

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

Thaís dos Santos

AVALIAÇÃO DE FONTES DE POLUIÇÃO FECAL E DA SUSCEPTIBILIDADE
MICROBIANA AO CLORO E ANTIMICROBIANOS EM ÁGUAS DESTINADAS
AO ABASTECIMENTO PÚBLICO NO RIO DE JANEIRO

Rio de Janeiro

2018

Thaís dos Santos

**AVALIAÇÃO DE FONTES DE POLUIÇÃO FECAL E DA SUSCEPTIBILIDADE
MICROBIANA AO CLORO E ANTIMICROBIANOS EM ÁGUAS DESTINADAS
AO ABASTECIMENTO PÚBLICO NO RIO DE JANEIRO**

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

Orientadora: Maysa Beatriz Mandetta
Clementino

Colaborador: Kayo Cesar Bianco Fernandes

Rio de Janeiro

2018

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Santos, Thaís dos

Avaliação de fontes de poluição fecal e da susceptibilidade Microbiana ao cloro e antimicrobianos em águas destinadas ao abastecimento público no Rio de Janeiro. / Thaís dos Santos. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2018.

93 f. : il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) -Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2018.

Orientadora: Maysa Beatriz Mandetta Clementino.

Colaborador: Kayo Cesar Bianco Fernandes.

1. Abastecimento de Água. 2. Contaminação. 3. Fezes. 4 Poluição Ambiental. 5. Cloro. 6. Resistência Microbiana a Medicamentos. I Título.

Dedico, aos meus pais, Sérgio e Jovina e aos meus irmãos Luis, Luciano, Tatiana, Leandro e Thamires.

AGRADECIMENTOS

Ao meu bondoso e maravilhoso Deus pela oportunidade de viver, pelo seu infinito e incondicional amor por mim, por Sua constante presença em minha vida, pelas vitórias alcançadas e por todas as bênçãos que Ele me concede a cada dia;

Aos meus pais, Sérgio e Jovina, pelo amor incondicional, incentivo e educação, por vibrarem comigo a cada conquista;

Aos meus irmãos Luis, Luciano, Tatiana, Leandro e Thamires por sempre estarem ao meu lado, pelas palavras encorajadoras, pela força concedida a mim e por confiar no meu potencial;

Aos meus Padrinhos, Ciomara e Ronald, pelo amor e preocupação;

Ao meu namorado e amigo, Reginaldo Marinho, por todo amor, incentivo, compreensão e descontração em todos os momentos;

Ao meu amigo Jorge Renato por todas as conversas e conselhos, que me ajudaram a crescer como ser humano;

Aos meus sobrinhos, Guilherme, Lohane, Cailane, Letícia e Hugo Gabriel, pelo amor e carinho a mim concedido. Eu amo vocês;

Aos meus queridos irmãos da Igreja, em especial ao grupo Amiguinhos de Cristo, grupo esse que sou completamente apaixonada e ao meu querido Pastor Anderson Iglesias e Família, pela amizade, palavras de incentivo, atenção e orações em meu favor;

Aos meus cunhados Anderson e Luciana, pelo apoio e força concedidos a mim;

Aos meus Primos Maicon, Michael, Cintia, Gláucia e Thiago pelo carinho e amizade;

A minha orientadora Dra. Maysa Beatriz Mandetta Clementino pela orientação, pelo estímulo à pesquisa, acima de tudo, por ter confiado no meu trabalho;

Ao meu co-orientador Kayo Bianco, por seu apoio e ajuda fundamental para o êxito deste estudo;

Aos Doutores, Ivano de Filippis, Célia Romão e Antonio Eugenio por sempre estar disposto a me ajudar quando eu precisava;

Aos funcionários do meio de cultura e esterilidade do INCQS, Mônica, Marcos, Pedro Paulo, Sineide, e os demais que não sei o nome, obrigada pela ajuda

e compreensão, vocês são 10, quero agradecer especialmente ao Will e ao “seu Jorge”, que além de profissionais excelentes, foram bons amigos;

Aos amigos do laboratório, Aline, Nathercia, Renata Pacheco, Rafaela Cerejo, Samara, Carol, Marcela, Andressa, Luca, Irene, Camila, Cátia, Jandira, Claudia Flores, Mariana, Talita e Rafael, obrigada pela ajuda e dedicação;

A técnica Claudia Andrade, muito, muito, muito obrigada, por todo auxílio, muitas dúvidas sanadas, obrigada claudinha;

A Ingrid, muito obrigada por sua amizade, conversas e mais conversas, conselhos, momentos de descontração, ajuda nos meus experimentos, você é DEZ;

A equipe de coleta da CEDAE, pela coleta dos afluentes da bacia hidrográfica do rio Guandu, que tive o prazer de participar;

Ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, ao programa de pós-graduação em Vigilância Sanitária e ao Departamento de Microbiologia que possibilitaram a realização deste estudo, a CAPES pela concessão da bolsa de mestrado;

Enfim, a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, auxiliaram-me para o desenvolvimento deste trabalho, Agradeço.

Que darei eu ao SENHOR por todos os benefícios que me tem feito?

Salmos 116.12

RESUMO

A contaminação de corpos hídricos por material fecal é uma das principais causas de doenças entéricas no mundo, além disso, bactérias tolerantes ao cloro são motivo de grande preocupação devido a sua relação com multirresistência aos antibióticos. A bacia hidrográfica do rio Guandu, localizada no estado do Rio de Janeiro, possui como destino a Estação de Tratamento de Águas (ETA) do Guandu, que abastece cerca de 85% da população da região metropolitana do Rio de Janeiro. No entanto, as águas dos afluentes dessa bacia vêm sendo poluídas por resíduos industriais, esgoto doméstico, entre outros. Atualmente os coliformes totais e termotolerantes são utilizados no monitoramento da qualidade microbiológica da água, porém estes indicadores não permitem a identificação do organismo-fonte da contaminação, o que vem levantando questionamentos sobre sua eficiência. Organismos dos domínios Archaea e Bacteria vêm sendo apontados como bioindicadores alternativos ao grupo coliforme, uma vez que possuem a capacidade de indicar a fonte da contaminação fecal. O tratamento da água destinada ao consumo humano é necessário para torná-la potável, ou seja, para eliminar as impurezas prejudiciais e nocivas à saúde. Desta forma, no Rio de Janeiro, os afluentes chegam à ETA Guandu poluídos e turvos e passam por diversas etapas tais como: coagulação química, floculação, decantação, filtração, clarificação, desinfecção por cloro e fluoretação. Bactérias tolerantes ao cloro e resistentes aos antibióticos vêm sendo descritas como agentes etiológicos de vários processos infecciosos. No presente estudo foi realizada a quantificação da contaminação fecal hospedeiro-específico e avaliação da tolerância ao cloro e resistência aos antimicrobianos em águas destinadas ao abastecimento público, da bacia do rio guandu. Para isso, foram realizadas a determinação das concentrações de coliformes totais/*E. coli*, bem como, a quantificação dos biomarcadores em nove pontos dessa bacia. Isolados bacterianos dos afluentes identificados pelo sequenciamento do gene *rrs* do 16S rRNA foram analisados em relação a susceptibilidade aos antimicrobianos e a determinação da concentração bactericida mínima de cloro. As concentrações de contaminação fecal variaram entre os biomarcadores, sendo humana ($8,59 \times 10^2$ e $1,92 \times 10^8$), equina ($5,21 \times 10^4$ e $3,67 \times 10^9$), bovina ($8,26 \times 10^7$ e $3,33 \times 10^{12}$) e suína ($4,52 \times 10^4$ e $4,83 \times 10^{12}$ cópias/ μL), mesmo em amostras satisfatórias pela metodologia oficial, demonstrando a limitação da mesma

na avaliação da qualidade microbiológica das águas. Os isolados de *Pseudomonas* spp. apresentaram resistência ao meropenem e aztreonam e os *Ochrobactrum* spp. foram resistentes a beta-lactâmicos (cefalosporinas), fluoroquinolonas e aminoglicosídeo. Oitenta e dois por cento dos isolados foram tolerantes ao cloro (2,5mg/L). Nossos resultados revelam que mesmo após o tratamento na ETA, bactérias tolerantes ao cloro podem permanecer na água potável e com isso aumentar a concentração de micro-organismos e genes de resistência, provocando riscos à saúde humana. Estes dados nos levam a concluir que questões relacionadas ao tratamento e a qualidade de águas destinadas ao abastecimento público, ainda necessitam de muito investimento no desenvolvimento de metodologias mais sensíveis e acuradas com a finalidade de proporcionar um monitoramento mais eficaz quanto a qualidade das águas.

PALAVRAS CHAVES: Contaminação Fecal. Água. Rastreamento de Fonte Microbiana. Tolerância ao Cloro. Resistência a Antibióticos.

ABSTRACT

Contamination of water bodies with fecal material is one of the main causes of enteric diseases in the world, in addition, chlorine tolerant bacteria are of great concern due to their relationship with multiresistance to antibiotics. The Guandu watershed, located in Rio de Janeiro state, has Guandu Water Treatment Plant (WTP) as its destination, which supplies about 85% of the population from metropolitan region of Rio de Janeiro. However, the affluents of this watershed are being polluted by industrial and domestic sewage, among others. Currently, total and thermotolerant coliforms are adopted to monitor the microbiological water quality, but these indicators do not allow the microbial source tracking, which has raised questions about its efficiency. Microorganisms of Archaea and Bacteria domains have been identified as alternative bioindicators to the coliform group, since they have the capacity to indicate the source of the fecal contamination. The treatment of water intended for human consumption is necessary to make it potable. Thus, in Rio de Janeiro, the Guandu affluents reach the WTP Guandu polluted and turbid and go through several stages such as: chemical coagulation, flocculation, decantation, filtration, clarification, chlorine disinfection and fluoridation. Chlorine tolerant and antibiotic resistant bacteria have been described as etiological agents of various infectious processes. In the present study, the quantification of host-specific fecal contamination, the chlorine tolerance and antimicrobial resistance in waters destined for public water supply in the Guandu Watershed were performed. For this purpose, the determination of total coliforms / *E. coli* concentrations was done, as well as the quantification of the biomarkers in nine points of this watershed. Bacterial isolates from the affluents identified by the *rrs* gene 16 rRNA sequencing, were analyzed for antimicrobial susceptibility and determination of minimal bactericidal concentration to chlorine. Fecal contamination concentrations varied between the human (8.59×10^2 and 1.92×10^8), equine (5.21×10^4 and 3.67×10^9), bovine (8.26×10^7 and 3.33×10^{12}) and swine (4.52×10^4 and 4.83×10^{12} copies/ μL), even in samples satisfactory by the official methodology, demonstrating the limitation of the same in the evaluation of the microbiological quality of the waters. The isolates of *Pseudomonas* spp. showed resistance to meropenem and aztreonam and *Ochrobactrum* spp. were resistant to beta-lactams (cephalosporins), fluoroquinolones and aminoglycosides. Eighty-two percent of the isolates were chlorine tolerant (2.5mg / L). Our results show that even

after treatment in WTP, chlorine tolerant and antimicrobial resistant bacteria can remain in drinking water, thereby increase the microorganisms and resistance genes concentration, leading human health risks. These data lead us to conclude that issues related to the treatment and quality of water intended for public supply still require great investment in the development of more sensitive and comprehensive methodologies in order to provide safer water quality monitoring.

KEYWORDS: Fecal Contamination, Water, Microbial Source Tracking, Chlorine Tolerance, Antibiotics Resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição da água no mundo	24
Figura 2 - Mapa da Bacia Hidrográfica dos Rios Guandu, da Guarda, Guandu-Mirim – RII.....	29
Figura 3 - Esquema de uma ETA convencional.....	31
Figura 4 - Pontos de coleta da bacia do rio Guandu.....	49
Figura 5 - Percentual de isolados resistentes a concentrações que variam entre 1,0 e 2,0 mg/L de cloro ativo	61
Figura 6 - Gel representativo da PCR do gene 16S rRNA de <i>Pseudomonas</i> spp. (618pb).....	62
Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR dos isolados para detecção de <i>P. aeruginosa</i> (956pb)	63
Figura 8 - Identificação dos isolados através do sequenciamento.....	64

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição de água doce no mundo.....	25
Gráfico 2 - Representação gráfica da quantificação do gene <i>nifH</i> de <i>M. smithii</i> (Humano), gene <i>nifH</i> de <i>M. ruminantium</i> (Bovino), gene <i>rrs</i> de <i>Bacteriodales</i> de origem suína e gene <i>mcrA</i> de <i>M. gottschalkii</i> (Equino) nas amostras de água da bacia hidrográfica do rio Guandu.....	60
Gráfico 3 - Total de Isolados identificados a partir das amostras de água da bacia hidrográfica do rio Guandu	64
Gráfico 4 - Gráfico da suscetibilidade aos antibióticos dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp	65
Gráfico 5 - Gráfico da suscetibilidade aos antibióticos dos isolados de <i>P. aeruginosa</i>	66
Gráfico 6 - Gráfico da suscetibilidade aos antibióticos dos isolados de <i>Ochrobactrum</i> spp	66
Gráfico 7 - Porcentagem de todas as amostras submetidas ao teste da CIM	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais doenças transmitidas pela água, seus agentes patogênicos e suas vias de entrada e saída do corpo humano Modificado de D'AGUILA e colaboradores (2000)	28
Tabela 2 - Oligonucleotídeos, genes alvo e condição da PCR em tempo real	51
Tabela 3 - Oligonucleotídeos, genes alvo e condição da PCR.....	53
Tabela 4 - Antimicrobianos empregados no teste de suscetibilidade para <i>Pseudomonas</i> sp.....	55
Tabela 5 - Antimicrobianos empregados no teste de suscetibilidade para <i>P. aeruginosa</i> e gênero <i>Ochrobactrum</i>	55
Tabela 6 - Parâmetros Físico-químicos e Microbiológicos dos afluentes do rio Guandu	58

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes
ANA	Agência Nacional de Águas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BFI	Bactéria Fecal Indicadora
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albumina Bovina
CEDAE	Companhia Estadual de Águas e Esgotos
°C	Grau Celsius
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CRMV	Conselho Regional de Medicina Veterinária
Ct	<i>Ciclo threshold</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ETA	Estação de Tratamento de Água
EUA	Estados Unidos da America
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
g	Gramma
IDEC	Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INEA	Instituto Nacional do Meio Ambiente
L	Litro
MEC	Ministério da Educação
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar

mS	MiliSiemens
MMA	Ministério do Meio Ambiente
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
NMP	Número mais Provável
OD	Oxigênio dissolvido
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pb	Pares de bases
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RFM	Rastreamento de Fonte Microbiana
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossomal
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SINVSA	Subsistema Nacional de Vigilância em Saúde Ambiental
STEC	<i>Escherichia coli</i> produtora de toxina shiga
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TAE	Tris-Acetato-EDTA
T _m	Temperatura de melting
TMDL	<i>Total Maximum Daily Load</i>
T-RFLP	Polimorfismo de Fragmentos Terminais de Restrição
UE	União Européia
µL	Microlitro
µM	Micromolar
UN-Water	<i>United Nations Water</i>
VSA	Vigilância em Saúde Ambiental
VTEC	<i>Escherichia coli</i> verotoxigênica
WHO	<i>World Health Organization</i>
±	mais ou menos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
1.1	Vigilância ambiental em saúde	19
1.2	Qualidade da água e a saúde pública	20
1.3	Água destinada ao abastecimento	24
1.4	Bacia hidrográfica do Rio Guandu	28
1.5	Desinfecção com cloro em ETA	31
1.6	Bioindicadores de contaminação fecal.....	33
1.7	Rastreamento da fonte microbiana em ambientes aquáticos.....	35
1.8	Ordem <i>bacteroidales</i>	38
1.9	Domínio Archaea	39
1.10	PCR em tempo real na detecção de biomarcador.....	42
2	RELEVÂNCIA	44
3	OBJETIVOS.....	46
3.1	Geral.....	46
3.2	Específicos	46
4	MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1	Coleta de amostras fecais.....	47
4.2	Extração de DNA total de amostras de origem fecal	47
4.3	Coleta de amostras de águas superficiais	48
4.4	Parâmetros físico-químicos e microbiológicos	49
4.5	Extração de dna total em amostras de águas superficiais	49
4.6	Reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	50
4.7	Curva padrão para o ensaio da qPCR.....	51
4.8	Isolamento de micro-organismos na presença ao hipoclorito de sódio .52	
4.9	Reação em cadeia da polimerase – PCR	52
4.10	Sequenciamento	54
4.11	Análise do sequenciamento.....	54
4.12	Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos dos isolados bacterianos54	
4.13	Susceptibilidade dos isolados ambientais ao hipoclorito de sódio	55
5	RESULTADOS	57
5.1	Parâmetros físico-químicos e microbiológico	57
5.2	Determinação quantitativa da contaminação fecal.....	59
5.3	Isolados ambientais resistentes ao hipoclorito de sódio.....	61

5.4 Identificação dos isolados	61
5.4.1 Coloração Gram e OF Glicose	61
5.4.2 PCR dos isolados de <i>Pseudomonas</i> spp	62
5.4.3 Sequenciamento	63
5.4.4 Identificação final dos isolados	64
5.4.5 Identificação bioquímica de <i>Ochrobactrum</i>	65
5.5 Resistência dos isolados aos antimicrobianos	65
5.6 Concentração inibitória mínima do cloro dos isolados bacterianos	67
6 DISCUSSÃO	68
7 CONCLUSÕES	73
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vigilância ambiental em saúde

Vigilância sanitária é o resultado de duas vertentes históricas, uma antiga e outra moderna, e também o testemunho de duas posturas diante de problemas de saúde, uma elitista autoritária, outra democrática e baseada no diálogo da população. Surgiu para prevenir ou diminuir riscos provocados por problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, ou originados de doenças infecto contagiosas (BUENO, 2005). Os saberes de práticas de vigilância sanitária são multidisciplinares, tem como intuito seu melhor desempenho (COSTA & ROZENFELD, 2012).

A lei 6360, publicada em 1976 e que ficou conhecida justamente pelo nome de Lei da Vigilância Sanitária, dispôs sobre a vigilância sanitária de medicamentos, drogas, insumos farmacêuticos e saneantes, entre outros produtos. Somente a partir dessa lei foi estabelecida a exigência de apresentação de receita médica na venda de determinados medicamentos (BRASIL, 1976). A Medida Provisória nº 1.791/98 foi aprovada em 13 de janeiro de 1999, originando a Lei nº 9.782/99, de criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), promulgada em 26 de janeiro do mesmo ano (BRASIL, 1999).

A Lei Orgânica da Saúde, nº8.080, de 19 de setembro de 1990, definiu a Vigilância Sanitária como “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir, ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde”. Esta lei inclui no campo de atuação do Sistema Único de Saúde (SUS) a "colaboração na proteção do meio ambiente", assim como o controle da água para consumo humano e de substâncias tóxicas e radioativas (BARCELLOS & QUITÉRIO, 2006; AITH & DALLARI, 2009). Essas ações são de extrema importância, pois “atuam sobre fatores de riscos associados a produtos, insumos e serviços relacionados com a saúde, com o meio ambiente, com a circulação internacional de transportes, cargas e pessoas” (COSTA & ROZENFELD, 2012).

No Brasil, no setor saúde, tradicionalmente a vigilância sanitária tem se incumbido das ações sobre o ambiente, embora tais ações estejam limitadas, via de regra, ao saneamento básico, desde sua origem. Assim, a questão ambiental, como

parte das condições de saúde e como objeto das políticas públicas, são temas inseridos na esfera da vigilância sanitária. De acordo com o Ranking do Saneamento do Instituto Trata Brasil (2014), 2,5 bilhões de pessoas (36%) viviam sem saneamento adequado, 71% eram de áreas rurais. A cobertura de saneamento adequado aumentou de 49% em 1990 para 64% em 2012. Entre 1990 e 2012, quase dois bilhões de pessoas ganharam acesso ao saneamento.

Em junho de 2003 foi criada a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) no âmbito do Ministério da Saúde e dentre as competências inclui-se a Coordenação da Gestão do Subsistema Nacional de Vigilância em Saúde Ambiental (SINVSA). Esse sistema é definido como um conjunto de ações que proporciona o conhecimento e a detecção de qualquer alteração nos fatores determinantes e condicionantes do meio ambiente que interferem na saúde humana, com a finalidade de identificar as medidas de prevenção e controle dos fatores de risco ambientais relacionados às doenças ou outros agravos à saúde (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002). Dentre seus objetivos, está a adoção de ações integradas, de modo a exercer a vigilância desses fatores de risco ambientais que possam vir a afetar a saúde da população, estabelecendo parâmetros, identificando e intervindo nos fatores que levem a doenças e outros agravos, tendo em vista a eliminação do risco, o controle e a recuperação do meio ambiente (AUGUSTO, 2003; BRASIL, 2017).

1.2 Qualidade da água e a saúde pública

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

A agricultura no Brasil é, historicamente, umas das principais bases da economia do país, desde os primórdios da colonização até o século XXI, evoluindo das extensas monoculturas para a diversificação da produção. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC), o Brasil é o 5º maior país do mundo em território com cerca de 20% da sua área (174 milhões de hectares) ocupada por pastagens (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES, 2011), produzindo atualmente em torno de 10

milhões de toneladas de carne bovina (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES, 2018). A grande variedade de sistemas produtivos em um território tão vasto também reflete na diversificação dos produtos. Em 2000, o Brasil foi consolidado como potência na produção e exportação de carne bovina, assumindo em 2004 a primeira colocação dentre os exportadores (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES, 2011).

No Brasil, a criação de bovinos representa a principal e maior criação de ruminantes, que por sua vez proporcionam a produção de 10 a 15 kg/animal/dia de dejetos (CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2011). Estudos revelam que bovinos saudáveis podem carregar cepas *Escherichia coli* verotoxigênica (VTEC) do sorotipo O157:H7. Cada vez mais, este sorotipo e outros VTEC são identificados em animais não ruminantes, incluindo porcos, coelhos, gambás e aves aquáticas. Vale ressaltar que no Brasil, a primeira cepa de *E. coli* O157:H7 foi isolada e identificada em Parelheiros, no município de São Paulo, a partir de uma amostra de água de poço (UFNAR et al., 2007; BRASIL, 2011). Em adição, atualmente, o aumento das concentrações de hormônios em águas vem sendo associado ao uso desenfreado de hormônio do crescimento para o aumento da produção de leite, gerando um novo risco à saúde humana.

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

Dejetos suínos são muito concentrados em matéria orgânica biodegradável (aproximadamente 55%), possuem número elevado de micro-organismos patogênicos e são ricos em nitrogênio e minerais (cobre, zinco e arsênico) (HOODA & EDWARDS, 2000; SCHMIDT et al., 2007; SCANLON et al., 2013).

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

Além disso, em regiões agrícolas e até mesmo regiões urbanas ainda podem observar a criação de cavalos, que produz cerca de 7 a 8 kg/animal/dia de dejetos (20% urina e 80% material sólido), mais ricas em nitrogênio do que as fezes de suínos e bovinos (MATOS, 2005). A infecção de seres humanos por *Bacillus anthracis*, *Trichinella spirallis* e *Salmonella enterica*, vêm sendo associada à contaminação de fezes de equinos. Além da contaminação fecal bovina, suína e equina, a contaminação fecal de humanos é umas das principais carreadoras de patógenos como *Bacteroides* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Candida* spp., *E. coli* enterohemorrágica. Além de parasitas intestinais, seus ovos também carregam grande quantidade de antibióticos, hormônios e outras substâncias tóxicas (NOGUEIRA, 2005).

As doenças veiculadas através da água têm sido apontadas constantemente como um problema nos diversos tempos históricos da humanidade. Problemas com a poluição fecal são comuns a todas as nações, independentemente de situação econômica, embora o nível de poluição e o tipo variem entre os países (STEWART

et al., 2007). A água contaminada pode transmitir doenças como diarreia, cólera, disenteria, febre tifóide e poliomielite. Calcula-se que a água potável contaminada cause 502 000 mortes por diarreia todos os anos. Estimativas globais sugerem que 844 milhões de pessoas não possuem acesso a serviço básico de água potável, incluindo 159 milhões de pessoas que dependem da água de superfície, pelo menos, 2 bilhões de pessoas usam uma fonte de água potável contaminada com fezes. Calcula-se que cerca de 842 000 pessoas morrem anualmente devido à diarreia resultante de água potável insegura, saneamento e higiene das mãos. No entanto, a diarreia é amplamente evitável, e as mortes de 361.000 crianças menores de 5 anos poderiam ser evitadas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

O primeiro relato descrito sobre doença de veiculação hídrica foi no ano de 1854 em Londres quando se verificou que as áreas de Londres que eram abastecidas com água da Companhia Southpark, captação à jusante do lançamento de esgoto da cidade, registravam um número de óbitos e uma taxa de mortalidade muito superior à daquelas que recebiam a água da concorrente Lambeth com captação ao montante do ponto de lançamento de esgoto. O número de casos de cólera era elevado, em apenas 10 dias foram registradas mais de 500 mortes. A contaminação da água foi claramente comprovada por análises, ficando demonstrado então, que a água estava contaminada com fezes humanas e que era a origem da infecção por cólera (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS, 2018). No Brasil, de maio a julho de 1999, a Agência Nacional das Águas relatou que em Pedra Azul, Minas Gerais, foram contabilizados 25 casos suspeitos e uma morte causada pelo vibrião colérico veiculado pela água de consumo sem tratamento prévio (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, 2016).

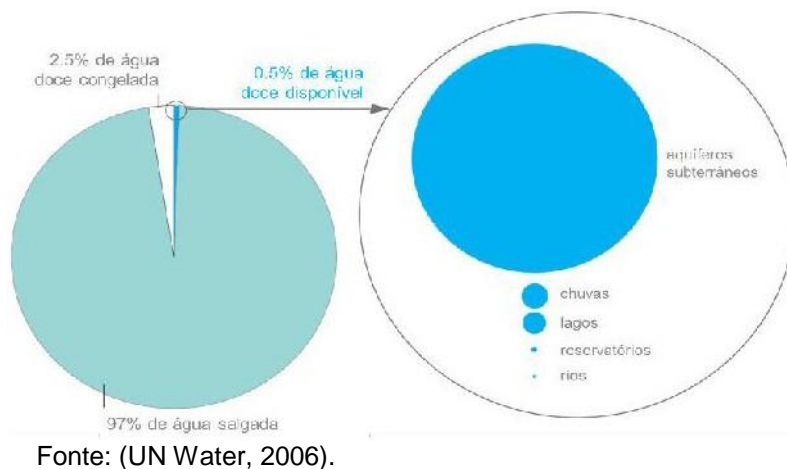
A atenção das autoridades sanitárias para com os sistemas públicos de abastecimento de água, destino de dejetos, tratamento de esgoto, coleta e disposição de resíduos sólidos gerados, principalmente nos grandes centros urbanos, está tradicionalmente direcionada para as consequências que os problemas desse contexto são capazes de causar ao meio ambiente e à Saúde Pública. Essa situação tem se agravado nos últimos anos devido à contaminação frequente das águas de consumo humano, águas recreacionais e águas de irrigação por patógenos emergentes como *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum*, *E. coli* O157:H7, entre outros (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2007; ALVES, 2016).

A qualidade da água “*in natura*” é de grande importância nos sistemas de tratamento de águas superficiais, uma vez que uma falha no tratamento pode produzir água com risco à saúde dos consumidores. Em 1988 ocorreu um surto de doenças de veiculação hídrica, na Suécia, atingindo cerca de 11.000 pessoas em decorrência de uma falha na cloração da água. Com isso, podemos concluir que o monitoramento da qualidade da água que abastece as estações de tratamento é de extrema importância. A falta de estrutura sanitária e principalmente o manejo inadequado de dejetos humanos e de outros animais incorporadas ao solo são os fatores mais importantes de contaminação dos recursos hídricos (ANDERSSON & BOHAN, 2001; SILVA & MATTOS 2001; BIANCO, 2015a).

1.3 Água destinada ao abastecimento

A superfície do planeta é constituída por aproximadamente 70% de água, sendo 97% de água salinas, e aproximadamente 3% de água doce, sendo 2.5% encontradas em geleiras. Dos 0.5% da água doce do planeta a maior parte está presa em aquíferos subterrâneos, dificultando o acesso humano. Somente 0.04% da água do planeta está disponível na superfície, em rios, lagos, mangues, etc (UN Water, 2006) (Figura 1).

Figura 1 - Distribuição da água no mundo.

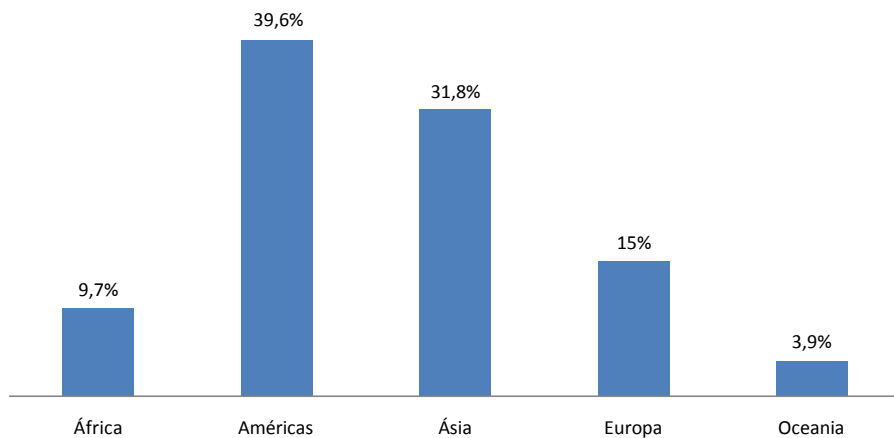


Segundo a Organização das Nações Unidas (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 2018) cerca de um bilhão de pessoas não possuem acesso a um

abastecimento suficiente, o acesso é definido como fonte que forneça 20 litros de água por pessoa por 1 dia a uma distância que não supere a mil metros. São incluídas como fontes as ligações domésticas, fontes públicas, fossos, poços e nascentes protegidos e a coleta de águas pluviais. A crise global enfrentada pelas Nações Unidas é resultado da crescente demanda mundial de recursos hídricos para atender às necessidades agrícolas e comerciais da humanidade, além da crescente necessidade de saneamento básico.

A distribuição de água no mundo não ocorre de maneira igualitária. Apenas 9 países concentram mais de 60% da água disponível no planeta: Brasil, Rússia, China, Canadá, Indonésia, EUA, Índia, Colômbia e a República Democrática do Congo, distribuídos em 5 continentes (Gráfico 1) (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS, 2009).

Gráfico 1 - Distribuição de água doce no mundo.



Fonte: (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS, 2009).

A maior disponibilidade hídrica do mundo se encontra no Brasil, 12% da produção hídrica de 182.170 m³/s. No entanto, sua distribuição ocorre de maneira irregular entre as regiões. Aproximadamente 70% da água disponível estão concentradas no Norte, onde habita 7% da população nacional; enquanto 30% restantes são distribuídas desigualmente pelo país, para atender 93% da população (GALINDO & FURTADO, 2006; CARVALHO, 2012). Além disso, o Brasil registra um elevado desperdício: de 20% a 60% da água tratada para consumo se perde na distribuição, dependendo das condições de conservação das redes de

abastecimento. Além dessas perdas de água no caminho entre as estações de tratamento e o consumidor, o desperdício também é grande nas residências, envolvendo, por exemplo, o tempo necessário para se tomar um banho, a própria forma de se tomar banho, a utilização de descargas no vaso sanitário que consomem muita água, a lavagem da louça com água corrente, no uso da mangueira como vassoura na limpeza de calçadas, na lavagem de carros, etc (MMA, MEC e IDEC, 2005). O ciclo da água tem sofrido alterações em decorrência das ações antrópicas e a escassez de água limpa já é um dos grandes desafios do século XXI. Levando em conta que mais de 24% da população mundial não tem acesso à água tratada, o tema definitivamente entrou na agenda ambiental mundial (CAB AMBIENTAL, 2018).

Durante séculos, considerou-se que as fontes de água eram inesgotáveis, porém com o grande crescimento da população mundial, o desenvolvimento industrial e tecnológico, a urbanização e a expansão agrícola, a capacidade de autodepuração das águas foi comprometida. Tais fatores contribuem para a poluição e contaminação dos recursos hídricos, o que prejudica a qualidade e quantidade de água disponível ao consumo humano (BOMFIM et al., 2007). Segundo a Lei nº 9.443, de 8 de janeiro de 1997, considera-se a água um bem de domínio público, sendo um recurso natural limitado, dotado de valor econômico, constituindo seu uso prioritário voltado para o consumo humano e a dessedentação de animais em caso de escassez (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS, 2007).

A água é imprescindível para a manutenção da vida, sendo utilizada para consumo, alimentação, higiene pessoal, entre outros, desta forma, deve estar disponível em quantidade e qualidade adequadas a fim de prevenir danos à saúde e favorecer o bem-estar das pessoas (SOUSA, 2002; AMARAL, 2007). Uma das preocupações mundiais está vinculada ao uso preponderante da água e à sua manutenção. As autoridades sanitárias têm função de agentes fiscalizadores, e possuem sua atenção voltada para o abastecimento de água, destino de dejetos, tratamento de esgoto, coleta e disposição de resíduos sólidos gerados, principalmente nos grandes centros urbanos, tendo como objetivo prever as consequências que problemas desse contexto possam gerar ao meio ambiente e a Saúde Pública (SÁ et al., 2005).

Fatos históricos demonstram que algumas das mais generalizadas epidemias que já infligiram as populações humanas, com exceção da peste bubônica, tiveram

sua origem em sistemas de distribuição de água (ARRIGO, 2005). Como consequência, a proteção dos sistemas hídricos da contaminação fecal é um dos mais importantes e difíceis desafios para ambientalistas, e o monitoramento dos recursos hídricos é essencial como forma de controle da saúde ambiental destes ecossistemas. O monitoramento da qualidade da água é um componente essencial dos programas de proteção da saúde humana (PONTES & SCHRAMM, 2004).

A cada dia, milhões de toneladas de esgoto tratado inadequadamente e resíduos agrícolas e industriais são despejados nas águas de todo o mundo. [...] Todos os anos, morrem mais pessoas das consequências de água contaminada do que de todas as formas de violência, incluindo a guerra. [...] A contaminação da água enfraquece ou destrói os ecossistemas naturais que sustentam a saúde humana, a produção alimentar e a biodiversidade. [...] A maioria da água doce poluída acaba nos oceanos, prejudicando áreas costeiras e a pesca. [...] Há uma necessidade urgente para a comunidade global – setores público e privado – de unir-se para assumir o desafio de proteger e melhorar a qualidade da água nos nossos rios, lagos, aquíferos e torneiras (ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS, 2010).

Pesquisas realizadas pelo Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor em 2007, nas cidades de São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná, constataram que a água fornecida para estas cidades, principalmente no Rio de Janeiro, tem entre seus principais problemas a contaminação por coliformes, o baixo teor de cloro na água e alterações de cor. Na cidade do Rio de Janeiro, dentre os locais avaliados, o que tem maior grau de contaminação é onde a água é fornecida pela CEDAE (Companhia de Águas e Esgotos do Rio de Janeiro). Tais parâmetros avaliados são de fundamental importância para a saúde do consumidor, pois alguns patógenos podem estar presentes na água podendo provocar surtos de doenças como cólera, gastroenterites (Tabela 1) (BRASIL, 2016).

Tabela 1 - Principais doenças transmitidas pela água, seus agentes patogênicos e suas vias de entrada e saída do corpo humano Modificado de D'AGUILA e colaboradores (2000)

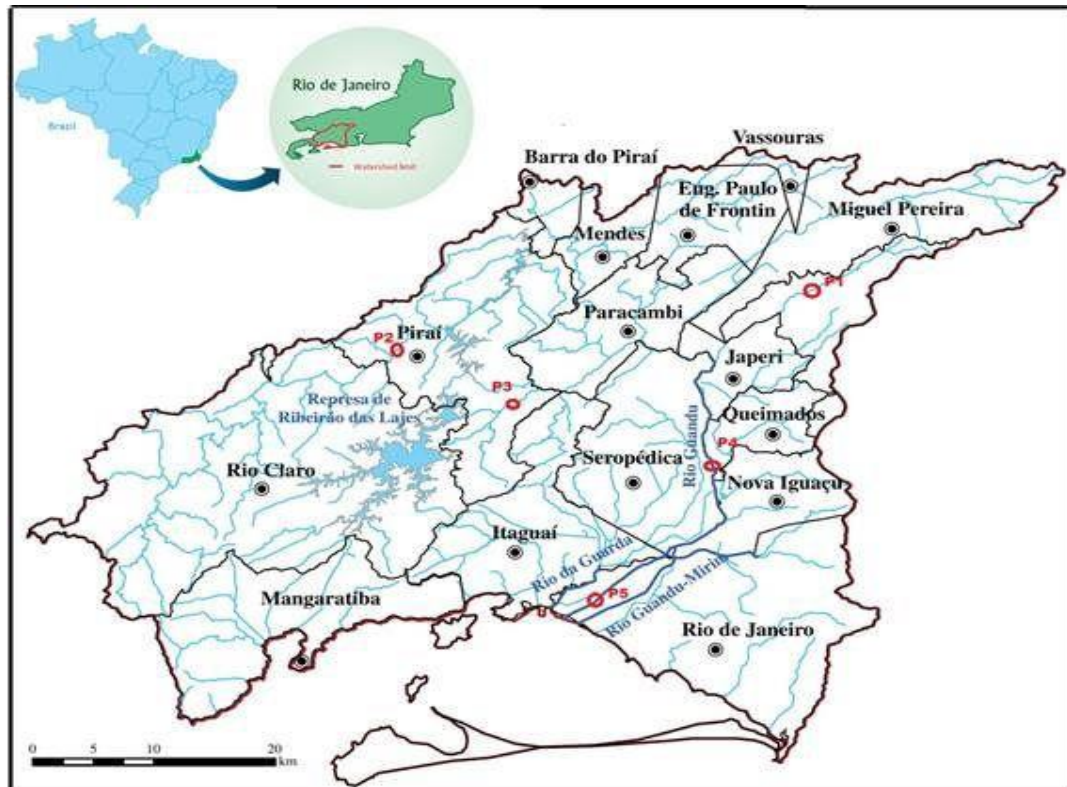
Doença	Agente etiológico	Via de saída do corpo humano	Via de entrada do corpo humano
Cólera	<i>Vibrio cholerae</i>	Fecal	Oral
Febre tifoide	<i>Salmonella typhi</i>	Fecal	Oral
Febre paratifoide	<i>Salmonella paratyphi A,B,C</i>	Fecal	Oral
Leptospirose	<i>Leptospira spp.</i>	Fecal	Oral
Giardíase	<i>Giardia lamblia</i>	Fecal	Oral
Amebíase	<i>Entamoeba spp.</i>	Fecal	Oral
Ascaridíase	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Fecal	Oral
Ancilostomose	<i>Ancylostoma duodenale</i>	Fecal	Oral
Disenteria bacilar	<i>Shigella spp.</i>	Fecal	Oral
Esquitossomose	<i>Schistosoma mansoni</i>	Fecal	Oral
Salmonelose	<i>Salmonella entérica</i>	Fecal	Oral
Hepatite infecciosa	Vírus da hepatite tipo A	Fecal	Oral
Gastroenterite	Outros tipos de <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> e <i>Proteus</i> spp.	Fecal	Oral
Diarréia infantil	Tipos enteropatogênicos de <i>Escherichia coli</i>	Fecal	Oral

Fonte: (Do autor, 2014).

1.4 Bacia hidrográfica do Rio Guandu

Situada no município do Rio de Janeiro, a bacia hidrográfica do rio Guandu abarca 15 municípios: Seropédica, Itaguaí, Paracambi, Japeri, Queimados, Miguel Pereira, Vassouras, Piraí, Rio Claro, Engenheiro Paulo de Frontin, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Mendes, Mangaratiba e Barra do Piraí. Esta bacia é formada pelos rios Guandu, da Guarda e Guandu-Mirim, com uma extensão de 3.600 km², está localizada a oeste da Baía da Guanabara (Figura 2) (VETTORAZZI et al., 2012).

Figura 2 - Mapa da Bacia Hidrográfica dos Rios Guandu, da Guarda, Guandu-Mirim – RII



Fonte: (Comitê Guandu, 2012).

A bacia do Guandu é de fundamental importância, pois é responsável pelo abastecimento da região metropolitana do Rio de Janeiro, e também proporciona o funcionamento de hidrelétricas, termelétricas e outras indústrias. Sendo considerada única para subsistência e desenvolvimento da região, estando sob a proteção das legislações federal, estadual e municipal. Apesar da importância da bacia para a população, suas águas sofrem com problemas decorrentes e recorrentes, causada por lançamento *in natura* de esgoto doméstico, resíduos industriais e defensivos agrícolas, além da extração mineral, principalmente areia, do desmatamento das matas ciliares e com raras exceções, também pode se mencionar a frágil ou inexistência gestão ambiental por parte dos poderes públicos municipais e da população em geral (INSTITUTO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2012).

O rio Guandu, localizado na região da Baixada Fluminense, Estado do Rio de Janeiro com a extensão de 48 km e largura variável (50 a 90m), nasce na confluência de Ribeirão das Lajes com rio Santana, possuindo como principais afluentes os rios dos Macacos, Santana, São Pedro, Poços/Queimados e Ipiranga. Grande parte da água do rio Guandu provém do rio Paraíba do Sul através da

transposição que ocorre no Bairro de Barra de Pirai no reservatório de Santa Cecília, estação da concessionária de energia elétrica do Estado do Rio de Janeiro. O trecho final do rio, que possui 15 km de extensão é denominado Canal de São Francisco (SALAMENE, 2011).

A bacia do Guandu é de grande importância para o Rio de Janeiro, visto que nela é realizada a captação de água para a Estação de Tratamento de Água (ETA) Guandu, inserida no *Guinness Book* como a maior estação de tratamento de águas em produção contínua, operada pela CEDAE, sendo responsável pelo abastecimento de água local e de aproximadamente 85% da população da Região Metropolitana do Rio de Janeiro (VIANA, 2009; COMPANHIA ESTADUAL DE ÁGUAS E ESGOTO, 2018a). A CEDAE possui grande interesse na qualidade da água do Guandu, pois quanto menor for o grau de poluição, menor será o gasto na ETA Guandu (SALAMENE, 2007).

A poluição do rio Guandu está diretamente relacionada com o crescimento industrial e populacional nos municípios que compõem a bacia hidrográfica e da poluição oriunda do rio Paraíba do Sul. Os rios Poços/Queimados e Cabuçu/Ipiranga possuem suas águas com alto índice de poluição, estes se encontram com o rio Guandu na lagoa do Guandu que possui baixa taxa de renovação hídrica e por vezes encontra-se tomada de macrófitas e apresenta mau cheiro (SALAMENE, 2007; VIANA, 2009).

O rio Queimados atravessa a área urbana do município de mesmo nome e o Pólo Industrial de Queimados, desembocando no rio dos Poços. Desde a nascente a água deste rio é comprometida, pois recebe esgoto sanitário da área de Queimados sem qualquer tratamento. Também recebe efluentes industriais que provêm das atividades realizadas no Pólo industrial. O rio dos Poços recebe rios que drenam a região urbana de Queimados. Despejo que são oriundos das áreas urbanas de Queimados e Nova Iguaçu são lançados no rio Ipiranga que possui como principal afluente o rio Cabuçu (SERBER, 2005).

A ETA Guandu está situada em nova Iguaçu e atende aos seguintes municípios: Nilópolis, Nova Iguaçu, Duque de Caxias, Belford Roxo, São João de Meriti, Itaguaí, Queimados e Rio de Janeiro. Segundo a CEDAE (2018b) a água chega a ETA Guandu barrenta e turva, e sai pura e cristalina após passar por diversas etapas tais como: coagulação química, floculação, decantação, filtração, clarificação, desinfecção com cloro e por último fluoretação (Figura 3).

Figura 3 - Esquema de uma ETA convencional



Fonte: (SERVIÇOS AUTÔNOMO MUNICIPAL DE ÁGUA E ESGOTO, 2018).

1.5 Desinfecção com cloro em ETA

Os processos de desinfecção têm como objetivo a destruição ou inativação de organismos patogênicos, capazes de produzir doenças, ou de outros organismos indesejáveis. O cloro e os agentes que contêm cloro são bastante utilizados com o intuito de desinfecção de água. O seu primeiro uso foi relatado em 1850 e, atualmente esse tratamento é considerado fator contribuinte para diminuição de doenças veiculadas pela água (DANIEL, 2001).

A adição de cloro à água potável reduz consideravelmente o risco de doenças infecciosas transmitidas pela água. Por mais de um século, a segurança do abastecimento de água potável foi melhorada pelo tratamento com cloro. E ainda permanece como o desinfetante de água potável mais comum. A adição de cloro na água potável tem por finalidade reduzir ou eliminar micro-organismos, que podem estar presentes na água de abastecimento. Sabe-se que a maioria de estações de tratamento de água para abastecimento público utiliza na sua desinfecção o gás cloro. Já piscinas, banheiras de hidromassagem, entre outros geralmente são clorados com substâncias que contem cloro como hipoclorito de cálcio, hipoclorito (alvejante) ou tricloro-triazinetriona (com conhecido como " tricloro "). Em todos os casos, a eficácia do cloro como germicida é resultado de sua ação oxidante (SHRIVASTAVA et al., 2004).

A Portaria no 518/04 do Ministério da Saúde estabelece que as águas para consumo, devam ser cloradas de forma a alcançar concentração de cloro residual final entre 0,5 a 2,0 ppm, em qualquer ponto da rede de distribuição (BRASIL, 2004). O hipoclorito de sódio é o agente de cloro mais utilizado. Seu mecanismo de ação compreende em aumentar o pH do meio, provocando mudanças na estrutura da célula, levando a danos na membrana externa, degeneração ou inibição irreversível das proteínas do citoplasma, além de reações de oxidação. Podem ocorrer, também, reações de cloraminação e saponificação (ESTRELA, 2000). Registros, na literatura, demonstram que um considerável número de bactérias tem a capacidade de desenvolver resistência aos diversos agentes usados no tratamento de água, incluindo o cloro (LE DANTEC et al., 2002; MEDEIROS et al., 2007).

A Organização Mundial da Saúde considera a *P. aeruginosa* um micro-organismo moderadamente resistente ao cloro (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). Estudos demonstram que bactérias que resistem a cloração parecem apresentar mais resistências, o que indica que o cloro pode ter capacidade de selecionar linhagens mais resistentes aos antibióticos assim como anti-sépticos e desinfetantes (PELLEGRINO et al., 2002; ORRETT, 2004). Os principais mecanismos de resistência de micro-organismos são: diminuição da permeabilidade da membrana, mecanismos de efluxo, mudança nos polissacarídeos, modificação de DNA-girase e inativação de estruturas de enzimas (MEDEIROS et al., 2007).

É importante ressaltar que a *P. aeruginosa* é a espécie mais virulenta do gênero *Pseudomonas* (NGWA et al., 2017). É um patógeno oportunista, encontrado em diversos ambientes e podem causar infecções nosocomiais severas e uma série de infecções sistêmicas humanas, incluindo endocardite, osteomielite, meningite, entre outras (STOLER et al., 2015).

O gênero *Ochrobactrum*, formado por bactérias Gram-negativas é amplamente distribuído no meio ambiente e pode fazer parte da flora normal do intestino grosso (APISARNTHANARAK et al., 2005). Espécies do gênero *Ochrobactrum* pertencem a família *Brucellaceae* e possuem 3 espécies principais, *O. anthropi*, *O. intermedium* e *O. pseudointermedium*, isolados de amostras clínicas (RASTOGI, 2017). O *O. anthropi* é considerado um patógeno oportunista e nosocomial, isolado de vários espécimes clínicos. As infecções nosocomiais por *O. anthropi*, principalmente em pacientes com cateter venoso central residente, aumentaram durante a última década, e apresentam resistência múltipla a

antibióticos (MÖLLER et al, 1999). *O. intermedium*, também é considerado um patógeno oportunista, mas não é tão comum quanto do *O. anthropi*. APISARNTHANARAK e colaboradores (2005) relataram um caso de bacteremia por *O. intermedium*, inicialmente mal identificada como *Shewanella putrefaciens*, em paciente com câncer de bexiga submetidos a múltiplas cirurgias gastrointestinais.

1.6 Bioindicadores de contaminação fecal

O conceito de indicador microbiológico, originalmente definido para avaliar a qualidade da água, é baseado na presença ou ausência de grupos ou de um único micro-organismo indicador em ambientes aquáticos (MACÊDO, 2005). As águas destinadas ao abastecimento apresentam o risco de serem poluídas por águas residuárias e dejetos de origem animal ou humano, podendo, desta forma, conter micro-organismos patogênicos, tornando-se assim um veículo de transmissão de doenças. Por isso, há a necessidade de controlar a qualidade dessas águas.

Coliformes totais, coliformes termotolerantes, enterococos e *E. coli* vêm sendo mundialmente utilizados como indicadores da qualidade microbiológica da água (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; APHA, AWWA & WEF, 2012), já que são micro-organismos presentes em grande número na microbiota intestinal de humanos e outros animais de sangue quente, e são fáceis de serem enumerados por métodos simples de cultivo (GRIFFITH et al., 2009). Assim, a qualidade microbiológica da água é frequentemente avaliada pela detecção de bactérias fecais indicadoras, tais como *E. coli* e *Enterococos*. A determinação de níveis elevados desses indicadores indica a presença de poluição fecal, o que pode implicar em riscos para a saúde pública. Além disso, não é possível vincular essas bactérias indicadoras a uma fonte de poluição específica devido à natureza ubíqua desses micro-organismos, o que dificulta a avaliação de riscos (GORDON 2001; STEWART et al 2007; FIELD & SAMADPOUR, 2007). Além disso, já se sabe que essas bactérias fecais indicadoras são capazes de persistirem tanto em sedimentos (DESMARAIS et al., 2002; ANDERSON et al., 2005) quanto em macrófitas aquáticas submersas (BADGLEY et al., 2010 a, b). Quando ocorre a suspensão destes sedimentos via turbulências naturais ou induzidas pelo homem, as concentrações de bactérias fecais indicadoras podem ser elevadas e assim superestimar o nível de

contaminação fecal em águas (GRACZYK et al., 2007a, b; PHILIP et al., 2009; STALEY et al., 2012).

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

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

Os coliformes de origem humana ou animal podem indicar a presença de patógenos de veiculação hídrica. No entanto, esses indicadores apresentam limitações quanto à discriminação da origem dessa contaminação fecal (humana e

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

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

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

1.7 Rastreamento da fonte microbiana em ambientes aquáticos

Com o intuito de saber a fonte de contaminação fecal de águas ambientais, o Rastreamento da Fonte Microbiana (RFM) surgiu no final da década do século XX (HARWOOD et al., 2014). Esses métodos baseiam-se em moléculas de assinatura (biomarcadores), tais como as sequências de DNA de micro-organismos associadas a diferentes espécies animais, permitindo a distinção entre as fontes de

contaminações fecais (SCOTT, 2002; MIESZKIN et al., 2009). A utilização de biomarcadores hospedeiro-específicos é de grande relevância em sua aplicação em águas ambientais, principalmente em água de abastecimento. Segundo BERNHARD & FIELD (2000) a persistência da contaminação ocorre em parte pela ausência de métodos que indique o agente causador.

A premissa básica do RFM é que certos micro-organismos fecais são fortemente associados a hospedeiros específicos. Os métodos de RFM podem ser divididos em dependentes de cultivo e independentes de cultivo. Neste caso em particular uma "biblioteca" é uma coleção de micro-organismos de diferentes fontes potenciais, bem como do local em estudo.

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

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

Atualmente, diversos marcadores microbianos humanos têm sido avaliados como *Bacteroides thetaiotamicron* (CARSON et al., 2005), *Methanobrevibacter*

smithii (UFNAR et al., 2007), *poliomavírus* humano (MCQUAIG et al., 2006) e *Faecalibacterium* (ZHENG et al., 2009). No Brasil, as pesquisas nessa área são escassas e, dessa forma, a seleção de bioindicadores e o desenvolvimento de metodologias mais acuradas e sensíveis capazes de discriminar as diferentes fontes de contaminação fecal são de extrema relevância para assegurar a qualidade das águas e conseqüentemente evitar danos à saúde da população (FIELD & SAMADPOUR, 2007).

Um bioindicador de contaminação fecal adequado, deve possuir as seguintes características: (1) deve ser um micro-organismo não patogênico; (2) ser detectado e enumerado por técnicas simples e rápidas; (3) apresentar sobrevivência no meio ambiente similar aos patógenos. Além de permitir o rastreamento da fonte de contaminação microbiana, bioindicadores devem apresentar todas as características do indicador clássico e ter poder de discriminar a origem do hospedeiro (SCOTT et al., 2002, UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2005). Até o momento, não existe um método único e universal para este tipo de análise, portanto a obtenção de biomarcadores moleculares que permitam a identificação de fontes de contaminação fecal humana e animal poderá ajudar na implantação de técnicas que possibilitem rastrear essas fontes de contaminação em águas superficiais. O uso desses bioindicadores para identificar a fonte de contaminação fecal é imperativo para preservar a integridade dos corpos hídricos e proteger a saúde da população.

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

1.8 Ordem *bacteroidales*

O filo Bacteroidetes são representados por bacilos Gram-negativos, e possui 4 classes: *Bacteroidia*, *Cytophagia*, *Flavobacteriia* e *sphingobacteria*. A classe *Bacteroidia* possui uma única ordem: *Bacteroidales*, que por sua vez possui cinco famílias: *Bacteroidaceae*, *Rikenellaceae*, *Porphyromonadaceae*, *Marinilabiliaceae* e *Prevotellaceae*. Esta classificação foi baseada em análises filogenética do gene *rrs* 16S rRNA (KRIEG et al., 2010; MERINO, 2012). Micro-organismos da ordem *Bacteroidales* são considerados bons alvos, devido a sua taxa de sobrevivência curta quando liberados no ambiente natural (devido à sua baixa tolerância ao oxigênio) e sua abundância em fezes de animais de sangue quente (FIKSDAL et al., 1985; BERNHARD & FIELD, 2000; SAVICHTCHEVA E OKABE, 2006).

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

Dentro dessa ordem micro-organismos pertencentes à família *Bacteroidaceae* podem ser encontrados na cavidade oral e na microbiota intestinal de animais (LESER, 2001), sendo predominantes entre as bactérias entéricas presente nas fezes de animais de sangue quente (KOBAYASHI et al., 2013). Os micro-organismos dos gêneros *Bacteroides* e *Prevotella* são bacilos, anaeróbicos, gram-negativos e estão frequentemente envolvidos em infecções humanas (FALAGAS & SIAKAVELLAS, 2000). Vários estudos têm sugerido que alguns micro-organismos da ordem *Bacteroidales* podem ser associados a hospedeiro-específicos (KREADER, 1995). BERNHARD & FIELD (2000) usaram a heterogeneidade dos produtos da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ou o polimorfismo de fragmentos terminais de restrição (T-RFLP) para identificar sequências específicas, do *rrs* 16S rRNA de ruminantes e humanos como marcador genético da ordem *Bacteroidales*.

1.9 Domínio Archaea

Há cerca de 25 anos atrás, com base no estudo de sequências do gene 16S do RNA ribossomal (16S rRNA) Carl Woese e colaboradores propuseram uma nova classificação dos organismos vivos em três domínios: Archaea, Bacteria e Eukarya (WOESE, 1990). Acredita-se que esses domínios surgiram através de diferentes vias evolutivas pertencentes a um ancestral comum (CARDOSO et al., 2003). O domínio Archaea possui aspectos comuns aos encontrados nos domínios Bacteria e Eukarya, porém também apresenta muitas características únicas (BEVERIDGE, 2001)

O domínio Archaea consiste de quatro filos: Crenarchaeota, que contém as archaea hipertermófilas redutoras de enxofre; Euryarchaeota, que compreende uma grande diversidade de organismos, incluindo as espécies metanogênicas, as halófilicas extremas e espécies hipertermófilas; Korarchaeota, conhecida somente de seqüências genéticas do gene *rrs* do 16S rRNA obtida de amostras de fontes hidrotermais; Thaumarchaeota, é um filo proposto recentemente para o domínio Archaea (BROCHIER-ARMANET et al., 2008). É composto por organismos mesofílicos e desenvolve papel importante nos ciclos geobioquímicos, como o ciclo do nitrogênio. O filo foi proposto baseado em dados filogenéticos, como sequência de *rrs* e a presença de uma forma de topoisomerase tipo I, que previamente só era encontrada em eucariontes (CARDOSO et al., 2003; AUCHTUNG et al., 2006;).

O filo Euryarchaeota, é representado principalmente por archaeas metanogênicas, porém, também possui um grupo distinto de organismos termoacidófilo associado ao gênero *Thermoplasma*, que são caracterizados pela ausência de parede celular (VAZOLLER et al., 1999). As archaeas metanogênicas são organismos obrigatoriamente anaeróbios e liberam gás metano (CH₄) como resíduo metabólico. São encontradas em ambientes com ausência de oxigênio e abundância de matéria orgânica, como brejos, açudes, lagos, sedimentos marinhos e rúmen de bovinos. Elas retiram hidrogênio e gás carbônico desses ambientes e os utilizam em seu metabolismo. Vivem como simbioses de uma grande variedade de protozoários também anaeróbicos, convertendo produtos finais de fermentação em gás metano ou CO₂. São de grande importância no ambiente no qual vivem pela alta eficiência de sua enzima hidrogenase, que, mantendo uma baixa pressão parcial de H₂ – para que a metanogênese ocorra – permite que os demais organismos fermentadores

façam reoxidação do NADH, o que corresponde a um maior rendimento de ATP e um aumento da biomassa. Esse fenômeno é conhecido como “Transferência de Hidrogênio Interespecífica” (CARDOSO et al., 2003).

O gênero *Methanobrevibacter* é um membro da ordem *Methanobacteriales* do domínio Archaea. Este gênero inclui 14 espécies conhecidas que habitam o trato intestinal animal, plantas em decomposição e lodo anaeróbico de estações de tratamento de esgoto. As espécies de *Methanobrevibacter* incluem *M. ruminantium* (intestino de ruminantes); *M. boviskoreani* e *M. millerae* (rúmen bovino); *M. arboriphilus* encontrado em material de plantas em decomposição; *M. cuticularis*, *M. curvatus* e *M. filiformis* (intestino de cupim); *M. oralis* (cavidade bucal humana); *M. gottschalkii* e *M. thaueri* (intestino de cavalo e porco); *M. woesei* (intestino de rato e ganso); *M. acididurans* e *M. wolinii* (intestino de carneiro); *M. olleyae* (rúmen ovino); *M. smithii* (intestino humano) (LAI et al. 2004; LEE et al. 2013). As espécies do gênero *Methanobrevibacter* são consideradas metanogênicas dominantes nestes animais e ajudam na digestão da celulose. Poucas espécies ocorrem em mais de um organismo e por esse motivo podem ser utilizados como bioindicadores de poluição fecal no ambiente. Atualmente, com o auxílio das técnicas de biologia molecular vem se investigando as possíveis relações de prevalência de archaea em diversas espécies de animais de sangue quente.

Através do sequenciamento do gene *rrs* do 16S rRNA, estudos confirmam a presença de *M. smithii* e *M. stadtmanae* no intestino humano com prevalência variável e baixa, enquanto *M. stadtmanae* apresenta menor detecção na maioria dos casos. Segundo UFNAR et al. (2006), *M. smithii* é encontrado no trato gastrointestinal de aproximadamente um terço dos indivíduos que residem nos Estados Unidos e Reino Unido, podendo compreender até 10% de todos os anaeróbios encontrados no intestino de adultos saudáveis e altamente prevalente em esgoto misto. Entretanto, estudos realizados por DÉBIS et al. (2011) demonstraram através de otimizações no protocolo de extração de DNA de fezes humanas, a obtenção de resultados satisfatórios, onde a totalidade de indivíduos testados apresentaram organismos do domínio Archaea. Dentre os 650 indivíduos analisados foi possível detectar uma elevada prevalência de *M. smithii* (95,5%) e *M. stadtmanae* (29,4%) no intestino humano (DRIDI et al., 2011). Estudos em camundongos gnotobioticos (“germe-free”) indicam que o *M. smithii* afeta a especificidade e eficiência da digestão de polissacarídeos, influenciando, dessa

maneira, a absorção de calorias e adiposidade do hospedeiro. O processo da metanogênese previne o acúmulo de H₂ no intestino humano, aumentando a eficiência da fermentação microbiana. Estas descobertas conduziram à hipótese de que *M. smithii* pode ser um alvo terapêutico para a redução da absorção de energia em humanos obesos (SAMUEL et al., 2007).

Outras espécies do gênero *Methanobrevibacter* que vem sendo considerados bons alvos de contaminação fecal específicas como o *M. ruminantium* (M1 ou DSM 1093), isolada a partir do rúmen de bovinos por BRYANT (1965), o *M. thaueri*, isolada de fezes suínas, por Rolf K. Thauer, *M. gottschalkii*, isolada de fezes de equinos e nomeada em homenagem à Gerhard Gottschalk devido suas significantes contribuições na definição bioquímica da metanogênese (KÖNIG, 1986; MILLER et al., 1986).

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

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

1.10 PCR em tempo real na detecção de biomarcador

O advento dos métodos moleculares foi um dos maiores passos das ciências biológicas durante o século XX. Dentre as técnicas baseadas em biologia molecular, *Polymerase Chain Reaction* (PCR) trouxe enormes benefícios e desenvolvimentos científicos, como sequenciamento de genoma, a expressão de genes em sistemas recombinantes, o estudo de genética molecular, a determinação rápida da paternidade e o diagnóstico rápido de doenças infecciosas se mostrando como um excelente caminho para a rápida detecção de patógenos, até mesmo aqueles de difícil cultivo (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004; VALONES et al., 2009).

A PCR em tempo real surgiu da necessidade de monitorar simultaneamente a quantidade e qualidade do DNA amplificado levando assim ao desenvolvimento de uma variante da técnica da PCR convencional, essa variante tem se mostrando uma técnica mais rápida e precisa, e é considerada uma inovação tecnológica e tem ganhado espaço em laboratórios clínicos e nos laboratórios de pesquisas (NOVAIS & PIRES-ALVES, 2004; VALONES et al., 2009; OLIVEIRA, 2010).

O monitoramento da PCR, em tempo real, revolucionou o processo de quantificação de fragmentos de DNA e RNA. A PCR em tempo real permite a quantificação destes ácidos nucleicos de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, uma vez que determina valores de quantificação durante a fase exponencial da reação. O acúmulo de produtos da PCR é detectado e monitorado diretamente pela leitura do aumento da fluorescência do fluoróforo utilizado, enquanto na PCR tradicional os produtos precisam ser posteriormente analisados por eletroforese. O principal fundamento na utilização deste método é o chamado limiar do ciclo, ou *threshold cycle* (Ct). O Ct é definido como o ciclo da reação de PCR no qual o sinal fluorescente do corante sinalizador atravessa uma linha arbitrária denominada limiar. Para apresentar os dados na forma de Ct, deve-se certificar que o limiar está delimitado na fase exponencial de amplificação, acima do ruído de fundo e abaixo da fase de platô da reação de PCR. O valor numérico do Ct é inversamente proporcional à quantidade inicial do transcrito de interesse na reação, ou seja, quanto menor o valor de Ct, maior a quantidade inicial do transcrito na amostra (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008).

O sucesso da técnica rapidamente levou ao seu aperfeiçoamento. Para tal contribuíram, por exemplo, o desenvolvimento de sondas de oligonucleótidos de

dupla-hélice e a revelação da atividade exonucleásica da enzima *Taq* polimerase. Foram criadas e comercializadas muitas plataformas de instrumentação, porém a maioria é composta por um termociclador, com sistema óptico para a excitação e coleta da emissão da fluorescência e um computador com software próprio para a aquisição de dados e análise final da reação (MACKAY et al., 2007).

2 RELEVÂNCIA

A relação saúde-ambiente vem sendo ressaltada desde os primórdios com Hipócrates, na Grécia Antiga, no início do século IV a.C. Sua obra, denominada *Dos Ares, das Águas e dos Lugares*, já trazia preocupações com aspectos ambientais na determinação de patologias, destacando a relação entre as doenças, principalmente as endêmicas, e suas origens (RIBEIRO, 2004).

As condições ambientais adversas nos países em desenvolvimento passaram a serem identificadas como riscos à saúde, que resultaram na necessidade de estudar e intervir sobre novos problemas, bem como abordar antigos problemas em uma nova perspectiva. Assim, surgiu a necessidade de superação do modelo de Vigilância à Saúde baseado em agravos, incorporando a temática ambiental nas práticas da Saúde Pública (BARCELOS & QUITÉRIO, 2006). O sistema de Vigilância em Saúde Ambiental (SVSA) começou a ser implantada pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA), com base no Decreto nº 3.450/2000, que estabeleceu, dentre suas competências, “a gestão do sistema nacional de vigilância ambiental”.

A integração das vigilâncias ganhou respaldo com a publicação da Portaria do Ministério da Saúde nº 3252, de 22 de dezembro de 2009, que veio confirmar a necessidade de atuação conjunta das vigilâncias: epidemiológica, sanitária, da situação de saúde, da saúde ambiental, da saúde do trabalhador, e da promoção da saúde, com o objetivo de controlar determinantes, riscos e danos à saúde de populações que vivem em determinados territórios, garantindo tanto a abordagem individual como coletiva dos problemas de saúde (BRASIL, 2009).

Em 2009, o Ministério da Saúde iniciou o processo de revisão da Portaria do Ministério da Saúde nº 518/2004, que determina o padrão de potabilidade da água e estabelece as competências do controle e da vigilância da qualidade da água para consumo humano. O processo contínuo e participativo de revisão da norma de potabilidade da água permite, a qualquer tempo, devido a novos conhecimentos, a adoção de critérios técnicos e científicos que assegurem à população brasileira o acesso à água de qualidade.

Atualmente, encontra-se constituído o Sistema Nacional de Vigilância Ambiental em Saúde, SNVA, que “prioriza a informação no campo da vigilância

ambiental, de fatores biológicos (vetores, hospedeiros, reservatórios, animais peçonhentos), qualidade da água para consumo humano, contaminantes ambientais químicos e físicos que possam interferir na qualidade da água, ar e solo, e os riscos de correntes de desastres naturais e de acidentes com produtos perigosos” (Decreto nº 3.450, de 10 de maio de 2000) (OMS, 1978).

As doenças veiculadas através da água têm sido apontadas constantemente como um problema nos diversos tempos históricos da humanidade. A destinação dos resíduos produzidos pelas populações humanas, sejam eles químicos ou biológicos, sempre estiveram presentes entre os problemas de saúde pública (Barcellos & Quitério, 2006). Segundo a OMS, 80% das doenças causadas em países em desenvolvimento estão relacionadas a contaminação de água e falta de saneamento básico (VERAS et al, 2017).

No que se refere à poluição fecal das águas voltadas ao abastecimento, o homem e outros animais de sangue quente diferem quanto à composição de suas fezes, podendo liberar diferentes patógenos e outras substâncias, como antibióticos e hormônios, capazes de provocar danos à saúde da população. Com isso, o monitoramento da qualidade microbiológica dessas águas, através da quantificação de biomarcadores de contaminação fecal hospedeiro-específico, vem sendo considerada de extrema relevância.

As metodologias utilizadas atualmente para detecção de contaminantes fecais na água apresentam limitações, tais como adaptação ou inibição de micro-organismos indicadores, e principalmente a não determinação da fonte da contaminação. Ferramentas moleculares, como a PCR em tempo real são uma alternativa para contornar essas limitações e gerar dados robustos capazes de contribuir para o aprimoramento dos serviços de vigilância em saúde ambiental.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Quantificação da contaminação fecal hospedeiro-específico e avaliação da susceptibilidade de isolados bacterianos dos gêneros *Pseudomonas* e *Ochrobactrum* ao cloro e resistência aos antimicrobianos em águas destinadas ao abastecimento público, da bacia do rio Guandu.

3.2 Específicos

- Coletar amostras de água superficial de nove pontos da bacia hidrográfica do Rio Guandu.
- Avaliar os parâmetros físicos e químicos como: temperatura, Potencial Hidrogeniônico (pH), Oxigênio Dissolvido (OD), salinidade e condutividade nas amostras;
- Determinar as concentrações de coliformes totais/*E. coli* dos pontos de coleta;
- Detectar e quantificar a contaminação fecal humana, suína, equina e bovina por meio da qPCR utilizando biomarcadores dos domínios Bacteria e Archaea;
- Caracterizar isolados de *Pseudomonas* spp. e *Ochrobactrum* spp. e determinar a susceptibilidade aos antimicrobianos e as concentrações bactericidas mínimas de hipoclorito de sódio em cinco pontos da bacia hidrográfica do rio Guandu

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta de amostras fecais

A especificidade dos iniciadores foi realizada através da qPCR frente às fezes humanas, suínas, equinas e bovinas coletadas de uma fazenda em Mato Grosso do Sul em um estudo anteriormente descrito no laboratório. Foram coletadas 100 gramas de fezes de cada um dos hospedeiros. As amostras foram refrigeradas e transportadas ao laboratório, em seguida foram conservadas a -20°C e posteriormente foi realizada a extração de DNA, conforme protocolo do item 4.2.

4.2 Extração de DNA total de amostras de origem fecal

A extração do DNA das amostras fecais foi realizada utilizando-se protocolo adaptado de GROßKOPF et al.,1998 onde um grama de fezes foi colocado em Eppendorf de 2 mL, e acrescidos 1 mL de Phosphate-Buffered Saline (PBS) e centrifugado a 5.000 rpm por 5 minutos (repetido 3 vezes). Logo após foi realizado o Freeze-Thaw, que consiste em colocar as amostras a -70°C por 2 minutos e depois a 65°C por 2 minutos, este processo foi repetido 3 vezes. Em seguida foram acrescentado 5 mg de Lisozima e as amostras serão incubadas por 1 hora a 37°C. Após foi acrescentado 2% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e as amostras foram incubadas por 15 minutos a 60°C. Em seguida foi adicionado 250 mg de pérolas de vidro (0,1mm de diâmetro); as amostras foram agitadas por 3 vezes no equipamento Mini-Beadbeater-1 (BIOSPEC) por 80 segundos à velocidade máxima e a seguir as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido para novos tubos de 2 mL e foram acrescentados 150 µL de CTAB/NACL (10% CTAB/0,7M NaCL); homogeneizadas em Vortex e incubadas a 65°C por 30 minutos (Heat Block); e posteriormente armazenadas no freezer a -20°C, 24h. Foram acrescentados 60 µL de PBS/BSA (1,5%) e 700 µL de fenol equilibrado com TE (pH=7,5) que foi misturado gentilmente com as mãos por 10 minutos. Após foi centrifugado a 8.000 rpm por 10 minutos. Após a constatação de lise celular através da presença de 3 fases, o sobrenadante foi recolhido para novo tubo de 2 mL e foram acrescentados 800 µL de clorofórmio/isoamílico (24:1) e agitado manualmente por 10 minutos, centrifugado a 13:000 rpm por 10 minutos a 10°C. O sobrenadante

foi recolhido para novo tubo de 2 mL e foram acrescentados 250 µL de acetato de amônio (3M a -20°C), e colocado no gelo por 15 minutos. Em seguida foram acrescentados 900 µL de isopropanol (-20°C), agitado manualmente e incubado a -70°C por 10 minutos, ou -20°C por 1 hora ou por 24h. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos a 4°C; O sobrenadante foi descartado e acrescentados 800 µL de etanol a 70%, para lavagem do pellet por inversão. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min. o sobrenadante foi descartado e ficou secando na estante por 10 minutos; logo após o “pellet” foi ressuscitado em 200 µL de água ultrapura (DNase e RNase – free) Gibco® (INVITROGEN), com pH=7,5 (ideal para DNA). O produto foi purificado utilizando-se o KIT QIAGEN (DNeasy Blood & Tissue Handbook) de acordo com protocolo descrito no manual do fabricante. Em seguida o DNA foi quantificado em equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer (INVITROGEN) conforme o manual do fabricante.

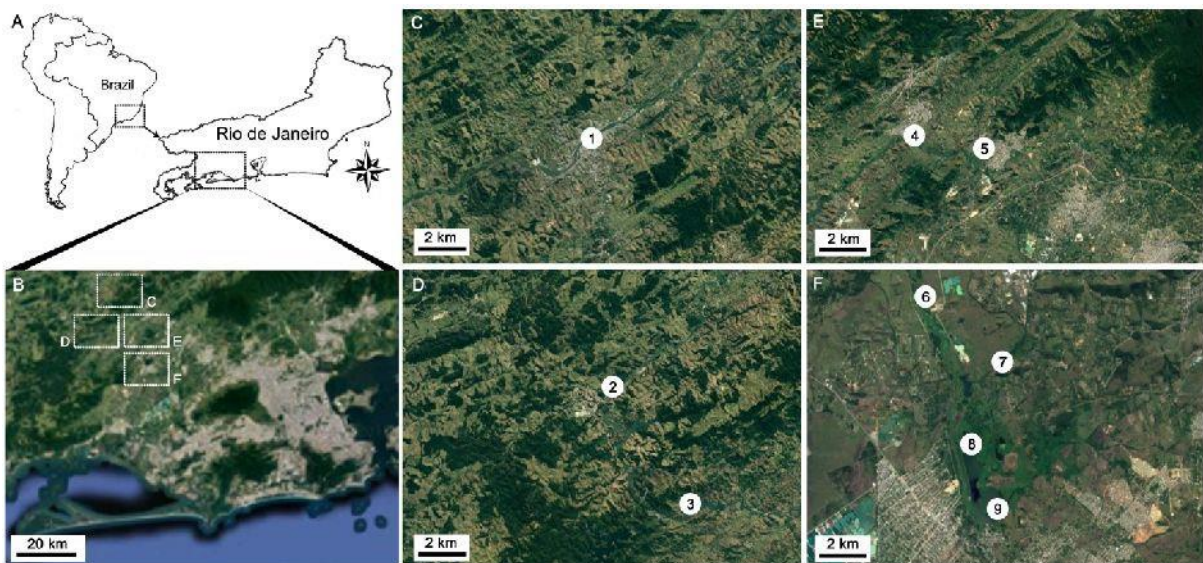
Para verificação da integridade do DNA genômico foi realizada eletroforese em gel de agarose após a extração e purificação do DNA. O gel foi preparado com 1% de agarose (SIGMA-ALDRICH) em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X e a corrida foi realizada a 45 volts por 40 min e posteriormente 60 v por 20 min adicionais. A coloração do gel foi realizada com solução de GelRed™ Acid gel Stain 60x e analisada através do sistema de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE Healthcare).

4.3 Coleta de amostras de águas superficiais

Foram realizadas 2 coletas de 9 pontos da bacia hidrográfica do rio Guandu nos anos de 2014 e 2016. Foram coletados 5 litros de amostras de cada ponto (Figura 4).

As amostras foram refrigeradas e transportadas ao laboratório, em seguida foram filtradas (Filtros Sterivex-GS de 0,22µm). O material retido nos filtros foi conservado a -20°C e posteriormente foi realizada a extração de DNA total, conforme protocolo do item 4.2.

Figura 4 - Pontos de coleta da bacia do rio Guandu.



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

Fonte: (Google, 2018).

4.4 Parâmetros físico-químicos e microbiológicos

Após a coleta foram analisados os seguintes parâmetros físico-químicos das amostras: temperatura, pH, condutividade, oxigênio dissolvido e turbidez. As dosagens foram realizadas através do equipamento *Water Quality Checker U-10* (HORIBA). A determinação do número mais provável (NMP) para detecção de coliformes totais e de *E. coli* foi realizado através do método do substrato definido (COLILERT, IDEXX), conforme protocolo descrito em *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, AWWA & WEF, 2012).

4.5 Extração de dna total em amostras de águas superficiais

O DNA total das amostras foi extraído, purificado e quantificado de acordo com o protocolo descrito no item 4.2.

4.6 Reação em cadeia da polimerase em tempo real

O DNA de *Methanobrevibacter smithii* INCQS A45D (DSM 11975), *Methanobrevibacter ruminantium* INCQS A36D (DSM 1093), *Methanobrevibacter gottschalkii* INCQS A49D (DSM 11977) foram empregados como controles positivos da reação de detecção e quantificação de bioindicadores do domínio Archaea. O fragmento amplificado na detecção do bioindicador de contaminação fecal suína do domínio Bacteria foi sequenciado e após confirmação da identidade, o mesmo foi empregado como controle positivo nas reações para tal domínio. Como controle negativo, foram utilizadas as cepas de *Escherichia coli* INCQS 00043/ATCC 23229, *Klebsiella pneumoniae* INCQS 00629 (ATCC BAA-1706), *Neisseria gonorrhoeae* INCQS 00604 (IAL1894 (WHO-D)), *Pantoea agglomerans* INCQS 00721 (ATCC 33243), *Haloferax volcanii* INCQS A1 (DSM 3757) e *Halococcus morrhuae* INCQS A12 (DSM 1307). Além disso, também foi adicionada uma alíquota de água deionizada estéril (Gibco®) para avaliar a ausência de DNA contaminante na mistura de PCR. A mistura para a reação de PCR em tempo real teve o volume final 20 µL, contendo 0,25 µM de cada iniciador e 0,2 µM de sonda (Tabela 2). Também compuseram a mistura: 1X de MasterMix QuantiNova Probe (Qiagen®), cerca de 25 ng de DNA da amostra e água Gibco® completando o volume nas seguintes condições: 5 minutos a 95 °C, 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C. A amplificação foi realizada em termociclador Rotor-Gene Q 5PLEX HRM PLATFORM. Para visualização dos resultados e análises dos parâmetros das reações, como *Threshold Cycle* (Ct) e ΔRn foi utilizado o software Rotor-Gene ScreenClust HRM Software fornecido pelo fabricante.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos, genes alvo e condição da PCR em tempo real

Iniciadores	Alvo	Tamanho do produto (pb)	Referência
qMnif12F qMnif143R qMnifProbe	<i>nifH</i> / <i>Methanobrevibacter</i> <i>Smithii</i>	131	Bianco, 2015b
qMru181-F qMru325-R qMru201-P	<i>nifH</i> / <i>Methanobrevibacter</i> <i>Ruminantium</i>	145	Bianco, 2015b
qPF191F qPF276R qPFProbe	<i>16S rRNA</i> / <i>Bacteroidales</i> Suínos	86	Bianco, 2015b
qGot23F qGot103R qGotProbe	<i>mcrA</i> / <i>Methanobrevibacter</i> <i>Gottschalkii</i>	80	Bianco, 2015b

Fonte: (Do autor, 2018).

4.7 Curva padrão para o ensaio da qPCR

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

Foi utilizado também o kit *Exogenous Internal Positive Control TaqMan®* (IPC) (Integrated DNA Technologies) para verificar a presença de inibidores, de acordo com instruções do fabricante. Após a construção da curva do IPC, foram realizadas reações com o kit do IPC e com uma mistura do DNA das amostras e uma concentração conhecida de IPC. Onde foram observados *Ct* (*Cycle threshold*) diferentes do esperado, foi calculada a inibição de acordo com a seguinte fórmula: $2^{(Ct \text{ Amostra+IPC} - Ct \text{ IPC})}$.

4.8 Isolamento de micro-organismos na presença ao hipoclorito de sódio

Da coleta realizada na bacia hidrográfica do rio Guandu em 2016, foram selecionados 5 pontos, sendo rio Guandu, barragem de Santa Cecília, rio Queimados, rio Macacos e barragem principal. Foram coletados 5 litros de amostra adicionais de cada ponto (Figura 4). Para verificar a sobrevivência dos micro-organismos na presença de cloro ativo, foram utilizadas 3 concentrações sendo 0,5 mg/L, 1 mg/L e 2 mg/L em um tempo de contato de 15 minutos, e ainda foi incluído uma amostra controle, ou seja, sem a presença do cloro. Após o tempo de contato, as amostras foram filtradas em membranas 0,45µm para clarificação e em seguida foram concentradas em filtros Sterivex-GS de 0,22µm. No final da filtração, foram acrescentados 250mL de PBS para cessar a ação do hipoclorito sobre a amostra. A seguir, as membranas foram inoculadas em caldo nutriente incubadas a 37°C por 24h e após o período de incubação, foram semeadas em duplicatas em ágar cetrimide e MacConkey, incubadas a 37°C por 24h.

Após esse período, foram selecionadas as placas com culturas originárias das maiores concentrações de cloro. A partir daí foram selecionadas colônias distintas que foram repicadas em ágar nutriente (AN) para checar a pureza das mesmas. Todos os isolados foram criopreservados em criotubos com 0,5 mL de BHI glicerol 20% e guardadas em freezer -70°C. Posteriormente, os isolados foram submetidos à coloração de Gram e ao OF Glicose. O DNA genômico dos isolados foi extraído com Kit Qiagen, protocolo para Gram negativos. Cepas obtidas do ágar cetrimide foram identificadas pela PCR com iniciadores específicos para o gênero *Pseudomonas* e posteriormente para *P. aeruginosa*. Os outros isolados foram identificados pela PCR do gene 16S rRNA.

4.9 Reação em cadeia da polimerase – PCR

A identificação de *Pseudomonas* spp e *P. aeruginosa* foi realizada através da PCR convencional. Foi empregado como controle positivo da reação, *Pseudomonas aeruginosa* INCQS 00311 (ATCC 10145) e controle negativo, *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* INCQS 00147 (ATCC 13883). Além disso, também foi adicionada uma alíquota de água deionizada estéril (Gibco®) para avaliar a ausência de DNA contaminante na mistura de PCR. Foi realizada também a PCR

convencional do gene 16S rRNA para identificação de outros isolados bacterianos. A mistura para a reação de PCR teve o volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de Master Mix, 50 picomoles de cada iniciador e aproximadamente 25-50 ng de DNA da amostra e água Gibco® completando o volume. As condições do ciclo consistiram no passo inicial de 95°C durante 5 min e 35 ciclos de amplificação a 94°C durante 20 min, temperatura de anelamento específica para cada par de iniciadores (Tabela 3) durante 1 min, 72°C durante 40 seg e alongamento final a 72°C durante 10 min.

Tabela 3 - Oligonucleotídeos, genes alvo e condição da PCR

Iniciadores	Sequências (5'-3')	Alvo	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho do produto (pb)	Referência
27F	AGAGTTTGATCCTG GCTCAG	16SrRNA	50	1464	Hongoh et al, 2003
1492R	GGTTACCTTGTTAC GACTT				
PA-SS-F	GACGGGTGAGTAAT GCCTA	<i>Pseudomonas</i> spp.	54	618	Spilker et al, 2014
PA-SS-R	CACTGGTGTTTCCTT CCTATA				
PA-SS-F	GGGGGATCTTCGG ACCTCA	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	58	956	Spilker et al, 2014
PA-SS-R	TCCTTAGAGTGCCC ACCCG				

PCR- Reação em Cadeia da polimerase/ pb- Pares de Base

Fonte: (Do autor, 2018).

Após a PCR, os produtos gerados na amplificação foram visualizados por eletroforese. O gel foi preparado a 1,5% de agarose (SIGMA-ALDRICH) em tampão TAE 1X, e a corrida foi realizada com 45 volts por 40 min e posteriormente 65V por 30 min adicionais. Foi utilizado o padrão de peso molecular de 100 bp (DNA Ladder, INVITROGEN). A coloração do gel foi realizada com solução de GelRed™ Acid gel Stain à 1x e analisada através do sistema de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE Healthcare). Após a confirmação da amplificação, os produtos foram purificados utilizando o kit *QIAquick® PCR Purification* (QIAGEN), de acordo com o manual do fabricante.

4.10 Sequenciamento

Foi realizado o sequenciamento de todas as amostras que não foram sugestivas de *Pseudomonas* spp. Os produtos da PCR com primer geral para o 16s rRNA foram submetidos ao sequenciamento com objetivo de identificar o gênero bacteriano dos fragmentos amplificados. Cerca de 200 a 300 ng dos produtos foram distribuídos em placa de 96 poços *MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate* (APPLIED BIOSYSTEMS). Em cada poço foi adicionado solução tampão 5X, *Big Dye*, e 3,2 pmol.µL⁻¹ do iniciadores *forward* (tabela 3). A placa foi submetida a uma reação de amplificação em termociclador *Mastercycler EP* (EPPENDORF), nas seguintes condições: 40 ciclos de 94°C por 10 seg, 50°C por 5 seg e 60°C por 4 min. A reação de sequenciamento foi realizada por eletroforese capilar em aparelho *ABI Prism 3730xL DNA Analyzer* (APPLIED BIOSYSTEMS) usando o kit *Big Dye Terminator* (Plataforma PDTIS/FIOCRUZ). As sequências com mais de 300 bases apresentando “*Phred score*” maior ou igual a 20 foram consideradas boas e incluídas nas análises subsequentes.

4.11 Análise do sequenciamento

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

4.12 Avaliação da susceptibilidade aos antibióticos dos isolados bacterianos

As análises de resistência aos antimicrobianos foram realizadas empregando-se o teste de suscetibilidade aos antibióticos por discos de difusão de acordo com a *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), 2018_ para *Pseudomonas* spp. (Tabela 4) e *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), 2017 - para *P. aeruginosa* e *Ochrobactrum* spp. (Tabela 5)

Tabela 4 - Antimicrobianos empregados no teste de suscetibilidade para *Pseudomonas* sp.

Antimicrobiano	Concentração
Piperacilina-tazobactam	30-6 µg
Ceftazidima	30 µg
Cefepima	30 µg
Aztreonam	30 µg
Imipenem	10 µg
Meropenem	10 µg
Gentamicina	10 µg
Ciprofloxacina	5 µg
Levofloxacina	5 µg

Fonte: (Do autor, 2018).

Tabela 5 - Antimicrobianos empregados no teste de suscetibilidade para *P. aeruginosa* e gênero *Ochrobactrum*

Antimicrobiano	Concentração
Piperacilina-tazobactam	100/10 µg
Ceftazidima	30 µg
Cefepima	30 µg
Aztreonam	30 µg
Imipenem	10 µg
Meropenem	10 µg
Gentamicina	10 µg
Ciprofloxacina	5 µg
Levofloxacina	5 µg

Fonte: (Do autor, 2018).

4.13 Susceptibilidade dos isolados ambientais ao hipoclorito de sódio

A susceptibilidade dos isolados ambientais ao hipoclorito de sódio foi avaliada através da metodologia da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Para determinar a CIM foram utilizadas soluções preparadas a partir do hipoclorito de sódio a 2%.

O ensaio para a determinação da CIM foi realizado segundo o CLSI (2003) e MEDEIROS et al. (2007) da seguinte forma: os 23 isolados bacterianos ambientais foram cultivadas em meio Ágar Nutriente a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24h. As concentrações finais do hipoclorito de sódio foram 2,5 mg/mL, 2,0 mg/mL, 1 mg/mL e 0,5 mg/mL em Caldo Müller Hinton.

A partir do crescimento em meio AN foi preparada uma suspensão em solução de cloreto de sódio a 0,85% estéril, cuja turvação foi ajustada para 0,5 da Escala MacFarland. Essa suspensão foi diluída também no meio caldo Müller Hinton até a concentração final do inóculo de aproximadamente 10^4 UFC/mL.

Foram utilizadas microplacas com 96 poços. Em cada poço, foram adicionados 50 μ L do hipoclorito de sódio nas diferentes concentrações, entre 2,5 e 0,5 mg/L, logo após foram adicionados 50 μ L do inóculo padronizado em seus respectivos poços. As placas foram incubadas por 24 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Foi considerada como CIM, aquela correspondente a menor concentração do hipoclorito que não permitiu crescimento visível.

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros físico-químicos e microbiológico

Os parâmetros físico-químicos apresentaram variações entre os pontos analisados. O pH e a turbidez variaram entre 1,83-12,23 e 0-24,8 UNT, respectivamente. O nível de oxigênio dissolvido, na maioria dos pontos, se mostrou dentro dos valores recomendados pela legislação, apenas os rios Piraí, Macacos e Queimados apresentaram valores abaixo do recomendado pela legislação nas duas coletas (>5 mg/L), o que pode estar relacionado à presença de descarte de efluentes doméstico, hospitalar e rural. A temperatura variou entre 10,7 e 22,8°C na lagoa do Guandu e no rio Macacos, respectivamente. O processo de decomposição da matéria orgânica provoca o consumo de oxigênio presente no meio, o que é acelerado, especialmente em temperaturas acima de 20°C. Os valores de condutividade na lagoa do Guandu foram de 0,074 μ S/cm na primeira coleta e 335 μ S/cm na segunda. Quanto a enumeração de *E. coli* nos afluentes da bacia hidrográfica do Guandu, 14 amostras de água apresentaram contagem com limites aceitáveis ($<1-173$ NMP/100mL) de acordo com o padrão brasileiro (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2005). As outras 4 amostras, rios Queimados (ambas coletas), Macacos e lagoa do Guandu apresentaram a contagem de *E. coli* acima da recomendada entre 1986,3 e >24196 NMP/100 mL (Tabela 6).

Tabela 6 - Parâmetros Físico-químicos e Microbiológicos dos afluentes do rio Guandu

		pH	Condutividade da amostra (µS/cm)	Turbidez (UNT ^a)	O.D ^b (mg/L)	Temperatura (°C)	Coliformes totais (NMP ^c /100 mL)	Escherichia coli (NMP/100 mL)
	Resolução CONAMA 357, 2005	6,0 - 9,0	-	Até 100	>5	-	-	1000
Barragem de Santa Cecília	Coleta 1	6,6	93	2,9	7,1	20,2	9804	120
	Coleta 2	9,2*	107	0	5,15	16,4	6,3	<1
rio Pirai	Coleta 1	6,4	91	2,6	4,8*	20,6	6131	97
	Coleta 2	1,83*	0,83	4	4,72*	12,1	21,1	6,2
Calha de Ribeirão da Lajes	Coleta 1	6,4	33	2,2	8,7	21,7	6488	10
	Coleta 2	11,05*	177	33	6,41	12,56	6,3	<1,0
Rio Macacos	Coleta 1	6,7	322	7,1	2,4*	22,8	>24196	>24196*
	Coleta 2	5,74*	122	2	2,82*	13,8	>24196	29,2
Rio Santana	Coleta 1	6,7	60	5,8	9,3	22,6	>24196	426
	Coleta 2	8,42	0,57	2	6,21	16,6	33,6	<1,0
Rio Guandu	Coleta 1	6,6	89	2,8	8,8	21,7	2909	52
	Coleta 2	10,23*	113	3	6,04	14	579,4	<1,0
Rio Queimados	Coleta 1	6,8	238	13	0*	22,2	>24196	>24196*
	Coleta 2	7,6	327	23	2,98*	11,5	>24196	1986,3*
Lagoa do Guandu	Coleta 1	7,8	335	24,8	8,3	21,3	>24196	173
	Coleta 2	12,23*	0,074	3	5,78	10,7	>24196	>24196*
Barragem principal	Coleta 1	7	84	3,6	8,2	21,5	410	31
	Coleta 2	4,4*	0,69	5	5,95	11,6	193	<1

^a Unidade nefelométrica de turbidez

^b Oxigênio dissolvido

^c Número mais provável

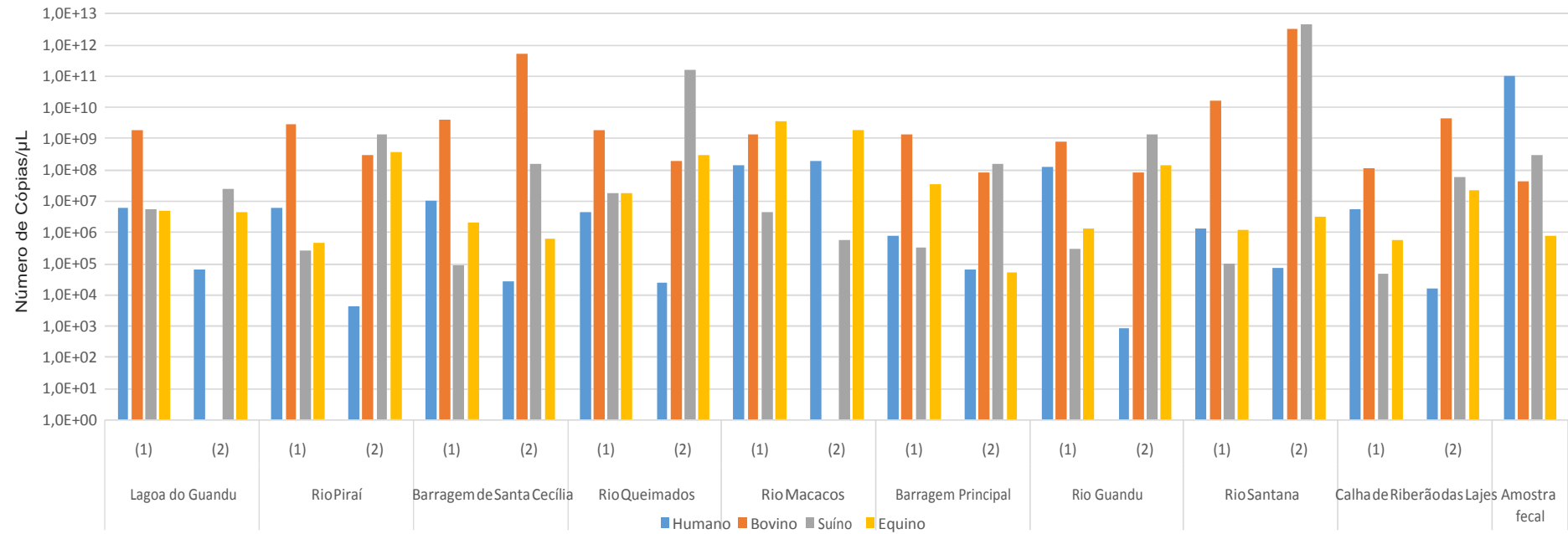
* Fora do preconizado pela legislação

Fonte: (Do autor, 2018).

5.2 Determinação quantitativa da contaminação fecal

O número de cópias do gene *nifH* de *M. smithii* quantificadas em 1 grama de fezes humanas foi de aproximadamente $1,02 \times 10^{11}$ cópias/ μL . Este biomarcador foi quantificado em todas as amostras ($n=18$) da bacia, variando entre $8,59 \times 10^2$ e $1,92 \times 10^8$ cópias/ μL , nos rios Guandu e Macacos, respectivamente. O número de cópias do gene *nifH* de *M. ruminantium* existente em 1 grama de fezes bovinas foi quantificado e apresentou concentrações de aproximadamente $4,35 \times 10^7$ cópias/ μL . Este mesmo biomarcador foi detectado e quantificado em 16 das 18 amostras da bacia hidrográfica do rio Guandu analisadas, variando entre $8,26 \times 10^7$ e $3,33 \times 10^{12}$ cópias/ μL , na segunda coleta, na barragem principal e no rio Santana, respectivamente. O número de cópias do gene *rrs* de *Bacteroidales* associado a suínos existentes em 1 grama de fezes foi de aproximadamente $3,06 \times 10^8$ cópias/ μL . Este biomarcador foi detectado e quantificado em todas as 18 amostras analisadas, variando entre $4,52 \times 10^4$ e $4,83 \times 10^{12}$ cópias/ μL , na calha de Ribeirão das Lajes e no rio Santana, respectivamente. O número de cópias do gene *mcrA* de *M. gottschalkii* quantificado em 1 grama de fezes equina foi de aproximadamente $7,79 \times 10^4$ cópias/ μL . Este biomarcador também foi detectado em todas as amostras analisadas apresentando $5,21 \times 10^4$ cópias/ μL , na barragem principal e $3,67 \times 10^9$ no rio Macacos (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Representação gráfica da quantificação do gene *nifH* de *M. smithii* (Humano), gene *nifH* de *M. ruminantium* (Bovino), gene *rrs* de *Bacteroidales* de origem suína e gene *mcrA* de *M. gottschalkii* (Equino) nas amostras de água da bacia hidrográfica do rio Guandu.

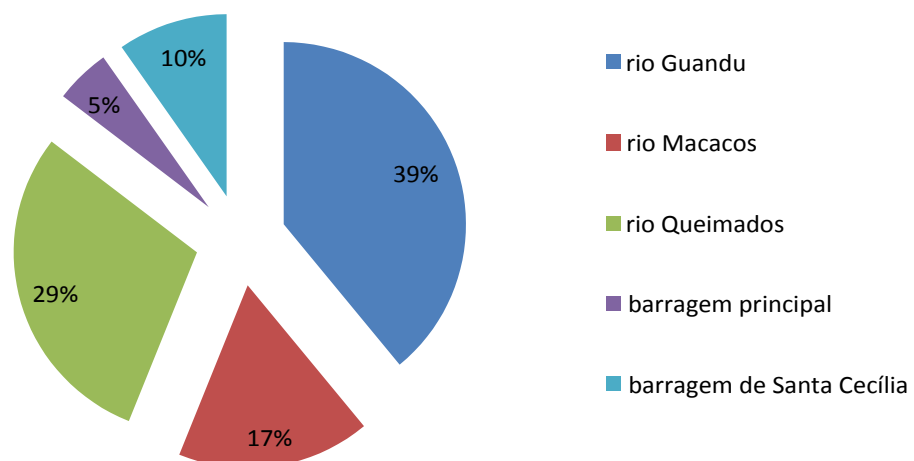


Fonte: (Do autor, 2018).

5.3 Isolados ambientais resistentes ao hipoclorito de sódio

Foi verificado crescimento microbiano nas concentrações de 0,5 mg/L, 1,0 mg/L e 2,0 mg/L, nas amostras dos rios Guandu, Queimados e Macacos, e na barragem principal. Na barragem de Santa Cecília só houve crescimento nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/L, não apresentando crescimento na concentração de 2,0 mg/L. Foram selecionados os isolados advindos das maiores concentrações de cloro, de cada ponto, ou seja, 2,0 mg/L em quatro pontos de coleta que apresentaram crescimentos nesta concentração e de 1,0 mg/L na barragem de Santa Cecília, resultando em um total de 41 isolados (Figura 5)

Figura 5 - Percentual de isolados resistentes a concentrações que variam de 1,0 à 2,0 mg/L de cloro ativo.



Fonte: (Do autor, 2018).

5.4 Identificação dos isolados

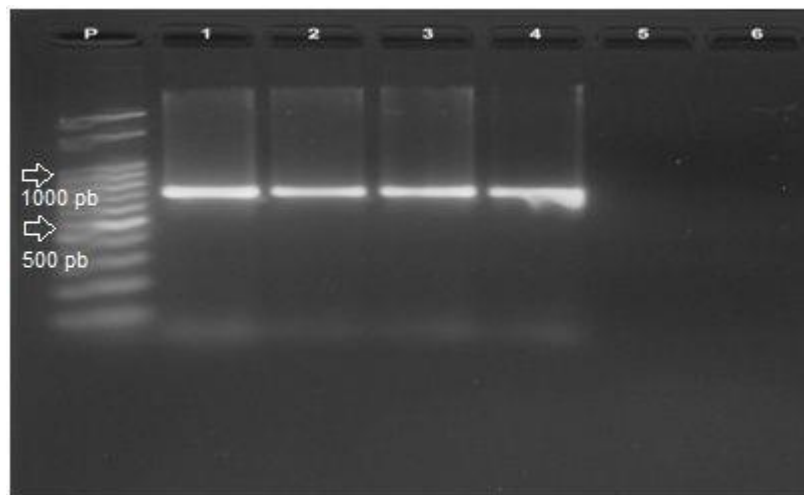
5.4.1 Coloração Gram e OF Glicose

Os 41 isolados foram semeados em meios seletivos, ágar Cetrimide, comumente adotado para isolar *Pseudomonas spp.* e ágar MacConkey utilizado para enterobactérias. Após o isolamento foi realizada a coloração de Gram e meio de oxidação/fermentação de glicose - OF Glicose. Dos 41 isolados 20 apresentaram metabolismo oxidativo de glicose, 9 metabolismo fermentador de glicose e 12 inerte.

5.4.2 PCR dos isolados de *Pseudomonas* spp.

Para a reação de PCR foram utilizados iniciadores específicos para o gene 16S rRNA de espécies do gênero *Pseudomonas*, foram selecionadas 20 isolados com metabolismo oxidativo de glicose. Todos os isolados apresentaram um fragmento de aproximadamente 618 pb, compatível com o fragmento detectado no DNA genômico de *P. aeruginosa* INCQS 00311 (Figura 6).

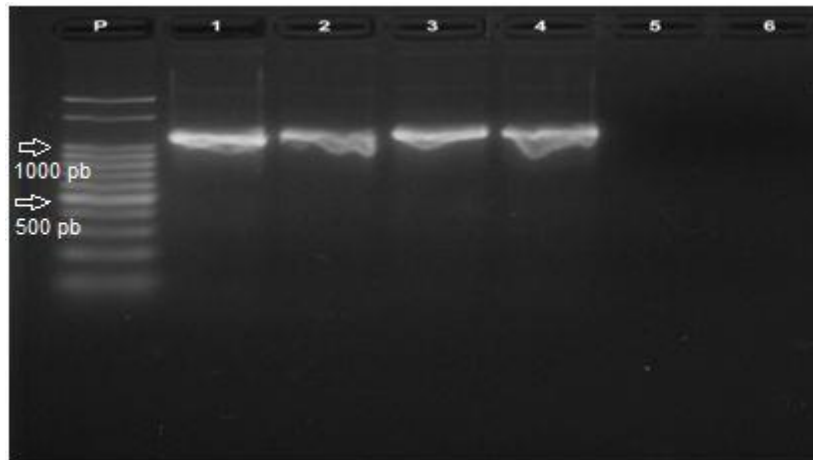
Figura 6 - Gel representativo da PCR do gene 16S rRNA de *Pseudomonas* spp. (618pb).



Linha (P) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (1) *P. aeruginosa* INCQS 00311 (ATCC 10145); Linhas (2,3,4) representam 20 amostras positivas; Linha (5) *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* INCQS 00147 (ATCC 13883); (6) H2O Gibco®.
Fonte: (Do autor, 2018).

Dos 20 isolados de *Pseudomonas* spp., 9 apresentaram fragmento de aproximadamente 965 pb, compatível com o fragmento detectado no DNA de espécies de *P.aeruginosa* 0031 INCQS (Figura 7)

Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR dos isolados para detecção de *P. aeruginosa* (956pb).

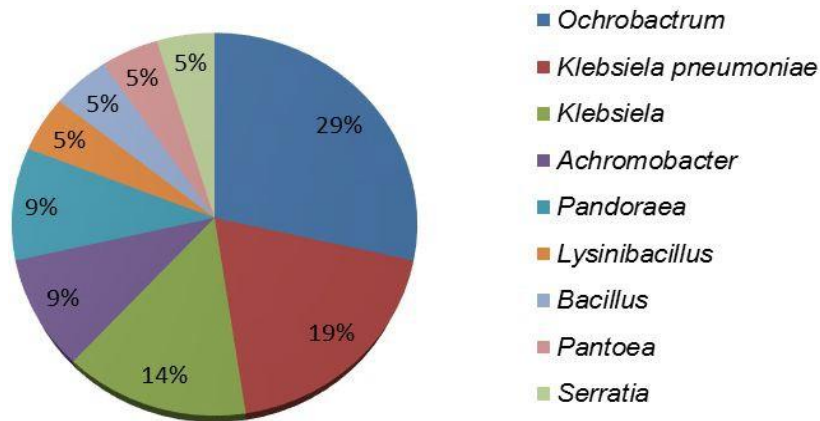


Linha (P) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linha (1) *P. aeruginosa* INCQS 00311 (ATCC 10145); Linhas (2,3,4) representam 9 amostras positivas; Linha (5) *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* INCQS 00147 (ATCC 13883); Linha (6) H2O Gibco®.
Fonte: (Do autor, 2018).

5.4.3 Sequenciamento

O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA dos outros 21 isolados (OF GLI fermentador e OF GLI inerte) analisados no banco de dados apresentaram percentuais de identidade entre 94% a 99% para espécie de *Ochrobactrum*, 99% para *Klebsiella pneumoniae*, 94% para o gênero de *Klebsiella*, 98% para *Achromobacter*, 99% para espécies do gênero *Pandoreae*, 97% para espécie do gênero *Lysinibacillus*, 97% para espécie de *Bacillus*, 96% para espécies do gênero *Pantoea* e 99% para espécies do gênero *Serratia* (Figura 8).

Figura 8 - Identificação dos isolados através do sequenciamento

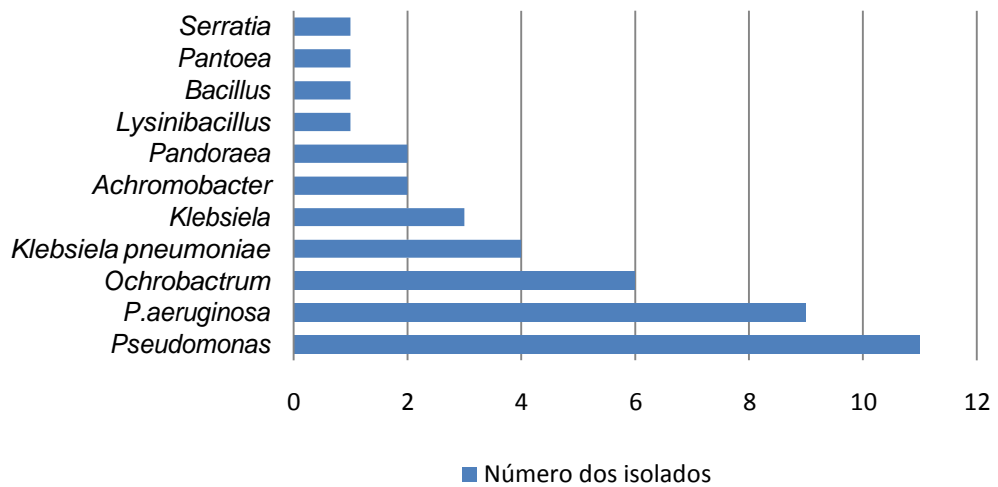


Fonte: (Do autor, 2018).

5.4.4 Identificação final dos isolados

A identificação dos 41 isolados resultou em nove gêneros bacterianos, sendo *Pseudomonas* spp. e *Ochrobactrum* spp. os mais prevalentes (gráfico 3).

Gráfico 3 - Total de Isolados identificados a partir das amostras de água da bacia hidrográfica do rio Guandu



Fonte: (Do autor, 2018).

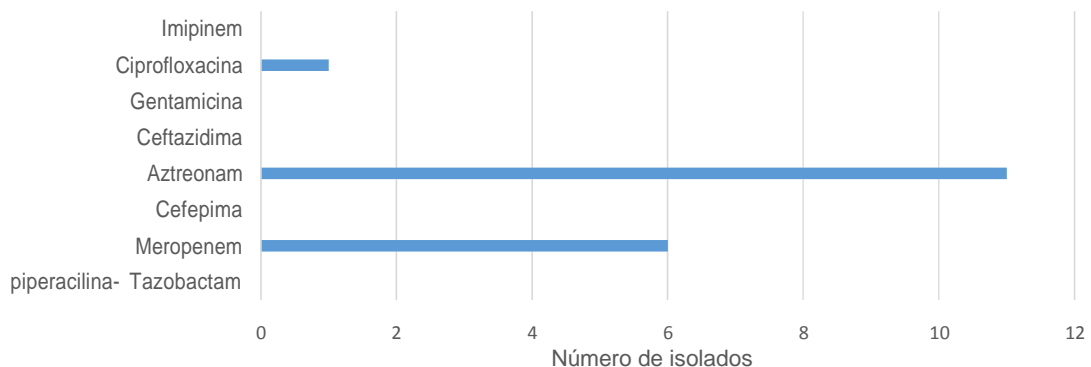
5.4.5 Identificação bioquímica de *Ochrobactrum*

Os 6 isolados identificados pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA como *Ochrobactrum* spp. foram confirmados pelas provas bioquímicas convencionais, lactose oxidativo, citrato positivo, urease positivo, indol negativo e sem produção de gás.

5.5 Resistência dos isolados aos antimicrobianos

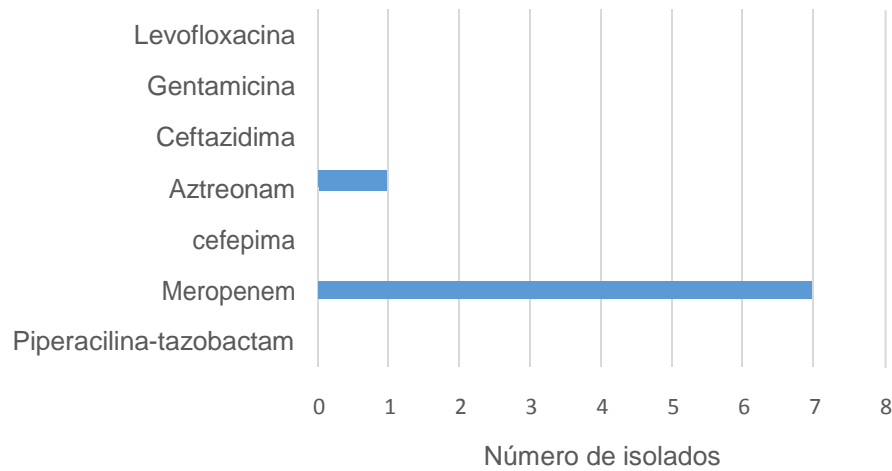
Os 11 isolados de *Pseudomonas* spp. foram resistentes ao aztreonam, destes, seis apresentaram também resistência a meropenem e um ao meropenem e ciprofloxacina (Gráfico 4).

Gráfico 4 - Gráfico da suscetibilidade aos antibióticos dos isolados de *Pseudomonas* spp.



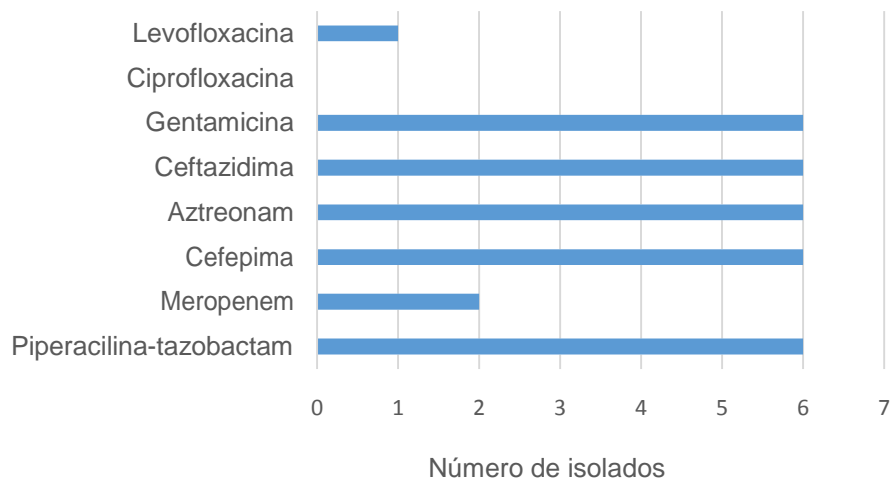
Fonte: (Do autor, 2018).

Dos nove isolados de *P. aeruginosa*, seis foram resistentes exclusivamente ao meropenem, um resistente ao meropenem e ao aztreonam, e dois foram sensíveis a todos antibióticos testados (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Gráfico da suscetibilidade aos antibióticos dos isolados de *P. aeruginosa*

Fonte: (Do autor, 2018).

Cem por cento (6/6) dos isolados de *Ochrobactrum* spp. foram resistentes a gentamicina, ceftazidima, aztreonam, cefepima e piperacilina-tazobactam. A resistência à levofloxacina foi observada em apenas 14,28% (1/6) dos isolados e ao meropenem em 28,57% (2/6) dos isolados. Todos os isolados foram sensíveis a ciprofloxacina (Gráfico 6).

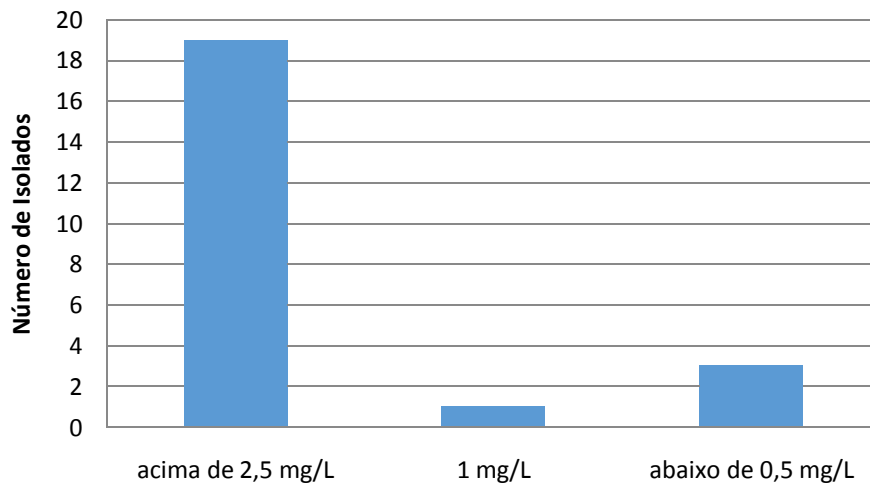
Gráfico 6 - Gráfico da suscetibilidade aos antibióticos dos isolados de *Ochrobactrum* spp.

Fonte: (Do autor, 2018).

5.6 Concentração inibitória mínima do cloro dos isolados bacterianos

Foram selecionados 23 isolados para a determinação da CIM ao cloro, sendo *Pseudomonas* spp. (n=10), *P. aeruginosa* (n=7) e *Ochrobactrum* (n=6). Foi observado crescimento na concentração máxima de 2,5 mg/L de cloro ativo em 82,6% (19/23) dos isolados. Treze por cento (3/23) dos isolados de *Ochrobactrum* sp. não apresentaram crescimento em nenhuma das concentrações sugerindo uma CIM inferior a 0,5 mg/L. Um único isolado de *pseudomonas* sp. teve CIM de 1,0 mg/L. Os três isolados que tiveram CIM inferior a 0,5 mg/L e o que tem o CIM de 1,0 mg/L foram estriados em AN e apresentaram crescimento bacteriano após incubação (Gráfico 7).

Gráfico 7 - Porcentagem de todas as amostras submetidas ao teste da CIM



Fonte: (Do autor, 2018).

6 DISCUSSÃO

A água é um elemento essencial para a sobrevivência básica, pois constitui até 60% do corpo humano adulto. No entanto, a água contaminada contendo patógenos, como bactérias, vírus e ou parasitas pode promover a disseminação desses patógenos, comprometendo a saúde humana. As doenças mais comuns são as patologias diarreicas, como cólera, febre tifóide, paratifóide, salmonelose, giardíase e criptosporidiose. Além de outros contaminantes que oferecem riscos para a saúde humana, como elementos químicos e radioativos na água. Por essas razões, a qualidade da água potável é uma preocupação universal, principalmente para os países em desenvolvimento (GASANA, 2014).

O monitoramento da qualidade microbiológica da água através da quantificação de coliformes é atualmente a metodologia oficial adotada, porém apresenta algumas limitações, a não determinação da fonte de contaminação (APHA, AWWA & WEF, 2012). Desta forma, essa quantificação pode ser sub ou superestimada por inibição do crescimento ou adaptação das bactérias ao ambiente, respectivamente (SCOTT et al., 2002; SAVICHTCHEVA & OKABE, 2006). Desta forma, metodologias independentes de cultivo, voltadas para a detecção e quantificação de contaminação fecal, vem sendo uma alternativa no controle da qualidade microbiológica da água (BIANCO, 2015a).

A correlação entre marcadores de contaminação fecal hospedeiro-especificos e indicadores fecais tradicionais ainda não é bem documentada. Embora, um estudo na França revelou uma correlação significativa entre as concentrações de *E. coli* e de marcadores de poluição fecal humana, nenhuma correlação foi observada para fezes de outros animais (GOURMELON et al., 2007). Em outro estudo, a qualidade da água foi avaliada nas praias de Doheny e Avalon na Califórnia, pela avaliação de concentrações de bactérias indicadoras fecais (BIF) e por rastreamento de fontes microbianas (RFM), tendo como alvos *M. smithii* e *Bacteroides* sp, biomarcadores de contaminação fecal humana dos domínios Archaea e Bacteria, respectivamente. Foram verificadas correlações entre BIFs e os marcadores humanos com maior frequência na praia de Doheny do que em Avalon, demonstrando a importância da utilização de ambas metodologias no controle microbiológico das águas (MCQUAIG et al., 2012)

No presente estudo, a quantificação de *E. coli* na bacia hidrográfica do rio Guandu revelou níveis dentro do preconizado pela legislação na maioria dos pontos de coleta, com exceção dos rios Queimados, Macacos e Lagoa do Guandu (Tabela 6). O monitoramento da qualidade dos afluentes do rio Guandu entre 2003 e 2008 também demonstrou altas concentrações de *E. coli* nos rios Queimados e Macacos, demonstrando a constante contaminação fecal nos rios que correm para a Estação de Tratamento de Água do Guandu (ETA) (SILVA et al., 2009). Assim como no estudo de MCQUAIG e colaboradores (2012), nosso estudo também revelou altas concentrações de biomarcadores hospedeiro-específicos em amostras que atendiam aos padrões regulatórios do BIF, demonstrando que sua utilização isoladamente apresenta limitações, o que reafirma a necessidade da combinação de metodologias mais sensíveis e seguras.

A avaliação de parâmetros físico-químicos de um determinado ambiente permite traçar um perfil de condições e potencial ecológico do mesmo, visando não somente a valorização biológica local, mas também evidenciando aspectos ambientais que permitam conduzir investigações e a prevenção de possíveis riscos à saúde humana (PEREIRA & GOMES, 2002).

No presente estudo, alguns parâmetros físico-químicos como, por exemplo, a temperatura, não apresentou variações significativas em relação às concentrações de *E. coli* e a presença dos biomarcadores de poluição fecal nos pontos de coleta. Por outro lado, embora as concentrações de coliformes totais e *E. coli* tenham apresentado níveis baixos na maiorias dos pontos analisados, todos os marcadores de contaminação fecal hospedeiro-específicos foram revelados pela qPCR. Um outro parâmetro relevante foi a concentração de oxigênio dissolvido (OD) que apresentou baixos valores nos rios Pirai, Macacos, sendo a menor concentração no rio Queimados. Esses dados eram esperados, uma vez que este rio recebe esgoto sanitário de todas as áreas urbanas de Queimados, sem qualquer tratamento, comprometendo assim, a qualidade de suas águas, desde a nascente (Serber 2005).

Nossos resultados também demonstraram a presença de pelo menos um biomarcador de contaminação fecal hospedeiro-específica em todos os pontos de coleta analisados. Segundo REIMANN e colaboradores (2013), o esgoto doméstico é a principal fonte de contaminação fecal dos afluentes da bacia hidrográfica do rio Guandu. Altas taxas de contaminação nessas águas comprometem o sistema de

tratamento, que se torna bastante oneroso e até mesmo improvável, acarretando danos à ETA Guandu. Em meados da década de 70, a Companhia Estadual de Águas e Esgotos (CEDAE) foi obrigada a desativar duas estações de tratamento de água. Uma delas em Santa Cruz, na Zona Oeste, a estação de Santos Malheiros que captava água do Rio Guandu-Mirim. Devido à grande quantidade de poluentes, não foi possível realizar o tratamento das águas. Já na ETA Guandu, o descarte de esgoto bruto diretamente nos afluentes do rio Guandu é compensado pela transposição do rio Paraíba do Sul, que promove um aporte extra de água e dilui essa poluição e favorece o tratamento dessas águas (SANTOS, 2014).

Com isso, a CEDAE gasta em média 318 toneladas de produtos químicos (cerca 250 toneladas de sulfato de alumínio, 18 toneladas de cloro, 30 a 40 toneladas de cal, 10 toneladas de flúor), além de 100 quilos de polímeros por dia, apenas para tratar a água captada pelo ETA Guandu, nas bacias hidrográficas dos rios Guandu e Paraíba do Sul. Esta quantidade poderia ser reduzida em cerca de 20 a 25%, não fosse o excesso de poluição encontrada naqueles corpos hídricos – que representam a única fonte de abastecimento da Região Metropolitana do Rio de Janeiro (ASSOCIAÇÃO DOS EMPREGADOS DE NÍVEL UNIVERSITÁRIO DA CEDAE, 2018). Os lodos gerados na ETA Guandu classificados como resíduos sólidos deveriam ser tratados e dispostos corretamente segundo a norma brasileira ABNT 10.004:2004. No entanto, a maior parte desses lodos tem sido lançada nos cursos de água próximos sem nenhum tipo de tratamento. Desta maneira, esse lodo se torna um material com potencial poluidor sendo cada vez mais prejudicial ao meio ambiente e à saúde pública. O mesmo efeito pode ocorrer com seu descarte em aterros porque com o acúmulo deste resíduo, as chuvas podem transportá-lo para os rios (COSIN et al., 2004).

A poluição fecal é de fato um grave problema ambiental que afeta muitas regiões costeiras no mundo. Patógenos associados à poluição fecal, além de gerar danos à saúde humana, podem acarretar perdas econômicas em agricultura e indústrias que dependem de recursos hídricos (PANDEY et al., 2014). Apesar dos esforços para minimizar a contaminação de recursos hídricos por material fecal, o problema persiste, em parte devido a uma incapacidade de se identificar, com segurança, fontes não pontuais de contaminação. Essas fontes podem incluir estações de tratamento de esgoto ineficientes, vazamento de sistemas sépticos ou escoamento agrícola (STRITTHOLT et al., 1998). Conhecer a origem da

contaminação fecal é crucial para uma gestão eficaz desses recursos e, em última análise, solucionar o problema (BENHARD & FIELD, 2000).

Dejetos equinos e humanos podem conter esporos de *Clostridium tetani*, oriundos do trato intestinal. Estes esporos quando são introduzidos em ferimentos externos através de lesões podem germinar e causar tétano, uma infecção aguda e grave que acomete seres humanos (FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ, 2013). Vale ressaltar, que dejetos bovinos, podem conter *E. coli* verotoxigênica, principalmente representantes do sorotipo O157:H7 produtoras de toxina Shiga-like (STEC) e outros tipos não-verotoxigênicos, comumente relacionadas a doenças entéricas. Estas bactérias podem estar associadas a diversos outros hospedeiros, mas o gado bovino é seu principal reservatório (STELLA, 2009). De fato, a contaminação fecal humana nos corpos hídricos pode conter, além de bactérias, fungos e vírus, cistos de *Giardia intestinalis*, que podem desenvolver um quadro de diarreia crônica, esteatorréia, cólicas abdominais, sensação de distensão, perda de peso e desidratação (FERREIRA et al., 2008).

Evidências crescentes sugerem que a água potável é um reservatório para bactérias resistentes aos antibióticos (BRA) e genes de resistência aos antibióticos (GRA) (ARMSTRONG et al., 1981; SCHWARTZ et al., 2003). Dessa forma, a possível ocorrência de problemas de saúde pública vem gerando preocupações (RAM et al., 2008). Estudos indicam que a cloração, uma desinfecção comumente usada em água potável ou no tratamento de águas residuais pode contribuir para o aumento de BRA e de GRA (XI et al., 2009). A resistência cruzada ou co-resistência de desinfetantes e genes de resistência pode ser o mecanismo fundamental, responsável pela promoção da resistência a antibióticos (DUKAN E TOUATI, 1996; GREENBERG et al., 1990; NAKAJIMA et al., 1995).

Um estudo realizado com diferentes linhagens de *P. aeruginosa* demonstrou a ocorrência de linhagens resistentes ao cloro em águas de diferentes fontes. Os autores observaram que as amostras de água da torneira da unidade de terapia intensiva de adulto precisaram de maior concentração de cloro (2,0 ppm) e maior tempo de contato (entre 10 e 20 min) para a ação bactericida (Medeiros et al., 2007). A sensibilidade ao cloro de bactérias isoladas de sistemas de distribuição de água potável clorados e não-clorados foram comparadas por dois métodos independentes. Um método mediu o efeito tóxico do cloro livre nas bactérias, enquanto o outro mediu o efeito do cloro combinado. Isolados do sistema clorado

foram mais resistentes às formas combinadas e livres de cloro do que as do sistema não clorado, sugerindo que pode haver seleção de micro-organismos mais tolerantes ao cloro em águas cloradas (RIDGWAY & OLSON 1982).

Segundo SHRIVASTAVA et al. (2004) bactérias que sobrevivem à cloração podem apresentar multirresistência, indicando a capacidade do cloro de selecionar linhagens resistentes aos antibióticos. Curiosamente, no presente estudo, isolados de *P. aeruginosa* e de *Pseudomonas* spp tolerantes ao cloro não apresentaram perfis de multirresistência. No entanto, nossos isolados de *Ochrobactrum* spp. tolerantes ao cloro, demonstraram resistência aos betalactâmicos de espectro estendido analisados, assim como demonstrado em estudos anteriores, que atribuíram essa resistência intrínseca a sua capacidade de produzir β -lactamases AmpC (HIGGINS et al., 2001; THOMA et al., 2009; ALONSO et al., 2017,). Ainda, 33% dos *Ochrobactrum* e 77% de *P. aeruginosa* foram resistentes ao meropenem, a resistência aos antibióticos carbapenêmicos pode surgir em alguns organismos por meio de mutações que diminuem o influxo (perda de porina da membrana externa) ou elevam o efluxo (ativação da bomba de efluxo) (SHI, 2013; WEBB et al., 2016).

No presente estudo, os isolados de *P. aeruginosa*, *Pseudomonas* spp e *Ochrobactrum* spp sobreviveram a altas concentrações de hipoclorito de sódio, o que pode ser atribuído ao lançamento contínuo de esgoto sanitário “*in natura*” nos afluentes destinados ao tratamento na ETA Guandu. Este dado é preocupante, pois sinaliza a possibilidade da presença de linhagens tolerantes ao cloro e possivelmente aos antibióticos em águas tratadas e destinadas ao abastecimento público.

7 CONCLUSÕES

- A contaminação fecal humana, equina e bovina, detectada por marcadores dos domínios Archaea e Bacteria mesmo em amostras satisfatórias pelo BIF, demonstram a limitação da abordagem convencional na avaliação da qualidade microbiológica das águas.
- Bactérias tolerantes ao cloro e resistentes aos antibióticos, mesmo após o tratamento, podem permanecer na água potável e com isso aumentar a concentração de micro-organismos e genes de resistência o que poderá provocar riscos à saúde humana.
- Por fim, concluímos que investigações das fontes de poluição fecal em águas destinadas ao abastecimento público, podem contribuir para a implementação de estratégias mais eficientes no monitoramento e tratamento destas águas.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A presença de altas concentrações de matéria orgânica nos afluentes da bacia do rio Guandu, principalmente nos rios Queimados e Macacos, pode comprometer a eficiência do tratamento das águas destinadas ao abastecimento público.
- Questões relacionadas ao tratamento e a qualidade de águas destinadas ao abastecimento público, ainda necessitam de muito investimento no desenvolvimento tecnológico e científico, uma vez que quase 2,4 bilhões de pessoas no mundo não têm acesso a água potável ou instalações de gerenciamento de resíduos.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. **Pecuária brasileira**. 2011. Disponível em:

<http://www.abiec.com.br/3_pecuaria.asp>. Acesso em: 31 mar. 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES. **Participação da Abiec na Gulfood abre oportunidades para a carne brasileira**.

2018. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/download/gulfood-020318.pdf>>. Acesso em: 30 mar. 2018.

AHMED, W.; NELLER, R.; KATOULI, M. Host species-specific metabolic fingerprint database for enterococci and *Escherichia coli* and its application to identify sources of fecal contamination in surface waters. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 8, p. 4461-4468, 2005.

AITH, F.; DALLARI, S.G. Vigilância em Saúde no Brasil: os desafios dos ricos sanitários do século XXI e a necessidade de criação de um Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. **Revista de Direito Sanitário**, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 94-125, ago./nov. 2009.

ALONSO, C. A. et al. Diversity of Ochrobactrum species in food animals, antibiotic resistance phenotypes and polymorphisms in the blaOCH gene. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 364, n. 17, 2017.

ALVES, F. C. et al. Microbiological and parasitological analysis of the water used in a public hospital in the state of Rondônia. **Revista UNINGÁ**, v.49, p. 40-45, jul./set. 2016.

AMARAL, A. L. P. **Microrganismo indicadores de qualidade de água**. 2007. 40 f. Monografia – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22. ed. Washington, USA, 2012

ANDERSON, K.L.; WHITLOCK, J. E.; HARWOOD, V. J. Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. **Appl. Environ. Microbiol**, p. 3041–3048, 2005.

ANDERSSON, Y.; BOHAN, P. **Water quality**: guidelines, standards and health. 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (Brasil). Disponível em: <www.ana.org.br>. Acesso em: 13 abr. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (Brasil). **Fatos e tendências**: água. Brasília, set. 2009.

_____. **Legislação básica**. 2. ed. Brasília, 2007.

APISARNTHANARAK, A.; KIRATISIN, P.; MUNDY, L. M. Evaluation of *Ochrobactrum intermedium* bacteremia in a patient with bladder cancer. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 53, p. 153–166, 2005.

ARMSTRONG, J. L. et al. Antibiotic-resistant bacteria in drinking water. **Appl Environ Microbiol.**, v. 42, n. 2, p. 277–283, 1981.

ARRIGO, K. R. Marine microorganisms and global nutrient cycles. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 349-55, 2005.

ASSOCIAÇÃO DOS EMPREGADOS DE NÍVEL UNIVERSITÁRIO DA CEDAE (Rio de Janeiro). **Alerta**: sinal vermelho no Guandu. Disponível em: <http://www.aseac.com.br/jorn37_4.htm>. Acesso em: 04 abr. 2018.

AUCHTUNG, T. A.; TAKACS-VESBACH, C. D.; CAVANAUGH, C. M. 16S rRNA Phylogenetic Investigation of the Candidate Division “Korarchaeota”. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 7, p. 5077-5082, 2006.

AUGUSTO, L. G. S. Saúde e vigilância ambiental: um tema em construção. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 12, n. 4, p. 177-187, 2003.

BADGLEY, B.D.; NAYAK, B.S.; HARWOOD, V.J. The importance of sediment and submerged aquatic vegetation as potential habitats for persistent strains of enterococci in a subtropical watershed. **Water Res**, v. 44, p. 5857-5866, 2010a.

BADGLEY, B.D.; THOMAS, F.I.; HARWOOD, V.J. The effects of submerged aquatic vegetation on the persistence of environmental populations of *Enterococcus* spp. **Environ Microbiol**, v. 12, p. 1271-1281, 2010b.

BARCELLOS, C.; QUITÉRIO, L. A. D. Vigilância ambiental em saúde e sua implantação no Sistema Único de Saúde. **Rev. Saúde Pública.**, v. 40, n. 1, p. 170-7, 2006.

BARNES, B.; GORDON, D.M. Coliform dynamics and the implications for source tracking. **Environ. Microbiol.**, v. 6, n. 5, p. 501-509, 2004.

BERNHARD, A. E.; FIELD, K. G. PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in Bacteroides-Prevotella genes encoding 16S rRNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, p. 4571-4574, 2000.

BETTEGA, J.M.P.R. et al. Métodos analíticos no controle microbiológico da água para consumo humano. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.5, p. 950-954, 2006.

BEVERIDGE, T. J. Use of the gram stain in microbiology. **Biotech Histochem.**, v. 76, p. 111-118, 2001.

BIANCO K, BARRETO C. et al. Fecal pollution source tracking in Waters intended for human supply based on archaeal and bacterial genetic markers. **J Water Health**, v. 13, n. 4, p. 985-995, 2015a.

BIANCO, K. **Detecção e quantificação de contaminação fecal hospedeiro-específico em águas destinadas ao abastecimento público**. 2015. 138f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015b.

BLANCH, A.R. et al. Integrated analysis of established and novel microbial and chemical methods for microbial source tracking. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, n. 9, p. 5915-5926, 2007.

BLATCHLEY, ER 3RD et al. Effects of wastewater disinfection on waterborne bacteria and viruses. **Water Environ Res**, v. 79, n. 1, p. 81-92, 2007.

BOMFIM, M. V. J. et al. Avaliação físicoquímica e microbiológica da água de abastecimento do laboratório de bromatologia da UERJ. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 21, n. 152, p. 99-103, jun. 2007.

BOWER, P. A. et al. Detection of genetic markers of fecal indicator bacteria in lake michigan and determination of their relationship to *Escherichia coli* densities using standard microbiological methods. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 12, p. 8305-8313, 2005.

BRASIL. Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos, Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos, e dá outras Providências. **AEAP**. Disponível em: <http://www.aeap.org.br/doc/lei_federal_6360_de_23_de_setembro_de_1976.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2018.

_____. Presidência da República. Lei nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Casa Civil**. 2001. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9782.htm>. Acesso em: 30 mar. 2018.

_____. Medida provisória nº 2.134-29, de 26 de abril de 2001. Altera dispositivos das Leis nº 9.782, de 26 de janeiro de 1999, que define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e nº 6.437, de 20 de agosto de 1977, que configura infrações à legislação sanitária federal e estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências. **Casa Civil**. <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/mpv/Antigas_2001/2134-29.htm#art13>. Acesso em: 30 mar. 2018.

_____. Ministério da Saúde. Vigilância em Saúde. **Vigilância ambiental**. 2017. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/vigilancia-em-saude/vigilancia-ambiental>>. Acesso em: 30 mar. 2018.

_____. Ministério do Meio Ambiente. **Plano Nacional de Resíduos Sólidos**. Brasília, 2011.

_____. Portaria 518/04 MS que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 de março de 2004.

_____. Portaria nº 3.252 de 22 de dezembro de 2009. Aprova as diretrizes para execução e financiamento das ações de Vigilância em Saúde pela União, Estados, Distrito Federal e Municípios e dá outras providências.

BRINGUIER, A. et al. Real-time PCR quantification of methanobrevibacter oralis in periodontitis. **J Clin Microbiol.**, 2013.

BROCHIER-ARMANET, C. et al. "Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota". **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 6, n. 3, p. 245-52, 2008.

BRYANT, M.P. Rumen methanogenic bacteria. In: DOUGHERTY, R. W. (Ed.). **Physiology of digestion in the ruminant**. Washington, D.C.: Butterworths, 1965. p.411-418.

BUENO, E. À sua Saúde: a vigilância sanitária na história do Brasil. Brasília: Anvisa, 2005.

CAB AMBIENTAL (Brasil). **A importância da água**. Disponível em: <<http://www.cabambiental.com.br/A-Importancia-da-Água>>. Acesso em: 03 abr. 2018.

CARBERRY, C.A. et al. Rumen Methanogenic genotypes differ in abundance according to host RFI phenotype and diet type. **Appl Environ Microbiol.**, 2013.

CARDOSO, A.M. et al. Archaea: potencial biotecnológico. **Biotec. Ciên. Desen.**, n.30, p.71-77, 2003.

CARSON, C.A. et al. Specificity of a Bacteroides thetaiotaomicron marker for human feces. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 8, p. 4945-4949, 2005.

CARVALHO, R.S. **Água, um bem que precisa ser cuidado**. Coordenador Nacional do Projeto de Estruturação Institucional de Consolidação da Política Nacional de Recursos Hídricos – BRA/OEA/01/002 – SRH/MMA, 2012.

COMPANHIA ESTADUAL DE ÁGUAS E ESGOTO (Rio de Janeiro). **Apresentação**. Disponível em: <<http://www.cedae.com.br/img/guandu/guandu.pdf>>. Acesso em: 8 dez. 2018a.

_____. Companhia Estadual de Águas e Esgoto. Estação de Tratamento do Guandu e Laranjal. Disponível em: <http://www.cedae.com.br/estacoes_tratamento>. Acesso em: 05 abr. 2018b.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA (Brasil). Disponível em: <www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/Ecolinet.htm>. Acesso em: 19 jan. 2016.

CIMENTI, M. et al. Evaluation of microbial indicators for the determination of bacterial groundwater contamination sources. **Water Air Soil Pollut.**, v. 168, n. 1-4, p. 157-169, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 27th ed. Wayne, PA, 2017. (CLSI supplement M100, v. 37, n. 1).

_____. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico**: norma aprovada. 6. ed. São Paulo, 2003. (CLSI supplement M7-A6, v. 23).

COLFORD JÚNIOR, J.M.; WADE, T.J.; SCHIFF, K.C. Water quality indicators and the risk of illness at beaches with nonpoint sources of fecal contamination. **Epidemiology**, v. 18, n. 1, p. 27–35, 2007.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução n. 357, de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Ministério do Meio Ambiente**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 7 out. 2014.

CONSELHO REGIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Manual de Zoonoses**. Disponível: <http://crmvs.gov.br/Manual_de_zoonoses.pdf.2011>. Acesso em: 31 mar. 2018.

COSIN, S. et al. “**Estudo e caracterização de lodo de estação de tratamento de água visando sua utilização na produção de materiais cerâmicos**”. Florianópolis, SC: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia em Resíduos e Desenvolvimento Sustentável, 2004.

COSTA, E. A.; ROZENFELD, S. Constituição da Vigilância Sanitária no Brasil. In: Suely Rozenfeld. (Org). **Fundamento da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2012. p. 15-40.

D'AGUILA, P. S. et al. Avaliação da qualidade de água para abastecimento público do Município de Nova Iguaçu. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.16, n. 3, p. 791-798, jul./set. 2000.

DANIEL, L.A. **Processos de desinfecção e desinfetantes alternativos na produção de água potável**. Rio de Janeiro: ABES, 2001.

DESMARAIS, T. R.; SOLO-GABRIELE.; PALMER, C.J. Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment. **Appl Environ Microbiol**, p. 1165-1172, 2002.

DRIDI, B.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. Archaea as emerging organisms in complex human microbiomes. **Anaerobe**, v. 17, n. 2, p. 56-63, 2011.

DUKAN, S; TOUATI D. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. **J Bacteriol.**, v. 178, n. 21, p. 6145-50, 1996.

DWIGHT, R.H. et al. Health effects associated with recreational coastal water use: urban versus rural California. **Am J Public Health**, v. 94, n. 4, p. 565-7, 2004.

EBDON, J.E.; TAYLOR, H.D. Geographical stability of enterococcal antibiotic resistance profiles in Europe and its implications for the identification of fecal sources. **Environ. Sci. Technol.**, v. 40, n. 17, p. 5327-5332, 2006.

ECKBURG, PB et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. **Science**, 2005

EDBERG, SC. Et al. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. **J Appl Microbiol**, 2000.

EDGE, T.A.; HILL, S. Multiple lines of evidence to identify the source of fecal pollution at a freshwater beach in Hamilton Harbour, Lake Ontario. **Water Res.**, v, 41, n. 16, p. 3585-94, 2007.

ESTRELA, C.R.A. **Eficácia antimicrobiana de soluções irrigadoras de canais radiculares**. 2000. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2000.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST). **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.**

2018. Disponível em:

<http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.0_Breakpoint_Tables.pdf>. Acesso em: 13 abr. 2018

FALAGAS, M. E.; SIAKAVELLAS, E. Bacteroides, Prevotella, and Porphyromonas species: a review of antibiotic resistance and therapeutic options. **International Journal of Antimicrobial Agents.**, v. 15, n. 1, p. 1-9, June 2000.

FERREIRA, M. D. et al. Parasitas e bactérias prevalentes no Córrego Monte Alegre localizado na área de influência do aterro sanitário de Ribeirão Preto. **O Mundo da Saúde São Paulo**, v, 32, n. 3, p. 287-293, jul./set. 2008.

FIELD, K. G. et al. A comparative study of culture-independent, library-independent genotypic methods of fecal source tracking. **Journal of Water and Health**, v. 1, n. 4, p. 181- 94, 2003.

FIELD, K. G., SAMADPOUR, M. Fecal source tracking, the indicator paradigm, and managing water quality. **Water Res.**, v. 41, n. 16, p. 3517-38, 2007.

FIKSDAL, L. et al. Survival and detection of Bacteroides spp., prospective indicator bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 49, p. 148-150, 1985.

FUNDAÇÃO OSVALDO CRUZ. **Tétano**: sintomas, transmissão e prevenção. Disponível em: <<http://www.bio.fiocruz.br/index.php/tetano-sintomas-transmissao-e-prevencao>>. Acesso em: 25 out. 2013.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE (Brasil). **Vigilância ambiental em saúde.** Brasília, 2002.

GALINDO, E.F.; FURTADO, M.F.R.G. Cidades e suas águas: gestão articulada para a sustentabilidade ambiental. **Cadernos metrópole**, v. 15, p. 71-88, 2006.

GASANA, J. Air Water Borne Diseases. **Water and Health**, v. 3, n. 2 , 1000e129, 2014.

GELDREICH, E.E. Qualidade microbiológica em águas potáveis. In: SECRETARIA DOS SERVIÇOS E OBRAS PÚBLICAS. **Desinfecção das águas.** São Paulo, CETESB, 1974. p. 73-93. Cap. 7.

GILPIN, B. et al. The use of chemical and molecular microbial indicators for faecal source identification. **Water Sci. Technol.**, v. 47, n. 3, p. 39-43, 2003.

GORDON, D. M. Geographical structure and host specificity in bacteria and the implications for tracing the source of coliform contamination. **Microbiology**, v. 147, p. 1079-1085, 2001.

GOURMELON, M. et al. Evaluation of two library independent microbial source tracking methods to identify sources of fecal contamination in French estuaries. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, n. 15, p. 4857-4866, 2007.

GRACZYK, T.K. et al. Bather density and levels of Cryptosporidium, Giardia, and pathogenic microsporidian spores in recreational bathing water. **Parasitol Res**, v. 101, p. 1729-1731, 2007a.

GRACZYK, T.K. et al. Quantitative evaluation of the impact of bather density on levels of human-virulent microsporidian spores in recreational water. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, p. 4095-4099, 2007b.

GREENBERG, J. T. et al. Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in Escherichia coli. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 87, p. 6181-6185, 1990.

GREGOR, J. et al. Use of classification and regression tree (CART) analysis with chemical faecal indicators to determine sources of contamination. **N.Z.J. Mar. Freshwater Res.**, v. 36, p. 387-398, 2002.

GRIFFITH, J.F. et al. Evaluation of rapid methods and novel indicators for assessing microbiological beach water quality. **Water Res**, v. 43, p. 4900-4907, 2009.

GROßKOPF, R.; JANSSEN, P. H.; LIESACK, W. Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 3, p. 960, 1998.

GUERRA, N.M.M. et al. Ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* em água potável. **Acta Sci. Biol. Sci.**, v.28, n.1, p.13-18, 2006.

HARDINA, C.M.; FUJIOKA, R.S. Soil: The environmental source of *Escherichia coli* and enterococci in Hawaii's streams. *Environmental Toxicology and Water Quality. An International Journal*, v. 6, p.185-195, 1991.

HARWOOD, V. J. et al. Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes. *FEMS Microbiol Rev*, v. 38, p. 1-40, 2014.

HARWOOD, V.J. et al. Isolation of fecal coliform bacteria from the diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin centrata*). *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 865-867, 1999.

HEALTH AND WELFARE CANADA. **Guidelines for Recreational Water Quality**. Ottawa, Canada, 1992.

HIGGINS, C. S. et al. Characterization, cloning and sequence analysis of the inducible *Ochrobactrum anthropi* AmpC β - lactamase. *J Antimicrob Chemother*, v. 47, p. 745-4, 2001.

HONGO, Y. et al. Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. *FEMS Microbiology Letters*, v. 221, n. 2, p. 299-304, 2003.

HOODA, P.S.; EDWARDS, A.C. A review of water quality concerns in livestock farming areas. *The Science of the Total Environment*, v. 250, p. 143-167, 2000.

INSTITUTO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (Brasil). **Bacia Hidrográfica dos Rios Guandu, da Guarda e Guandu-Mirim**: experiências para a gestão dos recursos hídricos. Rio de Janeiro, 2012. 340 p.

INSTITUTO TRATA BRASIL. **Ranking do saneamento**. 2014. Disponível em: <<http://www.tratabrasil.org.br/ranking-do-saneamento>>. Acesso em: 30 mar. 2018
ISOBE, K.O. et al. Quantitative application of fecal sterols using gas chromatography– mass spectrometry to investigate fecal pollution in tropical waters: western Malaysia and Mekong Delta, Vietnam. *Environ. Sci. Technol.*, v. 36, n. 21, 4497-4507, 2002.

JOHNSTON, C. et al. A real-time qPCR assay for the detection of the *nifH* gene of *Methanobrevibacter smithii*, a potential indicator of sewage pollution. *Journal of Applied Microbiology*, n. 109, p.1946-1956, 2010.

KILDARE, B.J. et al. 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal Bacteroidales: a Bayesian approach. **Water Res.**, 2007.

KOBAYASHI, A. et al. Chicken- and duck-associated *Bacteroides*–*Prevotella* genetic markers for detecting fecal contamination in environmental water. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 97, p. 7427-7437, 2013.

KÖNIG, H. Chemical composition of cell envelopes of methanogenic bacteria isolated from human and animal feces. **Syst Appl Microbiol**, v. 8, p. 159-162, 1986.

KONZEN, E.A. **Manejo e utilização dos dejetos de suínos**. Concórdia: EMBRAPA/CNPQA, 1983, 36p. (EMBRAPA Suínos e Aves, Circular Técnica, 6).

KREADER, C. A. Design and evaluation of *Bacteroides* DNA probes for the specific detection of human fecal pollution. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 1171-1179, 1995.

KRIEG, N. R. Phylum XIV Bacteroidetes phyl. nov. In: GOODFELLOW, M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed. New York: Springer, 2010. p. 25-467.

LAI, M.C. et al. *Methanocalculus chunghsingensis* sp. Nov., isolated from an estuary and a marine fishpond in Taiwan. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 54, p. 183-18, 2004.

LECLERC, H. et al. Advances in the bacteriology of the Coliform Group: their suitability as markers of microbial water safety. **Annu Rev. Microbiol**, v. 55, n. 201-234, 2001.

LE DANTEC, C. et al. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. **Appl Environ Microbiol.**, v. 68, n. 11, p. 5318-25, 2002.

LEE J.H. et al. *Methanobrevibacter boviskoreani* sp. nov., isolated from the rumen of Korean native cattle. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 2013.

LESER, T. D. et al. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 673-690, 2001.

MACÊDO, Jorge Antônio Barros. **Métodos Laboratoriais de Análises Físico-Químicas e Microbiológicas**. 3. ed., atual e rev. Belo Horizonte, 2005.

MACKAY, I. M. et al. Real-time PCR: history and fluorogenic chemistries in mackay. In: MACKAY, I.M. (Ed.). **Real- Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization**. Australia: Caister Academic Press Norfolk, 2007. p.1-40.

MARTELLINI, A.; PAYMENT, P.; VILLEMUR, R. Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. **Water Res.**, v. 39, n. 4, p. 541-548, 2005.

MATOS, A.T. **Tratamento de resíduos agroindustriais**. Belo Horizonte: Fundação Estadual do Meio Ambiente, 2005.

MCQUAIG, S.; GRIFFITH, J.; HARWOOD, V.J. The association of fecal indicator bacteria with human viruses and microbial source tracking markers at coastal beaches impacted by nonpoint source pollution. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, p. 6423-6432, 2012.

MCQUAIG, S.M. et al. Detection of human-derived fecal pollution in environmental waters by use of a PCR-based human polyomavirus assay. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 7567-7574, 2006.

MEDEIROS, L. V.; VASCONCELOS, U.; CALAZANS, G. M. T. Ocorrência de linhagens de pseudomonas aeruginosa cloro resistentes em águas de diferentes origens. **Acta Sci. Biol. Sci. Maringá**, v. 29, n. 3, p. 309-313, 2007.

MERINO, V. R. C. **Avaliação quantitativa de enteropatógenos em crianças com e sem diarreia na Cidade de São Paulo, SP**. 2012. 100 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MIESZKIN, S. et al. Phylogenetic analysis of Bacteroidales 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR. **J Appl Microbiol.**, 2010.

MIESZKIN, S., FURET, J. P., CORTIER, G., E GOURMELON, M. Estimation of Pig Fecal Contamination in a River Catchment by Real-Time PCR Using Two Pig-Specific Bacteroidales 16S rRNA Genetic Markers. *Applied and environmental microbiology*, p. 3045–3054, May 2009.

MILLER, T.L.; WOLIN, M.J.; KUSEL, E. Isolation and characterization of methanogens from animal feces. **Syst Appl Microbiol**, v. 8, p. 234-238, 1986.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE; MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO; INSTITUTO BRASILEIRO DE DEFESA DO CONSUMIDOR. **Manual de Educação para o Consumo Sustentável**. Brasília, 2005.

MÖLLER, L.V. et al. Ochrobactrum intermedium infection after liver transplantation. **J Clin Microbiol**, v. 37, p. 241-244.

NAKAJIMA, H. et al. Overexpression of the robA gene increases organic solvent tolerance and multiple antibiotic and heavy metal ion resistance in Escherichia coli. **Appl Environ Microbiol.**, v. 61, n. 6, p. 2302-7, 1995.

NGWA, G. A. et al. Comparative detection and recovery of Pseudomonas aeruginosa by membrane filtration and a Most Probable Number technique. **Journal of Microbiological Methods**, v. 133, p. 76-81, 2017.

NOGUEIRA, J.M.R.; MIGUEL, L.F.S.. **Bacteriologia**. Rio de Janeiro: ENSP, 2005.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M. Uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 13, p. 4, 2004.

OKABE, S. et al. Identification and quantification of host-specific Bacteroides-Prevotella 16S rRNA genetic markers for assessment of fecal pollution in freshwaters. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 74, p. 890-901, 2007.

OLIVEIRA, T. PCR em tempo real: métodos e aplicações. 2010. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Universidade de Aveiro, 2010.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. **A ONU e a água**. Disponível em:<<https://nacoesunidas.org/acao/agua/>>. Acesso em: 03 abr. 2018.

_____. **Declaração da “ONU Água” para o dia mundial da água**. 2010. Disponível em:<<https://nacoesunidas.org/acao/agua/>>. Acesso em: 03 abr. 2018

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Declaração de Alma-Ata**. Alma-Ata: **OMS**. 1978. 3 p. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39228/9241800011_por.pdf;jsessionid=96E8439FDD66978A201BAF0FC2691F15?sequence=5>. Acesso em: 29 mar. 2018.

ORRETT, F.A. Antimicrobial susceptibility survey of *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from clinical sources. **J. Natl. Med. Assoc.**, Washington, D.C., v. 96, n. 8, p. 1065-1069, 2004.

PANDEY, P.K. et al. Contamination of waterresources by pathogenic bacteria. **AMB Express.**, v. 28, n. 4, p. 51, 2014.

PELLEGRINO, F.L.P.C. et al. Occurrence of a multi drug-resistant *pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, D.C., v. 40, n. 7, p. 2420-2424, 2002.

PENG, X. et al. Tracing anthropogenic contamination in the Pearl River estuarine and marine environment of South China Sea using sterols and other organic molecular markers. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 50, n. 8, 856-865, 2005.

PEREIRA, R. C., A. S. GOMES (Org.). **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Interciências, 2002. 382 p.

PHILIP, D. A. T. et al. Impact of recreation on recreational water quality of a small tropical stream. **J Environ Monit**, v. 11, p. 1192-1198, 2009.

PONTES, C. A. A.; SCHRAMM, F. R. Bioética da proteção e papel do Estado: problemas morais no acesso desigual à água potável. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 5, p. 1319-1327, set./out., 2004.

PRIETO, M.D. et al. Recreation in coastal waters: health risks associated with bathing in sea water. **J Epidemiology Community Health**, v. 55, p. 442-447, 2001.

RAM, S.; VAJPAYEE, P.; SHANKER, R. Contamination of potable water distribution systems by multiantimicrobial-resistant enterohemorrhagic *escheria coli*. **Environ Health Perspect.**, v. 116, n. 4, p. 448-452, 2008.

RASTOGI, N; MATHUR, P. Ochrobactrum anthropi: An emerging pathogen causing meningitis with sepsis in a neurotrauma patient. **J Infect Dev Ctries**, v. 11, n. 9, p. 733-735, 2017.

RECHE, M. H. L. R.; PITTOL, M.; FIUZA, L. M. Bactérias e bioindicadores de qualidade de águas de ecossistemas orizícolas da região sul do Brasil. **Oecol. Aust.**, v.14, n.2, p.452-463, 2010.

REIMANN, M. M. et al. Biomonitoramento indica poluição do rio Guandu por compostos cancerígenos. **AS&T**, v. 1, n. 2, 2013.

REISCHER, G.H. et al. A quantitative real-time PCR assay for the highly sensitive and specific detection of human faecal influence in spring water from a large alpine catchment area. **Lett Appl Microbiol.**, 2007.

REISCHER, G.H. et al. Quantitative PCR method for sensitive detection of ruminant fecal pollution in freshwater and evaluation of this method in alpine karstic regions. **Appl Environ Microbiol.**, 2006.

RHEINHEIMER, D. S. et al. Impacto das atividades agropecuárias na qualidade da água. **Ciência & Ambiente**, n.27, p. 85-96, 2003.

RIBEIRO H. Saúde Pública e Meio Ambiente: evolução do conhecimento e da prática, alguns aspectos éticos. **Saúde e Sociedade**, v. 13, n. 1, p. 70-80, 2004.

RIDGWAY, H.F.; OLSON, B.H. Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, D.C., v. 44, n. 4, p. 972-987, 1982.

SÁ, L. L. C. et al. Qualidade microbiológica da água para consumo humano em duas áreas contempladas com intervenções de saneamento. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 14, n. 3, 2005.

SALAMENE, S. **Estratificação e Caracterização Ambiental da Área de Preservação Permanente do Rio Guandu, RJ**. 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais) - Instituto de Florestas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

SALAMENE, S. et al. Estratificação e caracterização ambiental da área de preservação permanente do rio Guandu/ RJ. **Revista Árvore**, v. 35, n.2, p.221-231, mar./apr. 2011.

SERVIÇOS AUTÔNOMO MUNICIPAL DE ÁGUA E ESGOTO. **Tratamento de água e esgoto**. Disponível em: <<http://www.samaepomerode.com.br/index.php?pg=1052>>. Acesso em: 13 abr. 2018.

SAMUEL, B. S. et al. Genomic and metabolic adaptations of *Ethanolobacter smithii* to the human gut. *Proc Natl Acad Sci*, v. 104, n. 25, p. 10643-8, 2007.

SANTO DOMINGO, J.W. et al. Quo vadis source tracking? Towards a strategic framework for environmental monitoring of fecal pollution. **Wat Res.**, v.41, p.3539-3552, 2007.

SANTOS, T. **Aplicação de biomarcadores de poluição fecal hospedeiro-específico em ecossistemas aquático**. 2014. 57 f. Monografia. Universidade Castelo Branco, Rio de Janeiro, 2014.

SAVICHTCHEVA, O.; OKABE, S. Alternative indicators of fecal pollution: relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. **Water Res.**, v. 40, n. 13, p. 2463-2476, 2006.

SCANLON, K.A. et al. Occurrence and characteristics of fastidious *Campylobacteraceae* species in porcine samples. **Int J Food Microbiol.**, 2013

SCHMIDT, G.A.; LEGRANDE, A.N.; HOFFMANN, G. Water isotope expressions of intrinsic and forced variability in a coupled ocean-atmosphere model. **J. Geophys. Res.**, 2007.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, v. 3, p. 1101-1108, 2008.

SCHONNING, C.; LEEMING, R.; STENSTROM, T.A. Faecal contamination of source-separated human urine based on the content of faecal sterols. **Water Res.**, v. 36, n. 8, p. 1965-1972, 2002.

SCHRIEWER, A. et al. Presence of Bacteroidales as a predictor of pathogens in surface waters of the central California coast. **Appl Environ Microbiol.**, 2010.

SCHWARTZ, T. et al. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. **FEMS Microbiol Ecol.**, v. 43, n. 3, p. 325-35, 2003. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2003.tb01073.x.

SCOTT, T. M. et al. Microbial Source Tracking: Current Methodology and Future Directions†. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, n. 12, p. 5796, 2002.

SEGANFREDO, M. A. A questão ambiental na utilização de dejetos de suínos como fertilizante do solo. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2000. 37 p. (CircularTécnica 22).

SERBER, J. B. **Diagnóstico ambiental das atividades do Pólo industrial de Queimados como subsídios ao termo de ajustamento de conduta na gestão sustentável da Bacia Hidrográfica do Rio Guandu, RJ.** 2005. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Tecnologia e Ciência, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2005.

SEURINCK, S. et al. Detection and quantification of the human-specific HF183 Bacteroides 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater. **Environ Microbiol.**, v. 7, n. 2, p. 249-59, 2005.

SHI, W. et al. Carbapenem and cefoxitin resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains associated with porin OmpK36 loss and DHA-1 -lactamase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 435-442, 2013.

SHRIVASTAVA, R. et al. Suboptimal Chlorine treatment of drinking water leads to selection of multi drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, New York, v. 58, n. 2, p. 277-283, 2004.

SILVA, A. P.; OLIVEIRA, E. F.; CONSOLI, M. A. F. Aspectos críticos da poluição da bacia do rio Guandu: sua influência sobre a ETA Guandu e o abastecimento da população da cidade do Rio de Janeiro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS HÍDRICOS, 18., 2009, Campo Grande, MS. **[Anais...]** Mato Grosso do Sul: ABRH, 2009.

SILVA, M. D.; MATTOS, M. L. T. Microbiological quality of water for human consumption in the hydrographical microbasin of Arroio Passo do Pilão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21., 2001, Foz do Iguaçu. **Resumos...** Foz do Iguaçu, 2001. 42 p.

SIMPSON, J.M.; SANTO DOMINGO, J.W.; REASONER, D.J. Microbial source tracking: state of the science. **Environ. Sci. Technol.**, v. 36, p. 5279-5288, 2002.

SOUSA, T. G. S. **Aguá potável garantia de qualidade de vida**. 2002. 16 f. Monografia (Especialização em Supervisão Escolar) – Universidade Federal do Piauí, 2002.

SOUZA, V. et al. Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3373-3385, 1999.

SPIPKER, T. et al. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. **J Clin Microbiol.**, v. 42, n. 5, p. 2074-9, 2004.

STALEY, C.M. et al. Assessment of sources of human pathogens and fecal contamination in Florida freshwater lake. **Water Res**, v. 46, p. 5799–5812, 2012.

STELLA, A. E. **Fatores de virulência em isolados de *Escherichia coli* provenientes de amostras de água, leite e fezes de bovinos leiteiros da região de Ribeirão Preto-SP, Brasil**. 2009. 85 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, São Paulo. 2009.

STEWART, J.R.; SANTO DOMINGO, J.W.; WADE, T.J. Fecal pollution, public health, and microbial source tracking. In: SANTO DOMINGO, J.W.; SADOWSKY, M.J. (Eds). **Microbial source tracking**. USA: ASM Press, p 1–32, 2007.

STOECKEL, D. M.; HARWOOD, V. J. Performance, design, and analysis in microbial source tracking studies. **Appl Environ Microbiol**, v. 73, n. 8, p. 2405-15, 2007

STOLER, J. et al. Presence of *Pseudomonas aeruginosa* in coliform-free sachet drinking water in Ghana. **Food Control**, v. 55, p. 242-247, 2015.

STRITTHOLT, J. R.; GARONO, R. J.; FROST, P. A. **Spatial patterns in land use and water quality in the Tillamook Bay watershed: a GIS mapping project**. Corvallis, Oreg.: Earth Designs Consultants, 1998.

THOMA. B. et al. Identification and antimicrobial susceptibilities of *Ochrobactrum* spp. **Int J Med Microbiol**, v. 299, p. 209-20, 2009.

UNIÃO EUROPÉIA. **Diretiva 2006/7/CE**: pollution, public health: quality of bathing water. Disponível: <www.europarl.europa.eu/oeil/file.jsp?id=226822>. Acesso em: 20 jan. 2018.

UFNAR, J. A. et al. Development of a swine-specific fecal pollution marker based on host differences in methanogen *mcrA* genes. **Applied and environmental microbiology**, p. 5209-5217, aug. 2007.

UFNAR, J. A. et al. Detection of the *nifH* gene of *Methanobrevibacter smithii*: a potential tool to identify sewage pollution in recreational waters. **J Appl Microbiol.**, v. 101, n. 1, p. 44-52, 2006.

UN WATER. **A disponibilidade de água no mundo e no Brasil**. 2006. Disponível em: <<https://saveh.com.br/artigos/a-disponibilidade-de-agua-no-mundo-e-no-brasil/>>. Acesso em: 15 abr. 2018.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Microbial source tracking guide document. EPA/600/R-05/064**. Cincinnati, OH,: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, 2005.

VALONE, M. A. A. et al. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. **Braz. J. Microbiol.**, v. 40, n. 1, 2009.

VAZOLER, R. F.; MANFIO, G. P.; CANHOS, V. P. Diversidade do Domínio *Archaea*. In: BIODIVERSIDADE do Estado de São Paulo Microrganismos & Vírus. São Paulo: FAPESP, 1999. p. 17-24.

VERAS, H. N. et al. Monitoring of microbiological quality of water in tourist site in Parnaíba, Piauí, Brazil. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.12, n.1, p.42-49, jan./abr., 2017.

VETTORAZZI, J. S., FILHO, D. T., THOMÉ, S. M. G. **Bacia hidrográfica do Rio Guandu**: ação antrópica e potencial presença de protozoários de importância médica. INEA, 2012. p. 79-100.

VIANA, V. J. **Riscos ambientais associados ao transporte de produtos perigosos na área de produtos perigosos na área de influência da ETA Guandu-RJ**. 2009, 157 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

XI, C. et al. Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, 5714e5718, 2009.

WEBB, H. E. et al. Carbapenem-resistant bacteria recovered from faeces of dairy cattle in the high plains region of the USA. **PLoS One**, v. 11, n. 1, e0147363, p. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Water quality : guidelines, standards and health : assessment of risk and risk management for water-related infectious diseases / edited by Lorna Fewtrell and Jamie Bartram.** London, UK: IWA Publishing, 2001.

_____. **Guidelines for drinking water quality incorporating first addendum: recommendations.** 3. ed. Geneva: 2007. v. 1.

_____. **Guidelines for drinking water quality: recommendations.** 3. ed. Geneva, 2004. v. 1. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/em/index.html>. Acesso em: 13 abr. 2018.

_____. **Drinking-water.** 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water>>. Acesso em: 21 maio 2018.

_____. **Guidelines for drinking water.** Geneve, 2003.

ZHENG, G. et al. Development of Faecalibacterium 16S rRNA gene marker for identification of human faeces. **J Appl Microbiol.**, v. 106, n. 2, p. 634-41, 2009.