

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

Gigliola Rhayd Boechat Sallôto

**AVALIAÇÃO METAGENÔMICA DA MICROBIOTA DO  
COMPLEXO LAGUNAR DE JACAREPAGUÁ E SEUS IMPACTOS  
NA SAÚDE PÚBLICA**

Rio de Janeiro

2012

**Gigliola Rhayd Boechat Sallôto**

PPGVS/INCQS  
FIOCRUZ  
2012

Gigliola Rhayd Boechat Sallôto

**AVALIAÇÃO METAGENÔMICA DA MICROBIOTA DO  
COMPLEXO LAGUNAR DE JACAREPAGUÁ E SEUS IMPACTOS  
NA SAÚDE PÚBLICA**

Dissertação 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

Orientadores:

Maysa B. Mandetta Clementino  
Ricardo Pilz Vieira

Rio de Janeiro  
2012

Gigliola Rhayd Boechat Sallôto

**AVALIAÇÃO METAGENÔMICA DA MICROBIOTA DO COMPLEXO  
LAGUNAR DE JACAREPAGUÁ E SEUS IMPACTOS NA SAÚDE PÚBLICA**

Dissertação 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 \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Ivano Rafaelle Victorio de Filippis Capasso (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Orlando Bonifácio Martins (Doutor)  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Alexander Machado Cardoso (Doutor)  
Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia

---

Antônio Eugênio Castro Cardoso de Almeida (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Janaina Japiassu de Vasconcelos Cavalcante (Doutora)  
Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia

Catologação na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em saúde

Biblioteca

Sallôto, Gigliola Rhayd Boechat

**Avaliação metagenômica da microbiota do complexo lagunar de Jacarepaguá e seus impactos na saúde pública** / Gigliola Rhayd Boechat Sallôto. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012.

124f.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2012. Orientador: Maysa B. Mandetta Clementino.

1.Lagoas de Jacarepaguá 2.Biodiversidade 3.Microrganismos 4.Metagenômica 5.Isolamento. I. Título.

*Dedico este trabalho a Deus, pois sem Ele, nada seria possível.*

*Aos meus pais, Dino e Arlinda, pelo amor, exemplo e dedicação, sem os quais não conseguiria chegar até aqui.*

*Ao meu marido Edivaldo e filhas, Chiara e Isli, pela compreensão nos momentos mais difíceis e pela abdicação do tempo em prol dos meus sonhos.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela benção da vida.

Aos meus pais, Dino e Arlinda, pela educação e amor incondicional.

Ao meu marido Edivaldo e filhas, Chiara e Isli, por me mostrarem que a felicidade existe e está muito próxima de nós.

A minha irmã, Gabriella, e cunhado, Erick, pelos exemplos diários de determinação.

A minha amiga Joyce por ter estado junto comigo nos momentos decisivos da minha vida acadêmica.

Ao Professor Dr Orlando B. Martins pela oportunidade de aprendizado.

Ao Professor Dr Ivano de Filippis pelo apoio e orientação sempre que solicitado.

Ao Professor Dr Antônio Eugênio pela constante motivação.

A todos os amigos do Laboratório de Biologia Molecular da UFRJ e do Laboratório de Microbiologia de Referência do INCQS, em especial, Carlos, Cátia e Ana Paula, por me ajudarem sem medir esforços.

Aos meus orientadores, Dr<sup>a</sup> Maysa Beatriz Mandetta Clementino e Dr Ricardo Pilz Vieira, pelo papel fundamental em minha vida acadêmica, pois são mestres no sentido literal que a denominação os confere. Exemplos de amor à profissão, que conduzem seus alunos com excelência, garra, força, motivação, inspiração e muito conhecimento. Agradeço pela oportunidade, orientação, compreensão, amizade, confiança e a todos os ensinamentos a mim transmitidos.

*Pois quem quer amar a vida e ver dias felizes refreie a língua do mal e evite que seus lábios falem dolosamente; aparte-se do mal pratique o que é bom, busque a paz e empenhe-se por alcançá-la.*

*Porque os olhos do Senhor repousam sobre os justos, e os seus ouvidos estão abertos às suas súplicas, mas o rosto do Senhor está contra aqueles que praticam os males.*

*2 Pedro:3, 10-12.*

## RESUMO

Lagoas urbanas costeiras são ambientes dinâmicos e poluídos, sendo altamente afetadas pela mistura de sedimentos, água do mar e de água doce continental. Apesar de uma série de estudos publicados sobre estuários de água doce e ambientes marinhos há pouco interesse nas lagoas urbanas impactadas nos trópicos. Neste estudo, realizamos uma abordagem polifásica, utilizando métodos microbiológicos como isolamento de bactérias e seus perfis de resistência aos antibióticos e moleculares como a DGGE-PCR e bibliotecas do gene *rrs* do 16S rRNA para comparar as comunidades microbianas do ecossistema lagunar de Jacarepaguá. Foram selecionados três ambientes distintos para o estudo: água límpida (maçico Pedra Branca), águas poluídas das lagoas e água marinha do Joá. O isolamento das culturas foi realizado em meios seletivos e as bibliotecas foram preparadas a partir do DNA genômico ambiental e do DNA proveniente do enriquecimento em BHI. Análises de DGGE mostraram perfis distintos tanto entre as bibliotecas ambientais e enriquecidas quanto entre os pontos de coleta de cada uma das abordagens. Um total de 497 sequências resultou em 245 unidades taxonômicas operacionais agrupadas a 97%. As análises comparativas demonstraram comunidades bacterianas significativamente diferentes entre as abordagens por meio do programa Unifrac. Este resultado também pode ser observado pelo diagrama de Venn, no entanto, vale ressaltar que uma OTU, correspondente ao *Vibrio cholerae*, foi compartilhada entre as três abordagens. Bactérias potencialmente patogênicas foram isoladas nos três ambientes estudados e 50% delas apresentaram resistência a pelo menos uma das classes de antibióticos analisadas. Nossos resultados permitem concluir que ambientes com diferentes parâmetros físico-químicos possuem comunidades microbianas distintas. A detecção de organismos resistentes nas águas límpida e poluídas demonstram a presença de mecanismos de resistência intrínseca e adquirida pelos microrganismos dependendo da pressão seletiva. A análise metagenômica com e sem enriquecimento demonstrou a eficiência do modelo proposto na avaliação da diversidade bacteriana no ecossistema aquático de Jacarepaguá. Nossos dados podem fornecer um indicador complementar na avaliação da qualidade da água e dos riscos à saúde humana, colaborando para o aprimoramento dos serviços de vigilância ambiental e epidemiológica dos recursos hídricos.

## ABSTRACT

Urban coastal lagoons are polluted and dynamic environments that highly affected by the mixing of sediment, seawater and continental freshwater. In spite of a number of published studies of estuaries, freshwater and marine environments few concerned impacted urban lagoons in the tropics. We performed a polyphasic approach using microbiological methods as bacteria isolation and their antibiotic resistance profiles and molecular techniques such as PCR-DGGE and *rrs* gene of the 16S rRNA libraries to compare the bacterioplankton communities from the Jacarepaguá lagoon ecosystem. We selected three different environments for the study: freshwater (Pedra Branca), polluted waters of the lagoons and Joa's seawater. The culture isolation was performed on selective medium and libraries were prepared from the genomic DNA environment and DNA from the enrichment in BHI. DGGE analysis showed distinct community profiles between each BHI culture and their environmental counterparts indicating that culturing leads to shifts in community composition. A total of 497 bacterial sequences were analyzed by MOTHUR, yielding 245 operational taxonomic units (OTUs) grouped at 97% stringency. UniFrac metrics and Venn diagrams showed that bacterial communities covered by each experimental approach were significantly different and that only one OTU was shared between them, corresponding to *Vibrio cholera*. Potentially pathogenic bacteria were isolates from most of the sampled environments and 50% of them showed antibiotic resistance. Our results suggest that environments with physical and chemical parameters have different microbial communities. The detection of resistant organisms in polluted waters clearly demonstrates the presence of intrinsic resistant mechanisms acquired by the microorganisms depending on the selective pressure. Metagenomic analyses, with or without enrichment, demonstrated the efficiency model for the evaluation of bacteria diversity in Jacarepaguá aquatic ecosystem. Our data may contribute to the improvement of environmental services and epidemiological surveillance of waters resources.

Key-words: Jacarepagua Lagoons. Public Health. Metagenomic. Cultivable.

## LISTA DE SIGLAS

CG	Circle Grow
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
DO	Oxigênio dissolvido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FEEMA	Fundação Nacional de Engenharia do Meio Ambiente
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
IPTG	Isopropílico $\beta$ -D-1 thiogalactopiranosídeo
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
OTU	Unidade Taxonômica Operacional
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
rRNA	Ácido Ribonucléico Ribossomal
SOC	Super Optimal Broth Catabolite
TBE	Tampão tris/borato/EDTA
VIGISUS	Vigilância em Saúde do Sistema Único de Saúde
X-GAL	Bromo-indolil galactopiranosídeo cloro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1. QUALIDADE DA ÁGUA E SANEAMENTO BÁSICO.....	11
1.2. LAGOAS COSTEIRAS .....	12
1.3. LAGOAS COSTEIRAS NO BRASIL .....	14
1.4. BAIXADA DE JACAREPAGUÁ .....	14
1.5. MICRORGANISMOS E OS ECOSSISTEMAS AQUÁTICOS.....	17
1.6. PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS .....	18
1.7. SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS .....	19
1.8. METAGENÔMICA .....	21
1.9. RELAÇÃO COMA VIGILÂNCIA SANITÁRIA.....	22
1.10. SANEAMENTO BÁSICO E A SAÚDE PÚBLICA.....	24
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	26
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>27</b>
3.1. AMBIENTE SELECIONADO PARA O ESTUDO.....	27
3.1.1. Pontos de coleta .....	28
3.1.2. Localização dos pontos de coleta.....	28
3.2. FLUXOGRAMA .....	29
3.3. COLETA DAS AMOSTRAS .....	30
3.3.1. Dosagem dos parâmetros físicos e químicos .....	30
3.3.2. Filtração e Preservação das amostras .....	30
3.4. EXTRAÇÃO DE DNA AMBIENTAL.....	30
3.5. MEIO DE CULTURA ENRIQUECIDO (MCE) .....	31
3.6. DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS - DGGE.....	31
3.7. BIBLIOTECA DO GENE <i>rrs</i> DO 16S rRNA.....	31
3.8. SEQUENCIAMENTO DOS CLONES.....	35
3.8.1. Preparo das amostras para sequenciamento.....	35
3.8.2. Purificação e precipitação da reação de sequenciamento .....	35
3.9. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS E CONSTRUÇÃO DE ÁRVORES FILOGENÉTICAS.....	36
3.10. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA .....	38

3.11. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS .....	39
3.11.1. Identificação Bioquímica (pelo Vitek2) .....	39
3.12. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS .....	39
3.13. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR .....	40
3.14. PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS .....	42
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
4.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS .....	43
4.2. DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS - DGGE .....	44
4.3. COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA BACTERIANA .....	45
4.4. ANÁLISE FILOGENÉTICA .....	46
4.5. ANÁLISE FENOTÍPICA.....	51
4.5.1. Identificação dos isolados.....	51
4.5.2. Susceptibilidade aos antimicrobianos .....	53
4.7. COMPARAÇÃO ENTRE AS COMUNIDADES BACTERIANAS .....	54
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>61</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>
<b>APÊNDICE A - REAGENTES E MEIOS DE CULTURA .....</b>	<b>78</b>
<b>APÊNDICE B - MÉTODO DE GRAM. ....</b>	<b>79</b>
<b>APÊNDICE C - MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>APÊNDICE D - PREPARO DE GÉIS E TAMPÕES .....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO A - CAPÍTULO DE LIVRO - Water Pollution - Metagenomic in Polluted Aquatic Environments.....</b>	<b>82</b>
<b>ANEXO B - MANUSCRITO 1 - O Potencial Biotecnológico das Archaeas de Ambientes Salinos. ....</b>	<b>99</b>
<b>ANEXO C - MANUSCRITO 2 - (Submetido) Impacts on water resoucers in the Rio+20 meeting place revealed by polyphasic approach.....</b>	<b>108</b>

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1. QUALIDADE DA ÁGUA E SANEAMENTO BÁSICO**

Três quartos do planeta Terra são constituídos por água. No entanto, a exploração irracional da água doce e a poluição de outros mananciais, como rios e lagoas, limitam em 1% da água que realmente pode ser usada pelo homem. Assim, a água está emergindo como um dos mais críticos problemas de recursos naturais que a humanidade enfrenta, sendo um bem escasso vulnerável às pressões antropogênicas (KOSEK et al, 2003). Apesar de ser geralmente reconhecida a importância de manter pura a água que deverá ser utilizada pelas comunidades humanas, na prática ocorrem descargas de efluentes (industriais, urbanas, domésticas) potencialmente causadores de poluição diretamente nos cursos de água e nos lagos e lagoas. Os dois aspectos mais frequentemente considerados quando existem problemas de qualidade da água são a eutroficação e a poluição. Com isso, a ocupação humana nas bacias hidrográficas de forma cada vez mais desordenada, gerando a impermeabilização dos solos, lançamento de esgotos industriais e domésticos nos rios e lagos, tem promovido uma deterioração da qualidade das águas naturais, com riscos de propagação de doenças de veiculação hídrica ao próprio ser humano (BORGES, 1999).

Na primeira metade do século XX, houve grande enfoque em relação à poluição hídrica, envolvendo parâmetros físico-químicos que permitissem a avaliação das cargas orgânicas domésticas e industriais pontuais. O reconhecimento da contribuição das fontes difusas para os problemas de qualidade hídrica e o entendimento a respeito das interações entre os fatores físico-químicos e biológicos e seus condicionantes sobre a qualidade hídrica, conduziram países que já apresentavam sistemas de gestão hídrica, a adotar uma visão mais holística da poluição que incluísse, nos critérios de avaliação da qualidade hídrica, parâmetros biológicos e hidromorfológicos aos já tradicionais critérios químicos e microbiológicos (PIZELLA; SOUZA, 2007)

O Brasil é um país dotado de grande diversidade climática, geomorfológica e biológica, apresentando uma ampla rede hidrográfica que responde por 53% da produção de águas doces do continente sul-americano e 12% do total mundial (REBOUÇAS, 1997), cuja distribuição se dá por meio das três grandes unidades hidrográficas do Amazonas, São Francisco e Paraná, que concentram cerca de 80% da produção hídrica do país. As unidades hidrográficas subdividem-se em 12 regiões hidrográficas com variações espaciais e temporais de distribuição hídrica distintas. Especificamente em relação aos recursos hídricos, as desigualdades de desenvolvimento

econômico regionais, com diferentes graus de ocupação e intensificação das atividades produtivas, resultam em situações de estresse hídrico e ambiental.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que quatro bilhões de casos de diarreia por ano, entre outras doenças, estão associados à falta de acesso à água potável (KOSEK et al., 2003) e fatos históricos demonstram que algumas das maiores pandemias que já infligiram às populações humanas, com exceção da peste bubônica, tiveram sua origem em sistemas de distribuição de água (BRANCO, 1999). Com a escassez de relatos, a verdadeira dimensão das doenças transmitidas pela água ainda é pouco conhecida. Como consequência, a proteção da contaminação fecal é um das mais importantes e difíceis desafios para resguardar as águas usadas para abastecimento e recreação. A monitorização dos recursos hídricos é essencial como forma de controle da saúde ambiental dos ecossistemas. Ao desafio ambiental acresce a necessidade de garantia da saúde pública.

O saneamento básico é definido pela OMS como “o controle de todos os fatores do meio físico do homem, que exercem ou podem exercer efeitos deletérios sobre o seu bem-estar físico, mental ou social”, ou seja, sobre a saúde, tendo em vista que esta instituição a define a partir da agregação desses três componentes. Em 2008 foi decretado pela ONU o ano internacional do saneamento básico e segundo as metas do milênio, até 2015 devemos reduzir pela metade a população sem saneamento (Fundação Getúlio Vargas, 2008). É na dimensão ambiental que as ações de saneamento podem efetivamente intervir na ação de um organismo patogênico ao ser humano. Condições ambientais precárias, abastecimento de água insuficiente e sistemas de esgotos inadequados são frequentemente citados como os maiores obstáculos para o controle do desenvolvimento de surtos de doenças e epidemias. Dentro das atividades de saúde pública, o saneamento é um dos mais importantes meios de prevenção de doenças (CAIRNCROSS, 1984).

Os principais agentes biológicos descobertos nas águas contaminadas são as bactérias patogênicas, os vírus e os parasitas, encontrados principalmente em países quentes e em locais onde existem más condições sanitárias (D'AGUILA, et al. 2000).

## **1.2. LAGOAS COSTEIRAS**

Atualmente, 50% da população mundial vivem em cidades e vilarejos com distâncias próximas de 100 km da costa (SHUVAL, 2003). Dentre os corpos aquáticos continentais pequenos, as lagoas costeiras são muito representativas (PRAST et al,

2010), pois ocupam ~13% do litoral mundial e se caracterizam pela posição de interseção entre os ambientes marinho, terrestre e dulcícola, sendo distinguidas pela alta produtividade biológica (KNOPERS, 1994). Devido à baixa cota altimétrica aliada à condição lântica e ao uso humano expressivo, as lagoas costeiras constituem ambientes onde os efeitos decorrentes de processos naturais e antrópicos na bacia de drenagem são maximizados cumulativamente (KJERFVE, 1994).

Essas áreas costeiras também têm sido afetadas através de despejo de vários tipos de poluentes, que invadem esses ecossistemas diariamente (SHUVAL, 2003). Nas últimas décadas, alguns problemas sociais e ambientais surgiram nas zonas costeiras em todo o mundo, em consequência do desenvolvimento urbano desorganizado, incluindo: indústrias, portos, comércios, agricultura, aquicultura, pesca e atividades de turismo (PEREIRA et al, 2010).

O crescimento desordenado das populações humanas é um dos fatores responsáveis pela poluição dos corpos aquáticos, uma vez que grandes quantidades de esgoto doméstico e resíduos industriais são lançados *in natura* ou inadequadamente tratados, o que tem promovido uma deterioração da qualidade das águas naturais, com riscos de propagação de doenças de veiculação hídrica (SAVICHTCHEVA; OKABE, et al, 2006). Além dos resíduos oriundos da utilização de fertilizantes químicos na agricultura, outra fonte de poluição também relevante são os compostos polifosfatados. Esse tipo de poluição tem como consequência a eutrofização artificial dos ecossistemas aquáticos, caracterizado por modificações drásticas nas condições físico-químicas, nas comunidades de organismos e microrganismos no ambiente e na produtividade do sistema.

Os corpos aquáticos urbanos oferecem valores estéticos e recreativos e servem como zonas de captação de escoamento de águas pluviais. Além disso, eles fornecem o alimento, a proteção e a criação de áreas para diferentes espécies animais e vegetais (STEWART et al, 2008). Nos trópicos, esses ambientes também podem ser associados com ecossistemas de mangue natural. No entanto, lagoas costeiras urbanas são constantemente submetidas a impactos negativos devido às atividades humanas gerando altas taxas de sedimentação e eutrofização (WU et al, 2010). A sua manutenção como ecossistema funcional e saudável é essencial para nosso bem-estar futuro (GONZALEZ-FERNANDEZ et al, 2011).

### 1.3. LAGOAS COSTEIRAS NO BRASIL

No litoral do Brasil, as lagoas costeiras são muito abundantes e variam desde pequenas depressões, preenchidas com água da chuva e/ou do mar, de caráter temporário, até corpos d'água de grandes extensões como a lagoa dos Patos no Rio Grande do Sul (MOSCHINI-CARLOS; POMPEO, 2001). A zona costeira brasileira se estende desde o estado do Amapá até o Rio Grande do Sul perfazendo um total de 8.500 Km (KOZLOWSKY-SUZUKI; BOZELLI, 2002).

A ocupação do nosso país é prioritária na região litorânea, o que gera muitas conseqüências nas lagoas costeiras do litoral brasileiro, principalmente devido à ocupação urbana desordenada. Assim como em outras partes do mundo, no Brasil, o aumento na demanda por recursos naturais não veio acompanhado de cuidado com a preservação dos mesmos, sobretudo da água (ASSUNÇÃO, 2008).

Estima-se que o Brasil possua de 12 a 18% da disponibilidade mundial de recursos hídricos. A região hidrográfica Atlântico Sudeste (na qual se encontra a cidade do Rio de Janeiro) é umas das menores em área (215 mil Km<sup>2</sup>) e ao mesmo tempo uma das mais urbanizadas e poluídas do Brasil, o que indica que os ecossistemas naturais nestas áreas encontram-se sob constante ação antrópica direta ou indireta (ANA, 2010).

O município do Rio de Janeiro é dividido em três macrobacias hidrográficas: A Bacia da Baía de Guanabara, a Bacia de Sepetiba e a Bacia das Lagoas Costeiras (BRASIL/SMAC, 1998). As lagoas da cidade do Rio de Janeiro são caracterizadas como urbanas, sendo divididas entre as lagoas da baixada de Jacarepaguá e a Lagoa Rodrigo de Freitas. Esforços em estudos sobre estes ecossistemas têm sido feito em nível mundial, no Brasil estudos sobre as lagoas costeiras são escassos, destacam-se trabalhos desenvolvidos no sistema lagunar de Maricá (GUERRA et al, 2011), na Lagoa Rodrigo de Freitas (FONSECA et al, 2011), no sistema lagunar de Araruama (CLEMENTINO et al, 2008), entre outros.

O monitoramento dos recursos hídricos é essencial como forma de controle da saúde ambiental dos ecossistemas. Ao desafio ambiental acresce a necessidade de garantia da saúde pública.

### 1.4. BAIXADA DE JACAREPAGUÁ

A Baixada de Jacarepaguá possui uma Bacia Hidrográfica constituída pelos rios nascentes nas vertentes dos Maciços da Tijuca e da Pedra Branca e no escudo rochoso situado ao norte da baixada, tendo aproximadamente 300 Km<sup>2</sup> de área drenante, sendo

124 Km<sup>2</sup> correspondentes às lagoas, de acordo com a Secretaria Municipal de Meio Ambiente - SMAC, 1998. Esta bacia é formada pelas lagoas da Tijuca (4,34 km<sup>2</sup>), Camorim (0,80 km<sup>2</sup>), Jacarepaguá (4,07 km<sup>2</sup>), Marapendi (3,33 km<sup>2</sup>) e Lagoinha (0,70 km<sup>2</sup>), totalizando 13,24 km<sup>2</sup>, sendo interligadas ao mar pelo canal da Joatinga, ao leste (VIANNA, 1992) e está localizada ao sul do município do Rio de Janeiro compreendida entre as latitudes 22°55'S e 23°03'S e as longitudes 43°30'W e 43°18'W. Esta bacia hidrográfica é delimitada pelos maciços montanhosos da Tijuca a leste, da Pedra Branca a oeste e pelo Oceano Atlântico ao sul, compõe o Complexo Lagunar de Jacarepaguá composto por diversos rios que descem as vertentes dessas montanhas e deságuam nas lagoas (Tijuca, Jacarepaguá, Marapendi e Camorim) (Figura 1).

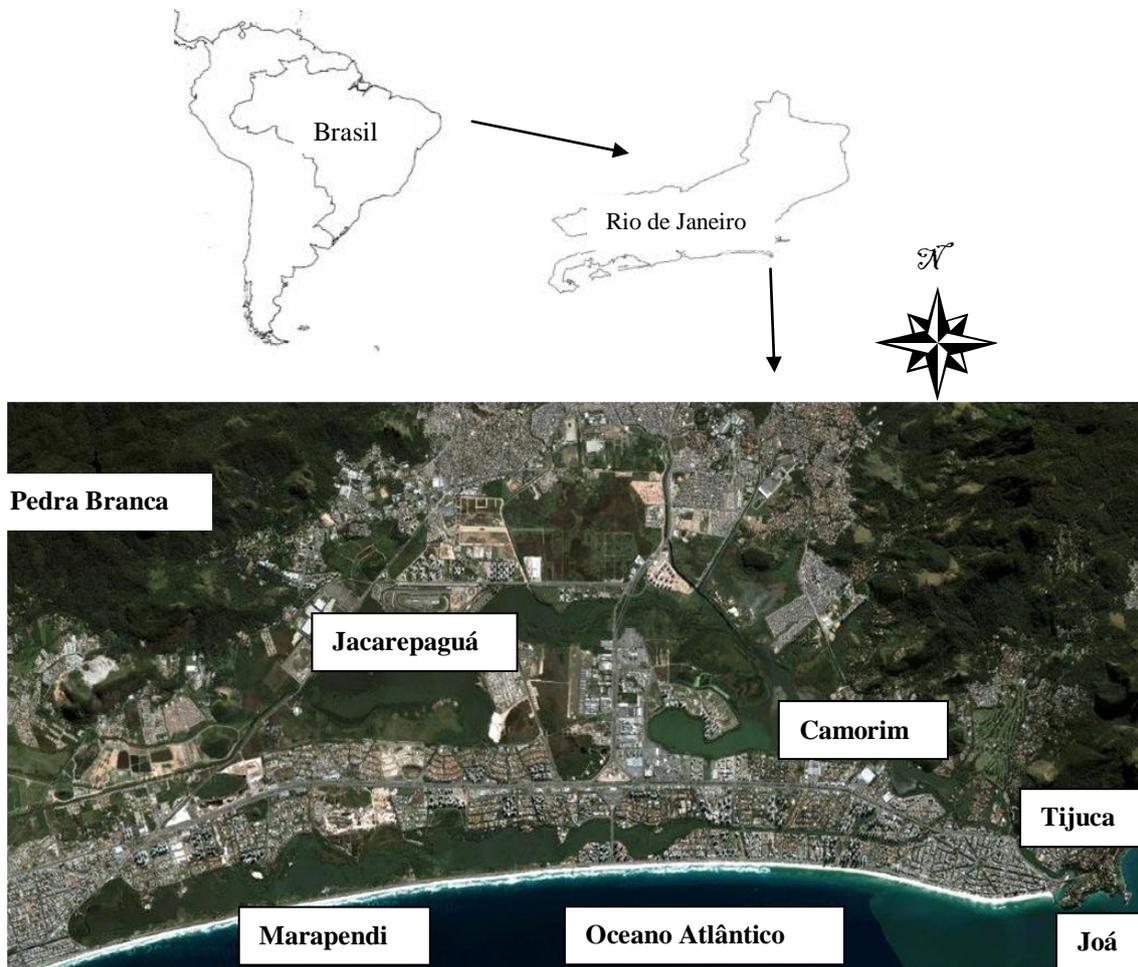


Figura 1 – Mapa dos locais a serem estudados

Esta baixada é provavelmente, no Município do Rio de Janeiro, o maior exemplo da possível contradição entre desenvolvimento urbano e sustentabilidade ambiental. O resultado da expansão urbana na região ausente de uma política pública de

investimentos em infra-estrutura de saneamento é a degradação ambiental do Complexo Lagunar da Baixada de Jacarepaguá.

O maciço da Pedra Branca vive atualmente um acelerado processo de desenvolvimento das atividades urbanas em seu entorno e de expansão da degradação do ecossistema florestal. O crescimento da malha urbana, o desmatamento e a expansão das atividades agrícolas em suas encostas imprimem hoje na paisagem grandes modificações no arranjo espacial de seus elementos e definem, assim, sua nova paisagem. Por ser área de expansão urbana, ou seja, onde o crescimento dos núcleos de ocupação estão ainda se processando, o maciço da Pedra Branca guarda no seu espaço traços de um conflito rural-urbano. Dados do Instituto Municipal de Planejamento (IPLAN) dão para os bairros localizados em seu sopé elevadas taxas de crescimento populacional ao longo das décadas de 1990 e 2000. Estas se deram pelo crescimento da chamada cidade informal, com a proliferação de favelas e loteamentos irregulares, avançando pela mata atlântica do Parque Estadual da Pedra Branca.

Como resultante deste processo, cresceram exponencialmente problemas ligados ao saneamento básico. A presença do Parque Estadual da Pedra Branca não é suficiente para impedir o avanço – seja por favelas ou residências de luxo – sobre as encostas da mata atlântica do maciço da Pedra Branca (<<http://www.vitruvius.com.br/revistas/read/arquitextos/10.116/3385>> Acessado em 04 de março de 2012).

O intenso processo de urbanização da Baixada de Jacarepaguá, a partir dos anos 70, tem causado grandes agressões ambientais ao complexo lagunar, comprometendo principalmente a qualidade das águas e a saúde da população, graças à expansão imobiliária sejam residências, comércios, hospitais e/ou chácaras quanto ao crescimento das favelas, onde reside a população de baixa renda. O Estado do Rio de Janeiro, rico em mananciais, mas igualmente mal distribuídos, passou a contar com dispositivos institucionais para disciplinar, controlar e fiscalizar o exercício da atividade de captação e exploração de águas, inclusive as subterrâneas, a partir da Lei de Recursos Hídricos promulgada em 1999. Mais recentemente, a criação do Conselho Estadual de Gerenciamento de Recursos Hídricos, órgão deliberativo, normativo e consultivo, com atribuições de supervisionar e promover a implantação das diretrizes da Política Estadual de Recursos Hídricos - SEGRH (BRASIL, 1999).

Os padrões atuais de avaliação das águas de consumo recreativo baseiam-se principalmente nas dosagens de coliformes totais e fecais para avaliar a qualidade

microbiológica da água e dos riscos à saúde humana. Durante muito tempo, acumulou-se grande número de dados que permitem estimar a sensibilidade e especificidade de tal indicador bacteriano da presença de poluição de origem fecal. Por outro lado, os coliformes fecais, um subgrupo dos coliformes, oferece uma correlação direta da poluição por fezes de animais de sangue quente. A principal característica bioquímica usada para identificar os coliformes fecais é a sua capacidade de fermentar a lactose, com produção de gás, na temperatura de 44,5°C. Análise do material fecal de animais de sangue quente, incluindo bovinos, suínos, ovinos, aves domésticas, cães, gatos, roedores e o ser humano, indica que os coliformes fecais contribuem com 93,0% a 98,7% do total de coliformes (SOUZA et al, 1983).

Desde a década de 1970, pesquisadores e gestores de recursos hídricos da Europa Ocidental e da América do Norte argumentam que as metodologias tradicionais de classificação das águas, baseadas em características físicas, químicas e bacteriológicas, não são suficientes para atender aos usos múltiplos da água, sendo particularmente deficientes na avaliação da qualidade estética, de recreação e ecológica do ambiente (ARMITAGE, 1995; CAIRNS Jr., PRATT, J. R, 1993; PRATT, J. M., COLER, 1976). Isso pode ser atingido com uma análise integrada da qualidade da água, ou seja, considerando não apenas as metodologias tradicionais de avaliação, mas os aspectos biológicos do sistema (BUSS et al, 2003). Além disso, não há relatos sobre a falta de correlação de bactérias como enterococos e coliformes fecais com doenças transmitidas pela água (GRIFFIN et al, 2001). Estes problemas refletem a necessidade de um conhecimento mais abrangente e detalhado das comunidades microbianas dos ambientes aquáticos.

## 1.5. MICRORGANISMOS E ECOSISTEMAS AQUÁTICOS

Os microrganismos possuem o mais rico repertório de diversidade genética e metabólica existente na natureza. Cerca de 50% do protoplasma da biosfera encontra-se no componente microbiano (bactérias, fungos, algas e protozoários). Os microrganismos registram mais de 3,5 bilhões de anos de história evolutiva e são imprescindíveis para os ciclos biogeoquímicos e cadeias alimentares, mantendo interações vitais entre si e com os organismos superiores. O estudo da biodiversidade microbiana em seu habitat natural ou modificado tem proporcionado novos conhecimentos sobre a composição das comunidades, suas interações e funções ecológicas (GIOVANNONI; STINGL, 2005). Estas informações têm sido fundamentais

para a compreensão do papel dos microrganismos nas cadeias tróficas e nos ciclos biogeoquímicos destes ambientes. A degradação das substâncias orgânicas, mediada pelos microrganismos presentes nos ambiente, libera nutrientes inorgânicos, dentre os quais podemos destacar o carbono, nitrogênio e o fósforo (ARRIGO, 2005).

O papel da microbiota na dinâmica de ecossistemas aquáticos é evidenciado por trabalhos multidisciplinares (taxonomia, biodiversidade, parâmetros físico-químicos, citometria, genômica) que demonstram que são os principais responsáveis pela ciclagem de matéria orgânica no meio ambiente. Estas informações têm sido fundamentais para o desenvolvimento de indicadores específicos para a avaliação da qualidade da água, bem como para a disseminação das informações que devem fazer parte das ações de vigilância sanitária, mais especificamente, vigilância ambiental em saúde.

As bactérias heterotróficas decompõem a matéria orgânica, disponibilizando nutrientes inorgânicos para o meio ambiente. Esta regeneração de nutrientes alimenta a produção primária na zona fótica sendo a base para o desenvolvimento das cadeias tróficas nos meios aquáticos e terrestres (AZAM; LONG, 2001). Estas comunidades respondem rapidamente às variações das características bio-físico-químicas dos ecossistemas, (p.ex. mudanças fenológicas, ciclos sazonais de chuva e seca) e estresses antrópicos, através de uma diferenciação mediante as oscilações ambientais. Alguns micro-organismos têm sido empregados como bioindicadores de impacto ou mudanças no meio ambiente (LONGNECK et al, 2005), sendo os mais adotados para a avaliação da qualidade de recursos hídricos os coliformes totais, coliformes termotolerantes (ZHENG et al, 2009), *Escherichia coli*, *Enterococcus fecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*, além das bactérias do gênero *Nitrossomas* e *Exiguobacterium* (GOMES, 2009) e as Cianobactérias. No entanto, estes indicadores podem persistir no ambiente e sua presença não fornece nenhuma informação sobre os riscos destes patógenos à saúde humana ou a fonte de contaminação fecal (FUJIOKA, 2001). Tais métodos também são suscetíveis a uma série de inconvenientes, tais como, a subestimação de patógenos como: *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. em contagem de testes padrão de coliformes (FUKUSHIMA et al, 2002).

## 1.6. PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS

Os parâmetros utilizados na análise físico-química de ambientes aquáticos são vários: pH, condutividade, turbidez, oxigênio dissolvido (OD), temperatura e salinidade. 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 (COSTA et al, 2003). 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 diminuem a claridade e reduzem a transmissão da luz no meio. Ela pode reduzir a eficiência da cloração pela proteção física dos microrganismos 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 em ambientes pobres em oxigênio e ricos em matéria orgânica são propensos a proliferação de microrganismos anaeróbios (COSTA et al, 2003). A temperatura é um parâmetro importante a ser analisado, pois está diretamente relacionado com o metabolismo dos microrganismos. 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 oxigênio dissolvido do corpo aquático, diminuem a solubilidade dos gases (exemplo: oxigênio dissolvido) e aumentam a taxa de transferência de gases, o que pode causar odor desagradável (APHA, 1995; VON SPERLING, 2005). A salinidade é outro fator importante, pois interfere diretamente no desenvolvimento microbiano (ESTEVES, 1988).

## 1.7. SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos revolucionaram a medicina, permitindo o tratamento de infecções que antes eram fatais e salvaguardando procedimentos que antes eram impensáveis. A seleção da resistência é uma consequência inevitável ao uso de antibióticos, embora a sua frequência varie de acordo com esquemas, extensão de uso, eficácia do controle da infecção e de fatores aleatórios, tais como a transferência lateral

de genes de resistência ao DNA celular de outras linhagens bacterianas (LIVERMORE; HAWKEY, 2005).

Estudos têm demonstrado que mesmo em concentrações subinibitórias os antibióticos exercem aumento da resistência sobre as comunidades microbianas, além disso, os efeitos da exposição dos organismos a baixas concentrações de antibióticos não são totalmente conhecidos. Seu uso indiscriminado acelerou a difusão de genes de resistência a esses medicamentos, carregados por micro-organismos portadores de genes de resistência intrínseca, cromossômicos e ou plasmidiais (BAQUERO et al, 2008). As mutações cromossômicas podem ser responsáveis pela diminuição da afinidade de antibióticos para os seus alvos. Além disso, alguns mecanismos de resistência (por exemplo, bombas de efluxo cromossômicas de beta-lactamases - AmpC) são extremamente regulados na sua expressão e conferem uma susceptibilidade naturalmente reduzida a essas drogas (LUPO et al., 2012).

Com o aumento das populações humanas, houve um crescimento dos impactos antropogênicos afetando lagos, rios e ecossistemas costeiros, principalmente devido à descarga de esgotos e compostos químicos, como pesticidas, hormônios e antibióticos que são amplamente utilizados em clínicas humanas e veterinárias (BARBA-BRIOSO et al, 2010). A principal fonte de antibióticos no meio ambiente vem da descarga de efluentes de indústrias farmacêuticas e hospitalares, da eliminação de estrume e da aquicultura (DING; HE, 2010). Grandes quantidades de antibióticos são usadas na criação de animais, resultando em uma vantagem seletiva, conseqüentemente, aumentando a abundância de bactérias resistentes em animais e seus estrumes. Estercos têm se apresentado, recentemente, como fonte de bactérias e genes de resistência a antibióticos, uma vez que 90% dos antibióticos utilizados são excretados pelos animais tratados (HEUER; SAMALLA, 2007).

Ambientes aquáticos são locais de intensa troca de material genético, onde as bactérias inicialmente sensíveis podem se tornar resistentes através da transferência horizontal de genes. Este processo representa uma ameaça à saúde da população, pois patógenos oportunistas podem adquirir resistência e disseminá-la ao meio ambiente (MARTÍNEZ, 2008), proporcionando em longo prazo pressão seletiva para o aparecimento e transmissão destes genes de resistência às microbiotas não resistentes, sendo transferidas através da água pelas bactérias patogênicas que são encontradas atualmente em ambientes clínicos (COLOMER-LLUCH et al, 2011). Sendo os microrganismos extremamente diversificados e dinâmicos, não é surpreendente que os

diferentes tipos de espécies microbianas presentes no ambiente aquático existem em distintos estados fisiológicos possuem requisitos diferentes para a sobrevivência e para sustentar os seus crescimentos (ROWAN, 2011).

## 1.8. METAGENÔMICA

Segundo HANDELSMAN (2004 apud HUSON et al, 2012), metagenômica foi definida como a análise genômica de microrganismos por extração direta e clonagem de DNA a partir de um conjunto de microbiota em um determinado ambiente.

Em 1978, Carl Woese sugeriu uma nova classificação dos seres vivos, não mais baseados na morfologia, mas na sequência estrutural do rDNA (genes que codificam rRNA) (WOESE; FOX, 1977). A partir desses estudos, os organismos foram divididos em três domínios: Archaea, Bacteria e Eukarya. A utilização das sequências de nucleotídeos dos genes que codificam as subunidades 16S e 18S do ribossomo tem sido visto como um marcador molecular adequado para investigar a biodiversidade microbiana das mais variadas fontes, incluindo águas e solos (WINKER; WOESE, 1991 e JANSSEN, 2006). Novas abordagens, como a metagenômica, podem revelar números mais elevados de microrganismos daqueles obtidos por métodos convencionais, além de identificar potenciais patógenos indicadores de contaminação fecal (LEE et al, 2007).

Nos últimos anos, até o advento da biologia molecular e da bioinformática, o estudo de microrganismos era feito exclusivamente pela fisiologia, morfologia e bioquímica de organismos cultiváveis em meios de cultura, limitada às espécies capazes de crescer em um meio artificial de cultura gerado no ambiente laboratorial. No entanto, estima-se que em muitos ambientes, cerca de 99% dos micro-organismos não foram cultivados em meios de cultura e outras condições laboratoriais conhecidas, sendo que grande parte destes são muito diferentes (evolutivamente) dos micro-organismos cultiváveis conhecidos atualmente (PACE, 1997). Desta forma, foram desenvolvidos métodos independentes de cultivo que possibilitam acessar e conhecer melhor a diversidade genética, a estrutura das populações e as funções ecológicas dos microrganismos (RIESENFELD et al, 2004). Esta abordagem pode detectar bactérias não cultiváveis, bem como indicadores fecais convencionais em corpos d'água, incluindo *E. coli*, *Salmonella* spp. (MARLONY et al, 2003), *Shigella* spp. (BEJ et al, 1991), *Campylobacter* spp. (HORMAN et al, 2004), *Legionellae* (LEE et al, 2011), e *Vibrio vulnificus* (CHAKRAVORTY S et al, 2010) entre outros.

Atualmente, as aplicações dos estudos de metagenômica podem ser desde estudos básicos em diversidade e ecologia microbiana até a obtenção de produtos de interesse biotecnológico, como novas enzimas de interesse industrial, antibióticos, entre outros. Esta área de pesquisa merece destaque em função de ser uma área recente no país e ao mesmo tempo multidisciplinar e com grande potencial de aplicação. É considerado o primeiro passo para o estudo de um mundo até então quase completamente desconhecido pela ciência e esse conhecimento só tende a avançar (GARCIA, 2010). Inicia-se uma nova perspectiva para a ciência, que permite a identificação e o monitoramento de uma quantidade enorme de microrganismos presentes em ambientes naturais e antropizados. Em muitos casos, os patógenos encontrados no meio ambiente são os mesmos agentes etiológicos multirresistentes das infecções hospitalares.

#### 1.9. RELAÇÃO COM A VIGILÂNCIA SANITÁRIA

A relação entre saúde e ambiente sempre fez parte da Saúde Pública do Brasil, mas ao longo da história, diferentes concepções de ambiente foram desenvolvidas de acordo com as demandas colocadas pela sociedade e a evolução das disciplinas científicas presentes na Saúde Pública. Influenciada por modelos envolvendo relações entre agentes e hospedeiros, ou de fatores de risco biológicos, as ações de prevenção nos sistemas de saúde estruturaram-se por intermédio das várias formas de vigilância, tendo por objeto central o controle dos modos de transmissão das doenças e dos fatores de risco, o qual possibilitou alguma governabilidade e eficácia de sua ação no âmbito do setor saúde, principalmente para as doenças infecto-contagiosas clássicas (FUNASA, 1999).

O propósito primário para a exigência de qualidade da água é a proteção à saúde pública. Os critérios adotados para assegurar essa qualidade têm por objetivo fornecer uma base para o desenvolvimento de ações que se propriamente implementadas junto à população garantirão a segurança da água através da eliminação ou redução à concentração mínima de constituintes perigosos à saúde (D'AGUILA et al., 2000). A relação entre a poluição da água e saúde pública tem sido preocupante e estimula o aumento dos esforços no controle da poluição ambiental (SIEGENER; CHEN, 2002).

A qualidade das águas é representada por um conjunto de características, geralmente mensurável, de natureza química, física e biológica. Sendo um recurso comum a todos, foi necessário, para a proteção dos corpos d'água, instituir restrições

legais de uso. Desse modo, as características físicas e químicas da água devem ser mantidas dentro de certos limites, os quais são representados por padrões, valores orientadores da qualidade de água, dos sedimentos e da biota (BRASIL, RESOLUÇÕES CONAMA nº 357/2005 e nº 344/2004, e PORTARIA nº 518, do MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE).

No Brasil, os mananciais de água doce são extremamente favoráveis para os diversos usos no entanto as características de recurso natural renovável, em várias regiões do país, têm sido drasticamente afetadas. Os processos de urbanização, de industrialização e de produção agrícola não têm levado em conta a capacidade de suporte dos ecossistemas (REBOUÇAS, 1997). Este quadro está sensivelmente associado ao lançamento – deliberado ou não – de mais de 90% dos esgotos domésticos e cerca de 70% dos efluentes industriais não tratados, o que tem gerado a poluição dos corpos de água doce de superfície em níveis nunca antes imaginados (REBOUÇAS, 1997). Por muito tempo a problemática da qualidade da água foi deixada de lado. O déficit na cobertura da população brasileira com sistemas de abastecimento de água dirigiu as políticas de saneamento para o atendimento da demanda reprimida, com a implantação e a ampliação de sistemas. Em função disso, as ações de controle e vigilância da qualidade da água foram colocadas em segundo plano.

A FUNASA (Fundação Nacional de Saúde) no uso das suas atribuições resolve regulamentar a vigilância ambiental em saúde por meio da Instrução Normativa nº 1 de 25/09/2001 que regulamenta a Portaria MS n.º 1.399, de 15/12/1999, no que se refere às competências da União, Estados, Municípios e Distrito Federal, na área de vigilância ambiental em saúde. A implementação do Projeto de Estruturação do VIGISUS (Vigilância em Saúde do Sistema Único de Saúde) tem colaborado no sentido de implementar o conceito de vigilância em saúde, possibilitando a incorporação de uma visão mais ampla do conjunto de fatores ambientais, decorrentes da atividade humana ou da natureza, que deverão ser sistematicamente monitorados levando-se em consideração o território onde estas interações entre o homem e o meio ambiente ocorrem, elegendo o município como o espaço privilegiado das práticas de saúde pública para o acompanhamento e o controle dos efeitos ambientais na saúde humana (BRASIL/FUNASA, 1999)

A vigilância ambiental em saúde é um conjunto de ações que proporciona o conhecimento e a detecção de qualquer mudança 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. Entre as dificuldades encontradas para sua efetivação no país está a necessidade de reestruturação das ações de vigilância nas secretarias estaduais e municipais de saúde e da formação de equipes multidisciplinares.

O monitoramento sistemático de qualidade de água do complexo lagunar de Jacarepaguá é realizado pelo INEA (Instituto Nacional do Ambiente), de acordo com a Resolução Conama nº. 357/05 a qual revela que este complexo encontra-se sob intenso impacto antropogênico.

#### 1.10. SANEAMENTO BÁSICO E A SAÚDE PÚBLICA

Os principais agentes biológicos descobertos nas águas contaminadas são as bactérias patogênicas, os vírus e os parasitas, encontrados principalmente em países quentes e em locais onde existem más condições sanitárias. Na Tabela 1 podem ser observadas algumas das principais doenças relacionadas à ingestão de água contaminada e seus agentes etiológicos.

**Tabela 1. Agentes etiológicos e patologias**

Patologias	Agentes etiológicos
Cólera	<i>Vibrio cholerae</i>
Desintéria bacilar	<i>Shigella</i> sp.
Febre tifóide	<i>Salmonella typhi</i>
Hepatite infecciosa	Vírus da hepatite do tipo A
Febre paratifóide	<i>Salmonella paratyphi</i> tipo A, B e C
Gastroenterite	Outros tipos de <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Proteus</i> sp.
Diarréia Infantil	Tipos enteropatogênicos de <i>Escherichia coli</i>
Leptospirose	<i>Leptospira</i> sp.

(D'AGUILA et al, 2000)

A precariedade do quadro sanitário brasileiro, com a baixa oferta dos serviços de saneamento, reflete-se no quadro epidemiológico, com alta taxa de mortalidade infantil verificada em vários municípios brasileiros, especialmente os localizados nas regiões

Norte e Nordeste e a alta incidência de várias doenças provenientes de águas impróprias para o consumo humano. Segundo dados do documento *Evolução e Perspectivas da Mortalidade Infantil no Brasil (1999)* do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), instituição vinculada ao Ministério do Planejamento, a partir da década de 70, a queda da mortalidade infantil observada em relação às décadas anteriores está ligado ao modelo de intervenção na área das políticas públicas, principalmente no campo da medicina preventiva e de saneamento básico, entre outros.

Dados do Sistema de Informações Hospitalares (SIH)/SUS (Sistema Único de Saúde) indicam que nos últimos dez anos ocorreram no Brasil cerca de 700.000 internações hospitalares anuais provocadas por doenças relacionadas com a falta ou inadequação de saneamento (FUNASA, 2010). Em 1997, segundo o Ministério da Saúde, morreram 50 pessoas por dia no Brasil vitimadas por enfermidades relacionadas à falta de saneamento básico. Destas, 40% eram crianças de 0 a 4 anos de idade citado no relatório “Incorporação da Coleta, Tratamento e Disposição do Esgoto Sanitário na Agenda de Prioridade dos Municípios Brasileiros” de 2000 (RINO; CORDEIRO, 2002).

No Brasil, a diarreia é a principal doença relacionada ao saneamento inadequado. Conforme dados do Sistema de Monitorização das Doenças Diarréicas Agudas (MDDA) da Secretaria de Vigilância em Saúde – SVS MS são detectadas, em média, anualmente, cerca de 1,5 milhões de casos de diarreias agudas (FUNASA, 2010).

O objetivo principal deste estudo foi a avaliação da microbiota frente aos possíveis impactos da urbanização baseada em uma abordagem multidisciplinar incluindo a metagenômica combinada a análise do PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), o que tem fornecido valores quantitativos e qualitativos da diversidade microbiana que permite uma comparação das comunidades frente seus diferentes ambientes aquáticos (MASSANA et al., 2000 e GIOVANNI; STINGL, 2005). Os dados adquiridos poderão subsidiar uma proposta de gestão da água baseada num conceito sustentável, onde prevenir a poluição se apresenta como a solução mais eficiente para a redução de custos na melhoria da qualidade das águas e na promoção da saúde pública e ambiental.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

“Determinar a diversidade bacteriana das lagoas do complexo lagunar de Jacarepaguá e avaliar o comportamento da microbiota e os possíveis impactos da poluição sobre o ecossistema e a Saúde Pública”

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os isolados utilizando métodos microbiológicos e moleculares e determinar a susceptibilidade aos antibióticos.
- Determinar a diversidade das comunidades microbianas das lagoas da Barra da Tijuca e Jacarepaguá por meio da DGGE e da construção de bibliotecas do gene rrs do 16S rRNA.
- Posicionar os clones no espaço filogenético; calcular a coberturas das bibliotecas; comparar as comunidades e realizar análises estatísticas.
- Constituir uma coleção representativa de isolados microbianos e de DNA metagenômico das amostras analisadas.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1. AMBIENTES SELECIONADOS PARA O ESTUDO:

*Córrego do Engenho Novo (JM)* - A bacia hidrográfica do córrego do Engenho Novo, afluente do rio Guerengüê, forma o chamado Arroio da Pavuna. Esta bacia se localiza na macrobacia hidrográfica de Jacarepaguá, os 66 ha restantes da área encontram-se na bacia hidrográfica do rio Pavuninha, também localizado na macrobacia hidrográfica de Jacarepaguá. A bacia do córrego do Engenho Novo tem formato alongado, cujas diagonais oeste-leste e norte-sul têm aproximadamente 1,7 km e 5,9 km, respectivamente, e sua área total é de 5,06 km<sup>2</sup>. O córrego do Engenho Novo nasce na serra do Camorim, a cerca de 650 m de altitude, percorrendo uma extensão de aproximadamente 8,1 km até sua desembocadura no rio Guerengüê. Seus principais afluentes são os rios do Tucum e do Areal (INSTITUTO LAGOA VIVA, 2010).

*Complexo Lagunar de Jacarepaguá* - O complexo lagunar de Jacarepaguá fica no município do Rio de Janeiro e é formado por quatro lagoas principais: Tijuca, Jacarepaguá, Marapendi e a de Camorim, situada entre as lagoas da Tijuca e de Jacarepaguá. O divisor de águas da bacia de drenagem do sistema é estabelecido pelas linhas da crista dos Maciços da Pedra Branca e da Tijuca. Com cerca de 280 Km<sup>2</sup> de área, a bacia hidrográfica do complexo lagunar de Jacarepaguá é composta por diversos rios que descem as vertentes dessas montanhas e deságuam nas lagoas, que por sua vez se ligam ao mar pelo canal da Barra da Tijuca,

*Canal da Joatinga* – canal que liga as lagoas ao mar, permitindo a troca de água com o mar.

### 3.1.1. Pontos de coleta



**Figura 2.** Estrelas (★) marcam os pontos de coleta no sistema lagunar

- **Ponto 1** - Cabeceira do Rio Engenho Novo / Comunidade Juliano Moreira (JM)
- **Ponto 2** - Lagoa de Jacarepaguá (JC);
- **Ponto 3** - Lagoa do Camorim (CAM);
- **Ponto 4** - Lagoa de Marapendi (MR);
- **Ponto 5** – Lagoa da Tijuca (TJ);
- **Ponto 6** - Canal do Joá.

A Coleta dos pontos 2, 3 e 4 foram realizadas em colaboração com o Instituto Estadual do Ambiente - INEA.

### 3.1.2. Localização dos pontos de coleta

Foram selecionados oito pontos de coleta de amostras: JM, JC342, CAMO320, MR361, MR369, TJ306, TJ301, JOA.

*Ponto JM: Reservatório da Cachoeira/Juliano Moreira (JM) - manancial que abastece as comunidades vizinhas, representando um ambiente natural com menor impacto da ocupação humana. Lat. 22° 56' 85" Long. 043° 24' 6"*

*Ponto JC342: Lagoa de Jacarepaguá - próximo ao rio Arroio da Pavuna - Lat. 22° 58' 10" Long. 043° 22' 99"*

*Ponto CAM320: Lagoa do Camorim - embaixo da ponte (Ayrton Senna) Lat. 22° 34' 04" Long. 043° 55' 32"*

*Ponto MR361: Lagoa de Marapendi - parque Chico Mendes Lat. 23° 01' 33" Long. 043° 25' 26"*

*Ponto MR369: Lagoa de Marapendi - Atrás da Barra Bali Lat. 23 00' 17" Long. 043° 21' 85"*

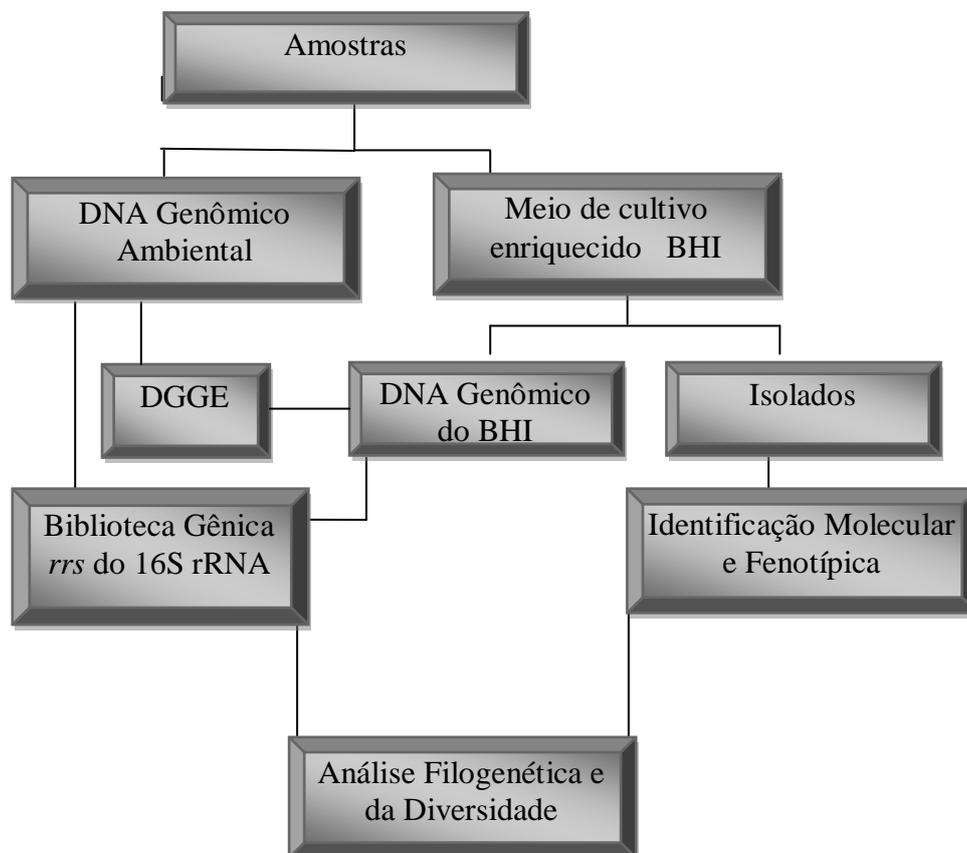
*Ponto TJ303: Lagoa da Tijuca - próxima ao quebra-mar (embaixo do elevado do Joá) Lat. 23° 00' 33" Long. 043° 17' 62"*

*Ponto TJ306: Lagoa da Tijuca - Atrás do “Hard Rock Café”. Lat. 23° 00' 59" Long. 043° 18' 56"*

*Ponto JOA: Canal da Joatinga - Lat. 23° 00' 56" Long. 043° 17' 60".*

### 3.2. FLUXOGRAMA

Uma amostra de cada um dos oito pontos selecionados foi coletada separadamente, em 16 de abril de 2009, e submetidos às análises físico-químicas, microbiológicas e moleculares. As amostras foram processadas de acordo com o fluxograma apresentado abaixo (Figura 3).



**Figura 3.** Fluxograma dos procedimentos.

### 3.3. COLETA DAS AMOSTRAS

Foram coletados 5,8 litros de cada ponto de coleta, foram utilizadas para as análises físico-químicas e dosagem de coliformes fecais. Para as análises moleculares foram utilizadas 5,8 litros para os pontos do Reservatório Juliano Moreira e Joá e 1 litro de cada ponto das Lagoas, coletado e doado pelo INEA.

#### 3.3.1. Dosagem dos parâmetros físicos e químicos

Foram analisados os seguintes parâmetros: temperatura; pH; Condutividade; Oxigênio dissolvido (OD); Turbidez e Salinidade com o equipamento Water Quality Checker U-10 (HORIBA<sup>®</sup>), em todos os pontos logo após a coleta.

#### 3.3.2. Filtração e preservação das amostras

As amostras de água foram filtradas imediatamente após a coleta, em condições assépticas, com auxílio de uma bomba peristáltica, primeiro através de um filtro plano com poro de 3µm, para retirada das partículas maiores, em seguida por uma unidade filtradora Millipore com membrana de 0,22 µm, com fluxo de 80 ml por minuto para a concentração da amostra.

### 3.4. EXTRAÇÃO DE DNA AMBIENTAL

A lise celular foi realizada de acordo com o método convencional onde 50 µl de lisozima (1mg/ml) foi adicionada ao filtro contendo tampão de lise (0,75M de sacarose, 20 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), e incubados a 37°C por 45 min. Em seguida, foi adicionado 50 µl de proteinase K (0,2mg/ml), 200 µl de dodecil sulfato de sódio (SDS) (10%), e incubados a 55°C por 1h. Os lisados foram retirados com seringa de 3ml, os filtros foram rinsados com tampão de lise e incubados por 15 minutos. O tampão de lavagem e os lisados foram agrupados.

O DNA do lisado foi extraído uma vez com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), pH 8,0) e outra vez com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). Os ácidos nucleicos da fase aquosa foram precipitados com dois volumes de etanol a -70°C, centrifugados, lavados com 70% de etanol, secos, e então dissolvidos em 100µl de TE (10mM Tris-HCL, 0,1mM EDTA, pH 8,0). Os DNAs foram purificados em coluna de purificação Qiagen e quantificados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo e analisados no equipamento de vídeo documentação Image Quant 300 (GE).

### 3.5. EXTRAÇÃO DE DNA DO MEIO DE CULTURA ENRIQUECIDO (MCE)

As amostras foram transferidas para meio de cultivo enriquecido, Brain Heart Infusion (BHI), com o objetivo de favorecer o crescimento de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativa. Um ml de cada um dos oito pontos de coleta: JM, JC342, CM320, MR361, MR369, TJ301, TJ306 e JOA (Figura 1), foi inoculado em 10 ml de BHI e incubado à 37°C. Após 24 horas, 500 µl da cultura foi centrifugada e o DNA genômico foi extraído usando o Kit *Dnaeasy® Blood & Tissue* (Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante.

### 3.6. DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS - DGGE

A diversidade das comunidades bacterianas foi analisada pela eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE). Os fragmentos do gene *rrs* do 16S rRNA foram amplificados pela (PCR) usando iniciadores 968BfC [5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGCGGAACGCGAAGAACCTTAC-3'] e 1401Br [5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3'] (WATANABE et al, 2001). Os produtos da reação de cada amostra foram aplicados ao sistema DCode DGGE (BioRad) e submetidos à 60V por 18 h a uma temperatura de 60°C em Tampão TAE 1X. Os produtos da PCR foram aplicados diretamente em um gel de poliacrilamida a 6% (w/v), em gradiente de desnaturação de 45% a 60% (onde 100% desnaturação contém 7-mol<sup>-1</sup> de uréia e 40% de formamida).

Após eletroforese, os géis foram corados com SYBR green I (Molecular Probes) por 1 h e analisado pelo sistema de documentação Image Quant 300 (GE Healthcare).

### 3.7. BIBLIOTECA DO GENE *rrs* DO 16S rRNA

*Reação em Cadeia pela Polimerase com DNA ambiental e do MCE* - A mistura de cada reação totalizou 50 µL e foi composta pelos seguintes reagentes: 25 pmol dos iniciadores universais para bactéria do gene *rrs* do 16S RNAr 27BF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492 RAB (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (LANE, 1991) para o DNA genômico do MCE e 27BF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 907RAB (5'-TTTGAGTTTMCTTAACTGCC-3') (WEISBURG et al, 1991) para o DNA genômico ambiental, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs - dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1U de *Taq* DNA polimerase ((INVITROGEN®), solução-tampão da PCR 1X (20mM Tris-

HCl-pH8.4, 50mM KCl), ~ 50ng do DNA da amostra e água deionizada estéril (INVITROGEN®). As cepas de referência *Haloferax volcani* (CT) DSMZ 3757/ATCC 29605 e *Escherichia coli* INCQS: 00031/ATCC 10536 foram empregadas para avaliar a especificidade dos iniciadores (controles das amostras) e uma alíquota de água deionizada estéril foi empregada para avaliar a ausência de DNA contaminante na mistura da PCR (controle da reação).

A amplificação foi realizada no equipamento termociclador Peltier Thermal Cycler, modelo PTC-200, MJ Research, nas seguintes condições: desnaturação inicial 94°C por 05 minutos; 30 ciclos: 94°C por 90 segundos, 50°C por 90 segundos e extensão a 72°C por 02 minutos e uma extensão adicional a 72°C por 05 minutos.

Para visualização dos produtos amplificados, alíquotas de 10 µL dos produtos da reação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% (Sigma®), a 70 volts por 50 minutos. Como tampão de corrida utilizou-se TBE 0,5X. Submeteu-se também à corrida eletroforética o padrão de peso molecular (100 pb DNA ladder INVITROGEN®). A coloração do gel foi realizada com solução de brometo de etídio (10 mg/mL) e foi analisada através do sistema de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE Healthcare). Os produtos da PCR foram purificados pelo Kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen®).

*Clonagem dos Genes 16S rDNA* - Os produtos de PCR foram ligados ao vetor de clonagem pGEM-T® Easy (Promega®) com T4 DNA ligase de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos de PCR foram clonados utilizando-se o kit comercial pGEM-T Easy Vector System I (Promega®). A mistura de cada reação totalizou 11 µL e foi composta por 50 ng de vetor pGEM-T, produto de PCR (aproximadamente 20 ng de DNA), 3 unidades de enzima T4 DNA ligase e tampão de reação (60 mM Tris-HCl pH 7,8, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM DTT, 2 mM ATP, 10% polietilenoglicol) (GIOVANNONI et al, 1990).

*Preparação das células competentes* - Foi inoculada 1 colônia de *Escherichia coli* (cepa DH10B) em 5 mL de meio de cultura, deixando agitar durante a noite em um shaker a 37°C. O pré-inóculo foi transferido para 500 mL de meio LB e foi deixado sob agitação a 37°C até a leitura da absorbância atingir o ponto ideal ( $A_{600nm}$  entre 0,5 a 0,8). Deixou-se no gelo por 15 minutos e centrifugou-se a 6000 rpm por 15 minutos a 4°C. O pellet foi ressuspendido em um volume total de 500 mL de água gelada

autoclavada e centrifugou-se novamente a 6000 rpm por 15 minutos a 4°C. Novamente o pellet foi ressuspensionado em um volume final de 0,25 L de água gelada, e centrifugou-se mais uma vez a 6000 rpm por 15 minutos a 4°C. Ressuspendeu-se o pellet em 6 mL de glicerol a 10% e centrifugou-se a 6000 rpm por 15 minutos a 4°C. Nesta última etapa, as células foram ressuspensionadas em um volume final de 1 mL de glicerol a 10%. Foram feitas alíquotas de 40 µL, as quais foram estocadas no freezer a - 70°C (DOWER et al., 1988).

*Transformação por eletroporação* - Antes da transformação, todas as reações de ligação foram dialisadas (para retirar o sal excessivo). O eppendorf contendo o mix da ligação foi colocado em um bécher com água e deixado 2 horas em temperatura ambiente. Após esse tempo, o eppendorf foi incubado overnight a 4°C. No dia seguinte, colocou-se todo o volume da ligação sobre uma membrana (Millipore 0,025 µm, Type VS), a qual foi deixada em contato com água destilada estéril, por 2 horas.

Foi misturado em uma cubeta de eletroporação de 1mm (BioRad), previamente resfriada, 5µL do produto da ligação dialisada com 45µL de células competentes (*E. coli*, DH10B). A eletroporação foi efetuada em um aparelho GenePulser Xcell™ (BioRad) ajustado para as seguintes condições: 1,8 kv, 200 Ω e 25 µF. Em seguida, acrescentou-se 1mL de meio de cultura LB na cubeta, transferindo-se o conjunto para tubos falcon e deixou-se agitando por 1 hora a 37°C. Após o tempo de recuperação, plaqueou-se 200µL da amostra em placa de LB contendo 150 µg/mL de ampicilina, 200 µL de X-Gal (20mg/mL) e 30 µL de IPTG (1M) e incubou-se overnight em estufa a 37°C. Esse procedimento foi realizado para as amostras referentes aos 5 pontos de coleta.

*Seleção de clones transformantes* - As placas foram retiradas da estufa. As colônias azuis foram descartadas e as colônias transformantes (brancas) foram coletadas aleatoriamente com o auxílio de palitos de madeira esterilizados por autoclavagem. Os clones foram organizados em microplacas “Deep well” de 96 poços contendo 1 mL de meio de cultivo CG com ampicilina (100 µg/mL) e 12% de glicerol. As placas foram então seladas com adesivos que foram furados com uma agulha em cada poço correspondente para permitir a aeração durante o crescimento das bactérias. As placas

foram incubadas durante 24 horas em shaker a 37°C. Após a incubação as bibliotecas foram armazenadas a -70°C (GIOVANNONI et al., 1990; CLEMENTINO et al., 2007).

*Mini-Preparação (extração do DNA plasmidial)* - As placas “Deep well” foram descongeladas e centrifugadas (Excelsa® 3 Modelo 280 marca FANEM ®) por 20 minutos a 2000 rpm. O meio foi descartado, invertendo a placa em balde com água sanitária, observando a formação do pellet. A placa foi colocada invertida sobre papel toalha, para absorver o excesso de meio, por aproximadamente 1 minuto. Foi adicionado, em cada poço, 200µL de GET para lavar o pellet por vortex. A placa foi agitada vigorosamente até que todas as células ficassem totalmente ressuspensas de forma homogênea. Foi centrifugado por 16 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado. Fez-se um mix com 19,8 mL de GET + 200µL de RNase (40mg/mL) e foi colocado 80 µL desta mistura por poço. A placa foi selada com adesivo e agitada no agitador de placas (vortex) por 2 minutos. O pellet ficou totalmente ressuspensado. A placa foi deixada em temperatura ambiente por 20 minutos. Foi adicionado solução de lise (NaOH 0,2 M + SDS 1%) em cada poço. A placa foi selada e invertida 10 vezes. Deu-se spin (até 300 rpm) e esperou-se 2 minutos. Foi adicionado em cada poço 100 µL de NaOAc 3M pH 4,6 gelado. A placa foi selada com adesivo e misturou-se 10 vezes por inversão. Esperou-se 3 minutos. A placa ficou “overnight” no freezer a -80°C. No dia seguinte, esperou-se a placa descongelar bem. Centrifugou-se por 30 minutos a 2000 rpm. Fixou-se com fita adesiva, uma placa Millipore (MAGV N22) no topo de uma microplaca de fundo “V” de 250 µL de polipropileno, verificando se os poços estavam realmente alinhados para que um clone não se misturasse a outro durante o processo de filtragem. Transferiu-se 150 µL do sobrenadante para a placa Millipore. A placa ficou 15 minutos a -20°C para compactar o “debris”. Após, centrifugou-se por 40 minutos a 2000 rpm. A placa Millipore foi removida e descartada. Ao filtrado foi adicionado 90 µL de isopropanol (gelado). A placa foi selada com adesivo e invertida novamente 10 vezes. O material foi centrifugado por 90 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 150 µL de etanol 70% gelado nos poços. A placa foi centrifugada por 40 minutos a 2000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e deu-se um “spin” (até 300 rpm) invertido sobre papel toalha. Para secagem do precipitado formado, a placa foi deixada aberta durante 10 minutos na estufa a 37°C. O DNA foi ressuspensado com 40 µL de água Milli-Q autoclavada. A placa foi coberta com adesivo

e ficou à temperatura ambiente por 30 minutos. Após, a placa foi agitada no vortex e guardada na geladeira.

### 3.8. SEQUENCIAMENTO DOS CLONES

#### 3.8.1. Preparo das amostras para sequenciamento

Após a extração dos plasmídeos (Mini-Preparação), o DNA foi quantificado e sua concentração ajustada para 200 ng/μL. As amostras para sequenciamento foram preparadas, em microplaca de 96 poços, com o kit de reação *ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready* (Applied Biosystems), nas seguintes proporções: 2 μL do iniciador (27 FB) (1,6 pmol/μL), 2 μL do tampão 5X (400 mM Tris-HCl pH 9; 10 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 μL de reativo BigDye (Applied Biosystems®), 5,5 μL de DNA (200-300ng), totalizando 10 μL. A reação foi realizada no termociclador Apollo™ ATC 401 nas seguintes condições: 40 ciclos de 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

#### 3.8.2. Purificação e precipitação da reação de sequenciamento

Nesta etapa, as amostras obtidas na PCR, foram precipitadas e limpas dos didesoxinucleotídios fluorescentes não incorporados durante a síntese de moléculas de DNA. Estes didesoxinucleotídios livres interferem com a leitura das bases durante o sequenciamento.

A precipitação, para a reação de sequenciamento do DNA, ocorreu da seguinte maneira: adicionou-se 30 μL de isopropanol 75% em cada poço. A placa foi levada ao vortex e submetida a um “spin” por 10 segundos a 1000 rpm. A placa ficou em repouso sob agitação da luz por 15 minutos. A placa foi centrifugada por 90 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, invertendo a placa em papel toalha. Foi colocada a placa invertida na mesa e foi realizado movimento circular com a placa para desprezar o excesso de isopropanol. Adicionou-se 50 μL de etanol 75% em cada poço. Centrifugou-se por 30 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, invertendo a placa em papel toalha. Foi colocada a placa invertida na mesa e foi realizado movimento circular com a placa para desprezar o excesso de etanol. A placa foi colocada invertida na centrífuga e deu-se um pulso até 500 rpm. A placa foi deixada à temperatura ambiente, protegida da luz, por 2 horas para secar. Após, o DNA presente no poço da placa, foi

ressuspendido em 5,5  $\mu$ L de água (GIBCO®). Deixou-se em repouso por 1 hora e agitou-se no vortex.

Após essa etapa as placas foram encaminhadas para o Sequenciador de DNA (Applied Biosystems modelo ABI 3700). A reação de sequenciamento foi realizada segundo metodologia padrão, por eletroforese capilar em um aparelho ABI Prism 3100 Genetic Analyzer Sequencer usando o kit *BigDye*<sup>®</sup> *Terminator* (Plataforma PDTIS/FIOCRUZ).

Os amplicons foram ligados ao vetor de clonagem pGEM-T (Promega) com T4 DNA ligase de acordo com as instruções do fabricante. A reação de ligação foi usada para transformar células eletrocompetentes (*E. coli*, DH10B). Em seguida, as células foram recuperadas por 1 h em meio SOC (Super Optimal Broth Catabolite) a 37°C sob agitação branda e plaqueadas para o isolamento de colônias em agar sólido contendo meio de cultura, IPTG (Isopropílico  $\beta$ -D-1 thiogalactopiranosídeo), X-Gal (bromo-indolil galactopiranosídeo cloro) e ampicilina. As colônias azuis foram descartadas e as positivas (brancas) separadas em placas de 96 poços contendo 150 $\mu$ l de meio de cultura CG (Circle Grow), glicerol 15% e ampicilina. As bibliotecas foram armazenadas a -70°C (VIEIRA et al, 2007).

Os procedimentos de sequenciamento foram realizados com réplicas de cada biblioteca crescida em placas de poço fundo contendo 1 ml de meio de cultura CG com ampicilina, a 37°C, por 22 h. Após a extração dos plasmídeos, o DNA foi quantificado e sua concentração ajustada para 200 ng/ $\mu$ l. A reação de seqüenciamento foi realizada segundo metodologia padrão, por eletroforese capilar em um aparelho ABI Prism 3100 Genetic Analyzer Sequencer usando o kit Big Dye Terminator na Plataforma PDTIS/FIOCRUZ. As seqüências com mais de 300 bases apresentando “Phred score” com uma qualidade maior ou igual a 20 foram consideradas boas e incluídas nas análises subseqüentes, as demais foram descartadas (DUFOUR, 1984).

### 3.9. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS E CONSTRUÇÃO DE ÁRVORES FILOGENÉTICAS

*Análise das sequencias* - Cada cromatograma obtido foi fornecido como arquivo de entrada ao programa PhredPhrap, que o transformou em dois arquivos de saída; um arquivo “fasta” onde cada pico do cromatograma é traduzido para sua base nitrogenada correspondente (A, T, C ou G) e um arquivo “qual” onde cada base recebe um valor de qualidade, que reflete o grau de confiança que se tem naquela posição (OLIVEIRA et al,

2010). Realizamos experiências de clusterização à 97% de identidade entre as sequências, com a finalidade de observar e quantificar as principais Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs), usando o programa MOTHUR (SCHLOSS et al, 2009), que em seguida foram comparadas com sequências depositadas em bancos de dados. As sequências também foram analisadas pelos programas “Mallard e Pintail” disponíveis na página do Bioinformatics Toolkit e as quimeras (sequências híbridas - sequências composta de fragmentos de DNA de origens diferentes) identificadas foram removidas da análise (COLE et al, 2005).

*Identificação dos taxa* - As sequências de boa qualidade foram alocadas no espaço filogenético por meio dos programas Ribosomal Database Project (RDP classifier tool) e BLASTn disponível no National Center for Biotechnology Information (NCBI), onde elas foram comparadas com sequências depositadas no GenBank (OLIVEIRA et al, 2010 e [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

*Análise filogenética e Índices de diversidade* - A primeira etapa na construção de árvores filogenéticas das comunidades microbianas presentes nas estações realizou-se pelo alinhamento das sequências com o programa Clustal X e a remoção das pontas com baixa qualidade (THOMPSON et al, 1997). Em seguida adicionadas ao arquivo de sequências dos filotipos, e de sequências consenso das OTUs, algumas sequências de referência obtidas no RDP II e no NCBI. Os índices de diversidade das OTUs foram determinados pela análise de rarefação (HECK et al, 1975). As análises estatísticas de riqueza e diversidade foram também calculadas usando o MOTHUR, incluindo estimativas de riqueza não paramétricas ACE, bootstrap, Chao1 e função Shannon. As árvores filogenéticas construídas pelo algoritmo neighbor-joining (SAITOU; NEI, 1987) baseadas nas distâncias calculadas pelo método Kimura-2 (KIMURA, 1980), usando o programa MEGA5 (KUMAR et al, 2001) e análise por meio de Bootstrapping com 1000 repetições. A percentagem relativa dos principais grupos de microrganismos identificados pelo BLAST-n foi calculada.

*Comparação Estatística da Cobertura das Bibliotecas* - As análises estatísticas das comunidades microbianas foram realizadas através de análises comparativas pelo programa LIBSHUFF (SCHLOSS et al, 2004) que utiliza os métodos de Monte Carlo para gerar curvas de coberturas homólogas e heterólogas das bibliotecas. As sequências foram aleatoriamente analisadas 999 vezes antes do cálculo da distância entre as curvas

usando o teste estatístico Cramér-von Mises. A matriz analisada pelo LIBSHUFF foi gerada pelo programa DNADIST de PHYLIP usando o modelo de Jukes-Cantor.

*Comparação das Comunidades Microbianas (UniFrac)* - Através das informações e relações filogenéticas comunidades microbianas foram comparadas entre si utilizando o diagrama de Venn, por meio do programas MOTHUR (SCHLOSS et al., 2009), e UniFrac, onde se quantifica a similaridade das mesmas. Esta ferramenta toma como entrada uma única árvore filogenética que contém sequências derivadas de pelo menos duas diferentes amostras ambientais e um arquivo que descreve as sequências que vieram da amostra (FIERER et al, 2010).

UniFrac permite:

- ✓ Determinar se os ambientes da árvore filogenética são significativamente diferentes entre as comunidades microbianas.
- ✓ Determinar se as diferenças da comunidade estão concentradas dentro das linhagens particulares da árvore filogenética.
- ✓ Determinar se há fatores ambientais, tais como a temperatura ou salinidade, influenciando no agrupamento de comunidades microbianas.
- ✓ Determinar se as amostras foram suficientes para apoiar os nós do cluster.
- ✓ Visualizar, graficamente, as diferenças entre os ambientes (LOZUPONE et al, 2006).

*Números de acesso das sequências de nucleotídeos* - Todas as sequências de 16S rDNA obtidas neste estudo foram cadastradas no Banco Internacional de Genes (GenBank) e receberam os seguintes números de acesso: JF692227-JF692723.

### 3.10. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA

Para a obtenção de culturas isoladas, as amostras foram semeadas em quatro meios de cultura diferentes com o objetivo de proporcionar a recuperação do maior número de espécies bacterianas. Um mililitro de cada amostra foi inoculada em 10 ml de BHI e incubados a 37°C. Após 24h, as culturas foram semeadas em agar sangue 5% (AS), Agar Brain Heart Infusion (BHI), que proporcionam o crescimento de vários micro-organismos; Agar Cetrimide (CET) seletivo para *Pseudomonas aeruginosa*, Agar Macconkey (MAC) seletivo para organismos Gram negativos e Agar Manitol Salgado (MSA) seletivo para organismos Gram positivos e incubados a 37°C por 24 a 48h. As

colônias puras selecionadas foram submetidas a coloração de Gram e os morfotipos representativos foram selecionados para a identificação molecular através do sequenciamento do gene *rrs* do 16S rRNA. Após a identificação os isolados foram preservados em glicerol 20% a -70°C.

### 3.11. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

#### 3.11.1. Identificação bioquímica (pelo Vitek2)

Foi preparado o inóculo a partir de uma cultura pura, de acordo com as boas práticas laboratoriais. As colônias selecionadas foram isoladas de uma placa primária conforme os requisitos de cultura e incubadas adequadamente. Foi preparado asépticamente 3,0 mL de solução salina estéril (NaCl aquoso de 0,45% a 0,50%, pH 4,5 a 7,0) em um tubo de ensaio de plástico (poliestireno) transparente (12 mm x 75 mm), utilizando uma alça bacteriana estéril ou descartável foi transferido um número suficiente de colônias morfológicamente idênticas para o tubo com a solução salina. A suspensão de microrganismo foi preparada e homogeneizada com uma densidade equivalente a um padrão McFarland N. 0,50 a 0,63, usando o calibrador do DensiCHEK™ VITEK®2 e colocado no tubo da suspensão e a carta GN (Gram Negativo) e/ou GP (Gram Positivo) no cassete.

### 3.12. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

Foi empregado o método de difusão de discos em ágar Mueller-Hinton modificado segundo o CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute), 2011; o mesmo órgão que preconiza os antibióticos a serem utilizados baseados na identificação dos microrganismos. Neste estudo foram empregados: piperacilina/tazobactan (110µg); ticarcilina/ácido clavulânico (75/10µg); ceftazidima (30µg); cefepima (30µg); imipeném (10µg); meropenem (10µg); aztreonam (30µg); gentamicina (10µg); ciprofloxacina (5µg); norfloxacina (10µg); tobramicina (10µg); polimixina B (300 UI); ampicilina (10µg); tetraciclina (30µg); doxiciclina (30µg); sulfonamidas (300µg); cotrimoxazol (25µg); cloranfenicol (30µg); claritromicina (15µg); ampicilina/sulbactam (10/10µg). Controle da qualidade dos discos com cepas de referência: *E. coli* INCQS 00033 (ATCC 25922), *P. aeruginosa* INCQS 00099 (ATCC 853) e *S. aureus* INCQS 00015 (ATCC 25923).

Inoculou-se com uma alça bacteriológica descartável, uma quantidade mínima do cultivo do ágar nutriente numa solução com 3 mL de salina estéril a 0,5%. A suspensão obtida foi de acordo com 0,5 na escala de McFarland ( $1-2 \times 10^8$  UFC/mL). Após a homogeneização da suspensão, essa foi semeada em placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton, usando-se um swab. O swab foi umedecido com a solução bacteriana e o excesso retirado comprimindo-se o mesmo contra as paredes do tubo contendo a solução. A inoculação no ágar foi feita em toda a extensão do meio de cultura girando-se a placa. Após aproximadamente 15 minutos de semeadura, os discos de difusão foram colocados sobre o ágar com o auxílio de uma pinça.

As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após, examinou-se cada placa para verificar se houve uniformidade no crescimento bacteriano, se havia presença de contaminantes e se os halos de inibição resultantes eram circulares. Após 24 horas, com o auxílio de um paquímetro, foi realizada a medição dos diâmetros dos halos de inibição (em mm) do crescimento bacteriano presentes ao redor dos discos de antimicrobianos, e as amostras foram classificadas em sensíveis, ou resistentes, utilizando-se os limites de sensibilidade estabelecidos pelo CLSI (SEJAS, 2003).

### 3.13. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

*Extração e purificação do DNA genômico dos isolados* - O DNA genômico de cada isolado foi extraído e purificado segundo o protocolo do kit *Dnaeasy® Blood & Tissue* (Qiagen®) para células Gram positivas e Gram negativas. Uma alça bacteriológica do crescimento bacteriano foi ressuspensa no tampão indicado e foi seguido todo o procedimento de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA genômico foi verificada em gel de agarose (1%) (Sigma®) numa corrida eletroforética a 70 volts por 50 minutos, em tampão TBE 0,5X e com a inclusão de um padrão de peso molecular (100 pb DNA ladder INVITROGEN®) no gel corado com brometo de etídio (10 mg/mL). A revelação do gel foi em um sistema de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE Healthcare).

*Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)* - Foi realizada a amplificação dos DNAs dos isolados pela reação em cadeia pela polimerase. A mistura da reação totalizou 50 µL e foi composta pelos seguintes reagentes: 25 pmol dos iniciadores universais para bactéria do gene *rrs* do 16S RNAr 27BF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492 RAB (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (LANE, 1991), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 mM de

cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs - dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1U de *Taq* DNA polimerase (INVITROGEN®), solução-tampão da PCR 1X (20mM Tris-HCl-pH8.4, 50mM KCl), ~ 50ng do DNA da amostra e água deionizada estéril (INVITROGEN®). As cepas de referência *Haloferax volcanii* (CT) DSMZ 3757/ATCC 29605 e *Escherichia coli* INCQS: 00031/ATCC 10536 foram empregadas para avaliar a especificidade dos iniciadores (controles das amostras) e uma alíquota de água deionizada estéril foi empregada para avaliar a ausência de DNA contaminante na mistura da PCR (controle da reação).

A amplificação foi realizada no equipamento termociclador Peltier Thermal Cycler, modelo PTC-200, MJ Research, nas seguintes condições: desnaturação inicial 94°C por 05 minutos; 30 ciclos: 94°C por 90 segundos, 50°C por 90 segundos e extensão a 72°C por 02 minutos e uma extensão adicional a 72°C por 05 minutos.

Para visualização dos produtos amplificados, alíquotas de 10 µL dos produtos da reação foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% (Sigma®), a 70 volts por 50 minutos. Como tampão de corrida utilizou-se TBE 0,5X. Submeteu-se também à corrida eletroforética o padrão de peso molecular (100 pb DNA ladder INVITROGEN®). A coloração do gel foi realizada com solução de brometo de etídio (10 mg/mL) e foi analisada através do sistema de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE Healthcare). O brometo de etídio é um agente intercalante de DNA e permite a visualização das bandas de DNA, quando exposto à luz ultravioleta. Os produtos da PCR foram purificados pelo Kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen®).

*Sequenciamento do isolados* - Após amplificação pela PCR dos DNAs dos isolados, os produtos foram quantificados e suas concentrações ajustadas para 200 ng/µL. Utilizou-se o kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing* e a reação de sequenciamento foi constituída de 5,5 µL de DNA (200ng), 2 µL de iniciador (27FB) (1,6 pmol/µL), 1 µL de reativo BigDye (Applied Biosystems), 1,5 µL de tampão BigDye, num volume final de 10 µL. A reação de sequenciamento foi conduzida em termociclador Apollo™ ATC 401 com as seguintes condições: 40 ciclos de 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. A seguir, o produto das reações foi precipitado adicionando-se a cada poço 30 µL de isopropanol 75%. A placa foi levada ao vortex e submetida a um “spin” por 10 segundos a 1000 rpm. A placa ficou em repouso sob proteção da luz por 15 minutos. A placa foi centrifugada por 90 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, invertendo a placa em papel toalha. Foi colocada a placa

invertida na mesa e foi realizado movimento circular com a placa para desprezar o excesso de isopropanol. Adicionou-se 50 µL de etanol 75% em cada poço. Centrifugou-se por 30 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi desprezado, invertendo a placa em papel toalha. Foi colocada a placa invertida na mesa e foi realizado movimento circular com a placa para desprezar o excesso de etanol. A placa foi colocada invertida na centrífuga e deu-se um pulso até 500 rpm. A placa foi deixada à temperatura ambiente, protegida da luz, por 2 horas para secar. Após, o DNA presente no poço da placa, foi ressuspenso em 5,5 µL de água (GIBCO®). Deixou-se em repouso por 1 hora e agitou-se no vortex.

Após, a placa foi encaminhada para o setor de sequenciamento para a reação de desnaturação. A reação de sequenciamento foi realizada segundo metodologia padrão, por eletroforese capilar em um aparelho ABI Prism 3700 Genetic Analyzer Sequencer (Plataforma PDTIS/FIOCRUZ).

#### 3.14. PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS

Logo após o isolamento, as cepas foram preservadas em caldo BHI com glicerol a 20% e estocadas a -70°C. Após a identificação fenotípica e molecular, os isolados foram preservados por liofilização e armazenados na Coleção de Microrganismos do INCQS/FIOCRUZ.

## 4 RESULTADOS

### 4.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

O pH dos cinco pontos analisados se mantiveram entre 7,1 a 7,9 dentro da faixa de pH de crescimento da maioria dos micro-organismos (Tabela 2). A turbidez apresentou concentrações elevadas nos pontos JC342 e CM320, principalmente devido à presença de sólidos suspensos na água. A presença de matéria orgânica, micro-organismos e outros materiais diversos provocam a dispersão e a absorção da luz, dando à água uma aparência nebulosa. Os outros pontos apresentaram valores menores (Tabela 2).

Os níveis de oxigênio dissolvido apresentaram o maior e o menor valor nos pontos CM320 e MR369, respectivamente. Os elevados níveis de OD são essenciais para os microrganismos biodegradadores de matéria orgânica. Nos pontos TJ306 e JOÁ, o OD diminui uma vez que durante a estabilização da matéria orgânica, os microrganismos aeróbios presentes fazem uso do oxigênio nos seus processos respiratórios causando uma redução acentuada da sua concentração no meio (Tabela 2).

A temperatura dos pontos de coleta manteve-se de 20°C à 24°C favorecendo as formas mesófilas presentes (Tabela 2). A condutividade foi progressivamente aumentando desde o ponto R-JM, amostra de água doce, até o nível mais alto no ponto JOÁ, o mais próximo da água marinha, que é diretamente proporcional à ionização de substâncias dissolvidas no líquido, assim como a salinidade nesses mesmos pontos. A dissolução de eletrólitos em água aumenta a condutividade (tabela 2).

**Tabela 2. Dados físico-químicos dos pontos de coleta (n=8)**

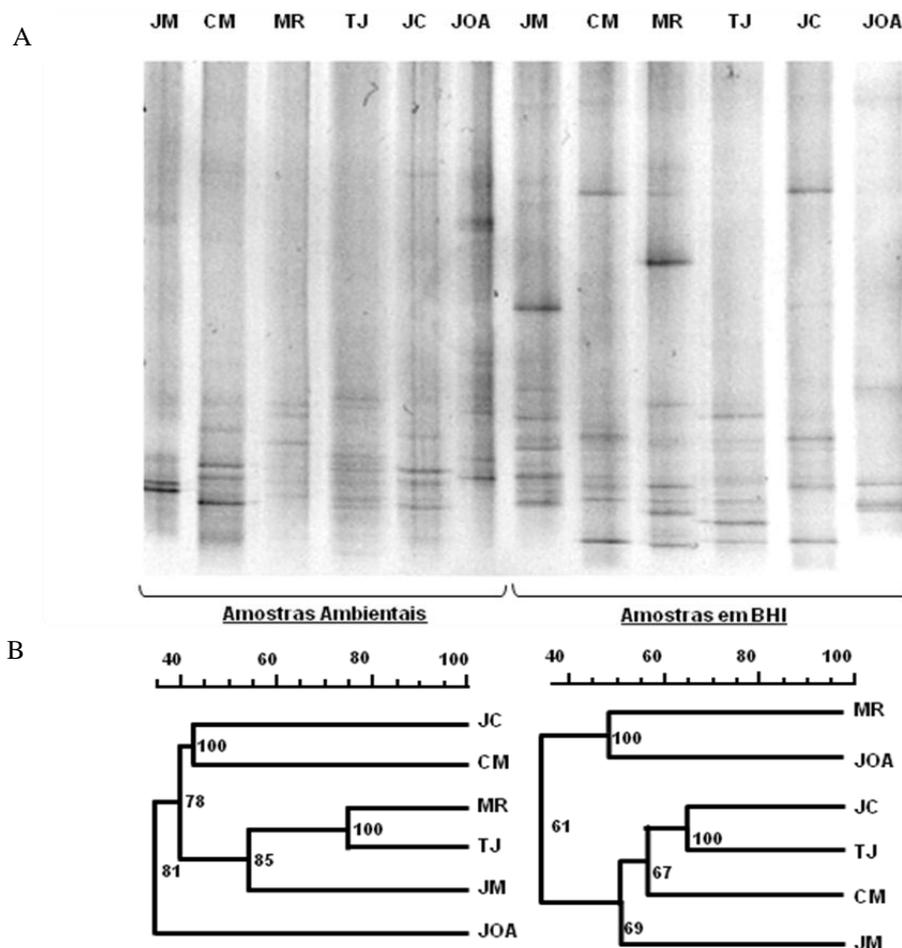
Locais	Salinidade (%)	pH	Condutividade (MS/cm)*	Turbidez (UNT)**	OD (mg/L)***	Temperatura (°C)
JM	0,00	7,9	0,112	0	5,8	20
JC342	0,25	7,1	4,8	139	5,52	24,3
CM320	0,36	7,4	6,74	140	6,57	24,3
MR369	0,55	7,1	9,88	74	4,97	24,2
TJ306	1,05	7,1	17,8	45	5,5	24
MR361	1,31	7,9	21,7	36	6,17	24,3
TJ303	2,13	7,6	33,8	22	6,3	23,8
JOÁ	3,34	7,9	50,7	1	5,5	23,5

\*Em *MiliSiemens* – mS/cm; \*\* em Unidades Nefelométricas de Turbidez – NTU; \*\*\* em mg/L

#### 4.2. DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS - DGGE

A análise pelo DGGE revelou que as amostras ambientais e de enriquecimento apresentaram comunidades bacterianas distintas, bem como dentro dos seis pontos de coletas representativos (JM, CM, MR, TJ, JC e JOA) para cada uma das duas abordagens (Figura 4). Relações entre as comunidades resultaram em um total de 12 perfis, seis para amostras ambientais e seis originadas do meio enriquecido em BHI.

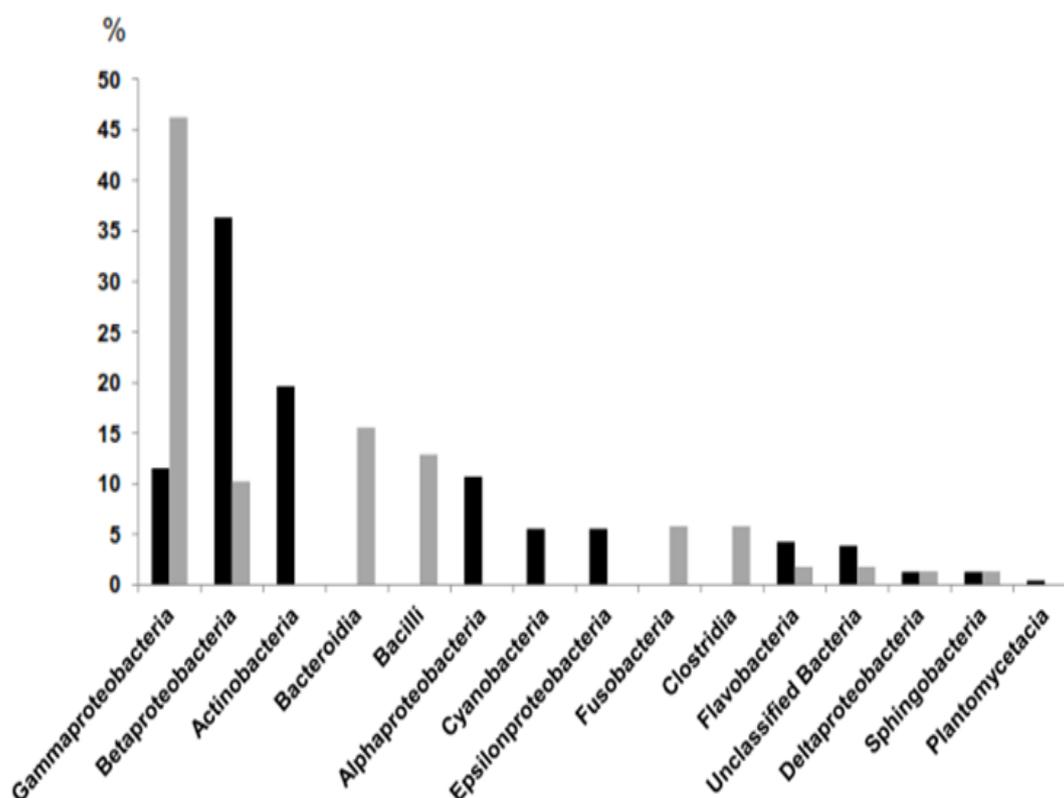
Os perfis de bandas das amostras provenientes de DNA ambientais resultaram em três grupos. O grupo um, incluindo JC e CM (42% de similaridade) agrupados em 40% com o segundo grupo (MR, TJ e JM). A comunidade mais distante relacionada ao JOA agrupou em 32% com os grupos 1 e 2. Os perfis de amostras de enriquecimento resultaram em dois grupos principais, o primeiro contendo MR e JOA (50%) e um segundo com o maior número de amostras TJ, JC, CM e JM. Estes dois grupos apresentaram menos de 35% de similaridade (figura 4).



**Figura 4.** Análise de DGGE das comunidades bacterianas de amostras ambientais e de enriquecimento de ecossistema Jacarepaguá. (A) Padrões de bandas do gene *rrs* do 16S RNAr amplificados pela PCR. (B) Dendrogramas gerados com base na imagem do perfil de bandas do DGGE de amostras do DNA ambiental e da fração enriquecida cultivada, gerada pelo programa Bionumeric.

#### 4.3. COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA BACTERIANA

A posição taxonômica das sequências do gene *rrs* recuperadas de nossas bibliotecas foi determinada por meio da ferramenta de classificação taxonômica do programa “Ribossomal Data Project” - RDP. Quatorze classes distintas foram identificadas, quatro delas (*Bacteroidia*, *Bacilli*, *Fusobacteria* e *Clostridia*) foram representadas exclusivamente nas bibliotecas de cultura enriquecida (c) enquanto cinco classes (*Actinobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Epsilonbacteria* e *Planctomycetacia*) foram representadas exclusivamente nas bibliotecas de DNA ambiental (a). *Gammaproteobacteria* foi a classe mais abundante na biblioteca de culturas enriquecidas, enquanto *Betaproteobacteria* foi a classe mais abundante na biblioteca ambiental (Figura 5). As sequências de isolados foram afiliadas com membros das ordens *Lactobacillales*, *Enterobacteriales*, *Vibrionales*, *Bacillales* e *Pseudomonadales* a partir das análises de identidade no Blast-n. (Figura 8).



**Figura 5. Distribuição taxonômica das classes bacterianas.** Sequências obtidas da biblioteca gênica *rrs* das amostras ambientais ■ e das culturas enriquecidas - BHI ■ foram atribuídas às classes taxonômicas pelo RDP classifier conforme threshold a 90%.

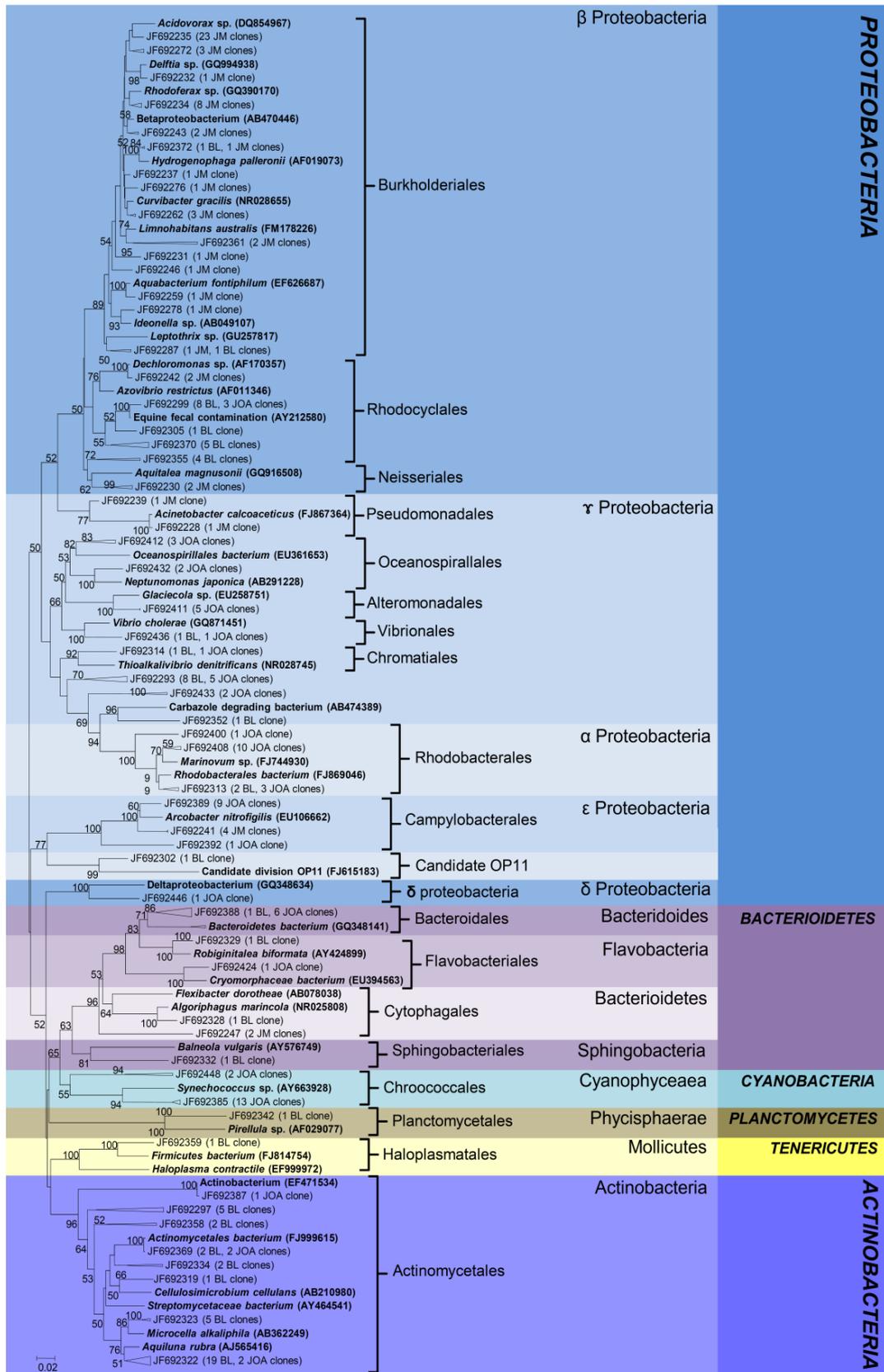
#### 4.4. ANÁLISE FILOGENÉTICA

As sequências de JM(a) foram dominadas pela classe *Betaproteobacteria* especialmente por membros das ordens *Burkholderiales*, *Rhodocyclales* e *Neisseriales* (Figura 6). Dois clones de *Cytophagales*, quatro clones relacionadas com *Arcobacter nitrofigilis* e um de *Acinetobacter calcoaceticus* também foram observadas neste ambiente de água doce pristina. Nas águas das lagoas LB(a), os grupos mais abundantes foram *Actinomycetales* seguidos por *Rhodocyclales* e *Rhodobacteriales* que compartilharam a mesma OTUs com a biblioteca de água marinha JOA(a), enquanto *Vibrionales*, *Chromatiales*, *Bacteroidales*, *Flavobacteriales*, *Sphingobacteriales* e *Planctomycetales* foram observados em menor proporção. Nove clones relacionados com bactérias provenientes de contaminação fecal equina e um clone relacionado com o candidato da divisão OP11 também foram observados na LB(a). Nas sequências de água marinha JOA(a), *Cyanobacteria*, representado por *Chroococcales* e *Gammaproteobacteria*, foram os grupos dominantes enquanto apenas algumas sequências foram relacionadas com *Actinobacteria*, *Deltaproteobacteria* e *Bacteroidetes*. Ressalta-se que foram identificados dois clones afiliados a *Vibrio cholera*, um na água do mar e outro na lagoa de Marapendí.

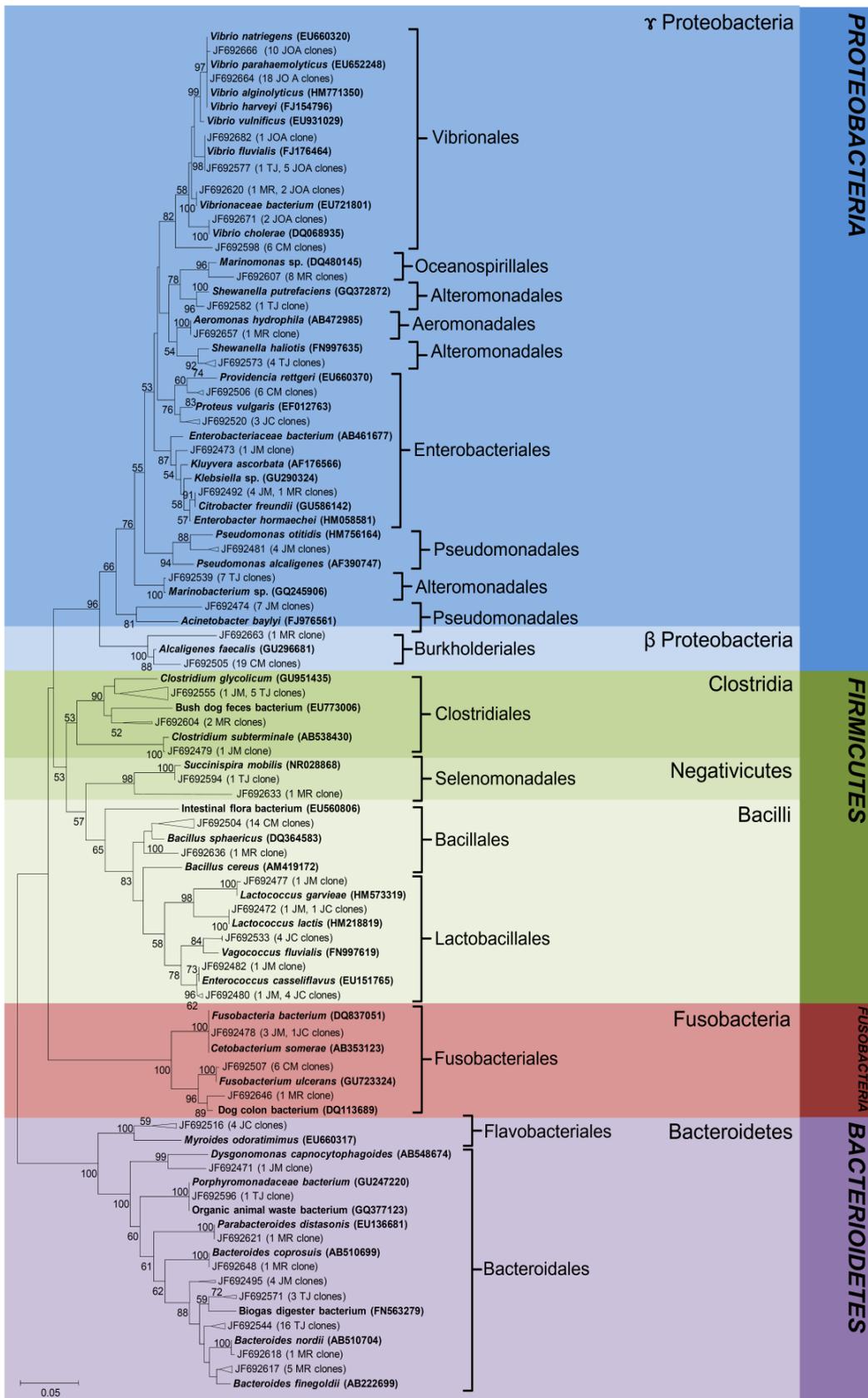
A análise filogenética das sequências de bactérias obtidas a partir do enriquecimento em BHI é demonstrada na Figura 7. Quatro principais filos bacterianos: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Fusobacterias* foram observados. Na biblioteca da água pristina JM(c), clones relacionadas com *Pseudomonadales* foram os mais abundantes, seguidos por aqueles relacionados com *Bacteroidales*, *Enterobacteriales*, *Lactobacillales*, *Fusobacteriales* e *Clostridiales*. *Enterobacteriales* foram encontrados na água das lagoas CM(c), MR(c) e JC(c), enquanto *Pseudomonadales* estavam presentes na lagoa TJ(c). Clones relacionadas com *Clostridiales* e *Bacteroidales* foram comuns entre as lagoas MR(c) e TJ(c), enquanto sequências relacionadas com *Lactobacillales* foram detectados na lagoa de JC(c). Sequências relacionadas com *Fusobacteriales* foram observadas nas amostras das lagoas de CM(c) e MR(c) e um clone na lagoa de JC(c). Na amostra da lagoa de MR(c), sequências relacionadas com *Oceanospirallales* e *Aeromonadales* foram detectados. No entanto, os clones relacionados com *Burkholderiales* e *Bacillales* foram divididas com os ambientes de CM(c) e *Selenomonadales* com TJ(c). Organismos da ordem *Alteromonadales* foram observados apenas na lagoa da TJ(c). A ordem *Vibrionales*, foi

amplamente representada por vários clones, foram encontrados na água marinha do JOA(c) e nas amostras das lagoas de CM(c), TJ(c) e MR(c).

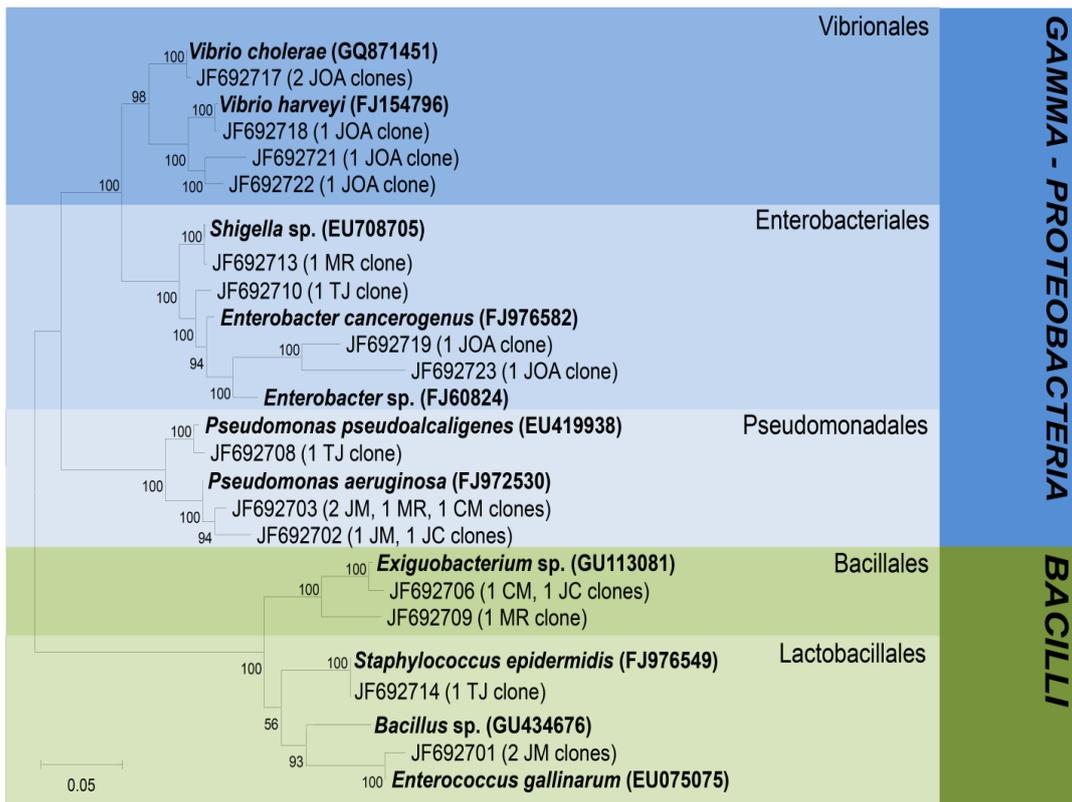
Foram também analisadas as relações filogenéticas das cepas de bactérias isoladas de água doce JM(i), água poluída de JC(i), TJ(i), MR(i) e CM(i) e de água marinha do JOA(i) (Figura 8). As bactérias isoladas foram compostas por apenas dois filos principais, 72% *Firmicutes* e 28% de *Proteobacteria* com membros divididos nas ordens dos *Lactobacillales*, *Enterobacteriales*, *Vibrionales*, *Bacillales* e *Pseudomonadales*. Cepas isoladas de JM(i) pertencem aos gêneros *Enterococcus gallinarum* e *Pseudomonas aeruginosa*, que também foram isoladas das lagoas poluídas de MR(i), CM(i) e JC(i). Amostras de isolados recuperados de CM(i), JC(i), MR(i) e (i)TJ foram relacionadas com a *Shigella* sp., *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Staphylococcus epidermidis*, e *Exiguobacterium* sp.. Isolados bacterianos da água do mar do JOA(i) foram afiliados a ordens dos *Vibrionales* e *Enterobacteriales*.



**Figura 6. Árvore filogenética dos clones bacterianos do DNA ambiental.** Sequências de referência do GenBank são apresentadas em negrito. OTUs foram definidas usando um nível de distância de 3% pelo algoritmo de distante no MOTHUR. Número de acesso de cada OTU é exibido. A topologia da árvore é baseada na análise de Neighbor Joining e o *bootstrap* foi calculado com 1000 repetições. Valores de *bootstrap* <50 não foram mostrados.



**Figura 7.** Árvore filogenética dos clones bacterianos do meio de cultura enriquecido em BHI. Sequências de referência do GenBank são apresentadas em negrito. OTUs foram definidas usando um nível de distância de 3% pelo algoritmo de distante no MOTHUR. Número de acesso de cada OTU é exibido. A topologia da árvore é baseada na análise de Neighbor Joining e o *bootstrap* foi calculado com 1000 repetições. Valores de *bootstrap* <50 não foram mostrados.



**Figura 8. Árvore filogenética dos isolados.** Sequências de referência do GenBank são apresentadas em negrito. OTUs foram definidas usando um nível de distância de 3% pelo algoritmo de distância no MOTHUR. Número de acesso de cada OTU é exibido. A topologia da árvore é baseada na análise de Neighbor Joining e o *bootstrap* foi calculado com 1000 repetições. Valores de *bootstrap* < 50 não foram mostrados.

## 4.5. ANÁLISE FENOTÍPICA

### 4.5.1. Identificação dos isolados

Foram obtidos 22 isolados dos pontos de coleta analisados sendo: JM (n=5), Lagoa da Tijuca (n=6), Lagoa do Camorim (n=2), Lagoa de Jacarepaguá (n=2), Lagoa de Marapendi (n=3) e Canal do Joá (n=4). Dos 22 isolados 13 (59 %) foram identificados tanto pela bioquímica quanto pelo sequenciamento e 9 foram identificados somente pelo sequenciamento do gene *rrs* do 16S rRNA.

Dois isolados de JM foram identificados como *Enterococcus gallinarum* pelo sequenciamento do gene *rrs* do 16S rRNA, porém não apresentaram identificação pela bioquímica e três isolados foram identificados como *Pseudomonas aeruginosa* pelo sequenciamento do gene *rrs*, desses apenas um foi identificado como o mesmo organismo pela bioquímica (Tabela 3).

Três isolados da Lagoa da Tijuca foram identificados como *Pseudomonas pseudoalcaligenes* pelo sequenciamento e como *Pseudomonas mendocina* e *Burkholderia cepacia* pela bioquímica. O quarto isolado foi identificado como *Citrobacter* sp., sugestivos de *Citrobacter youngae* ou *Citrobacter freundii* pelo Vitek2, pela análise do sequenciamento foi identificado como *Citrobacter freundii* (Tabela 3). O quarto isolado da Tijuca, assim como um isolado de cada uma das lagoas (Jacarepaguá, Camorim e Marapendi) não apresentaram resultado na identificação bioquímica, porém através do sequenciamento do gene *rrs* do 16S rRNA demonstraram similaridade com *Exiguobacterium* sp., o mesmo ocorreu com o quinto isolado desta Lagoa que teve sua identificação apenas pelo sequenciamento com alta similaridade para *Staphylococcus epidermidis* (Tabela 3). Três cepas das lagoas de Jacarepaguá, Camorim e Marapendi apresentaram altas similaridades com *Pseudomonas aeruginosa*, tanto pelo Vitek2 quanto pelo sequenciamento do gene *rrs* do 16S rRNA. Um último isolado da lagoa de Marapendi revelou 97% de identidade com a *Escherichia coli* pelo Vitek2 enquanto o sequenciamento resultou 96% de similaridade com *Shigella* sp. (Tabela 3).

Os três isolados do Joá apresentaram alto percentual de similaridade com *Vibrio parahaemolyticus* através do Vitek2, todavia as mesmas cepas analisadas através do gene *rrs* foram identificadas como *Vibrio harveyi*. O *V. cholerae* identificado pelo sequenciamento do gene *rrs*, com similaridade de 97%, não foi identificado pela bioquímica (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação bioquímica e molecular dos isolados

Isolados	Local	Ponto de coleta	Sequenciamento do gene <i>rrs</i> do 16S rRNA / (%) identidade	Identificação através do Vitek 2 / (%) probabilidade
R1	Reservatório	JM	<i>E. gallinarum</i> (93%)	***
R2	Reservatório	JM	<i>E. gallinarum</i> (94%)	***
R3	Reservatório	JM	<i>P. aeruginosa</i> (94%)	<i>P. aeruginosa</i> (99%)
R4	Reservatório	JM	<i>P. aeruginosa</i> (93%)	***
R5	Reservatório	JM	<i>P. aeruginosa</i> (95%)	***
LT1	Lagoa da Tijuca	TJ303	<i>P. pseudoalcaligenes</i> (96%)	<i>P. mendocina</i> (90%)
LT2	Lagoa da Tijuca	TJ303	<i>P. pseudoalcaligenes</i> (96%)	***
LT3	Lagoa da Tijuca	TJ303	<i>P. pseudoalcaligenes</i> (97%)	<i>Burkholderia cepacia</i> **
LT4	Lagoa da Tijuca	TJ306	<i>C. freundii</i> (96%)	<i>Citrobacter</i> sp. *
LT5	Lagoa da Tijuca	TJ306	<i>Exiguobacterium</i> sp. (97%)	***
LT6	Lagoa da Tijuca	TJ306	<i>S. epidermidis</i> (97%)	***
LJ1	Lagoa de Jacarepaguá	JC342	<i>Exiguobacterium</i> sp. (96%)	***
LJ2	Lagoa de Jacarepaguá	JC342	<i>P. aeruginosa</i> (97%)	<i>P. aeruginosa</i> (98%)
LC1	Lagoa de Camorim	CM320	<i>Exiguobacterium</i> sp. (93%)	***
LC2	Lagoa de Camorim	CM320	<i>P. aeruginosa</i> (99%)	<i>P. aeruginosa</i> (99%)
LM1	Lagoa de Marapendi	MR361	<i>Exiguobacterium</i> sp. (96%)	***
LM2	Lagoa de Marapendi	MR361	<i>P. aeruginosa</i> (99%)	<i>P. aeruginosa</i> (99%)
LM3	Lagoa de Marapendi	MR369	<i>Shigella</i> sp. (96%)	<i>E. coli</i> (97%)

Isolados	Local	Ponto de coleta	Sequenciamento do gene <i>rrs</i> do 16S rRNA / % similaridade	Identificação através do Vitek 2 / % similaridade
CJ1	Canal do Joá	JOA	<i>V. harveyi</i> (94%)	<i>V. parahaemolyticus</i> (99%)
CJ2	Canal do Joá	JOA	<i>V. harveyi</i> (94%)	<i>V. parahaemolyticus</i> (99%)
CJ3	Canal do Joá	JOA	<i>V. harveyi</i> (96%)	<i>V. parahaemolyticus</i> (99%)
CJ4	Canal do Joá	JOA	<i>V. cholerae</i> (97%)	***

\*Baixa discriminação segundo Vitek2

\*\*Excelente discriminação

\*\*\*Organismo não identificado

#### 4.5.2. Susceptibilidade aos antimicrobianos

De um total de 22 isolados obtidos de diferentes pontos de coleta, 50% demonstraram reduzida susceptibilidade a vários antibióticos analisados (Tabela 4). A resistência simultânea a três antibióticos foi observada em três isolados, *Enterococcus gallinarum* (R1) de JM, *Pseudomonas aeruginosa* (LM1) de MR361 e *Vibrio fluvialis* (CJ1) do JOA. Embora nenhum isolado tenha demonstrado resistência apenas para ceftazidima (CAZ), 90% dos isolados foram resistentes a estreptomicina (ATM). O teste de susceptibilidade revelou cinco perfis diferentes entre as bactérias isoladas de JM(i), BL(i) e JOA(i) que foram resistentes a pelo menos um dos antibióticos utilizados neste estudo, pertencentes a duas classes: os β-lactâmicos: cefalosporina e monobactâmico, e o aminoglicosídeos. A identidade de cada isolado foi determinada pela análise de sequenciamento parcial do gene *rrs* do 16S rRNA e analisadas em relação do percentual de identidade obtida no programa BLAST-n (Tabela 4).

**Tabela 4. Perfil de resistência aos antibióticos dos isolados bacterianos**

Local	Isolados	Número de Acesso	NCBI (best hits) identidade (%)	CAZ	ATM	TOB
JM	<b>R1</b>	EU075075	<sup>1</sup> <i>E. gallinarum</i> (100%)	■	■	■
TJ303	<b>LT1</b>	EU419938	<sup>2</sup> <i>P. pseudoalcaligenes</i> (96%)	■	■	■
TJ306	<b>LT2</b>	GU120647	<sup>2</sup> <i>Exiguobacterium</i> sp. (96%)	■	■	■
CM320	<b>LC1</b>	HQ622549	<sup>2</sup> <i>Exiguobacterium</i> sp. (93%)	■	■	■
MR361	<b>LM1</b>	HM461147	<sup>2</sup> <i>P. aeruginosa</i> (95%)	■	■	■
MR369	<b>LM2</b>	GU968176	<sup>2</sup> <i>Shigella</i> sp. (96%)	■	■	■
JC342	<b>LJ1</b>	AY745848	<sup>2</sup> <i>Exiguobacterium</i> sp. (95%)	■	■	■
JOÁ	<b>CJ1</b>	FR695475	<sup>1</sup> <i>V. fluvialis</i> (94%)	■	■	■
JOÁ	<b>CJ2</b>	GQ871451.1	<sup>3</sup> <i>V. cholerae</i> (95%)	■	■	■
JOÁ	<b>CJ3</b>	FJ154796.1	<sup>3</sup> <i>V. harvery</i> (96%)	■	■	■
JOÁ	<b>CJ4</b>	CP002555.1	<sup>4</sup> <i>V. cholerae</i> (98%)	■	■	■

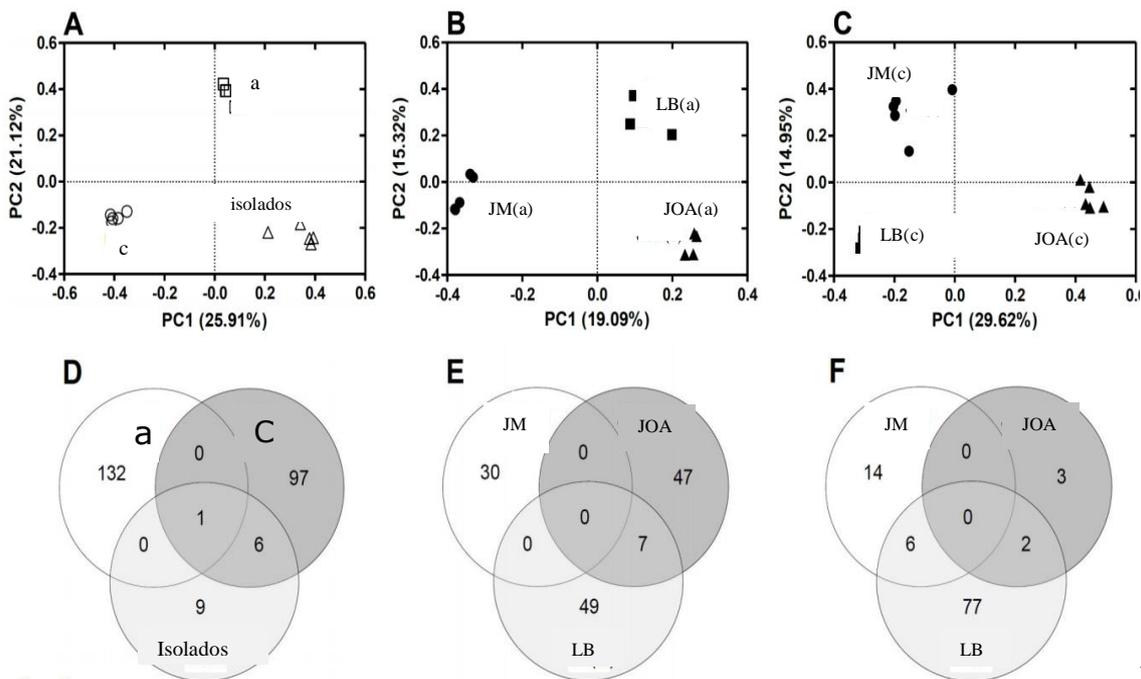
Meios de cultura seletivos utilizados no isolamento das culturas (1) agar Manitol Salgado, (2) agar Cetrimide, (3) agar Sangue, (4) agar MacConkey, ■ Resistente, ■ Susceptível, (5). Isolado (R1) - Reservatório, Isolados (LT1 e LT2) - Lagoa da Tijuca, Isolado (LC1) - Lagoa de Camorim, Isolados (LM1 e LM2) - Lagoa de Marapendi, Isolados (LJ1 e LJ2) - Lagoa de Jacarepaguá, Isolados - (CJ1, CJ2, CJ3 e CJ4) Canal do Joá. Antibióticos: CAZ – Ceftazidima, ATM – Astreonom, TOB – Tobramicina.

#### 4.7. COMPARAÇÃO ENTRE AS COMUNIDADES BACTERIANAS

O programa UniFrac foi utilizado para agrupar as sequências do gene *rrs* do 16S rRNA de acordo com as semelhanças compartilhadas na composição da comunidade e para comparar três diferentes conjuntos de dados (JM, LB e JOA) através da análise de coordenadas principais (PCA). Inicialmente, sequências das bibliotecas ambientais JM(a), LB(a) e JOA(a) foram combinadas para representarem sequências do DNA ambiental(a) e comparados com os das culturas do enriquecimento em BHI(c) e dos isolados bacterianos (Fig. 9A). No gráfico de dispersão, comunidades bacterianas recuperadas pelas três diferentes abordagens metodológicas foram significativamente diferentes. Então, aleatoriamente, foram comparadas sequências de sub-amostras a partir das bibliotecas de água doce JM(a), lagoas de Jacarepaguá LB(a) e água do mar JOA(a) (Fig. 9B). Claramente, as seqüências sub-amostradas foram similares no mesmo ambiente e significativamente diferente entre JM, LB e JOA. Em relação às

comunidades do enriquecimento em BHI, quando JM(c) foi comparado com LB(c) e JOA(c), PC1 e PC2 geraram 29,62% e 14,95% de variação dos dados, respectivamente, demonstrando que as comunidades diferem de acordo com cada amostra ambiental utilizada para o enriquecimento em BHI (Fig. 9C).

As intercessões das OTUs agrupadas a 97% de similaridade foram observadas pelo diagrama de Venn. Na comparação entre as três abordagens metodológicas adotadas, apenas uma OTU foi compartilhada entre as bibliotecas ambientais e as do enriquecimento, enquanto a comparação entre as bibliotecas do enriquecimento e dos isolados apresentaram 6 OTUs comuns (Figura 9D). A outra análise comparativa entre as bibliotecas ambientais (JM, LB e JOA) resultou no compartilhamento de sete OTUs entre JOA e LB e nenhuma OTU comum com JM (Figura 9E). Quanto as bibliotecas do enriquecimento em BHI não verificamos nenhuma OTU comum entre as comunidades das três bibliotecas, no entanto, JM e LB dividiram seis OTUs enquanto apenas duas OTUs foram comuns a LB e JOA (Figura 9F).



foi gerada usando uma única árvore filogenética contendo sequências derivadas de três diferentes abordagens: metagenômica, cultivável e isolados. (A) Comparação entre as bibliotecas de DNA ambiental (a), culturas em meio enriquecido - BHI (c) e isolados. (B) Comparação entre as bibliotecas de DNA ambiental (a) dos pontos de coleta de água marinha (JOA), água salobra das lagoas (LB) e de água doce (JM), e (C) Comparação entre as bibliotecas de meio de cultura enriquecido em BHI (c) das amostras de água marinha (JOA), água salobra das lagoas (LB) e pontos de água doce (JM). Diagrama de Venn (D) a partir de bibliotecas de DNA ambiental (a), as culturas de enriquecimento (c) e isolados. (E) diagrama de Venn das bibliotecas de DNA ambiental da amostragem da água marinha (JOA), água das lagoas (LB) e de água doce (JM), e (F) diagrama de Venn das bibliotecas de enriquecimento de cultura em BHI da água marinha (JOA), das lagoas (LB) e água doce (JM).

## 5 DISCUSSÃO

A água é sem dúvida um dos recursos naturais mais valiosos do nosso planeta e, embora plenamente consciente disso, as atividades humanas têm aumentado os índices de poluição comprometendo a qualidade dos ecossistemas aquáticos (OLABISI; AWONUSI, 2008). As lagoas costeiras urbanas de Jacarepaguá estão experimentando impactos antrópicos de eutrofização com intensidade e frequência sem precedentes, o que pode, direta ou indiretamente, causar alterações na estrutura e organização da diversidade microbiana das lagoas e comprometer a qualidade da água.

A rápida redução nos custos de sequenciamento de DNA tem permitido a utilização de técnicas independentes de cultivo como a construção de bibliotecas gênicas de amostras ambientais. Essa abordagem é considerada uma ferramenta eficiente e precisa na implementação do monitoramento dos corpos d'água, especialmente em relação às questões de saúde pública, tais como a propagação de doenças de veiculação hídrica, com objetivo de complementar os ensaios de determinação de coliformes que apresentam limitações (SAVICHETCHEVA; OKABE, 2006). Além disso, uma vez que as bactérias cultiváveis representam 1 a 10% da população microbiana estimada, é fundamental que técnicas independentes de cultivo devam ser aplicadas na determinação da diversidade microbiana no ambiente (OSMAN et al., 2008)

As análises de diversidade microbiana, consideradas prioridade nas pesquisas ecológicas atuais, bem como, o desenvolvimento de novas ferramentas moleculares para a determinação das comunidades microbianas (GIOVANNONI e STINGL, 2005) têm aumentado nossa habilidade de investigar as relações entre a diversidade procariótica e o funcionamento dos sistemas naturais (JESSUP et al., 2004).

Considerando a importância da composição das comunidades microbianas e as alterações relacionadas ao ambiente, investigamos a diversidade bacteriana do sistema lagunar de Jacarepaguá focando principalmente na qualidade da água e suas possíveis implicações à saúde da população.

Os resultados das análises métricas pelo programa UniFrac mostraram que as comunidades bacterianas recuperadas do DNA ambiental e das culturas enriquecidas em BHI foram significativamente diferentes. Além disso, alguns dos organismos isolados em meios de cultura seletivos também foram representados nas duas abordagens. O mesmo foi detectado pela abordagem do DGGE, onde os perfis de bandas foram totalmente distintos não só entre o DNA ambiental e das culturas enriquecidas mas também em relação aos pontos de coleta.

Apesar da grande contribuição de novas ferramentas moleculares para estudos sobre a biodiversidade, nós também consideramos as técnicas tradicionais de enriquecimento e isolamento como importantes para a compreensão da capacidade metabólica e as características fenotípicas dos microrganismos.

As análises das coordenadas principais também demonstraram uma clara separação entre as comunidades reveladas a partir do DNA ambiental e do enriquecimento entre as amostras da água doce (JM), das águas poluídas (LB) e da água marinha (JOA), demonstrando que a salinidade foi um parâmetro importante na modulação da composição microbiana da comunidade (LOZUPONE; KNIGHT R, 2007; SILVEIRA et al, 2011). Além disso, as análises de sobreposições demonstraram que apenas um pequeno número de OTUs agrupou a 97% de similaridade entre bibliotecas geradas a partir dos métodos independentes (DNA ambiental) e dependentes (enriquecimento e isolados), sugerindo que diferentes comunidades bacterianas são recuperadas por cada metodologia.

Os riscos e as consequências associados à transmissão microbiológica em corpos de água têm sido uma preocupação nas questões de saúde pública no Brasil desde 1886, quando Oswaldo Cruz, um importante sanitarista, concluiu seu doutorado com a tese intitulada "A veiculação microbiana pelas águas". Neste estudo, Cruz demonstrou a presença de micróbios na água a partir de várias fontes com base em parâmetros fisiológicos e químicos e explorou a prevenção de infecções em geral causadas por meio da água (CRUZ, 1893). O reconhecimento desses impactos e das interações entre agentes físico-químicos e biológicos nos ecossistemas aquáticos levaram os países, que já possuíam regras de gestão de água estruturalmente consolidadas, a incluir parâmetros biológicos e moleculares aos tradicionais critérios químicos e microbiológicos para avaliar a qualidade da água (BOWER et al., 2005). Estes dados reforçam a recomendação de uso de múltiplas abordagens, uma vez que cada metodologia favorece a detecção de determinados grupos de bactérias, e juntas elas se complementam (McLELLAN et al, 2010).

A poluição fecal em ambientes aquáticos pode produzir graves consequências devido, principalmente, à presença de patógenos entéricos. Ao contrário de países desenvolvidos, o acesso à água potável e o saneamento básico não é a regra nos países em desenvolvimento e de acordo com a OMS, mais de 50% das doenças microbianas associadas à água são infecções intestinais e pelo menos 11.399 de mortes no mundo são devido a cólera (THOMPSON et al, 2004). O *Vibrio cholerae* O1 (biotipos El Tor e

clássicos) e o O139 são os principais responsáveis por epidemias de cólera, enquanto algumas cepas de outros sorogrupos (não-O1 / não-O139) também estão associados com gastroenterite esporádica (NEOGI et al, 2010). Neste estudo, nós detectamos o *Vibrio cholerae* tanto nas águas poluídas das lagoas quanto na água do mar por meio das três abordagens metodológicas. Assim como em nosso estudo, a presença de espécies de vibrios potencialmente patogênicos em lagoas poluídas, zonas costeiras marinhas e associadas ao plâncton marinho têm sido relatadas (MAUGERI et al, de 2000; HEATH et al, 2002; MONTANARI et al, 1999; MAUGERI et al, 2004). Um dos aspectos relevantes a esse respeito é sua capacidade de sobrevivência por longos períodos em ambientes aquáticos, particularmente na água do mar, independente de condições como temperatura, pH e salinidade ou a sua permanência em estado viável mas não cultivável (VIMONT; BERCHE, 2000; COLWELL; SPIRA, 1993).

A identificação de *Vibrio cholerae* nos vários ambientes estudados, pelas diferentes abordagens, reflete a presença significativa dessa espécie no sistema aquático de Jacarépagua, o que certamente irá comprometer a água do mar, onde as águas das lagoas serão lançadas. A limitação da metodologia, atualmente utilizada pelos órgãos responsáveis pelo monitoramento das águas, em detectar esse e outros patógenos, fortalece a necessidade de abordagens mais abrangentes como a metagenômica na avaliação da qualidade da água de recreação. Dentro do contexto da vigilância ambiental concluímos que a necessidade de monitoramento constante em áreas de possível contaminação deve ser implementada a fim de evitar a disseminação deste patógeno e o comprometimento da saúde da população. Além disso, observamos também uma significativa diversidade de bactérias incluindo muitos patógenos oportunistas principalmente nas lagoas mais impactadas.

Garantir o acesso da população à água potável constitui uma das medidas de proteção mais eficazes contra a cólera. Sendo a veiculação hídrica o mecanismo mais freqüente de infecção pelo *V. cholerae*, todos os esforços deverão ser despendidos no sentido de assegurar o provisionamento de água saudável para a ingestão, para o preparo de alimentos e para a higiene pessoal. Para isso, deve-se seguir as orientações contidas na Portaria n.º 518 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2004), que estabelece os procedimentos e as responsabilidades relativas ao controle e à vigilância da qualidade da água para consumo humano, bem como seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.

A ocorrência de organismos resistentes aos antibióticos nas águas de recreação é outro importante indicador de patogenicidade que merece atenção especial. A resistência a antibióticos é um problema de saúde pública relevante, uma vez que a utilização de agentes antimicrobianos é cada vez mais reconhecido como o principal causador da pressão selectiva responsável pela aumento da resistência em ecossistemas aquáticos (GOOSSENS; GRABEIN, et al, 2005). Identificamos várias espécies bacterianas resistentes a diferentes classes de antibióticos, incluindo espécies reconhecidas como patógenos humanos, tais como *Pseudomonas aeruginosa* e *Vibrio cholerae*. Entre os nossos isolados, *Enterococcus gallinarum*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Vibrio fluvialis* mostraram perfis de multirresistência aos antibióticos (Tabela 4). Assim, consideramos a avaliação dos níveis de resistência microbiana dos isolados uma forma simples e eficiente de verificar a presença organismos multirresistentes no ambiente e acessar os possíveis riscos para os seres humanos e outros animais em ambientes públicos associados com corpos d'água impactados. Mezzatesta e colaboradores (2008, p.7) observaram resistência ao aztreonam e outros antimicrobianos em mais de 90% dos isolados hospitalares de *Acinetobacter baumannii* e em nosso estudo, de 22 isolados, dez apresentaram resistência a este antibiótico. Outros estudos, em diferentes estados brasileiros (Rio de Janeiro, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul e Bahia), também mostraram altas taxas de resistência ao aztreonam em isolados clínicos e ambientais (PELLEGRINO et al., 2002; FERREIRA, 2005; SANTORO et al, 2012). Além disso, significativos aumentos na resistência ao aztreonam foram observadas nos Estados Unidos e na Espanha (OBRITSCH et al., 2004; GUTIÉRREZ et al., de 2007). Estes dados sugerem aumento do uso de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e a ocorrência de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e/ou organismos produtores de AmpC, capazes de hidrolisar um grande espectro de cefalosporinas, penicilinas e aztreonam (RUPP e FEY, 2003).

Nossos resultados nos permitem sugerir que o descarte de resíduos líquidos provenientes de clínicas e hospitais, das comunidades, das indústrias farmacêuticas e de outros resíduos nas lagoas de Jacarepaguá, contribui para disseminação de bactérias resistentes, uma vez que as comunidades bacterianas costumam responder à pressão seletiva dos antibióticos através da aquisição de genes de resistência, ou seja, elementos genéticos móveis que podem ser compartilhados horizontalmente entre as espécies (KRISTIANSSON et al, 2011; GARCIA-ARMISEN et al, 2011). Embora a presença de bactérias patogênicas nas águas poluídas das lagoas seja esperado, o isolamento de

microrganismos contendo genes que conferem resistência a muitas drogas pode representar sérios riscos à saúde da população (AIYEGORO et al, 2011).

Apesar de muitos estudos terem demonstrado altos níveis de resistência a antibióticos em isolados da microflora humana, muito do imenso e diverso reservatório de genes de resistência presente nos ambientes ainda não foram descritos (RIESENFELD et al, 2004, D’COSTA, 2006). Atualmente, a seleção pela metagenômica funcional, tem confirmado que o repertório de genes de resistência nesses locais é muito maior que o sugerido pelos métodos dependentes de cultivo (SOMMER, 2009 e 2010).

A incorporação da Vigilância Ambiental no campo das políticas públicas de saúde é uma demanda relativamente recente no Brasil. Entre as dificuldades encontradas para sua efetivação está a necessidade de reestruturação das ações de vigilância nas secretarias estaduais e municipais de saúde e de formação de equipes multidisciplinares, com capacidade de diálogo com outros setores (BARCELLOS; QUITÉRIO, 2006). A vigilância ambiental em saúde é apoiada no reconhecimento da relação entre riscos e seus efeitos adversos sobre a saúde (THACKER, 1996). Uma das tarefas primordiais para o estudo da relação entre ambiente e saúde é a seleção de indicadores para esses níveis de manifestação dos problemas ambientais. Esses componentes devem estar combinados para que se defina uma estratégia eficaz para a prevenção ou redução do impacto dos problemas ambientais sobre a saúde (BARCELLOS; QUITÉRIO, 2006). Mediante as afirmações reforçamos a importância da Vigilância Sanitária no controle das patologias emergentes e reemergentes, e em continuidade a isto, sua interferência na preservação do meio ambiente no tocante à manutenção da qualidade dos recursos hídricos.

Como esperado, o resultado final deste estudo, incluindo a metagenômica, o enriquecimento das culturas e isolamento de microrganismos, foi a determinação de diferentes comunidades bacterianas, nos diferentes ambientes analisados ao longo de todo sistema lagunar urbano. No entanto, a característica mais marcante do estudo foi a descrição inédita das comunidades microbianas nesses ambientes, sua dinâmica e interação com o ecossistema aquático, por meio de um esquema polifásico.

## 6 CONCLUSÕES

Concluimos que a investigação das relações entre a diversidade microbiana e funcional do ecossistema aquático de Jacarepaguá é ainda preliminar. No entanto, nossos resultados nos permitem concluir que:

- A estrutura das comunidades microbianas das águas límpida, poluída e salgada sofreram alterações pelas condições abióticas dos ambientes analisados.
- A presença de microrganismos resistentes a diferentes antibióticos, tanto na água límpida quanto na poluída, reflete a presença de genes de resistência intrínsecos e adquiridos pela transferência lateral de genes nos microrganismos.
- A análise metagenômica de amostras ambientais e àquelas do enriquecimento em BHI revelou a presença de comunidades bacterianas distintas em todos os ambientes analisados, reforçando a importância do esquema polifásico.
- A revelação de vários patógenos oportunistas, além da detecção de *Vibrio cholerae* em todos os ambientes confirma a necessidade de implementação da metodologia oficial. A abordagem proposta colabora com um controle mais efetivo da qualidade da água e com a visualização de efeitos antropogênicos e seus possíveis impactos para a saúde humana.
- Nossos resultados sugerem que um melhor entendimento da estrutura e função da diversidade procariótica poderá abrir perspectivas para a gestão desses ecossistemas produtivos e vulneráveis. Além disso, poderão colaborar para o aprimoramento dos serviços de vigilância ambiental e epidemiológica, e de modelos de prevenção e monitoramento de doenças emergentes e reemergentes advindas dos recursos hídricos.
- Por fim, a investigação aqui apresentada poderá fornecer, um controle mais efetivo da qualidade da água e, principalmente, visualizar efeitos antropogênicos e seus possíveis impactos para a saúde humana. Esse cenário mostra claramente a necessidade do desenvolvimento de sistemas rápidos, sensíveis e abrangentes na identificação das comunidades microbianas das lagoas de Jacarepaguá.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS – ANA. Relatório de Avaliação Social do Programa Marco de Reassentamento Involuntário. 2010, 26p.

ARMITAGE, P. D. Behaviour and ecology of adults. In: ARMITAGE, P. D. et al. **The Chironomidae: Biology and Ecology of Non-Biting Midges**. London: Editora Chapman & Hall, 1995. p. 194-224.

ARRIGO, K. R. Marine microorganisms and global nutrient cycles. **Nature**. v. 15, n. 437, p. 349-55, set. 2005.

ASSUNÇÃO, J. C. R. **Relações entre o crescimento urbano desordenado e a qualidade das águas fluviais na cidade do Rio de Janeiro**. 2008. 78f. Tese (Mestrado em Geografia). Departamento de Geografia, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2008.

AIEYGORO, O. et al. Interactions of antibiotics and methanolic crude extracts of *Azelaia africana* (smith.) against drug resistance bacterial isolates. **Int J Mol Sci**. v. 12, n. 7, p. 4477-503, jul 2011.

APHA – American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 19th ed. Washington D.C.: American Public Health Association, 1995. 1134p.

AZAM, F.; LONG, R. A. Sea snow microcosms. **Nature**. v. 414, n. 495, p. 497-8, nov. 2001.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 19, n. 3, p. 260-265, jun 2008.

BARBA-BRIOSO, C. et al. Multi-source water pollution in a highly anthropized wetland system associated with the estuary of Huelva (SW Spain). **Marine Pollution Bulletin**. v. 60, n. 8, p. 1259-1269, ago. 2010.

BARCELLOS, C.; QUITÉRIO, L. A. D. Vigilância ambiental em saúde e sua implantação no Sistema Único de Saúde. **Ver. Saúde Pública**. v. 40, n.1, p. 170-177, ago. 2006.

BEJ, A. K. et al. Detection of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for uid. **Appl Environ Microbiol**. v. 57, n. 8, p. 2445, ago 1991.

BORGES, A. et al. **Estudo de Impacto ambiental do Centro Industrial Avançado – CIA/RN**. 1999. 79f. Tese (Mestrado em Recursos Hídricos e Engenharia Sanitária) - Departamento de Engenharia Civil, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 1999.

BRANCO, S. M. **Água, Meio Ambiente e Saúde: Águas Doces no Brasil**. São Paulo: Editora Escrituras, 1999. p. 227.

BRASIL (SEGRH). Lei nº 3.239, de 02 de agosto de 1999. Institui a política estadual de Recursos Hídricos; cria o sistema estadual de gerenciamento de recursos hídricos; regulamenta a Constituição Estadual, em seu artigo 261, parágrafo 1º inciso VII; e dá outras providências. **Diário Oficial do Estado do Rio de Janeiro**, Poder Executivo, Rio de Janeiro, RJ, 02 ago. 1999. p. 03. Disponível em: <<http://www.jusbrasil.com.br/legislacao/205541/lei-3239-99-rio-de-janeiro-rj>>. Acesso em 13 abr. 2012.

\_\_\_\_\_ (CONAMA). Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA -. Resolução nº 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. **Diário**

**Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2005. p. 58-63. Disponível em: <<http://amarnatureza.org.br/site/resolucoes-do-conama-de-1984-a-2009,132>>. Acesso em 10 abr. 2010.

BRASIL (CONAMA). Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA -. Resolução nº 344, de 2004. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 07 maio 2004. p. 56-57. Disponível em: <<http://amarnatureza.org.br/site/resolucoes-do-conama-de-1984-a-2009,132>>. Acesso em 10 abr. 2010.

\_\_\_\_\_. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Diretoria de Pesquisas Departamento de População e Indicadores Sociais. Evolução e Perspectivas da Mortalidade Infantil no Brasil. **Estudos e Pesquisas Informação Demográfica e Socioeconômica, Poder Executivo**, Rio de Janeiro, RJ, n. 02, nov. 1999.

\_\_\_\_\_. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de portabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1. p. 266-270. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/portaria\\_518\\_2004.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/portaria_518_2004.pdf)>. Acesso em 10 abr. 2010.

\_\_\_\_\_. (FUNASA). Portaria nº 1.399, de 15 de dezembro de 1999. Regulamenta a (Norma Operacional Básica do Sistema Único de Saúde) NOB SUS 01/96 no que se refere às competências da União, estados, municípios e Distrito Federal, na área de epidemiologia e controle de doenças, define a sistemática de financiamento e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 dez 1999. p. 1415-1537. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_sinvas.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_sinvas.pdf)>. Acesso em 10 abr. 2010.

BRASIL. Secretaria Municipal de Meio Ambiente – SMAC. **Relatório de Notícias**. Rio de Janeiro, 1998.

BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação a qualidade da água de rios. **Cad. Saúde Pública**. v. 19, n. 2, p. 465-473, mar-abr 2003.

CAIRNS, Jr J.; PRATT, J. R. A history of biological monitoring using benthic macroinvertebrates. In: D. M. Rosenberg & V. H. Resh. **Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates**. New York: Editora Chapman & Hall, 1993. pp. 10-27.

CAIRNCROSS, S. Aspectos de saúde nos sistemas de saneamento básico. **Engenharia Sanitária**. v. 23, p. 334-338, 1984.

\_\_\_\_\_. Aspectos de saúde nos sistemas de saneamento básico. **Revista Engenharia Sanitária**. v. 23, n.4, p. 334 – 338, dez. 1984.

CHAKRAVORTY, S. et al. Rapid universal identification of bacterial pathogens from clinical cultures by using a novel sloppy molecular beacon melting temperature signature technique. **J. Clin. Microbiol**. v. 48, n. 1, p. 258-67, jan. 2010.

CLEMENTINO, M. M. et al. Prokaryotic diversity in one of the largest hypersaline coastal lagoons in the world. **Extremophiles**. v. 12, n. 4, p. 595-604, abr. 2008.

CLEMENTINO, M. M. et al. Archaea biodiversity in distinct tropical environmental communities. **J Appl Microbiol**. v. 103, n. 1, p. 141-51, jul. 2007.

COLE, J. R. et al. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. **Nucleic Acids Res**. v 1, n. 33, p. D294-296, jan. 2005.

COLWELL, R. R.; SPIRA, W. M., 1993. The ecology of *Vibrio cholerae*. In: BARUA, D.; GREENOUGH, W. B. **Cholera: Current Topics in Infections Disease**. 3ª edição. New York: Plenum Medical Book Co, 1993. p. 3-60.

CLINICAL STANDARDS LABORATORY INSTITUTE (CLSI). **M100-S21: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth-First Informational Supplement**. USA, 2011.

COLOMER-LLUCH, M.; JOFRE, J.; MUNIESA, M. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. **PLoS One**. v. 6, n. 3, p.e17549, mar. 2011.

COSTA, L.L. et al. Eficiência de Wetlands construídos com dez dias de detenção hidráulica na remoção de colífagos e bacteriófagos. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Paraíba, v.3, n.1, primeiro semestre 2003.

CRUZ, O. G. A **Vehiculação microbiana pelas águas**. 1892. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Departamento de Higiene, Faculdade Nacional de Medicina, Rio de Janeiro, 1893.

D'AGUILA, P. S. et al. Quality assessment of the public water supply in Nova Iguaçu, Rio de Janeiro. **Cad. Saúde Pública**. v. 16, n. 3, p. 791-8, jul-set. 2000.

D'COSTA, V. M. et al. Sampling the antibiotic resistome. **Science**. v. 311, n. 5759, p.311-374, jan. 2006.

DING, C.; HE, J. Effect of antibiotics in the environment on microbial populations. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 87, n. 3, p.925–941, jul. 2010.

Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em 23 abr 2010.

DOWER, W.J; MILLER, J. F.; RAGSDALE, C.W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Res.**, v .16, n.13, p- 6127-6145, Jul. 1988.

ESTEVEES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1988. 575 p.

DUFOUR, A. P. Bacterial indicators of recreational water quality. **Can J Public Health**. v 75, n. 1, p. 49-56, jan-fev.1984.

FERREIRA, L.L. **Estrutura clonal e multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa***. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2005. 99p.il. Dissertação (Mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro.

FIERER, N. et al. Forensic identification using skin bacterial communities. **PNSA**. v. 107. n. 14, p. 6477-6481, abr. 2010.

FONSECA, E. M. et al. Geochemical behavior of heavy metals in different environments in Rodrigo de Freitas lagoon - RJ/Brazil. **An Acad Bras Cienc**. v. 83, n.2, p. 457-69, jun. 2011.

FUNDAÇÃO GETÚLIO VARGAS - FGV/IBRE – CPS. Relatório Trata Brasil: saneamento, saúde e o bolso do consumidor, 2008, 149 p.

FUJIOKA, R. S. Monitoring coastal marine waters for spore forming bacteria of fecal and soil origin to determine point from non-point source pollution. **Water Sci Technol**. v. 44, n. 7, p. 181-188, 2001.

FUSHIMA, M.; KAKINUMA, K.; KAWAGUCHI, R. Phylogenetic analysis of Salmonella, Shigella, and Escherichia coli strains on the basis of the gyrB gene sequence. **J Clin Microbiol**. v. 40, n. 8, p. 2779-85, ago. 2002.

GARCIA-ARMISEN, T. et al. Antimicrobial resistance of heterotrophic bacteria in sewage-contaminated rivers. **Water Res**. v. 45, n. 2, p.788-96, jan. 2011.

GARCIA, E. Metagenômica: uma nova revolução científica? **Agência Fiocruz de Notícias**, Rio de Janeiro, 10 maio 2007. Disponível em: <<http://www.fiocruz.br/ccs/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm>>. Acesso em 31 mar. 2010.

GIOVANNONI, S. J.; STINGL, U. Molecular diversity and ecology of microbial plankton. **Nature**. v 15, n. 437, p. 343-8, set. 2005.

\_\_\_\_\_. et al. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. **Nature**. v 345, p. 60-63, maio. 1990.

GOMES, D. A. V. **Identificação de micro-organismos presente nos pescados e nos compartimentos de armazenamento de embarcações**. 2009, 81f. Rio Grande do Sul: UFRS, 2009. Tese (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2009.

GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, D. et al. Fecal Pollution in Coastal Marine Sediments from a Semi-Enclosed Deep Embayment Subjected to Anthropogenic Activities: An Issue to Be Considered in Environmental Quality Management Frameworks Development. **Ecohealth**. v. 7, n. 4, p. 473-84, jan. 2011.

GOOSENS, H.; GRABEIN, B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum beta-lactamase- and AmpC-producing Enterobacteriaceae from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004). **Diagn Microbiol Infect Dis**.v. 53, N. 4, p.257-64, dez 2005.

GRIFFIN, D.W. et al. Marine recreation and public health microbiology: quest for the ideal indicator. **BioScience**. v. 51, n. 10, p. 817 – 825, 2001.

GUERRA, L. V. et al. Biochemical and microbiological tools for the evaluation of environmental quality of a coastal lagoon system in Southern Brazil. **Braz J Biol**. v. 71, n. 2, p. 461-8, mai 2011.

GUTIÉRREZ, O. et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n.12, p. 4329-4335, Dec. 2007.

HEATH, D. et al. Occurrence of pathogenic vibrios in the coastal areas of France. **J. Appl. Microbiol.** v. 92, p.11-23, 2002.

HECK, K. L. Jr; VAN BELLE, G. e SIMBERLOFF, D. Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size. **Ecology**. v. 56, p. 1459-1461, 1975.

HEUER, H.; SMALLA, K. Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least twomonths. **Environmental Microbiology**. v. 9, n. 3, p. 657–666, 2007.

HORMAN, A. et al. *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwestern Finland, 2000-2001. **Appl Environ Microbiol.** v. 70, n. 1, p. 87-95, jan. 2004.

HUSON, D. H. et al. MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Res*, jan. 2007.

INSTITUO LAGOA VIVA. **Subcomitê da Bacia Hidrográfica de Jacarepaguá e o Movimento Evolutivo Pacto de Resgate Ambiental**. Disponível em: <<http://www.pactoderesgateambiental.org/subcomite.htm>>. Acesso em 23 abr 2010.

JANSSEN, P. H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Appl Environ Microbiol.** v 72, n. 3, p.1719-28, mar. 2006.

JESSUP, C. M. et al. Big questions, small worlds: microbial model systems in ecology. **Trends Ecol Evol.** v. 19, n. 4, p.189-97, abr. 2004.

KIMURA, M. A. Simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol.** v 16, n. 2, p. 111-120, dez. 1980.

KJERFVE, B. Coastal Lagoon Processes. In: KJERFVE, B. **Coastal Lagoon Processes.** Amsterdam: Ed. Elsevier Oceanography, 1994, p. 1-8

KNOPPERS, B. Aquatic primary production. In: KJERFVE, B. **Coastal Lagoon processes.** Amsterdam: Ed. Elsevier Oceanography, 1994, p. 221-241.

KOSEK, M.; BERN, C.; GUERRANT, R. L. The magnitude of global burden of diarrhoeal disease from studies published 1992-2000. **Bulletin of the World Health Organization.** v. 81, p.197-204, 2003.

KOZLOWSKY-SUZUKI, B.; BOZELLI, R. L. Experimental evidence of the effect of nutrient enrichment on the zooplankton in a Brazilian coastal lagoon. **Braz J Biol.** v. 62, n. (4B), p. 835-46, fev. 2003.

KRISTIANSOON, H.; TIMSON, D. J. Increased promiscuity of human galactokinase following alteration of a single amino acid residue distant from the active site. **Chembiochem.** v. 12, n.13, p.2081-7, set. 2011.

KUMAR, S. et al. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics.** v 17, n. 12, p. 1244-1250, dez. 2001.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E.; Goodfellow, M. **Nucleic Acid Techniques in bacterial systematic.** New York: Editora Willey, 1991. p. 115-175.

LEE, L.; TIN, S. e KELLEY, S. T. Culture-independent analysis of bacterial diversity in a hild-care facility. **BMC Microbiol.** v. 5, p. 7-27, 2007.

LEE, J.V. et al. An international trial of quantitative PCR for monitoring *Legionella* in artificial water systems. **J Appl Microbiol.** Jan, 2011.

LEE, J.V.; WEST, A. A. Survival and growth of *Legionella* species in the environment. **Soc Appl Bacteriol Symp Ser.** v. 20, p. 121S-129S, 1991.

LIVERMORE, D.M.; HAWKEY, P. M. CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. **J Antimicrob Chemother.** v. 56, n. 3, p. 451-4, set. 2005.

LONGNECK, K.; SHERR, B. F.; SHERR, E. B. Activity and phylogenetic diversity of bacterial cells with high and low nucleic acid content and electron transport system activity in an upwelling ecosystem. **Appl Environ Microbiol.** v. 71, n. 12, p. 7737-49, dez. 2005.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. Global patterns in bacterial diversity. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 104, n. 7, p. 11436-11440, jul. 2007.

\_\_\_\_\_. C.; HAMADY, M.; KNIGHT, R. UniFrac – An online tool for comparing microbial community diversity in a phylogenetic context. **BMC Bioinformatics.** v. 7, n. 371, p. 1-14, ago. 2006.

LUPO, A.; COYNE, S.; BERENDONK, T. U. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. **Front Microbiol.** v. 3, n. 18, jan. 2012.

MALORNY, B. et al. Interlaboratory diagnostic accuracy of a *Salmonella* specific PCR-based method. **Int J Food Microbiol.** v. 89, n. 2-3, p. 241-9, dez. 2003.

MASSANA, R.; DELONG, E. F.; PEDRÓS-ALIÓ C. A. few cosmopolitan phylotypes dominate planktonic archaeal assemblages in widely different oceanic provinces. **Appl Environ Microbiol.** v. 66, n. 5, p. 1777-8, maio 2000.

MARTÍNEZ, J. L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. **Science**. v. 321, n. 5887, p. 365-367, jul. 2008.

MAUGERI, T. L et al. Distribution of potentially pathogenic bacteria as free living and plankton- associated in a marine coastal zone. **J. Appl. Microbiol.** v. 97, n. 2, p. 354-361, 2004.

\_\_\_\_\_.; CACCAMO, D; GUGLIANDOLO, C. Potentially pathogenic vibrios in brackish waters and mussels. **J. Appl. Microbiol.** v. 89, n. 2, p. 261-266, 2000.

McLELLAN, S. L. et al. Diversity and population structure of sewage-derived microorganisms in wastewater treatment plant influent. **Environ Microbiol.** v. 12, n. 2, p.378-92, fev. 2010.

MEZZATETA, M. L. et al. In vitro activity of tigecycline and comparators against carbapenem-susceptible and resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Italy. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.** v. 7, n. 4, p. 7-4, fev. 2008.

MONTANARI, M. P. et al. Vibrios associated with plankton in a coastal zone of the Adriatic Sea (Italy). **FEMS Microbiol. Ecol.** v. 29, n. 3, p. 241-247, 1999.

MOSCHINI-CARLOS, V.; POMPEO, M. L. M. Lagoas Costeiras: Morro dos Conventos, Ararangu? Litoral do Extremo Sul Catarinense. **IB-Departamento de Ecologia.** Santa Catarina, 2001. Disponível em: <[http://ecologia.ib.usp.br/portal/index.php?option=com\\_content&view=article&id=75&Itemid=415](http://ecologia.ib.usp.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=75&Itemid=415)>. Acessado em 13 abr. 2012.

NEOGI, S. B. et al. A highly sensitive and specific multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. **Applied Microbiology.** jun. 2010.

OBRITSCH, M. D. et al.. Nation surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care units patients from 1993 to 2002. **Antimicrob. Agent Chemother.**, v. 48, n.12, p. 4606-4610, Dec. 2004.

OLABISI, O.; AWONUSI, A. Water and pollution agents in the 21<sup>st</sup> century. **Nature and Science**, v.6, n. 4, p.16-24, 2008.

OLIVEIRA, L. L. de, et al. **Desenvolvimento de uma Ferramenta Web para análise automática de Cromatogramas**. São Paulo: USP, 2010. Disponível em: <<http://www.sbis.org.br/cbis11/arquivos/1043.pdf>>. Acesso em 23 abr. 2010.

OSMAN, S. et al. Microbial burden and diversity of commercial airline cabin air during short and long durations of travel. **ISME J.** v. 2, n. 5, p. 482-97, maio 2008.

PACE, N. R. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. **Science**, v. 276, n. 5313, p.734-740, May 1997.

PELLEGRINO, F. L. P. C. et al. Occurrence of a multirug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal Clinical Microbiology**, v. 40, n.7, p. 2420-2424, July 2002.

PEREIRA, P. et al. Daily availability of nutrients and metals in a eutrophic meso-tidal coastal lagoon (Obidos lagoon, Portugal). **Mar Pollut Bull.** v. 60, n. 10, p.1868-72, out. 2010.

PIZELLA, D.J.; SOUZA, M. P. Análise da Sustentabilidade Ambiental do Sistema de Classificação das Águas Doces Superficiais Brasileiras. v. 12, n. 2, p. 139-148, abr/jun 2007.

PRAST, A. E.; BENTO, L. F. J.; SANTORO, A. L. S. **Influência das Mudanças Globais sobre as Lagoas da Cidade do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: RJ, 2010. Disponível em: <<http://www.rio.rj.gov.br/ipp/>>. Acesso em 31 mar. 2010.

PRATT, J. M.; COLER, R. A. A. Procedure for the routine biological evaluation of urban runoff in small rivers. **Water Research.** v. 10, n. 11, p.1019-1025, 1976.

REBOUÇAS, A. C. Panorama da água doce no Brasil. In: REBOUÇAS, A. C. (Org.). **Panorama da degradação do ar, da água doce e da terra no Brasil**. São Paulo: Editora IEA/USP, 1997, p. 59-107.

RIESENFELD, C. S.; SCHLOSS, P. D. e HANDELSMAN. Metagenomics: genomic analysis of microbial communities. **J. Annu Rev Genet.** v. 38, p. 525-52, 2004.

RINO, C. A. F.; CORDEIRO, J. S. Disposição de efluentes de estação de tratamento de esgotos no solo: uma técnica de reuso de águas. In: XXVIII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, 28, 2002, Cancún. **Anais**. México: Editora Femisca, 2002. p. 1-5.

ROWAN, N. J. Definindo estabelecidos e emergentes riscos microbianos na aquático ambiente: o conhecimento atual, implicações e perspectivas. **Int J Microbiol.** p. 462832, 2011.

RUPP, M. E.; FEY, P. D. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. **Drugs.** v. 6, n. 4, p. 353-65, 2003.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol Biol Evol.** v 4, n. 4, p. 406-425, jul. 1987.

SANTORO, D. O.; ROMÃO, C. M. C. A.; CLEMENTINO, M. M. Decreased aztreonam susceptibility among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospital effluent treatment system and clinical samples. **International journal of Environmental Health research**, 2012.

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.

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 Research**. v. 40, n. 13, p. 2463 – 2476, jul. 2006.

SCHLOSS, P. D. et al Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. **Appl Environ Microbiol**. v. 75, n. 23, p. 7537–7541, dez. 2009.

\_\_\_\_\_; LARGET, B. R.; HANDELSMAN, J. Integration of microbial ecology and statistics: a test to compare gene libraries. **Appl Environ Microbiol**. v 70, n. 9, p. 5485-92, set. 2004.

SEJAS, L. M. et al. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v 39, n. 1, p. 27-35, 2003.

SHUKLA, S. Água, água em todo lugar, mas nenhuma gota para beber. **Thaindian**, A news portal for Indians in Thailand, 2009. Disponível em: <<http://www.medindoagua.blogspot.com/2009/03/agua-agua-em-todo-lugar-mas-nenhuma.html>. Acessado em 27 ago. 2010.

SHUVAL, H. Estimating the global burden of thalassogenic diseases: human infectious diseases caused by wastewater pollution of the marine environment. **J Water Health**. v. 1, n. 2, p. 53-64, jun. 2003.

SIEGENER, R; CHEN, R. F. Caffeine in Boston Harbor seawater. **Mar Pollut Bull**. v. 44, n. 5, p. 383 – 387, 2002.

SILVEIRA, C. B. et al. (2011) Influence of salinity on bacterioplankton communities from the Brazilian rain forest to the coastal Atlantic Ocean. **PLoS One**. v 6, n. 3, p. e17789, mar. 2011.

SOMMER, M. O.; CHURCH, G. M.; DANTAS, G. The human microbiome harbors a diverse reservoir of antibiotic resistance genes. **Virulence**. v. 1, n. 4, p. 299-303, Jul-Ago. 2010.

---

\_\_\_\_\_ . Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. **Science**. v. 325, n. 5944, p.1128-31, ago. 2009.

STEWART, J. R. et al. The coastal environment and human health: microbial indicators, pathogens, sentinels and reservoirs. **Environ Health**. v. 7, supl. 2, p. 1476–1069X, nov. 2008.

SOUZA, L. C. et al. Bactérias coliformes totais e coliformes de origem fecal em águas usadas na dessedentação de animais. **Rev. Saúde públ.** v. 17, n. 2, p.112-22, 1983.

THACKER, S. B. et al. Surveillance in environmental public health: issues, systems, and sources. **Am J Public Health**. v. 86, n. 5, p. 633-638, 1996.

THOMPSON, F. L.; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of Vibrios. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 68, n. 3, p. 403–431, set. 2004.

THOMPSON, J. D. et al. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Res.** v 25, n. 24, p. 4876-4882, dez. 1997.

VIANNA, H. Baixada de Jacarepaguá: sertão e "Zona Sul". Rio de Janeiro: **Secretaria Municipal de Cultura, Turismo e Esporte**. Departamento Geral de Patrimônio Cultural, 1992. Disponível em: <<http://www.escaladoresdejacarepagua.org>>. Acesso em 23 abr. 2010.

VIEIRA, R. P. et al. Archaeal Communities in a Tropical Estuarine Ecosystem: Guanabara Bay, Brazil. **Microbial Ecolog.** v. 54, n. 3, p. 460-468, out. 2007.

VIMONT, S.; BERCHE, P. NhaA, an Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter Involved in Environmental Survival of *Vibrio cholerae*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, p. 2937-2944, 2000.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3 ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2005. 1v.

WATANABE, K.; KODAMA, Y.; HARAYAMA, S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. **J Microbiol Methods**. v. 44, n. 3, p.253-62, abr. 2001.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J Bacteriol**. v. 173, n. 2, p. 697-703, jan. 1991.

WINKER, S.; WOESE, C. R. A definition of the domains Archaea, Bacteria and Eucarya in terms of small subunit ribosomal RNA characteristics. **Syst Appl Microbiol**. v 14, n. 4, p. 305-10, 1991.

WOESE, C. R. e FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 74, n. 11, p. 5088-90, nov. 1977.

WU, H. C. et al., Characterization of Coastal Urban Watershed Bacterial Communities Leads to Alternative Community-Based Indicators. **PLoS ONE**. v. 5, n. 6, p. e11285, jun. 2010.

ZHENG, G. et al. Development of *Faecalibacterium* 16S rRNA gene marker for identification of human faeces. **J Applied Microbiology**. v. 106, n. 2, p. 634 – 641, fev. 2009.

## APÊNDICE A - REAGENTES E MEIOS DE CULTURA

### Meios de cultura

#### Caldo BHI – Brain Heart Infusion

Brain Heart Broth (MERCK) – nº referência 1.10493.0500 / lote VM859493 - 734

Pesar e hidratar segundo instruções do fabricante.

#### Agar BHI - Brain Heart Infusion

Brain Heart Broth (MERCK) – nº referência 1.13825.0500 / lote VM857825 - 735

Pesar e hidratar segundo instruções do fabricante.

#### Agar Manitol Salgado

Mannitol salt Phenol-Red Agar (MERCK) - nº referência 1.05404.0500 / lote VM977704 - 816

Pesar e hidratar segundo instruções do fabricante.

#### Agar Cetrimide

Cetrimide Agar Base (DIFCO) – nº referência 285420 / lote 5125466

Pesar e hidratar segundo instruções do fabricante.

#### Agar MacConkey

MacConkey Agar (MERCK) - nº referência 1.05465.0500 / lote VM476885 - 420

Pesar e hidratar segundo instruções do fabricante.

#### Agar Nutriente

Extrato de carne.....3g

Peptona de carne.....5g

Agar.....15g

Água destilada qsp.....1000mL

Suspender os componentes de água destilada.

Dissolver por aquecimento à ebulição.

Distribuir alíquotas de 20mL em placas de Petri.

Deixar solidificar.

pH final: 7,0 +/- 0,2.

Meio SOB

Meio SOB (100 ml):

Triptona – 2g

Extrato de Levedura – 0,5g

NaCl – 0,05g

- 1) Adicionar parte da água e agitar até dissolver;
- 2) Adicionar 1 ml de KCl 250 mM;
- 3) Ajustar o pH para 7,0 com NaOH 5 N;
- 4) Ajustar o volume para 100 ml;
- 5) Autoclavar e quando esfriar adicionar 0,5 ml MgCl<sub>2</sub> 2M OU 1 ml de MgCl<sub>2</sub> 1M.

Meio SOC - caldo de carne Optimal Super (100 ml):

Para 10 ml de SOB adicionar:

180 µl Glicose 20% estéril (preparada por filtração) OU adicionar 2 ml de Glicose 1M  
100 µl MgCl<sub>2</sub> 1M (caso ainda não tenha sido adicionado MgCl<sub>2</sub> ao SOB)

## APÊNDICE B - MÉTODO DE GRAM

Reagentes (corantes)

**Cristal Violeta:** (Seg. Hucker)

Solução A:

Cristal Violeta.....2g

Álcool etílico.....20g

Solução B:

Oxalato de amônio.....0,8g

Água destilada.....80mL

Misturar soluções A e B.

Deixar em repouso por 24 horas.

Filtrar em papel wathmann nº 1.

Armazenar em frasco escuro.

Lugol:

Iodo.....1g

Iodeto de potássio.....2g

Água destilada.....30mL

Macerar o iodo e o iodeto de potássio em um gral.

Adicionar água aos poucos e misturar bem.

Completar o volume com água destilada.

Armazenar em frasco escuro.

Descorante:

Agente lento: álcool etílico 95%

Agente rápido: acetona

Agente intermediário: álcool – acetona (álcool etílico 95%, 100mL; acetona, 100mL)

Fucsina Fenicada: (Seg. Ziehl)

Fucsina básica.....1g

Álcool etílico 95%.....10mL

Fenol fundido.....5g

Água destilada.....100mL

Dissolver em um gral a fucsina no álcool.

Juntar aos poucos o fenol.

Homogeneizar até completa dissolução.

Juntar a água aos poucos, lavando o gral.

Filtrar após 24h de repouso.

## APÊNDICE C - MÉTODOS DE PRESERVAÇÃO

Glicerol 20%

Preparar uma solução a 20% de glicerol com meio líquido de cultura (BHI). Utilizar 500µL da solução para um alça de cultura, e armazenar em freezer a -70 °C.

## Liofilização

As culturas serão semeadas em meios de cultivo apropriados e após a incubação o crescimento será coberto com “Skim Milk” (DIFCO 0001) a 10%, retirado com o auxílio de uma alça de “Drigalsky” e transferido para ampolas estranguladas, em volumes de 0.3 a 0.5mL por ampola. As ampolas serão então colocadas em banho de gelo seco e etanol absoluto, para congelamento rápido, aonde a temperatura do banho chega a -70 °C. Em ~30 segundos de imersão no banho gelado, a suspensão congela podendo ser transferida para um freezer a -70°C, onde permanecerá por 24-48 horas, antes de ser liofilizada. Este congelamento rápido é importante para evitar a formação de cristais de gelo entre as membranas dos micro-organismos, o que poderia inviabilizar as células, levando a ruptura de estruturas vitais das mesmas.

Após 72 horas a -70°C as ampolas serão colocadas no liofilizador com o objetivo de retirar toda água da amostra por meio do processo de sublimação, levando a água do estado sólido diretamente para o estado gasoso. Após 18 horas, as ampolas serão transferidas para um ”*manifold*”, que irá permitir a finalização do processo e o fechamento das ampolas com auxílio de um maçarico de chama dupla (gás metano + O<sub>2</sub>). Serão liofilizadas 10 ampolas para cada microrganismo isolado.

## APÊNDICE D - PREPARO DE GÉIS E TAMPÕES

### Tampões

#### Tampão Tris\_Borato – EDTA 10X (TBE 10X)

TRIS base .....	121.1g
Ácido Bórico.....	61.8g
Na <sub>2</sub> EDTA.....	3.7g
Água MilliQ esterilizada q.s.p. ....	1000mL

#### Tampão Tris-Borato – EDTA TBE (0.5X)

Tampão TBE 10X.....	125µL
Água MilliQ esterilizada q.s.p. ....	2500µL

### Géis

#### Gel de Agarose

Agarose (Sigma A-0169).....	10g
TBE (0.5X).....	1000µL
Brometo de Etídio (5mg/mL).....	60µL

## ANEXO A - CAPÍTULO DE LIVRO

### **“Water Pollution”**

Editado por Nuray Balkis, ISBN 978-953-307-962-2, capa dura, 202 páginas.

Editora: InTech, Publicado em Fevereiro de 2012.

A poluição da água é um grande problema global que requer avaliação contínua e revisão da política de recursos hídricos em todos os níveis (do municipal ao internacional, dos aquíferos aos poços individuais). Tem sido sugerido que é a principal causa mundial de mortes e doenças, e que é responsável pela morte de mais de 14.000 pessoas diariamente. Além dos graves problemas de poluição da água nos países em desenvolvimento, os países industrializados continuam a lutar com problemas de poluição também. A água é tipicamente referida como poluído quando é prejudicada por contaminantes antropogênicos, não sendo própria para consumo humano, e/ou sofre mudanças acentuadas nas suas características naturais, não sendo adequada às comunidades bióticas, tais como peixes. Fenômenos naturais tais como vulcões, proliferação de algas, tempestades e terremotos também causam grandes mudanças na qualidade da água e nas características físico-químicas da mesma. A maioria dos poluentes da água, eventualmente, são transportados por rios para os oceanos.

ANEXO B - MANUSCRITO 1

**“A biologia das arqueias halofílicas e seu potencial biotecnológico”**

*Revista Brasileira de Biociências (2012 – aceito)*

Gigliola Rhayd Boechat Salloto<sup>2</sup>, \*Leonardo Henriques Pinto<sup>1</sup>, Joyce Lemos Lima<sup>1</sup>, Ricardo Pilz Vieira<sup>1</sup>, Alexander Machado Cardoso<sup>1</sup>, Orlando Bonifácio Martins<sup>1</sup> e Maysa Mandetta Clementino<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Avenida Carlos Chagas Filho nº 373, 21941-590, Rio de Janeiro - RJ, Brasil; <sup>2</sup>Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde - INCQS/FIOCRUZ, Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, 21941-590, Rio de Janeiro - RJ, Brasil.

ANEXO C - MANUSCRITO 2

**“Impacts on water resoucers in the Rio+20 meeting place revealed by polyphasic approach”**

*(PLoS ONE - Submetido/2012 )*

Gigliola R. B. Sallôto<sup>1</sup>, Alexander M. Cardoso<sup>2</sup>, Leonardo H. Pinto<sup>3</sup>, Felipe H. Coutinho<sup>3</sup>, Ricardo P. Vieira<sup>3,4</sup>, Catia Chaia<sup>1</sup>, Joyce Lemos<sup>3</sup>, Rodolpho M. Albano<sup>4</sup>, Orlando B. Martins<sup>3</sup> and Maysa M. Clementino<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Microrganismos de Referência, INCQS, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>2</sup>Diretoria de Programa, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Rio de Janeiro, Brazil, <sup>3</sup>Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. <sup>4</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.