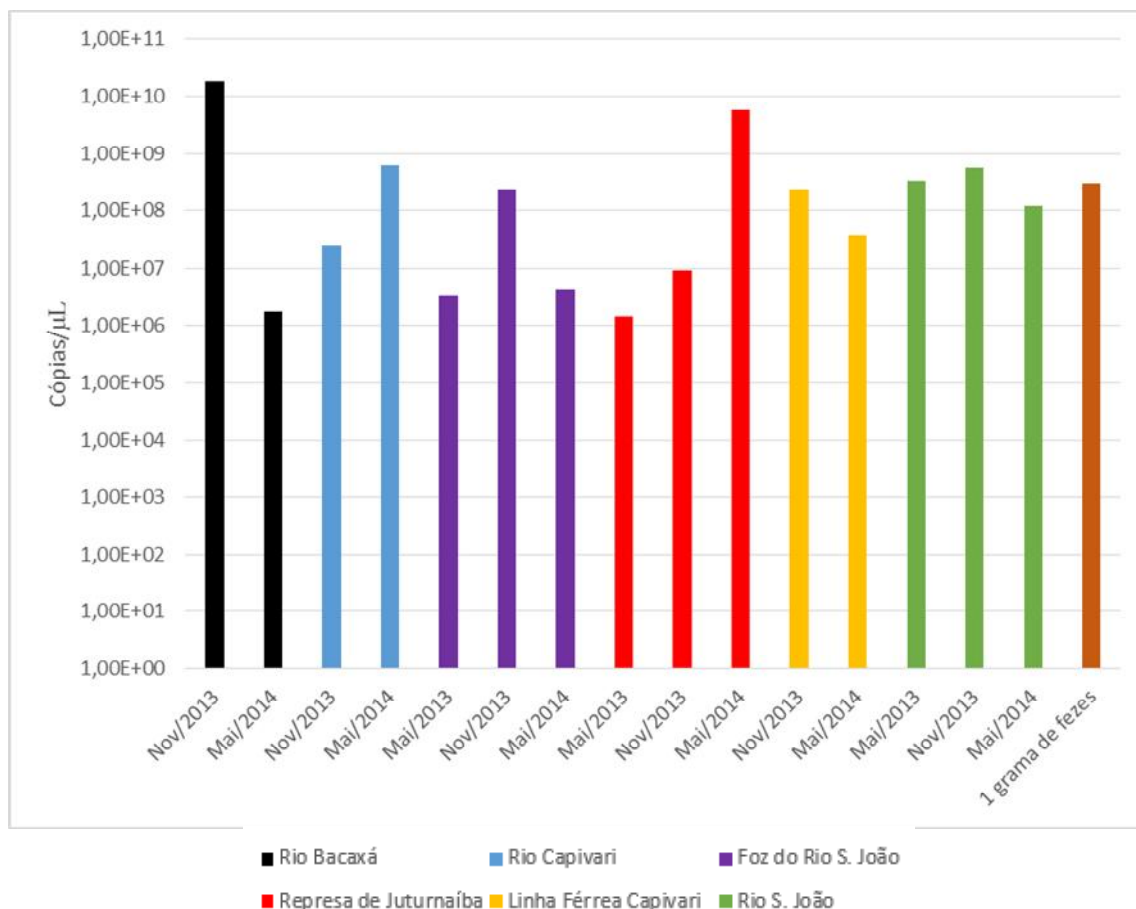
**Gráfico 2:** Representação gráfica da quantificação do gene *nifH* de *M. smithii*, através de PCR em tempo real nas amostras de água da bacia do rio São João e em 1 grama de fezes do hospedeiro-alvo.



**Gráfico 3:** Representação gráfica da quantificação do gene *nifH* de *M. ruminantium*, através de PCR em tempo real nas amostras de água da bacia do rio São João e em 1 grama de fezes do hospedeiro-alvo.



**Gráfico 4:** Representação gráfica da quantificação do gene *mcrA* de *M. gottschalkii*, através de PCR em tempo real nas amostras de água da bacia do rio São João e em 1 grama de fezes do hospedeiro-alvo.



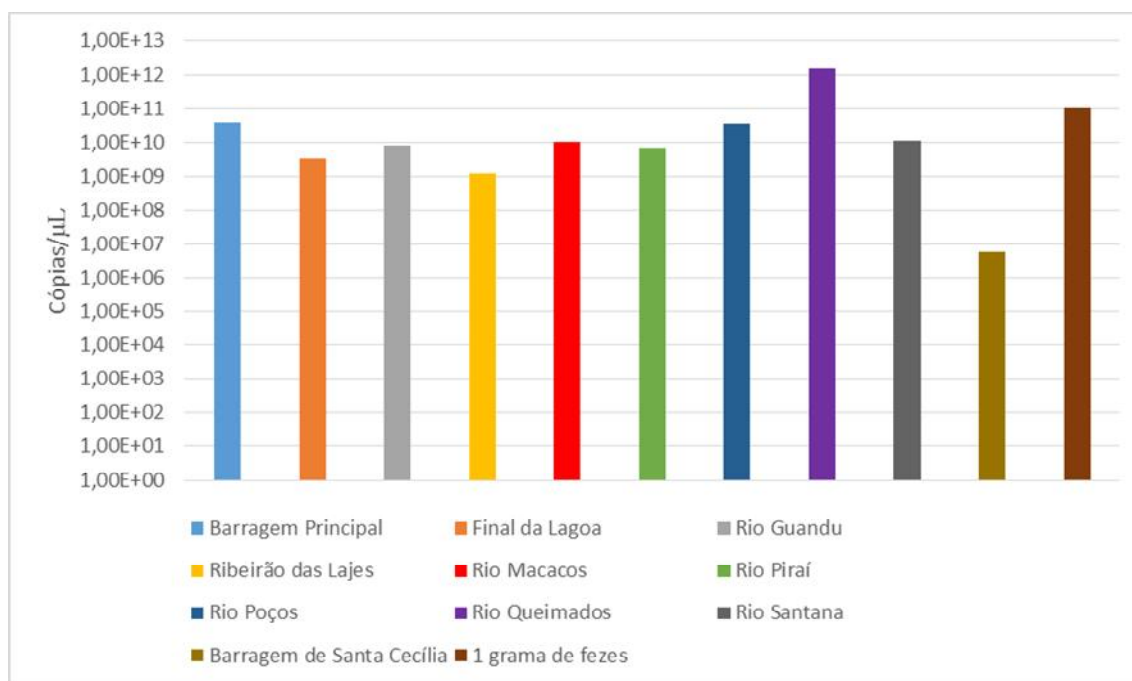
**Gráfico 5:** Representação gráfica da quantificação do gene *rrs* de *Bacteroidales* de origem suína, através de PCR em tempo real nas amostras de água da bacia do rio São João e em 1 grama de fezes do hospedeiro-alvo.

#### 4.7.1.2. Bacia Hidrográfica do rio Guandu

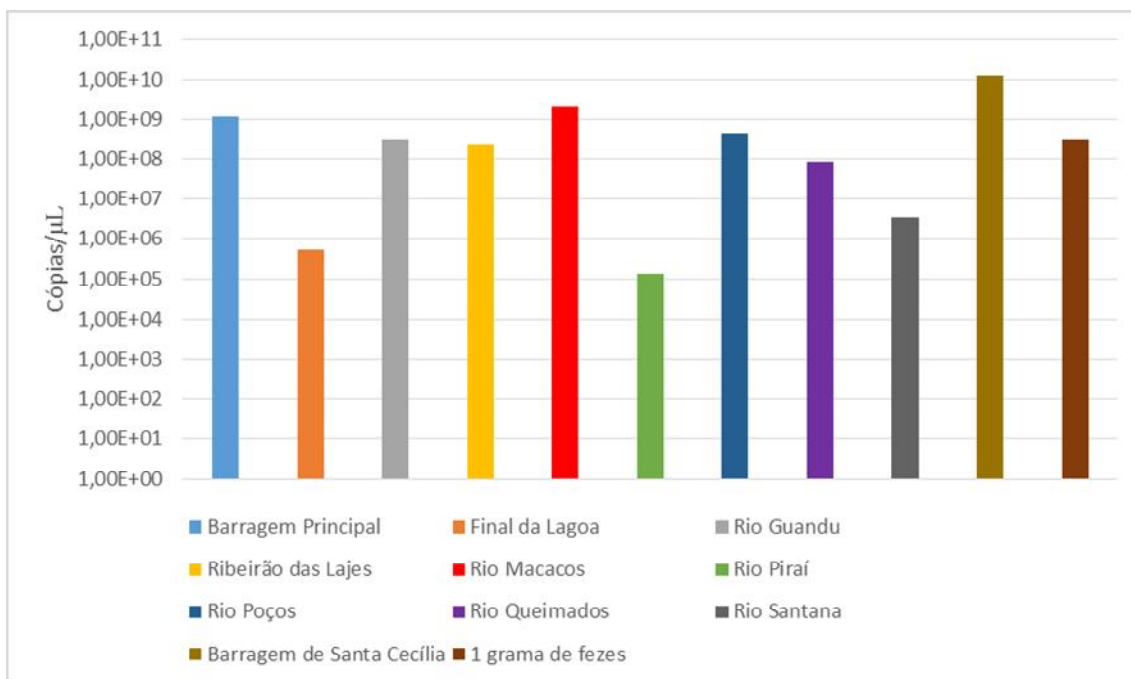
Foi quantificado o número de cópias do gene *nifH* de *M. smithii* existentes em 1 grama de fezes de humanos, foram encontrados valores de aproximadamente  $1,02 \times 10^{11}$ . O gene alvo foi detectado e quantificado em 10 das 10 amostras do rio Guandu analisadas, variando entre  $5,83 \times 10^6$  e  $1,47 \times 10^{12}$  cópias/µL, na barragem de Santa Cecília e no rio Queimados, respectivamente (Gráfico 6). O número de cópias do gene *nifH* de *M. ruminantium* quantificadas em 1 grama de fezes bovinas foi de aproximadamente  $4,35 \times 10^7$ . O gene alvo foi detectado e quantificado em 10 das 10

amostras analisadas, variando entre  $6,93 \times 10^5$  e  $6,76 \times 10^9$  cópias/ $\mu\text{L}$ , no rio Piraí e na Barragem principal, respectivamente (Gráfico 7).

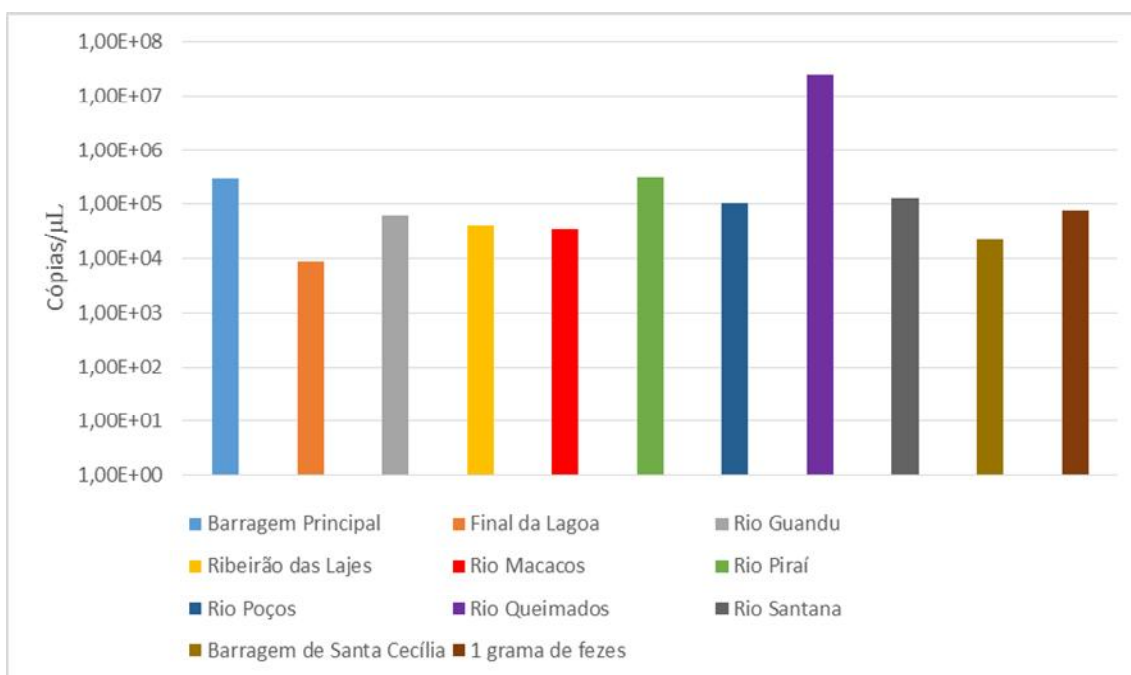
O número de cópias do gene *mcrA* de *M. gottschalkii* quantificados em 1 grama de fezes equinas foi de aproximadamente  $6,30 \times 10^4$ . O gene alvo foi detectado e quantificado em 10 das 10 amostras analisadas, variando entre  $8,93 \times 10^3$  e  $2,45 \times 10^7$  cópias/ $\mu\text{L}$ , no Final da lagoa e no rio Queimados, respectivamente (Gráfico 8). O número de cópias do gene *rrs* de *Bacteroidales* suínos existentes em 1 grama de fezes suínas foi de aproximadamente  $3,06 \times 10^8$ . O gene alvo foi detectado e quantificado em 10 das 10 amostras analisadas, variando entre  $1,34 \times 10^5$  e  $1,20 \times 10^{10}$  cópias/ $\mu\text{L}$ , no rio Piraí e na Barragem de Santa Cecília, respectivamente (Gráfico 9). Todas as amostras apresentaram inibição e tiveram seus valores ajustados conforme a formula do item 3.12.3.



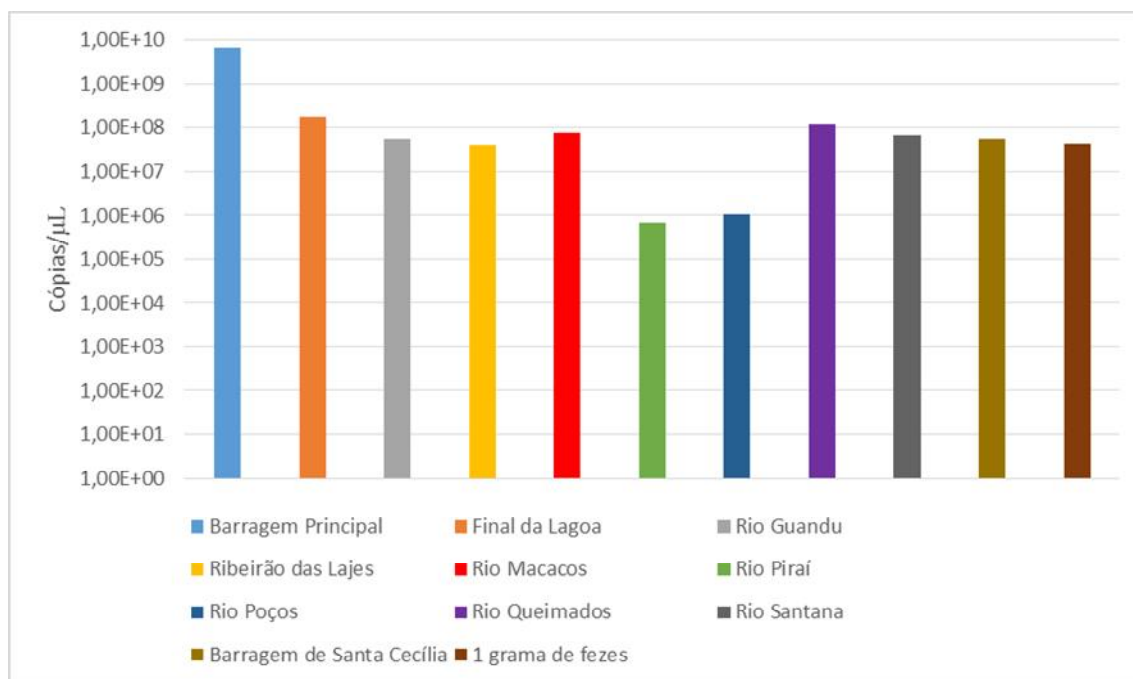
**Gráfico 6:** Representação gráfica da quantificação de *M. smithii*, através de PCR em tempo real nas amostras de água da bacia do rio Guandu e em 1 grama de fezes do hospedeiro-alvo.



**Gráfico 7:** Representação gráfica da quantificação de *M. ruminantium*, através de PCR em tempo real nas amostras de água da bacia do rio Guandu e em 1 grama de fezes do hospedeiro-alvo.



**Gráfico 8:** Representação gráfica da quantificação de *M. gottschalkii*, através de PCR em tempo real nas amostras de água da bacia do rio São João e em 1 grama de fezes do hospedeiro-alvo.



**Gráfico 9:** Representação gráfica da quantificação de *Bacteroidales* de origem suína, através de PCR em tempo real nas amostras de água da bacia do rio Guandu e em 1 grama de fezes do hospedeiro-alvo.

## 5 DISCUSSÃO

De acordo com um estudo realizado pela Organização não governamental (ONG) SOS Mata Atlântica que coletou amostras em 15 pontos da cidade do Rio de Janeiro, 60% deles apresentaram qualidade ruim da água. Entretanto, o estado adotou ações importantes, como planos de preservação da Mata Atlântica em 18 municípios e projeto de recuperação de microbacias na Região dos Lagos. Ainda segundo o estudo, muitos córregos e canais pesquisados lançam suas águas diretamente no mar, por meio dos emissários (SOS Mata Atlântica, 2014).

A avaliação de parâmetros físico-químicos de um determinado ambiente permite traçar um perfil de condições e potencial ecológico do mesmo, visando não somente a valorização biológica local, mas também evidenciando aspectos ambientais que permitam conduzir investigações e a prevenção de possíveis riscos à saúde humana. A temperatura é uma propriedade física que caracteriza o equilíbrio térmico de um sistema e atua como fator limitante à reprodução, crescimento e distribuição de comunidades microbianas, influenciando praticamente todos os processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem na água (PEREIRA & GOMES, 2002).

Neste estudo, alguns parâmetros físico-químicos, como por exemplo, a temperatura apresentou variações na barragem de Santa Cecilia e na represa de Juturnaíba, entre 20,2 e 33°C, respectivamente. Embora as concentrações de *E. coli* tenham apresentado níveis baixos na barragem e ausentes na represa, a presença de marcadores de contaminação fecal de três hospedeiros-específicos foram detectados pela qPCR, em cada um deles. Um outro parâmetro relevante foi a concentração de oxigênio dissolvido (OD) que demonstrou baixos valores no rio Capivari (3,27 mg/L) e na linha férrea do Capivari (3,05 mg/L) onde aparentemente não há descarte de esgoto, o que nos levou a sugerir um possível descarte a montante desses pontos de coleta.

As águas da bacia do rio São João e do rio Guandu são impactadas com níveis elevados de contaminação fecal, pela falta de tratamento do esgoto gerado nas cidades no entorno dos mesmos. Embora a legislação não determine um limite de coliformes totais, estes revelaram valores elevados em todos os pontos analisados. Além disso, quatro pontos de coleta, foz do rio São João (3ª coleta), linha férrea do Capivari (2ª coleta), rio Macacos e rio Queimados também



apresentaram altas concentrações de *E. coli* e dois pontos, foz do rio São João (1ª coleta) e rio Capivari (2ª coleta) apresentaram valores próximos aos limites permitidos pela Resolução Nº 357/2005 do CONAMA.

Neste estudo, verificamos uma baixa correlação entre a enumeração de *E. coli* e a detecção de *Methanobrevibacter* spp. e *Bacteroidales*. Das 21 amostras que apresentam níveis de *E. coli* dentro de limites aceitáveis, todas demonstraram a presença de, pelo menos, 3 dos biomarcadores dos domínios Bacteria e Archaea. Por outro lado, as outras 4 amostras com níveis de *E. coli* acima do limite recomendado mostraram a presença de todos os biomarcadores de ambos os domínios. Resultados semelhantes foram observados em um estudo realizado por Johnston e colaboradores (2010), onde houve pouca ou nenhuma correlação entre a detecção de biomarcadores de contaminação fecal humana e a enumeração de *E. coli* e *Enterococcus faecalis*. Apesar dessas limitações, coliformes totais e *E. coli* continuam a ser os indicadores microbianos de contaminação fecal mais amplamente utilizados em muitos países (CABRAL, 2010).

Ainda em relação a correlação entre biomarcadores, um estudo demonstrou que o gene *nifH* de *M. smithii* detectado em efluentes tratados apresentaram baixa correlação com *Enterococcus* cultiváveis, mas apresentaram alta correlação com norovirus, *Cryptosporidium* spp. e *Giardia Lamblia*. Estes resultados indicaram que este bioindicador pode ser correlacionado com patógenos não removidos durante o processo de tratamento (Rosário et al., 2009).

Em nosso estudo, os biomarcadores do domínio Archaea, gene *nifH* de *M. smithii* e *M. ruminantium* foram detectados pela PCR convencional na maior parte das amostras de água, 96% e 92%, respectivamente, enquanto o gene *rrs* de *Bacteroidales* humanos e bovinos foram detectadas em 56% e 32%, respectivamente. No entanto, um estudo realizado na Austrália, avaliou a especificidade e a sensibilidade do gene *nifH* como marcador, frente a amostras fecais e de águas residuais de 11 espécies de animais, incluindo seres humanos. A especificidade foi de 96%, enquanto a sensibilidade em esgoto humano foi de 81%. A prevalência do marcador em amostras de água do ambiente foi relativamente baixa em comparação com outros marcadores testados (esp, HF183, HPyVs e adenovírus). No entanto, concluiu-se que o marcador *nifH* sozinho pode não ser sensível o suficiente para detectar poluição fecal nas águas ambientais, mas

apresentou alta especificidade sendo recomendado a sua utilização em conjunto com outros marcadores de material fecal humano (Ahmed 2012).

Tanto a contaminação fecal humana, quanto a contaminação bovina foram detectadas em 100% das amostras de água pela PCR em tempo real através da detecção do gene *nifH*. A quantificação deste biomarcador demonstrou a presença de altas concentrações em todos os pontos analisados, foi possível notar um aumento gradual na concentração de contaminação fecal humana na represa de Juturnaíba e a ação da sazonalidade na foz do rio São João em relação a contaminação fecal bovina. Estes biomarcadores permitiram constatar que tanto os pontos considerados impróprios quanto os próprios pelo método da detecção de *E. coli*, foram contaminados recentemente com resíduos fecais de origem humana e bovina, uma vez que *Methanobrevibacter* spp. são archaeas anaeróbicas estritas, incapazes de se reproduzir na presença de oxigênio (UFNAR et al.2007).

Essa é uma questão que requer a atenção de autoridades locais, pois segundo dados recentes do INEA (2014), a praia do pontal, localizada entre Cabo Frio e Casimiro de Abreu, que recebe as águas do rio São João foi considerada imprópria em relação a balneabilidade. O rio São João vem sofrendo com despejo irregular de esgoto de três municípios, Casimiro de Abreu, Cabo Frio e Rio das Ostras devido à falta de saneamento nessa área, o que torna o problema ainda mais grave em relação a qualidade das águas dessa praia e os riscos para a saúde humana.

Nossos resultados demonstraram também através da PCR convencional a presença de contaminação fecal suína em 92% das amostras com marcador de *Bacteroidales* e 52% com o gene *mcrA*, específico de archaeas metanogênicas. Entretanto, um estudo realizado por Ufnar e colaboradores (2007b), relatou alta sensibilidade do gene *mcrA*, todavia vale ressaltar que neste estudo o marcador foi testado apenas frente a amostras de fezes do hospedeiro alvo e não com amostras ambientais. Fezes suínas costumam carrear diversos parasitas, como *Cysticercus cellulosae* (forma larval da *Taenia solium*), *Cryptosporidium* spp. e *Ascaris suum* (UFNAR et al. 2007b). Quando utilizamos qPCR observamos a presença de contaminação fecal suína em 100% das amostras testadas com o marcador do gene *rrs* de *Bacteroidales*. Nota-se também o aumento gradativo da contaminação na represa de Juturnaíba, além de altos níveis em todos os pontos, principalmente na

3ª coleta da represa de Juturnaíba e na barragem de Santa Cecília, apresentando mais de 1 grama de fezes a cada 4 litros de água.

Vale ressaltar que, os iniciadores para o gene *mcrA*, descritos neste estudo, para detecção de poluição fecal equina demonstraram alta especificidade e sensibilidade, foram detectados pela PCR convencional em 84% das amostras estudadas em comparação com 64% dos marcadores de *Bacteroidales*. Enquanto isso, 84% das amostras analisadas pela PCR em tempo real apresentaram contaminação fecal equina. Nota-se também a ação da sazonalidade na represa de Juturnaíba, assim como com outros marcadores. No entanto, os níveis encontrados foram mais baixos em comparação ao marcador humano, bovino e suíno. Na foz do rio São João, em todas as coletas, não foi possível detectar e quantificar a contaminação fecal equina pela PCR em tempo real, entretanto pela PCR convencional onde foi detectada contaminação equina em 2 coletas neste ponto. Esta diferença de sensibilidade pode ser atribuída a uma combinação de fatores como, por exemplo, a presença de inibidores e as condições das reações. Fezes equinas também são carreadoras de diversos patógenos, como *Salmonella* spp. e *Bacillus anthracis*.

Nenhum indicador individualmente é capaz de revelar de forma significativa a presença de todos os patógenos na água. Muitos estudos relatam que altas concentrações de coliformes totais, *E. coli* em águas, geralmente, indicam a presença de contaminação fecal, independentemente da existência ou não da presença de patógenos específicos, isso quer dizer que, ausência de indicadores na água não garante a ausência de micro-organismos patogênicos (CARTER et al., 1987; LONG and SOBSEY, 2004).

Os novos iniciadores para os domínios Bacteria e Archaea propostos neste estudo demonstraram alta sensibilidade e especificidade tanto frente as amostras fecais quanto as amostras de água analisadas. Embora, os marcadores de domínio Archaea foram mais frequentemente detectados, nas fezes e nos corpos d'água estudados. Eles detectaram a presença de marcadores humanos, suínos e equinos em 100% das amostras de fezes, enquanto os marcadores bacterianos mostraram 100% apenas para bovinos.

Estes dados nos levam a sugerir que o uso de varios marcadores na detecção e identificação da fonte de contaminação fecal é sempre recomendado, assim como

constatamos neste estudo, os marcadores apresentam variações dependendo da composição e tratamento das amostras, entre outros fatores. Essas inconsistências podem gerar resultados imprecisos em relação ao rastreamento de origem da contaminação fecal. Por exemplo, o marcador mais amplamente utilizado, o gene *rrs* de *Bacteroides* HF183, não apresentou alta especificidade na detecção de fezes humanas; no entanto, tem a vantagem de ser amplamente distribuído na população humana e conseqüentemente bastante detectado em águas residuais (AHMED 2009; CARSON *et al.*, 2005).

Vale ressaltar que, até onde é do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo utilizando os genes *nifH* (*M. smithii*, *M. ruminantium*), *mcrA* (*M. gottschalkii*) e *rrs* (*Bacteroidales* suínos) como marcador de poluição fecal humana, bovina, equina e suína em águas destinadas ao abastecimento público no Brasil.

A abordagem aqui apresentada demonstrou que a utilização de indicadores dos domínios Archaea e Bacteria simultaneamente, foi considerada eficiente no rastreamento de fontes de poluição fecal, o que certamente irá colaborar para o aprimoramento dos serviços de vigilância ambiental e epidemiológica e de modelos de prevenção e monitoramento de doenças emergentes e reemergentes advindas da contaminação fecal que interferem na saúde da população.

## 6 CONCLUSÕES

Diversos micro-organismos já foram propostos como indicadores alternativos da presença de contaminação fecal em corpos d'água, mas a aplicação dos domínios Bacteria e Archaea como biomarcadores moleculares pela PCR em tempo real é uma metodologia relativamente recente, e sua aplicação é inédito no Brasil.

A avaliação da especificidade e sensibilidade dos biomarcadores já descritos e dos novos propostos neste estudo, frente ao material fecal de diferentes hospedeiros, não apresentou reação cruzada o que demonstra boa especificidade dos mesmos.

Os biomarcadores aqui utilizados nos permitiram constatar que os pontos coletados considerados próprios ou impróprios, segundo a legislação, demonstraram a contaminação por diferentes resíduos fecais recentes.

Considerando que no Brasil, cerca de 43% dos municípios não possuem rede de esgoto e que no Estado do Rio de Janeiro apenas 35% do esgoto é tratado, nossos resultados alertam para a necessidade de maiores investimentos em saneamento básico e fiscalização do poder público, principalmente em relação ao esgotamento sanitário, que é um problema de saúde pública no estado do Rio de Janeiro.

A aplicação de vários bioindicadores pode apresentar resultados mais precisos e confiáveis em relação a qualidade dos corpos de água.

Por fim, concluímos que as investigações a respeito das fontes de poluição fecal em águas destinadas ao abastecimento público podem contribuir para a implementação das melhores estratégias do programa de monitoramento e remediação, a fim de melhorar a qualidade da saúde humana e do ecossistema.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes, **Pecuária Brasileira**. Disponível em: [http://www.abiec.com.br/3\\_pecuaria.asp](http://www.abiec.com.br/3_pecuaria.asp). Acessado em 10 de outubro de 2013.
- ADRIANO, D.C. **Trace elements in the terrestrial environment**. New York: Springer Verlag, 533p, 1986.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS - ANA. **Os principais parâmetros monitorados pelas sondas multiparâmetros são: pH, condutividade, temperatura, turbidez, clorofila ou cianobactérias e oxigênio dissolvido**. Maurrem Ramon Vieira. 2012. Água e poços na Região Metropolitana de Recife-PE. Rev. Hig. Alim. São Paulo, v.15, n.90/91, p.73-78, 2001.
- ANA - AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS/MINIST MEIO AMBIENTE. **Plano Estratégico de Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica dos Rios do Guandu, da Guarda e Guandu-Mirim**. 2006.
- AHMED, F.E. **Detection of genetically modified organisms in foods**. Trends in Biotechnology, v.20, n.5, p.215-223, 2002.
- AHMED, W., GOONETILLEKE, A., POWELL, D., CHAUHAN, K. & GARDNER, T. **Comparison of molecular markers to detect fresh sewage in environmental waters**. Water Res. Nov. 43(19), 4908–4917. 2009.
- AHMED, W., SIDHU, J. P. & TOZE, S. 2012 **Evaluation of the nifH gene marker of Methanobrevibacter smithii for the detection of sewage pollution in environmental waters in Southeast Queensland, Australia**. Environ. Sci. Technol. 46(1), 543–550.
- AHMED, W.; NELLER, R.; KATOULI, M. **Host species-specific metabolic fingerprint database for enterococci and *Escherichia coli* and its application to identify sources of fecal contamination in surface waters**. Appl. Environ. Microbiol. 71 (8), 4461–4468; 2005.
- ALEIXO, P.C.; NÓBREGA, J.A.; SANTOS JÚNIOR, D.; MULLER, R.C.S. **Determinação direta de selênio em água de coco e leite de coco utilizando espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite**. Química Nova, vol. 23 (3), p.310 - 312, 2000.

- ANDERSON, K.L., WHITLOCK, J.E. AND HARWOOD, V.J. **Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments**. Appl Environ Microbiol 71, 3041–3048. 2005
- ANDERSSON, Y.; BOHAN, P. **Water quality: guidelines, standards and health**. 2001.
- ANTUNES, C.A.; CASTRO, M.C.F.M.; GUARDA, V.L.M. **Influência da qualidade da água destinada ao consumo humano no estado nutricional de crianças com idades entre 3 e 6 anos, no município de Ouro Preto – MG**. Alim. Nutr., Araraquara, v. 15, n. 3, p. 221-226, 2004
- ANZECC/ARMCANZ - **Australian Guidelines for Water Quality Monitoring and Reporting**. October, 2000. In:  
<http://www.ea.gov.au/water/quality/nwqms/#monitor>. Acesso em 20/02/2014.
- APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AWWA - AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION & WEF - WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22. ed., Washington, APHA, USA, 2012.
- ARRIGO, KEVIN R. **Marine microorganisms and global nutrient cycles**. Nature. 2005 Sep 15; 437 (7057):349-55. Review.
- ABESA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL - **Seção Rio de Janeiro**. Disponível em:  
<http://www.abesrio.org.br/>. Acessado em 22 de dezembro de 2014
- AUCHTUNG, T. A.; TAKACS-VESBACH, C. D.; CAVANAUGH, C. M. **16S rRNA Phylogenetic Investigation of the Candidate Division “Korarchaeota”**. Appl. Environ. Microbiol. 72 (7): 5077–5082; 2006.
- BADGLEY, B.D., NAYAK, B.S. AND HARWOOD, V.J. **The importance of sediment and submerged aquatic vegetation as potential habitats for persistent strains of enterococci in a subtropical watershed**. Water Res 44, 5857–5866. (2010a)
- BADGLEY, B.D., THOMAS, F.I. AND HARWOOD, V.J. **The effects of submerged aquatic vegetation on the persistence of environmental populations of Enterococcus ssp p**. Environ Microbiol 12, 1271–1281. (2010b)

- BARCELLOS, C.; QUITÉRIO, L.A.D. **Vigilância ambiental em saúde e sua implantação no Sistema Único de Saúde**. Revista de Saúde Pública, v. 40, n. 1, p. 170-77, 2006.
- BARNES, B.; GORDON, D.M. **Coliform dynamics and the implications for source tracking**. Environ. Microbiol. 6 (5), 501–509;2004.
- BARNS, S. M.; DELWICHE, C. F.; PALMER, J. D.; PACE, N. R. **Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences**. PNAS 93 (17): 9188-9193; 1996.
- BAUGHN AD, MALAMY MH. **The strict anaerobe Bacteroides fragilis grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen**. Nature. 2004 Jan 29;427(6973):441-4.
- BAUMGARTEN, M. G.; POZZA, S. A. **Qualidade de águas. Descrição de parâmetros químicos referidos na legislação ambiental**. Rio Grande: Ed. FURG, 2001.
- BERG, R.D. **The indigenous gastrointestinal microflora**. Trends Microbiol. v.4., p.430-435, 1996.
- BERNHARD, A. E.; AND K. G. FIELD. **PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in Bacteroides-Prevotella genes encoding 16S rRNA**. Appl. Environ. Microbiol. 66:4571–4574, 2000.
- BETTEGA, J.M.P.R.; MACHADO, M.R.; PRESIBELLA, M.; BANISKI, G.; BARBOSA, C.A. **Métodos analíticos no controle microbiológico da água para consumo humano**. Ciência e Agrotecnologia, v.30, n.5, p. 950-954, 2006.
- BEVERIDGE, T. J. 2001. **Use of the gram stain in microbiology**. Biotech Histochem., 76: 111-118.<http://dx.doi.org/10.1080/bih.76.3.111.118>
- BLACKSTONE GM, NORDSTROM JL, VICKERY MC, BOWEN MD, MEYER RF, DEPAOLA A. **Detection of pathogenic Vibrio parahaemolyticus in oyster enrichments by real time PCR**. J Microbiol Methods. 2003
- BLANCH, A. R.; CAPLIN, J. L.; IVERSEN, A.; KÜHN, I.; MANERO, A.; TAYLOR, H. D.; VILANOVA, X. **Comparison of enterococcal populations related to urban and hospital wastewater in various climatic and geographic European regions**. J. Appl. Microbiol., v. 94, p. 994-1002, 2003.



- BLANCH, A.R., BELANCHE-MUNOZ, L., BONJOCH, X., EBDON, J., GANTZER, C., LUCENA, F., OTTOSON, J., KOURTIS, C., IVERSEN, A., KUHN, I., MOCE, L., MUNIESA, M., SCHWARTZBROD, J., SKRABER, S., PAPAGEORGIU, G.T., TAYLOR, H., WALLIS, J., JOFRE, J. **Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking.** Appl. Environ. Microbiol. 72 (9),5915–5926;2007.
- BLATCHLEY ER 3RD, GONG WL, ALLEMAN JE, ROSE JB, HUFFMAN DE, OTAKI M, LISLE JT: **Effects of wastewater disinfection on waterborne bacteria and viruses.** Water Environ Res 2007, 79(1):81-92.
- BOEHM, A.B., N.J. ASHBOLT, J.M. COLFORD, L.E DUNBAR, A.M. ICHIDA, C.D. MCGEE, J.A. SOLLER AND S.B. **A sea change ahead for recreational water quality criteria.** Journal of Water and Health, n.7, p. 9-20, 2009.
- BOMFIM, M. V. J.; SOEIRO, G. de O.; MADEIRA, M.; BARROS, H. D. **Avaliação físico-química e microbiológica da água de abastecimento do laboratório de bromatologia da UERJ.** Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v. 21, n. 152, p. 99-103, jun. 2007.
- BONJOCH, X., BALLESTE, E. & BLANCH, A.R. **Multiplex PCR with 16S rRNA gene targeted primers of Bifidobacterium spp. to identify sources of fecal pollution.** Appl. Environ. Microbiol. 70(5), 3171–3175. 2004
- BOWER, P. A., SCOPEL, C. O., JENSEN, E. T., DEPAS, M. M., AND MCLELLAN, S. L. **Detection of Genetic Markers of Fecal Indicator Bacteria in Lake Michigan and Determination of Their Relationship to *Escherichia coli* Densities Using Standard Microbiological Methods.** Appl. Environ. Microbiol. 71(12): 8305-8313; 2005.
- BRANQUINHO, M.R., **Estudo da quantificação de soja geneticamente modificada em alimentos pela técnica da reação em cadeia pela polimerase em tempo real: desenvolvimento de método evento específico.** 140p. Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro. 2010.
- BRASIL - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo – **Doenças transmitidas por água e alimentos.** Disponível:  
[ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc\\_tec/hidrica/doc/10EHEC\\_rev2011.pdf](ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/10EHEC_rev2011.pdf). 2011

- BRASIL. **Centro de Vigilância Epidemiológica**. Disponível em:  
<[www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/Ecolinet.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/Ecolinet.htm)>. Acesso em 19 jan. 2014.
- BRASIL. **Plano Nacional de Resíduos Sólidos**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 2011
- BRASIL. **Agência Nacional das Águas**. Disponível em: <[www.ana.org.br](http://www.ana.org.br)>. Acesso em 10 out. 2013.
- BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. **Resolução n. 357, de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências – Data da legislação: 17/03/2005 – Publicação DOU n. 053, de 18/03/2005, p. 58-63. Acesso em: 07 de novembro 2013, Brasília (DF); 2005**. Disponível em:  
<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2005>
- BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. **Resolução n. 397, de 2008. "Altera o inciso II do § 4o e a Tabela X do § 5o, ambos do art. 34 da Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA nº 357, de 2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes."** - Data da legislação: 03/04/2008 - Publicação DOU nº 66, de 07/04/2008, págs. 68-69. Acesso em: 07 de novembro 2012, Brasília (DF); 2008. Disponível em:  
<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=563>
- BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. **Resolução n. 410, de 2009. Prorroga o prazo para complementação das condições e padrões de lançamento de efluentes, previsto no art. 44 da Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, e no Art. 3o da Resolução nº 397, de 3 de abril de 2008."** - Data da legislação: 04/05/2009 - Publicação DOU nº 83, de 05/05/2009, pág. 106. Acesso em: 15 de novembro 2013, Brasília (DF); 2009. Disponível em:  
<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=603>.

- BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. **Resolução n. 430, de 2011. "Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA." - Data da legislação: 13/05/2011 - Publicação DOU nº 92, de 16/05/2011, pág. 89 Acesso em: 15 de novembro 2013, Brasília (DF); 2011.** Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>
- BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. **Resolução nº 274, de 2000 "Revisa os critérios de Balneabilidade em Águas Brasileiras" - Data da legislação: 29/11/2000 - Publicação DOU nº 018, de 08/01/2001, págs. 70-71. Acesso em: 15 de novembro de 2013, Brasília (DF); 2000.** Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=272>.
- BRASIL. **Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, 182 (5): 2829-2907, Brasília, set./out. de 1990 ou DOU de 20 de setembro de 1990.**
- BRASIL. **Portaria MS Nº 2914 DE 12/12/2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade - Data D.O.: 14/12/2011.** Disponível em: [http://www.comitepcj.sp.gov.br/download/Portaria\\_MS\\_2914-11.pdf](http://www.comitepcj.sp.gov.br/download/Portaria_MS_2914-11.pdf). Acesso em: 15 de novembro de 2013.
- BRINGUIER A, KHELAIPIA S, RICHEL H, ABOUDHARAM G, DRANCOURT M. **Real-time PCR quantification of Methanobrevibacter oralis in periodontitis.** J Clin Microbiol. 2013.
- BROCHIER-ARMANET C, BOUSSAU B, GRIBALDO S, FORTERRE P. **"Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota".** Nat. Rev. Microbiol. 6 (3): 245–52. 2008.
- BROCHIER-ARMANET C, GRIBALDO S, FORTERRE P. **"A DNA topoisomerase IB in Thaumarchaeota testifies for the presence of this enzyme in the last common ancestor of Archaea and Eucarya".** Biol. Direct 3: 54. 2008.
- BROOK I., FRAZIER E.H., COX M.E., YEAGER J.K. **The aerobic and anaerobic microbiology of pustular acne lesions.** Anaerobe. 1995

- BRYANT, M.P. **Rumen methanogenic bacteria**, p.411-418. In R. W. Dougherty (ed.), *Physiology of digestion in the ruminant*. Butterworths, Washington, D.C. 1965.
- BYAMUKAMA, D.; KANSIIME, F.; MACH, R.L.; FARNELEITHER, H. **Determination of Escherichia coli contamination with chromocult coliform ágar showed a high level of discrimination efficiency for dirrering fecal pollution levels in tropical water of Kampala, Uganda**. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.66, p.864-868, 2000.
- CAB AMBIENTAL, **A importância da água**. Disponível em: <http://www.cabambiental.com.br/A-Importancia-da-Água>. Acessado em: 15 de novembro de 2013.
- CABELLI, V.J.; DUFOUR, A.P.; LEVINE, M.A.; McCABE, L.J.; HABERMAN, P.W. **Marine recreacional water quality criterion consistent with indicator conceptor on risk analysis**. *J. Wat. Poll. Cont. Fed.*, v.55, p.1306-1314, 1983.
- CABRAL, J.P.S. **“Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water.”** *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7.10 (2010): 3657–3703. PMC.
- CAMARGO, F.P.; LEITE, M.A.; SUZUKI, E.T.; FRANCO, R.A.M.; HERNANDEZ, F.B.T. **Avaliações preliminares dos parâmetros químicos e microbiológico de dois córregos do cinturão verde (Ilha Solteira - SP)**. UNESP, 21., 2009.
- CAMPOS, M.L. **Determinação de cádmio, cobre, cromo, níquel, chumbo e zinco em fosfatos de rocha**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.40, n.4, p.361-367, 2005.
- CARBERRY, C.A.; WATERS, S.M.; KENNY, D.A.; CREEVEY, C.J. **Rumen Methanogenic genotypes differ in abundance according to host RFI phenotype and diet type**. *Appl Environ Microbiol.* 2013
- CARDOSO, A.L.S.P. **Incidência de coliformes e Salmonella sp em água proveniente de abatedouro avícola**. *Rev.Hig. Alim.* v.17, n.111, p.73-78, 2003.

- CARDOSO, A.M., CLEMENTINO, M.M., MARTINS, O.B., VIEIRA, R.P., ALMEIDA, R.V., ALQUERES, S.M.C., and ALMEIDA, W.I. **Archaea: Potential Biotecnológico**. Ver. Biotec. Ciên. Desen. N.30, p.71-77, 2003.
- CARRILLO, M.; ESTRADA, E.; HAZEN, T.C.; **Survival and enumeration of the fecal indicators *Bifidobacterium adolescentis* and *Escherichia coli* in a tropical rain forest watershed**. Appl. Environ. Microbiol. Aug; 50(2):468-76, 1985.
- CARSON, C.A., CHRISTIANSEN, J.M., YAMPARA-IQUISE, H., BENSON, V.W., BAFFAUT, C., DAVIS, J.V., BROZ, R.R., KURTZ, W.B., ROGERS, W.M., FALES, W.H. **Specificity of a *Bacteroides thetaiotaomicron* marker for human feces**. Appl. Environ. Microbiol. 71 (8), 4945–4949;2005.
- CARSON, C.A., CHRISTIANSEN, J.M., YAMPARA-IQUISE, H., BENSON, V.W., BAFFAUT, C., DAVIS, J.V., BROZ, R.R., KURTZ, W.B., ROGERS, W.M. & FALES, W.H. **Specificity of a *Bacteroides thetaiotaomicron* marker for human feces**. Appl. Environ. Microbiol. 71(8), 4945–4949, 2005.
- CARTER, A. M., PACHA, R. E., CLARK, G. W. & WILLAMS, E. A. **Seasonal occurrence of *Campylobacter* spp. in surface waters and their correlation with standard indicator bacteria**. Appl. Environ. Microbiol. 53(2), 523–526, 1987.
- CARVALHO, R.S.; **Água, um bem que precisa ser cuidado. Coordenador Nacional do Projeto de Estruturação Institucional de Consolidação da Política Nacional de Recursos Hídricos – BRA/OEA/01/002 – SRH/MMA, 2012.**
- CASAREZ, E.A.; PILLAI, S.D.; MOTT, J.B.; VARGAS, M.; DEAN, K.E.; DI GIOVANNI, G.D. **Direct comparison of four bacterial source tracking methods and use of composite data sets**. J Appl Microbiol. 2007.
- CBHLSJ - Comitê das Bacias Hidrográficas das Lagoas de Araruama, Saquarema e dos Rios São João e Una. **Decreto de Criação nº 36.733, de 8 de dezembro de 2004**. Acesso em 15/03/2013. Disponível em:  
<http://www.lagossaojoao.org.br>
- CETESB - Companhia Estadual Técnica de Saneamento Básico e Defesa do Meio Ambiente (São Paulo). **Variáveis de qualidade das águas**. São Paulo, 2001.

- CHANDRAN, A. & MAZUMDER, A. 2013. **Prevalence of diarrhea-associated virulence genes and genetic diversity in Escherichia coli isolates from fecal material of various animal hosts.** Appl Environ Microbiol. 79(23), 7371–7380.
- CIMENTI, M.; BISWAS, N.; BEWTRA, J.K.; HUBBERSTEY, A. **Evaluation of microbial indicators for the determination of bacterial groundwater contamination sources.** Water Air Soil Pollut. 168 (1-4), 157–169;2005.
- CLEMENTINO, M.M.; FERNANDES, C.C.; VIEIRA, R.P.; CARDOSO, A.M.; POLYCARPO, C.R.; MARTINS, O.B. **Archaeal diversity in naturally occurring and impacted environments from a tropical region.** J Appl Microbiol 103(1):141–151;2007.
- COLFORD, J.M. JR; WADE, T.J.; SCHIFF, K.C.; **Water quality indicators and the risk of illness at beaches with nonpoint sources of fecal contamination.** Epidemiology 18(1):27–35;2007.
- COLLADO, M. C. & SANZ, Y. 2007 **Characterization of the gastrointestinal mucosa-associated microbiota of pigs and chickens using culture-based and molecular methodologies.** J. Food Prot. 70(12), 2799-2804.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL [CETESB]. **Relatório de qualidade de águas subterrâneas no Estado de São Paulo 2004-2006.** São Paulo, 2007
- CORSO, P. S.; KRAMER, M. H.; BLAIR, K. A.; ADDISS, D. G.; DAVIS, J. P.; HADDIX, A. C. In: **Cost of illness in the 1993 waterborne Cryptosporidium outbreak, Milwaukee, Wisconsin.** Emergency Infected Disease, v. 9, n. 1, p. 426-431, 2003.
- COSTA, E. A. **Vigilância Sanitária, Saúde e Cidadania.** Belo Horizonte, MG: Núcleo de Saúde Coletiva, FAMED/UFMG, p. 13-27, 2000.
- COSTA, L.L., CEBALLOS, B.S.O.; MEIRA, C.M.B.S.; CAVALCANTI; M.L.F. **Eficiência de Wetlands construídos com dez dias de retenção hidráulica na remoção de colifagos e bacteriófagos.** Revista de Biologia e Ciências da Terra, Paraíba, v.3, n.1, primeiro semestre 2003.
- COUTO, R. J. **Toxicologia Veterinária.** (2ª ed). Barcelona: Salvat. (1989).

- CRMV – Conselho Regional de Medicina Veterinária. **Manual de Zoonoses**. Disponível: [http://www.crmvrs.gov.br/Manual\\_de\\_Zoonoses.pdf](http://www.crmvrs.gov.br/Manual_de_Zoonoses.pdf). 2011. Acesso 15/11/2013.
- D'AGUILA, P.S.; ROQUE, O.C.C.; MIRANDA, C.A.S.; FERREIRA, A.P. **Avaliação da qualidade de água para abastecimento público do Município de Nova Iguaçu**. Cad. Saúde Pública, vol.16, n.3, pp. 791-798. ISSN 0102-311X; 2000.
- DALLARI, S. G. **A vigilância sanitária no contexto constitucional e legal brasileiro**. Cadernos de Saúde Pública, Belo Horizonte, v. 4, p. 39-52, 2001.
- DESHPANDE, S.S. (2002). **Handbook of Food Toxicology**. (1ª ed). Nova Iorque: Marcel Dekker.
- DESMARAIS, T.R., SOLO-GABRIELE, H.M. AND PALMER, C.J. **Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment**. Appl Environ Microbiol 68, 1165–1172. (2002)
- DIAS, N.M.F.S. **Minamata Case Study**. Departamento de Ambiente. Ambicare. Portugal. 2004.
- DICK LK, BERNHARD AE, BRODEUR TJ, SANTO DOMINGO JW, SIMPSON JM, WALTERS SP, FIELD KG. **Host distributions of uncultivated fecal Bacteroidales bacteria reveal genetic markers for fecal source identification**. Appl Environ Microbiol. 2005 Jun;71(6):3184-91.
- DORAI-RAJ, S., O'GRADY, J., COLLERAN, E. **Specificity and sensitivity evaluation of novel and existing Bacteroidales and Bifidobacteria-specific PCR assays on feces and sewage samples and their application for microbial source tracking in Ireland**. Water Res 43:4980–4988, 2009.
- DRIDI B, RAOULT D, DRANCOURT M. **Archaea as emerging organisms in complex human microbiomes**. Anaerobe. 2011 Apr;17(2):56-63. doi: 10.1016/j.anaerobe.2011.03.001. Epub 2011.
- DU PREEZ JH. **Parameters for the determination and evaluation of heat stress in dairy cattle in South Africa**. Onderstepoort J Vet Res. 2000 Dec;67(4):263-71.
- DWIGHT, R.H.; BAKER, D.B.; SEMENZA, J.C.; OLSON, B.H.; **Health effects associated with recreational coastal water use: urban versus rural California**. Am J Public Health 94(4):565–7;2004.

- EBDON, J.E., TAYLOR, H.D. **Geographical stability of enterococcal antibiotic resistance profiles in Europe and its implications for the identification of fecal sources.** Environ. Sci. Technol. 40 (17), 5327–5332;2006
- ECKBURG PB, BIK EM, BERNSTEIN CN, PURDOM E, DETHLEFSEN L, SARGENT M, GILL SR, NELSON KE, RELMAN DA. **Diversity of the human intestinal microbial flora.** Science. 2005
- EDBERG SC, RICE EW, KARLIN RJ, ALLEN MJ. **Escherichia coli: the best biological drinking water indicator for public health protection.** J Appl Microbiol, 2000.
- EDGE, T.A.; HILL, S.; **Multiple lines of evidence to identify the source of fecal pollution at a freshwater beach in Hamilton Harbour, Lake Ontario.** Water Res., in press; 2007.
- EDUARDO, M. B. P.; MIRANDA, I. C. S. **Vigilância Sanitária.** 1. ed. São Paulo: Peirópolis, v. 1. 465 p, 1998.
- EDUARDO, M.B.P. **Saúde & Cidadania – Vigilância Sanitária.** p. 3 Instituto para o Desenvolvimento da Saúde - IDS. Núcleo de Assistência Médico-Hospitalar - NAMH/FSP e Banco Itaú. São Paulo, 1998.
- EGREJA FILHO, F.B. **Avaliação da ocorrência e distribuição dos metais pesados na compostagem de lixo domiciliar urbano.** Dissertação (Mestrado em Agronomia/ Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, 176p, 1993
- FERREIRA, M.C.S.; DOMINGUES, R.M.C.P & UZEDA, M. **In: Manual de Bacteriologia de Anaeróbios,** Rio de Janeiro, Brasil. 2003.
- FIELD, K. G., CHERN, E. C., DICK, L. K., FUHRMANN, J., GRIFFITH, J., HOLDEN, P., LAMONTAGNE, M. G., LE, J., OLSON, B., AND SIMONICH, M. T. **A comparative study of culture-independent, library-independent genotypic methods of fecal source tracking.** Journal of Water and Health 01(4), 181–94. 2003.
- FIELD, K. G., SAMADPOUR, M. **Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality.** Water Res. Aug;41(16):3517-38;2007.
- FIKSDAL, L., J.S. MAKI, S.J. LACROIX, AND J.T. STALEY. **Survival and detection of Bacteroides spp., prospective indicator bacteria.** Appl. Environ. Microbiol.49, 148-150;1985.



- FRANCO, B. D. G. M. **Microbiologia dos Alimentos**, 2º edição – São Paulo: Editora Atheneu, 2003.
- FRANCO, B.D. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 1996.
- FREITAS, M.B.; FREITAS, C.M. **A vigilância da qualidade da água para consumo humano – desafios e perspectivas para o Sistema Único de saúde**. Ciência & Saúde Coletiva, n. 10, v.4, p.993-1004, 2005.
- FUJIOKA, R.; SIAN-DENTON, C.; BORJA, M., CASTRO, J.; MORPHEW K. **Soil: the enviromental source of Escherichia coli and Enterococci in Guam's streams**. J. Appl. Microbiol., v.85, p.83-89, 1999
- FUNASA, **Guia de vigilância ambiental**, Brasília, novembro de 2002a.
- FUNASA, **Vigilância Ambiental em Saúde**, Brasília, novembro de 2002b.
- GACHON, C. M., STRITTMATTER, M., MÜLLER, D. G., KLEINTEICH, J. & KÜPPER, F. C. **Detection of differential host susceptibility to the marine oomycete pathogen *Eurychasma dicksonii* by real-time PCR: not all algae are equal**. Appl. Environ. Microbiol. 75(2), 322-328. 2009
- GALINDO, E.F.; FURTADO, M.F.R.G.; **Cidades e suas águas: gestão articulada para a sustentabilidade ambiental**. Cadernos metrópole 15 pp. 71-88. 2006.
- GAO B, GUPTA RS. **Phylogenetic framework and molecular signatures for the main clades of the phylum Actinobacteria**. Microbiol Mol Biol Rev. 2012 Mar;76(1):66-112.
- GĀSPARĪC, M. B. **Comparison of nine different REAL-time PCR chemistries for qualitative and quantitative applications in GMO detection**. Anal. Bioanal. Chem., v. 396, p. 2023-2029, 2010.
- GELDREICH, E.E. **Qualidade microbiológica em águas potáveis**. In: **Secretaria dos Serviços e Obras Públicas**. Desinfecção das águas. São Paulo, CETESB, 1974, cap. 7, p. 73-93
- GILL P, GHAEMI A. **Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review**. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2008 Mar;27(3):224-43.
- GILPIN, B.; JAMES, T.; NOUROZI, F.; SAUNDERS, D.; SCHOLE, P.; SAVILL, M. **The use of chemical and molecular microbial indicators for faecal source identification**. Water Sci. Technol. 47 (3), 39–43;2003.

- GORDON, D. M. **Geographical structure and host specificity in bacteria and the implications for tracing the source of coliform contamination.** Microbiology 147:1079–1085, 2001.
- GRABOW, W. **Waterborne diseases: Update on water quality assessment and control.** Water SA, v. 22, n. 2, p. 193-202, 1996.
- GRACZYK, T.K., SUNDERLAND, D., TAMANG, L., LUCY, F.E. AND BREYSSE, P.N. **Bather density and levels of Cryptosporidium, Giardia, and pathogenic microsporidian spores in recreational bathing water.** Parasitol Res101, 1729–1731. (2007a)
- GRACZYK, T.K., SUNDERLAND, D., TAMANG, L., SHIELDS, T.M., LUCY, F.E. AND BREYSSE, P.N. **Quantitative evaluation of the impact of bather density on levels of human-virulent microsporidian spores in recreational water.** Appl Environ Microbiol73, 4095–4099(2007b)
- GREGOR, J.; GARRETT, N.; GILPIN, B.; RANDALL, C.; SAUNDERS, D. **Use of classification and regression tree (CART) analysis with chemical faecal indicators to determine sources of contamination.** N.Z.J. Mar. Freshwater Res. 36, 387–398;2002.
- GRIBALDO, S. & BROCHIER-ARMANET. 2006. **The origin and evolution of Archaea: a state of the art.** Phil. Trans. R. Soc. B., 361: 1007.  
<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2006.1841>
- GRIFFITH, J.F.; CAO, Y.P.; MCGEE, C.D.; WEISBERG, S.B.; **Evaluation of rapid methods and novel indicators for assessing microbiological beach water quality.** Water Res43:4900–4907. 2009.
- GROßKOPF, R., JANSSEN, P.H., LIESACK, W. **Diversity and Structure of the Methanogenic Community in Anoxic Rice Paddy Soil Microcosms as Examined by Cultivation and Direct 16S rRNA Gene Sequence Retrieval.** Applied and environmental microbiology, p. 960–969, Mar. 1998.
- GUERRA, N.M.M.; OTENIO, M.H.; SILVA, M.E.Z.; GUILHERMETTI, M.; NAKAMURA, C.V.; NAKAMURA, T.U.; DIAS FILHO, B.P. **Ocorrência de Pseudomonas aeruginosa em água potável.** Acta Sci. Biol. Sci., v.28, n.1, p.13-18, 2006.
- GUILHERME, E.F.M.; SILVA, J.A.M. **Pseudomonas aeruginosa como indicador de contaminação hídrica,** Rev. Hig. Alim. v.14, n.76, p.43-47, 2000.

- HAGEDORN, C.; ROBINSON, S.L.; FILTZ, J.R.; GRUBBS, S.M.; ANGIER, T.A.; RENEAU, R.B.JR. **Determining sources of fecal pollution in a rural Virginia watershed with antibiotic resistance patterns in fecal streptococci.** Appl Environ Microbiol 65:5522–5531;1999.
- HAGLER, A. N. & MENDONÇA-HAGLER, L.C. **Microbiologia sanitária.** In ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L.R.; AZEVEDO, J. L. Tratado de microbiologia, Manole. São Paulo, Brasil, 1988.
- HALLAM S.J., GIRGUIS, P.R., PRESTON C.M., RICHARDSON P.M., DELONG E.F. **Identification of Methyl Coenzyme M Reductase A (*mcrA*) Genes Associated with Methane Oxidizing Archaea.** Applied and environmental microbiology, p. 5483–5491, Sept., 2003.
- HARDINA, C.M.; FUJIOKA, R.S. **Soil: The environmental source of Escherichia coli and enterococci in Hawaii's streams.** Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal, v6, p.185–195, 1991.
- HARWOOD VJ, WIGGINS B, HAGEDORN C, ELLENDER RD, GOOCH J, KERN J, SAMADPOURM, CHAPMAN ACH, ROBINSON BJ. **Phenotypic library-based microbial source tracking methods: Efficacy in the California collaborative study.** J Water Health. 2003.
- HARWOOD, V.J.; BROWNELL, M.; WANG, S. **Validation and field testing of library-independent microbial source tracking methods in the Gulf of Mexico.** Water Res. 43:4812–4819;2009.
- HARWOOD, V.J.; BUTLER, J.; PARRISH, D.; WAGNER, V. **Isolation of fecal coliform bacteria from the diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin centrata*).** Applied and Environmental Microbiology 65: 865-867;1999
- HARWOOD, V.J.; WHITLOCK, J.; WITHINGTON, V. **Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis: use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters.** Appl Environ Microbiol 66: 3698–3704;2000.
- HAZEN, T.C.; TORANZOS, G.A.; **Tropical source water: in McFeters GA.** Water Microbiology, p. 32-53, 1990.
- HEALTH AND WELFARE CANADA. **Guidelines for Recreational Water Quality.** National Health and Welfare. Ottawa, Canada, 1992.

- HEID, C.A., S., J., LIVAK, K.J., WILLIAMS, P.M. **Real time quantitative PCR.** Genome Research 6, 986-994. 1996.
- HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., WATSON, R. **Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.** Biotechnology Nature Publishing Company 11, 1026-1030. 1993.
- HOLLAND, P. M., ABRAMSON, R. D., WATSON, R. E GELFAND, D. H. **Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88, 7276-7280. 1991.
- HOODA, P.S.; EDWARDS, A.C.; **A review of water quality concerns in livestock farming areas.** The Science of the Total Environment 250: 143-167;2000.
- HRUDEY, S. E., PAYMENT, P., HUCK, P. M., GILLHAM, R. W. & HRUDEY, E. J. **A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world.** Water Sci. Technol. 47(3), 7–14. 2003
- HUBER, H., HOHN, M. J., RACHEL, R., FUCHS, R. R., T, WIMMER, V. C. & STETTER, K. O. 2002. **A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont.** Nature, 417: 63-67.  
<http://dx.doi.org/10.1038/417063a>
- HUTCHISON, M. L., WALTERS, L. D., AVERY, S. M., MUNRO, F. & MOORE, A. **Analyses of livestock production, waste storage, and pathogen levels and prevalences in farm manures.** Appl. Environ. Microbiol. 71(3), 1231–1236. 2005
- INEA – Instituto Nacional do Ambiente. **Boletim de Balneabilidade por município.** Disponível em:  
<http://www.inea.rj.gov.br/Portal/MegaDropDown/Monitoramento/Qualidadedaagua/Praias/BalneabilidadeporMunicipio/CasimirodeAbreu/index.htm&lang=#/%C3%9AltimoBoletimDivulgado>. Acessado em 09 de Janeiro de 2015

- ISOBE, K.O.; TARAO, M.; ZAKARIA, M.P.; CHIEM, N.H.; MINH LE, Y.; TAKADA, H.  
**Quantitative application of fecal sterols using gas chromatography–  
mass spectrometry to investigate fecal pollution in tropical waters:  
western Malaysia and Mekong Delta, Vietnam.** Environ. Sci. Technol. 36  
(21), 4497–4507;2002.
- IVAMA, A. M.; MELCHIOR, S. C. **Vigilância Sanitária: instrumento de promoção  
e proteção da saúde.** Bases da Saúde Coletiva. 2 ed. Londrina: EDUEL;  
ABRASCO, 2007.
- JIANG SC, CHU W, OLSON BH, HE JW, CHOI S, ZHANG J, LE JY, GEDALANGA  
PB. **Microbial source tracking in a small southern California urban  
watershed indicates wild animals and growth as the source of fecal  
bacteria.** Appl Microbiol Biotechnol. 2007.
- JOHNSTON, C., UFNAR, J.A., GRIFFITH, J.F., GOOCH, J.A., STEWART, J.R.,  
**A real-time qPCR assay for the detection of the nifH gene of  
Methanobrevibacter smithii, a potential indicator of sewage pollution,  
Journal of Applied Microbiology**, N. 109, p.1946-1956, 2010.
- KHATIB, L. A., Y. L. TSAI, AND B. H. OLSON. **A biomarker for the identification of  
cattle fecal pollution in water using the LTIIa toxin gene from  
enterotoxigenic Escherichia coli.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 59:97–104,  
2002.
- KILDARE BJ, LEUTENEGGER CM, MCSWAIN BS, BAMBIC DG, RAJAL VB,  
WUERTZ S. **16S rRNA-based assays for quantitative detection of  
universal, human-, cow-, and dog-specific fecal Bacteroidales: a  
Bayesian approach.** Water Res. 2007.
- KÖNIG, H. **Chemical composition of cell envelopes of methanogenic bacteria  
isolated from human and animal feces.** Syst Appl Microbiol 8, 159±162;  
1986.
- KÖNNEKE, M., BERNHARD, A. E., DE LA TORRE, J. R., WALKER, C. B.,  
WATERBURY, J. B. & STAHL, D. A. 2005. **Isolation of an autotrophic  
ammonia-oxidizing marine archaeon.** Nature, 437: 543-546.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nature03911>

- KONZEN, E.A. **Manejo e utilização dos dejetos de suínos**. Concórdia: EMBRAPA/CNPISA, 1983, 36p. (EMBRAPA Suínos e Aves, Circular Técnica, 6).
- KREADER CA. **Persistence of PCR-detectable *Bacteroides distasonis* from human feces in river water**. Appl Environ Microbiol. 1998 Oct;64(10):4103-5.
- KRIEG, N. R. **Phylum XIV Bacteroidetes phyl. nov.** In: GOODFELLOW, M. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed. New York: Springer, 2010. p. 25-467.
- KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J.; **Target genes for virulences assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment**. FEMS Microbiol. Rev. V.24, p.107-117. 2000.
- LAI, M.C., LIN, C.C., YU, P.H., HUANG, Y.F. AND CHEN, S.C. **Methanocalculus chunghsingensis sp. Nov., isolated from an estuary and a marine fishpond in Taiwan**. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54, 183–18, 2004.
- LANDRIGAN, P.J. et al. **Principles for prevention of the toxic effects of metals**. In: NORDBERG, G.F. et al. (Ed.). 3.ed. Handbook on the toxicology of metals. San Diego, California: Elsevier, 2007. Cap.16, p.319-337.
- LAYTON, A., MCKAY, L., WILLIAMS, D., GARRETT, V., GENTRY, R., SAYLER, G. **Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water**. Appl Environ Microbiol 72:4214–4224, 2006.
- LEADBETTER J.R, CROSBY L.D, BREZNAK J.A. **"Methanobrevibacter filiformis sp. nov., A filamentous methanogen from termite hindguts"**. Archives of Microbiology 169 (4): 287–92. PMID 9531629. Retrieved 2013-08-07. 1996.
- LECLERC, H., MOSSEL, D.A.A., EDBERG, S.C.; STRUIJK, C.B. **Advances in the bacteriology of the Coliform Group: their suitability as markers of microbial water safety**. Annu Rev. Microbiol 55: 201–234.2001.
- LEE J.H., KUMAR S., LEE G.H., CHANG D.H., RHEE M.S., YOON M.H., KIM B.C. **Methanobrevibacter boviskoreani sp. nov., isolated from the rumen of Korean native cattle**. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2013
- LEE, C. S., LEE, J. **Evaluation of newgyrB-based real-time PCR system for the detection of *B. fragilis* as an indicator of human specific fecal contamination**. J Microbiol Methods 82:311–318, 2010.

- LEHMANN LE, HUNFELD KP, EMRICH T, HABERHAUSEN G, WISSING H, HOEFT A, STÜBER F. **A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples.** Med Microbiol Immunol. 2008
- LEIGH JA. **Nitrogen fixation in methanogens: the archaeal perspective.** Curr. Issues. Mol. Biol. 125-31, 2000.
- LESER, T. D., J. Z. AMENUVOR, T. K. JENSEN, R. H. LINDECORONA, M. BOYE, AND K. MOLLER. **Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited.** Appl. Environ. Microbiol. 68:673–690, 2001.
- LESER, T. D., R. H. LINDECORONA, T. K. JENSEN, B. B. JENSEN, AND K. MOLLER. **Changes in bacterial community structure in the colon of pigs fed different experimental diets and after infection with *Brachyspira hyodysenteriae*.** Appl. Environ. Microbiol. 66:3290–3296, 2000.
- LONG, S. C. & SOBSEY, M. D. **A comparison of the survival of FpRNA and FpDNA coliphages in Lake Water Microcosms.** J. Water Health. 2(1), 15–22, 2004.
- LÓPEZ-PILA, J.M., SZEWZYK, R. **Estimating the infection risk in recreational waters from the faecal indicator concentration and from the ratio between pathogens and indicators.** Wat. Res. v. 34(17), p.4195-4200, 2000.
- LU, J., SANTO DOMINGO, J., SHANKS, O.C. **Identification of chickenspecific fecal microbial sequences using a metagenomic approach.** Water Res 41:3561–3574, 2007.
- MACÊDO, J.S.B.de. **Águas e Águas.** São Paulo: Livraria Varela, 2001.
- MACÊDO, JORGE ANTÔNIO BARROS. **Métodos Laboratoriais de Análises Físico-Químicas e Microbiológicas.** 3ª ed., atual e rev. Belo Horizonte, 2005.
- MACIEL, A.A; GÓES, C.D.; CANCIO, J.A.; OLIVEIRA, M.L.; COSTA, S.S.; **Indicadores de Vigilância Ambiental em Saúde.** Informe Epidemiológico do SUS; 8(3):59-66. 1999.

- MACKAY, I. M., MACKAY, J.F., NISSEN, M.D., SLOOTS, T.P. **Real-time PCR: History and Fluorogenic** Chemistries in Mackay, p.1-40, I.M. (Ed.), Real-Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization. Caister Academic Press Norfolk, UK. 2007.
- MARCHEGGIANI, S., LACONELLI, M., D'ANGELO, A., PIERDOMINICI, E., LA ROSA, G., MUSCILLO, M., EQUESTRE, M., MANCINI, L., **Microbiological and 16S rRNA analysis of sulphite-reducing clostridia from river sediments in central Italy.** BMC Microbiol. 8: 171; 2008.
- MARTELLINI, A.; PAYMENT, P.; VILLEMUR, R. **Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water.** Water Res. 39 (4), 541–548;2005.
- MATOS, A.T.; **Tratamento de resíduos agroindustriais.** Fundação Estadual do Meio Ambiente. 2005.
- MCQUAIG, S.M., SCOTT, T.M., HARWOOD, V.J., FARRAH, S.R., LUKASIK, J.O. **Detection of human-derived fecal pollution in environmental waters by use of a PCR-based human polyomavirus assay.** Appl. Environ. Microbiol. 72, 7567–7574;2006.
- MELVILLE, F.; BURCHETT, M. **Genetic variation in Avicennia marinain three estuaries of Sydney (Australia) and implications for rehabilitation and management.** Marine Pollution Bulletin44, 469-479, 2002.
- METCALF & EDDY, **"Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, Reuse"**. 3 rd ed.,. Mc Graw - Hill Book Company .New York, 1994.
- MIESZKIN S, FURET JP, CORTHIER G, GOURMELON M. **Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two pig-specific Bacteroidales 16S rRNA genetic markers.** Appl Environ Microbiol. 2009.
- MIESZKIN S, YALA JF, JOUBREL R, GOURMELON M. **Phylogenetic analysis of Bacteroidales 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR.** J Appl Microbiol. 2010.



- MILLER, T.L.; LIN, C. **Description of Methanobrevibacter gottschalkii sp. nov., Methanobrevibacter thaueri sp. nov., Methanobrevibacter woesei sp. nov. and Methanobrevibacter wolinii sp. nov.** Int J Syst Evol Microbiol. 2002.
- MILLER, T.L.; WOLIN, M.J.; KUSEL, E. **Isolation and characterization of methanogens from animal feces.** Syst Appl Microbiol 8, 234±238;1986.
- MOORE, D.F.; HARWOOD, V.J.; FERGUSON, D.M.; LUKASIK, J.; HANNAH, P.; GETRICH, M.; BROWNELL, M. **Evaluation of antibiotic resistance analysis and ribotyping for identification of faecal pollution sources in an urban watershed.** J Appl Microbiol 99: 618–628; 2005.
- MORAIS, L. L. C. S., JESUS, I. M., SANTOS, E. C. O., VALE, E. R., LOUREIRO, E. C. B., SÁ E. V. **Qualidade microbiológica da água para consumo humano em duas áreas contempladas com intervenções de saneamento.** Epidemiologia e Serviços de Saúde. Vol. 14 - Nº 3, 2005.
- MOROZUMI M, NAKAYAMA E, IWATA S, AOKI Y, HASEGAWA K, KOBAYASHI R, CHIBA N, TAJIMA T, UBUKATA K. **Simultaneous detection of pathogens in clinical samples from patients with community-acquired pneumonia by real-time PCR with pathogen-specific molecular beacon probes.** J Clin Microbiol. 2006
- MOURA, C.L. **Distribuição de Metais Pesados (Cr, Cu, Ni e Zn) em Sedimentos de Fundo do Rio Embu-Mirim-SP.** Dissertação de Mestrado. USP, São Paulo. 2002.
- MOUSSA SH, MASSENGALE RD. **Identification of the sources of Escherichia coli in a watershed using carbon-utilization patterns and composite data sets.** J Water Health, 2008.
- NELSON M, JONES SH, EDWARDS C, ELLIS JC. **Characterization of Escherichia coli populations from gulls, landfill trash, and wastewater using ribotyping.** Dis Aquat Organ, 2008.
- NOGUEIRA, J.M.R.; MIGUEL, L.F.S.; **Bacteriologia.** Escola Nacional de Saúde Pública – ENSP. 2005
- NOVAIS, C.M., PIRES-ALVES, M. **Uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR).** Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento. Edição nº 13, 4 pp. 2004.

- O'CONNOR, D. J. **The temporal and spatial distribution of dissolved oxygen in streams.** Water Resources. v.3, n.65-79, 1967.
- OGRAM, A., G. S. SAYLER, AND T. BARKAY. **The extraction and purification of microbial DNA from sediments.** J. Microbiol. Methods 7:57–66; 1987.
- OKABE, S. & SHIMAZU, Y. **Persistence of host-specific Bacteroides-Prevotella 16S rRNA genetic markers in environmental waters: effects of temperature and salinity.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 76(4), 935-44. 2007
- OKABE, S., OKAYAMA, N., SAVICHTCHEVA, O., ITO, T. **Identification and quantification of host-specific Bacteroides-Prevotella 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwaters.** Appl Microbiol Biotechnol 74:890–901, 2007.
- OLIVEIRA, A.R.R. **Quantificação de DNA nuclear e DNA mitocondrial por PCR em tempo real.** Dissertação de mestrado, Universidade de Lisboa – Faculdade de Ciências. Lisboa, 131 pp. 2009.
- PARVEEN, S.; PORTIER, K.M.; ROBINSON, K.; EDMISTON, L.; TAMPLIN, M.L. **Discriminant analysis of ribotype profiles of Escherichia coli for differentiating human and non human sources of fecal pollution.** Appl Environ Microbiol 65: 3142–3147, 1999.
- PELT-VERKUIL, E.; VAN BELKUM, A.; HAYS, J.P. **Principles and technical aspects of PCR amplification,** Springer, 332 pp. 2008.
- PENG, X.; ZHANG, G.; MAI, B.; HU, J.; LI, K.; WANG, Z. **Tracing anthropogenic contamination in the Pearl River estuarine and marine environment of South China Sea using sterols and other organic molecular markers.** Mar. Pollut. Bull. 50 (8), 856–865;2005.
- PEREIRA & GOMES. **Biologia Marinha.** Ed. Interciência, Rio de Janeiro, 2002, 5p.
- PEREIRA, R.S. **Identificação e caracterização das fontes de poluição em sistemas hídricos.** Revista Eletrônica de Recursos Hídricos, UFRGS, v.1, n.1, p.20-36, 2004.
- PESTER, M., SCHLEPER, C. & WAGNER, M. **The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology.** Current Opinion in Microbiology., 14:1-7, 2011

- PHILIP, D.A.T., ANTOINE, P., COOPER, V., FRANCIS, L., MANGAL, E., SEEPERSAD, N., RAGOO, R., RAMSARAN, S. **Impact of recreation on recreational water quality of a small tropical stream.** J Environ Monit 11, 1192–1198. 2009.
- PIVELI, R.P.; **Qualidade das águas e poluição: aspectos físico-químicos.** USP, 2010.
- POVINELLI, J. **Ação dos metais pesados nos processos biológicos de tratamento de águas residuárias.** Tese (Livre Docência em Engenharia/Hidráulica e Saneamento) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 1987.
- PRESTON, C. M., WU, K. Y., MOLNSKI, T. F. & DELONG, E. F. 1996. **A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov. sp. nov.** Proc. Natl. Acad. Sci., 93: 6241-6246.
- PRICE B, VENSO E, FRANA M, GREENBERG J, WARE A. **A comparison of ARA and DNA data for microbial source tracking based on source-classification models using classification trees.** Wat Res. 2007.
- PRIETO, M.D.; LOPEZ, B.; JUANES, J.A.; REVILLA, J.A.; LLORCA, J.; DELGADO RODRIGUEZ, M. **Recreation in coastal waters: health risks associated with bathing in sea water.** J Epidemiology Community Health 55:442–447;2001
- PROGRAMA DAS NAÇÕES UNIDAS PARA O DESENVOLVIMENTO (PNUD). **Relatório do Desenvolvimento Humano. A água para lá da escassez: poder, pobreza e a crise mundial da água.** New York, 10017, USA. 1101p; 2006.
- RECHE, M. H. L. R., PITTOL, M., FIUZA, L. M. **Bactérias e bioindicadores de qualidade de águas de ecossistemas orizícolas da região sul do Brasil.** Oecol. Aust. v.14, n.2, p.452-463, 2010
- REISCHER GH, KASPER DC, STEINBORN R, FARNLEITNER AH, MACH RL. **A quantitative real-time PCR assay for the highly sensitive and specific detection of human faecal influence in spring water from a large alpine catchment area.** Lett Appl Microbiol. 2007.

- REISCHER GH, KASPER DC, STEINBORN R, MACH RL, FARNLEITNER AH. **Quantitative PCR method for sensitive detection of ruminant fecal pollution in freshwater and evaluation of this method in alpine karstic regions.** Appl Environ Microbiol. 2006.
- RHEINHEIMER, D. S.; GONÇALVES, C. S.; PELLEGRINI, J. B. R. **Impacto das atividades agropecuárias na qualidade da água.** Ciência & Ambiente, n. 27, p 85-96, 2003.
- RIBEIRO, M.C.S. e BERTOLOZZI, M.R. **A questão ambiental como objeto de atuação da vigilância sanitária: uma análise da inserção das enfermeiras nesse campo.** Rev. Latino-Am. Enfermagem [online], vol.12, n.5, pp. 736-744. ISSN 0104-1169. 2004.
- RIBEIRO, M.V.; JUNGES, F.; **Vigilância Sanitária.** UNB, 2010.
- RIVIERE, J. E. (2006). **Biological Concepts and Techniques in Toxicology.** (1<sup>a</sup> ed) Nova Iorque: Taylor & Francis.
- ROSARIO K, SYMONDS EM, SINIGALLIANO C, STEWART J, BREITBART M. **Pepper mild mottle virus as an indicator of fecal pollution.** Appl Environ Microbiol. 2009 Nov;75(22):7261-7.
- ROSLEV, P., BUKH, A.S., **State of the art molecular markers for fecal pollution**
- SALGADO, M.J.M., **Influência dos Metais Pesados nas Águas Interiores.**  
Trabalho da Disciplina Hidrobiologia II, Faculdade de Saúde Pública da USP, 1980.
- SALLOTO, G.R.B.; PINTO, L.H.; LIMA, J.L.; VIEIRA, R.P.; CARDOSO, A.M.; MARTINS, O.B.; CLEMENTINO, M.M.; **A biologia das arqueias halofílicas e seu potencial biotecnológico.** Brazilian Journal of Biosciences, Porto Alegre, v. 10, n. 2, p. 226-234, abr./jun. 2012
- SAMUEL BS, HANSEN EE, MANCHESTER JK, COUTINHO PM, HENRISSAT B, FULTON R LATREILLE P, KIM K, WILSON RK, GORDON JI. **Genomic and metabolic adaptations of Methanobrevibacter smithii to the human gut.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Jun 19;104(25):10643-8. Epub 2007 Jun 11.
- SANTAMARÍA J, TORANZOS G.A. **Enteric pathogens and soil: a short review.** Int. Microbiol. 2003 Mar;6(1):5-9.

- SANTO DOMINGO, J.W.; BAMBIC, D.G.; EDGE, T.A.; WUERTZ, S. **Quo vadis source tracking? Towards a strategic framework for environmental monitoring of fecal pollution.** *Wat Res.* v.41, p.3539-3552, 2007.
- SANTOS, M. A. S. P.; CARVALHO, J. V.; SILVA, M. A. B.; SORRINI, E. **Qualidade da Água: estudo de casos, Sistema Rio Grande X Sistema Rio Claro.** In: XIII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS HÍDRICOS, 13, 1999, Belo Horizonte. Anais. Belo Horizonte: ABRH, 1999.
- SANTOS, S.G.; SERUFO, J.G.; SILVA, R.A.P.; MARRA, B.A.; REIS, C.M.F.; HAMDAN, J.S.; NICOLI, J.R.; CARVALHO, M.A.R.; FARIAS, L.M. **Microbiologic profile of intra-abdominal infection sat Belo Horizonte, Brazil.** *Am. J. Infect. Control.* v.31 (3), p.135-143, 2003.
- SANTOS, S.O., **Contaminação por cromo.** Disponível em: <http://orlandosantosedasilva.blogspot.com.br/2011/04/contaminacao-por-cromo.html>, acessado em 10/07/14.
- SÃO PAULO, (Estado). Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Ciclo das águas.** Disponível em: <[www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/ciclo.asp](http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/ciclo.asp)>. Acesso em 10 abr. 2014.
- SAVAZZI, E.A. **Determinação da presença de Bário, Chumbo e Crômio em amostras de água subterrânea coletadas no Aqüífero Bauru.** 87f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.
- SAVICHTCHEVA, O.; OKABE, S. **Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives.** *Water Res.* 40 (13), 2463–2476; 2006.
- SAVICHTCHEVA, O.; OKAYAMA, N.; ITO, T.; OKABE, S.; **Application of a direct fluorescence-based live/dead staining combined with fluorescence in situ hybridization for assessment of survival rate of Bacteroides spp. In drinking water,** *Biotechnol. Bioeng.* 92 (2007) 356–363.

- SCANLON KA, CAGNEY C, WALSH D, MCNULTY D, CARROLL A, MCNAMARA EB, MCDOWELL DA, DUFFY G. **Occurrence and characteristics of fastidious Campylobacteraceae species in porcine samples.** Int J Food Microbiol. 2013
- SCHMIDT, G.A.; LEGRANDE, A.N.; HOFFMANN, G.; **Water isotope expressions of intrinsic and forced variability in a coupled ocean-atmosphere model.** J. Geophys. Res.; 2007.
- SCHMIEGELOW, J. M. M. **O Planeta Azul.** Uma Introdução às Ciências Marinhas. Ed. Interciência. Rio de Janeiro, 2004.
- SCHONNING, C., LEEMING, R., STENSTROM, T.A. **Faecal contamination of source-separated human urine based on the content of faecal sterols.** Water Res. 36 (8), 1965–1972;2002.
- SCHRIEWER, A.; MILLER, W.A.; BYRNE, B.A.; MILLER, M.A.; OATES, S.; CONRAD, P.A.; HARDIN, D.; YANG, H.H.; CHOUICHA, N.; MELLI, A.; JESSUP, D.; DOMINIK, C.; WUERTZ, S. **Presence of Bacteroidales as a predictor of pathogens in surface waters of the central California coast.** Appl Environ Microbiol. 2010.
- SCOTT TM, ROSE JB, JENKINS TM, FARRAH SR, LUHASIK J. **Microbial source tracking: current methodology and future directions.** Appl Environ Microbiol 68:5796-803, 2002.
- SEA - Secretaria de Estado do Ambiente - **Pacto pelo Saneamento: Meta é duplicar tratamento de esgoto e erradicar lixões no estado até 2014, com a implantação de aterros sanitários.** Disponível em:  
<http://www.rj.gov.br/web/sea/exibeconteudo?article-id=330838>. Acessado em: 07 de Janeiro de 2015.
- SEGANFREDO, M.A. **A questão ambiental na utilização de dejetos de suínos como fertilizante do solo.** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, Circular Técnica 22, 37p., 2000.
- SEMADS - Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. **Bacias hidrográficas e recursos hídricos da macroregião 2 – bacia da Baía de Sepetiba.** Rio de Janeiro, 2001. 79p. (Projeto PLANÁGUA SEMADS/GTZ).

- SEURINCK S, DEFOIRDT T, VERSTRAETE W, SICILIANO SD. **Detection and quantification of the human-specific HF183 Bacteroides 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater.** Environ Microbiol. 2005 Feb;7(2):249-59. PubMed PMID: 15658992.
- SEURINCK, S., VERSTRAETE, W., SICILIANO, S. **Microbial source tracking for identification of fecal pollution.** Rev Environ Sci Biotechnol 4:19–37, 2005b.
- SHANKS, O. C., J. W. SANTO DOMINGO, R. LAMENDELLA, C. A. KELTY, AND J. E. GRAHAM. **Competitive metagenomic DNA hybridization identifies host-specific microbial genetic markers in cow fecal samples.** Appl. Environ. Microbiol. 72:4054–4060, 2008.
- SHANKS, O.C., KELTY, C.A., SIVAGANESAN, M., VARMA, M., HAUGLAND, R. A. **Quantitative PCR for genetic markers of human fecal pollution.** Appl Environ Microbiol 75:5507–5513, 2009.
- SHUVAL, H., **Estimating the global burden of thalassogenic diseases: human infectrious diseases caused by wastewater pollution of the marine environment.** J Water Health 1:53–64, 2003.
- SIEGRIST TJ, ANDERSON PD, HUEN WH, KLEINHEINZ GT, MCDERMOTT CM, SANDRIN TR. **Discrimination and characterization of environmental strains of Escherichia coli by matrixassisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS).** J Microbiological Methods, 2007.
- SILVA, M. D.; MATTOS, M. L. T. **Microbiological quality of water for human consumption in the hydrographical microbasin of Arroio Passo do Pilão.** In: Congresso Brasileiro de microbiologia, 21, 2001, Foz do Iguaçu. Resumos... Foz do Iguaçu, 2001. p 42.
- SILVA, M. O. S. **Análises físicos químicas para controle de estações tratamento de esgotos.** 1990.
- SIMPSON, J.M.; SANTO DOMINGO, J.W.; REASONER, D.J.; **Microbial Source Tracking: State of the Science.** Environ. Sci. Technol. 36: 5279-5288;2002.
- SONDOTÉCNICA ENGENHARIA DE SOLOS S.A. **Plano estratégico de recursos hídricos das bacias hidrográficas dos Rios Guandu, da Guarda e Guandu-Mirim: relatório gerencial.** Brasília, DF: ANA, 2007.

- SOS Mata Atlântica. **Qualidade da água é ruim ou péssima em 40% dos rios analisados pela Fundação** – Disponível em:  
<http://www.sosma.org.br/17354/qualidade-da-agua-e-ruim-ou-pessima-em-40-dos-rios-analisados-pela-fundacao/#sthash.MzpbBkCr.dpuf> Acessado em 22/12/2014
- SOUZA, D.A. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de multiresíduos de pesticidas em águas de abastecimento**. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.
- SOUZA, J. S.; STEIN, A. T. **Vigilância sanitária de uma cidade metropolitana do Sul do Brasil: Implantação da gestão plena e efetividade das ações**. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 13, p. 1-25, 2007.
- SOUZA, V.; ROCHA, M.; VALERA, A.; EGUIARTE, L.E. **Genetic structure of natural populations of Escherichia coli in wild hosts on different continents**. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 3373-3385; 1999.
- SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 2.ed. Belo Horizonte: DESA, 1996. 243p.
- SPERLING, M. V. **Noções de qualidade das águas. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 2. ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental - UFMG, v. 1. cap. 1, p. 11-50; 1996.
- STALEY, C.M., RECHKHOW, K.H., LUKASIK, J. AND HARWOOD, V.J. (2012) **Assessment of sources of human pathogens and fecal contamination in a Florida freshwater lake**. *Water Res*46, 5799–5812.
- STEWART, J.R., SANTO DOMINGO, J.W., WADE, T.J. **Fecal pollution, public health, and microbial source tracking**. In: Santo Domingo JW, Sadowsky MJ (eds) *Microbial source tracking*. ASM Press, USA, pp 1–32, 2007.
- STOECKEL, D. M., AND HARWOOD, V. J. **Performance, design, and analysis in microbial source tracking studies**. *Appl Environ Microbiol* 73(8), 2405–15. 2007
- STUART, D.G. **Comparative survival of indicator bacteria and enteric pathogens in well water**. *Appl. Microbiol.* v.27, n.5, p.823-829, 1974.



- TALLON, P.; MAGAJNA, B.; LOFRANCO, C.; LEUNG, K.T.; **Microbial indicators of faecal contamination in water: a current perspective.** Water Air Soil Pollut 166: 139–166. 2005.
- THERON J, CLOETE TE. **Emerging waterborne infections: contributing factors, agents, and detection tools.** Crit Rev Microbiol. 2002
- THORNTON, I. **Metals in the Global Environment: Facts and Misconceptions.** International Council on Metals and the Environment. Ottawa, Canada, 1995. 116 p.
- UE - UNIÃO EUROPÉIA. **Diretiva 2006/7/CE: Pollution, public health: quality of bathing water.** Disponível: [www.europarl.europa.eu/oeil/file.jsp?id=226822](http://www.europarl.europa.eu/oeil/file.jsp?id=226822).
- UFNAR JA, WANG SY, CHRISTIANSEN JM, YAMPARA-IQUISE H, CARSON CA, ELLENDER RD. **Detection of the nifH gene of Methanobrevibacter smithii: a potential tool to identify sewage pollution in recreational waters.** J Appl Microbiol. 2006 Jul;101(1):44-52.
- UFNAR, J. A., UFNAR, D. F., WANG, S. Y., ELLENDER, R. D., **Development of a Swine-Specific Fecal Pollution Marker Based on Host Differences in Methanogen mcrA Genes.** Applied and environmental microbiology, p. 5209–5217, Aug. 2007a.
- UFNAR, J. A., UFNAR, D. F., WANG, S. Y., ELLENDER, R. D., **Methanobrevibacter ruminantium as an Indicator of Domesticated-Ruminant Fecal Pollution in Surface Waters.** Applied and environmental microbiology, p. 5209–5217, Nov. 2007b.
- USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY **Microbial source tracking guide document. EPA/600/R-05/064;** U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development: Cincinnati, OH, 2005.
- VASCONCELOS, U.; MEDEIROS, L.V.; ANDRADE, M.A.G. de; CALAZANS, G.M.T. **Evidência do antagonismo entre *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias indicadoras de contaminação fecal em água,** Rev. Hig. Alim. v.20, n.140, p.127-130, 2006.
- VICTORINO, C.J.A. **Planeta água morrendo de sede: uma visão analítica na metodologia do uso e abuso dos recursos hídricos.** – Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

- VINATEA ARANA, L. **Princípios químicos da qualidade da água em aquicultura**. Florianópolis: Ed. da UFSC, 1997. 166p.
- VON SPERLING, M. V. **Princípio do tratamento biológico de águas residuárias. IN: Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 2005.
- WEIGHARDT, F. **Quantitative PCR for the detection of GMOs. In: The Analysis of food samples for the presence of genetically modified organisms**. Italy: WHO, 2004. p.10.1-10.19.
- WHO - World Health Organization. **Guidelines for drinking water quality: incorporating first addendum**. Vol. 1, Recommendations. – 3rd ed. Geneva: 2007.
- WHO - World Health Organization. **Guidelines for drinking water quality**. Volume 1. Recommendations. 3rd ed. World Health Organization. Geneva, 2004  
Disponível em [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/em/index.html](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/em/index.html).
- WHO - World Health Organization. **Edited by Lorna Fewtrell and Jamie Bartram**. London, UK, Published by IWA Publishing, 2001.
- YOUN-JOO A.N., KAMPBELL, D.H., BREIDENBACH, G.P. **Escherichia coli and total coliforms in water and sediments at marinas**. Environm. Poll. v.120, p.771-778, 2002.
- ZHENG G, YAMPARA-IQUISE H, JONES JE, ANDREW CARSON C. **Development of Faecalibacterium 16S rRNA gene marker for identification of human faeces**. J Appl Microbiol. 2009 Feb;106(2):634-41;2009.
- ZHENG, Y., KELLY, W. R., PANNO, S. V. & LIU, W. -T. **Identification of sources of fecal pollution of Karst Waters, Final Report for Midwest Technology Assistance Center**. University of Illinois, Illinois. 2013