

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

Camila Coutinho Barreto

**RASTREAMENTO DE POLUIÇÃO FECAL HUMANA E EQUINA ATRAVÉS DA
DETECÇÃO DE DNA MITOCONDRIAL E DE ARCHAEA METANOGÊNICAS EM
ÁGUAS SUPERFICIAIS DA LAGOA RODRIGO DE FREITAS, RIO DE JANEIRO,
BRASIL**

Rio de Janeiro

2016

Camila Coutinho Barreto

**RASTREAMENTO DE POLUIÇÃO FECAL HUMANA E EQUINA ATRAVÉS DA
DETECÇÃO DE DNA MITOCONDRIAL E DE ARCHAEA METANOGÊNICAS EM
ÁGUAS SUPERFICIAIS DA LAGOA RODRIGO DE FREITAS, RIO DE JANEIRO,
BRASIL**

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

Orientadora: Maysa Beatriz Mandetta Clementino

Rio de Janeiro

2016

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

Barreto, Camila Coutinho

Rastreamento de poluição fecal humana e equina através da detecção de DNA mitocondrial e archaeas metanogênicas em águas superficiais da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brasil / Camila Coutinho Barreto. – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2016.

68 f., il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz, 2016.

Orientadora: Maysa Beatriz Mandetta Clementino

1. Coliformes. 2. Qualidade da Água. 3. Poluição de Lagos e Barragens. 4. Análise Microbiológica. 5. DNA Mitocondrial. 6. Archaea. I. Título

Tracking human fecal pollution and equine through mitochondrial DNA detection and methanogenic archaeas in surface waters of the Rodrigo de Freitas Lagoon, Rio de Janeiro, Brazil

Camila Coutinho Barreto

**RASTREAMENTO DE POLUIÇÃO FECAL HUMANA E EQUINA ATRAVÉS DA
DETECÇÃO DE DNA MITOCONDRIAL E DE ARCHAEA METANOGÊNICAS EM
ÁGUAS SUPERFICIAIS DA LAGOA RODRIGO DE FREITAS, RIO DE JANEIRO,
BRASIL**

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

Aprovado em: 22/ 03 / 2016

BANCA EXAMINADORA

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

Catia Aparecida Chaia Miranda Fernandes (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Ana Cristina Rivas da Silva (Doutor)
Universidade Castelo Branco

Maysa Beatriz Mandetta Clementino (Doutor) - Orientador
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho ao meu pai, Carlos Henrique, por me fornecer a educação e o incentivo necessários para chegar até aqui.

À minha bisavó, Raimunda da Cunha (*in memoriam*), minha primeira professora.

Ao meu tio-avô Osni (*in memoriam*), que nos deixou saudades esse ano.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Carlos Henrique e Tania, pela minha criação e educação.

Aos meus irmãos Bruno, Anna Clara, Leonardo e Luciana.

À minha afilhada Alice, minha princesinha.

À Rosana, minha segunda mãe.

Aos meus avós, tios, primos e toda família.

À Yaissa, pela amizade, força e incentivo durante quase toda essa jornada.

À Fernanda, amiga sempre presente, em todos os momentos da minha vida.

À Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), à Coordenação de Pós-graduação em Vigilância Sanitária, aos professores e funcionários do INCQS, por tornarem possível a realização desse projeto.

Aos amigos do Laboratório de Microrganismos de Referência, do INCQS/Fiocruz, Kayo, Mariana, Renata, Samara, Carla, Aline, Cláudia Flores, Juliana, Claudia Andrade, Cátia, Talita e Jandira, pela amizade, companheirismo e por estarem sempre dispostos a ajudar em todas as situações.

À minha nova casa, Baktron Microbiologia LTDA., que me deu todo o apoio necessário para conclusão do projeto. Obrigada Fernando e Renato Cruz, Fernando Coelho, Sindy, Rose, Daniela, Danielle, Marcelo, Mônica, Flávia, Glauce, Joana, Samira, Daniel, Ulisses, Rozane, Roberto, e um agradecimento especial aos meus supervisionados do SMIC e SAPO, Verônica, Carol, Felipe, Bruna, Thaís e Mayara, pela confiança depositada em mim.

À minha orientadora, Dr^a Maysa Beatriz Mandetta Clementino, pelo papel fundamental na construção e desenvolvimento deste trabalho.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e Faperj, pelo apoio financeiro.

“Quando tudo nos parece dar errado
Acontecem coisas boas
Que não teriam acontecido
Se tudo tivesse dado certo.”

Renato Russo (1960 - 1996)

(Cantor e compositor brasileiro)

RESUMO

A água é o elemento fundamental da vida e seu uso é indispensável a um largo espectro de atividades humanas, tendo influência direta sobre a saúde. Coliformes totais, termotolerantes, enterococos e *Escherichia coli* têm sido mundialmente utilizados como indicadores da qualidade microbiológica da água, mas nem sempre são eficazes, podendo se adaptar e se multiplicar no ambiente em determinadas condições, além de não fornecerem informação sobre a fonte de contaminação. Diversos métodos de rastreamento de fonte microbiana vêm sendo propostos a fim de contornar essas limitações. O presente estudo tem como objetivo detectar a contaminação fecal e determinar sua fonte através do uso de biomarcadores moleculares hospedeiro-específicos nas águas da bacia da lagoa Rodrigo de Freitas. Foram coletadas amostras de água superficial de 6 pontos da lagoa. Os seguintes parâmetros físico-químicos foram analisados: temperatura, pH, condutividade, oxigênio dissolvido, turbidez, cloro e salinidade. A contagem de coliformes totais e *E. coli* realizada através do kit Colilert demonstrou índices de contaminação fecal em todos os pontos de coleta. A sensibilidade (r) e a especificidade (s) dos biomarcadores foram avaliadas utilizando 48 amostras fecais de 5 grupos de hospedeiros. Os valores de r e s de todos os biomarcadores testados foi de 1 (valor máximo de 1). Após filtração e extração, o DNA total das amostras foi submetido à PCR utilizando iniciadores específicos para mtDNA humano e equino, e para *Methanobrevibacter* sp. hospedeiro-específicos. Foi observada a presença de contaminação fecal humana e equina em todos os pontos de coleta. Estes resultados demonstram que, embora se trate de uma área urbanizada, há presença de lançamento irregular de esgoto humano e de resíduos equinos nas águas da bacia da Lagoa Rodrigo de Freitas. Estes dados reforçam a necessidade de maiores investimentos em saneamento básico e na fiscalização da rede de galerias de águas pluviais dessa região. A determinação da origem da contaminação fecal é essencial na avaliação dos riscos e no aprimoramento da Vigilância Ambiental em Saúde no que se refere ao desenho de ações preventivas aos impactos no ambiente e na saúde pública.

Palavras Chaves: Contaminação Fecal, Qualidade da Água, mtDNA, Archaea, Rastreamento de Fonte Microbiana.

ABSTRACT

Water is the most essential element for life and its use is indispensable for a wide spectrum of human activities. Total coliforms, thermotolerant coliforms, enterococci and *Escherichia coli* have been worldwide used as indicators of microbiological water quality, but are not always effective and can adapt and multiply under certain conditions in the environment, and do not identify the source of fecal pollution. Several methods for microbial source tracking have been proposed to avoid these limitations. This study aims to detect fecal pollution and determine its source through the use of host-specific molecular biomarkers in the Rodrigo de Freitas lagoon. Surface lagoon water samples were collected from 6 points. The following physicochemical parameters were analyzed: temperature, pH, conductivity, dissolved oxygen, turbidity, chlorine and salinity. The MPN of total coliforms and *E. coli* through Colilert kit showed high levels of fecal pollution in all collection points. The sensitivity (*r*) and specificity (*s*) of the 48 biomarkers were evaluated using fecal samples from 5 hosts groups. The values of *r* and *s* of all biomarkers tested was 1 (maximum value of 1). After filtration, the total extracted DNA was subjected to PCR using specific primers for human and equine mtDNA, and for host-specific *Methanobrevibacter* spp. The presence of human and equine fecal contamination was observed in all collection points. These results demonstrate the presence of irregular release of human sewage and equine waste waters in the Rodrigo de Freitas lagoon basin, although it is an urbanized area. These data reinforce the requirement for improvement in sanitation and inspection of the stormwater network galleries of that region. Determining source of fecal pollution is essential to measure the risks and to improve the Environmental Health Surveillance for preventive actions aiming the decrease of the impact on the environment and public health.

Key Words: Fecal Contamination, Water Quality, Archaea, mtDNA, Microbial Source Tracking.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Evolução da cobertura de saneamento básico e abastecimento de água potável no Brasil nos últimos 25 anos.....	24
Figura 2: Uso e Cobertura do Solo da Bacia Hidrográfica da lagoa Rodrigo de Freitas.....	27
Figura 3: Lagoa Rodrigo de Freitas antes da ocupação urbana e depois, com seu tamanho reduzido devido aos aterramentos para construção de edifícios e do Jockey Club.....	28
Figura 4: Localização dos pontos de coleta na lagoa Rodrigo de Freitas	39
Figura 5: Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos da PCR em material fecal.....	49
Figura 6: Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos da PCR em material fecal.....	50
Figura 7: Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos da PCR para detecção do gene <i>nifH</i> de <i>M. smithii</i> nas amostras da Lagoa Rodrigo de Freitas.....	51
Figura 8: Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos da PCR para detecção do gene <i>mcrA</i> de <i>M. gottschalkii</i> nas amostras da Lagoa Rodrigo de Freitas.....	51
Figura 9: Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos da PCR para detecção de mtDNA humano nas amostras da Lagoa Rodrigo de Freitas.....	52
Figura 10: Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos da PCR para detecção de mtDNA equino nas amostras da Lagoa Rodrigo de Freitas.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais doenças transmitidas pela água e suas vias de entrada e saída do corpo humano.....	21
Tabela 2: Proporção de óbitos devido a doença diarreica aguda em menores de 5 anos de idade, por Região, de 1990 a 2013.....	22
Tabela 3: Valores estimados da cobertura de saneamento básico e abastecimento de água potável no Brasil de 1990 a 2012.....	23
Tabela 4: Classificação dos corpos d'água e principais requisitos de qualidade segundo Resolução CONAMA nº 357/2005.....	25
Tabela 5. Sequências dos iniciadores específicos para <i>Methanobrevibacter</i> spp. hospedeiro-específicos e seus respectivos sítios-alvo.....	42
Tabela 6. Sequências dos iniciadores específicos para mtDNA humano (Humito) e equino (Homito) e seus respectivos sítios-alvo.....	42
Tabela 7. Parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos pontos LRF1, LRF2 e LRF3, e principais requisitos de qualidade para corpos d'água salobra de classe 2, segundo Resolução CONAMA nº 357/2005.....	47
Tabela 8. Parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos pontos LRF4, LRF5 e LRF6, e principais requisitos de qualidade para corpos d'água salobra de classe 2, segundo Resolução CONAMA nº 357/2005.....	48
Tabela 9: Detecção dos biomarcadores em amostras de fezes.....	50
Tabela 10: Sensibilidade e especificidade dos biomarcadores.....	50
Tabela 11. Identificação dos fragmentos amplificados pela PCR através da análise BLASTn no GenBank, NCBI.....	53

LISTAS DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
APP	Área de Proteção Permanente
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LMR	Laboratório de Micro-organismos de Referência
MS	Ministério da Saúde
MST	Microbial Source Tracking
mtDNA	DNA Mitocondrial
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	Oxigênio dissolvido
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PLANSAB	Plano Nacional de Saneamento Básico
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossomal
SIM	Sistema de Informação sobre Mortalidade
SMAC	Secretaria Municipal do Meio Ambiente
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SUS	Sistema Único de Saúde
TBE	Tris-Borato-EDTA

TCU

Tribunal de Contas da União

LISTA DE ABREVIATURAS

β	Beta
%	Porcento
\pm	Mais ou menos
$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
cm	Centímetro
CO_2	Dióxido de carbono
dATP	Deoxiadenosina trifosfato
dCTP	Deoxicitidina trifosfato
dGTP	Deoxiguanosina trifosfato
dNTPs	Deoxinucleotídeo trifosfato
dTTP	Deoxitimidina trifosfato
g	Grama
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
H^+	Íon hidrogênio
H_2	Hidrogênio molecular
KCl	Cloreto de potássio
L	Litro
mcrA	Metil coenzima M redutase
mg	Miligrama
MgCl_2	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro
μL	Microlitro
mM	Milimolar
mS	MiliSiemens
μM	Micromolar
μM	Micrômetro
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo
ng	Nanograma
nifH	Dinitrogenase redutase
nM	Nanomolar

OD	Oxigênio Dissolvido
pb	Pares de bases
pmol	Picomol
RPM	Rotações por minuto
Tm	Temperatura de melting

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 VIGILÂNCIA SANITÁRIA	17
1.1.1 Vigilância Ambiental em Saúde	18
1.2 ÁGUA	19
1.2.1 Lagoa Rodrigo de Freitas	25
1.3 QUALIDADE DA ÁGUA	27
1.3.1 Parâmetros físico-químicos	28
1.3.2 Parâmetros microbiológicos	30
1.4 RASTREAMENTO DE FONTE MICROBIANA	33
1.4.1 <i>Methanobrevibacter</i> spp.	33
1.4.2 DNA mitocondrial (mtDNA)	35
1.5 JUSTIFICATIVA	36
2 OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVO GERAL	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1 COLETA DAS AMOSTRAS	38
3.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS	39
3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	39
3.4 EXTRAÇÃO DE DNA	39
3.5 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE	40
3.6 AMPLIFICAÇÃO DO DNA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	40
3.7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	42
3.8 SEQUENCIAMENTO	42
3.9 ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO	43
4 RESULTADOS	44
4.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS	44
4.2 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE	48

4.3 DETECÇÃO DE CONTAMINAÇÃO FECAL NAS AMOSTRAS ATRAVÉS DA PCR	49
4.3 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	52
5 DISCUSSÃO	53
6 CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS.....	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 VIGILÂNCIA SANITÁRIA

A saúde é um direito fundamental do ser humano, e tem como fatores determinantes a alimentação, o meio ambiente, o saneamento básico e outros serviços essenciais (BRASIL, 1990). Desde a antiguidade há relatos do desenvolvimento de ações de saneamento, como controle da água e do esgoto, limpeza das ruas e cuidados com os alimentos. Com a criação da Organização Mundial da Saúde (OMS), após a II Guerra Mundial, a saúde foi proclamada um dos direitos humanos fundamentais. Desde então, a legislação sanitária tem sido aperfeiçoada ao longo dos anos (ROZENFELD, 2000).

No Brasil, o direito à saúde é garantido pela Constituição Federal de 1988, onde foi instituído o Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 1988). Dentre as atividades que competem ao SUS, determinadas no artigo 200 da Constituição Federal estão: a) controlar e fiscalizar procedimentos, produtos e substância de interesse para a saúde e participar da produção de medicamentos, equipamentos, imunobiológicos, hemoderivativos e outros insumos; b) executar as ações de vigilância sanitária e epidemiológica, bem como as de saúde do trabalhador; c) fiscalizar e inspecionar alimentos, compreendido o controle de seu teor nutricional, bem como bebidas e águas para consumo humano e d) participar do controle e fiscalização da produção, transporte, guarda e utilização de substâncias e produtos psicoativos, tóxicos e radioativos.

De acordo com a lei federal nº 8.080 - conhecida como a Lei Orgânica da Saúde - de 19 de setembro de 1990, é função do Estado prover as condições necessárias para garantia da saúde da população e do meio ambiente, executando ações que reduzam o risco de doenças e outros agravos (BRASIL, 1990). Essas ações consistem na Vigilância Sanitária, que é definida 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” (BRASIL, 1990).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) é responsável por exercer o controle sanitário de todos os produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária. A agência é vinculada ao Ministério da Saúde e foi criada pela lei nº 9.782, de 26 de

Janeiro de 1999, que definiu o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), em substituição à Secretaria de Vigilância Sanitária. No artigo 6º, foi estabelecida a finalidade institucional da Anvisa de “promover a proteção da saúde da população, por intermédio do controle sanitário da produção e da comercialização de produtos e serviços submetidos à vigilância sanitária, inclusive dos ambientes dos processos, dos insumos e das tecnologias a eles relacionados, bem como o controle de portos, aeroportos e de fronteiras” (BRASIL, 1999).

As principais unidades componentes do SNVS são: i) no nível federal, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), vinculado administrativamente à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e tecnicamente à ANVISA; ii) no nível estadual, os 27 órgãos de vigilância sanitária das secretarias estaduais de saúde, que também contam com o suporte de um Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN) em cada Unidade da Federação; e, iii) no nível municipal, os serviços de vigilância sanitária dos 5.561 municípios (LUCCHESI, 2006; ANVISA, 2014).

A vigilância sanitária tem como objetivo a proteção dos meios de vida (COSTA, 2009). Dentro desse conjunto, as ações voltadas ao controle da qualidade da água, do solo e do ar fazem parte da Vigilância Ambiental em Saúde (BRASIL, 2010).

1.1.1 Vigilância Ambiental em Saúde

A Fundação Nacional da Saúde (FUNASA), órgão institucional competente à gestão do sistema nacional de vigilância ambiental de acordo com o Decreto nº 7.335 de 19 de outubro de 2010, define a Vigilância Ambiental em Saúde como “um conjunto de ações que proporciona o conhecimento e a detecção de qualquer mudança nos fatores determinantes e condicionantes do meio ambiente que interferem na saúde humana, com a finalidade de identificar as medidas de prevenção e controle dos fatores de risco relacionados às doenças ou agravos à saúde” (FUNASA, 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 levam a doenças e outros agravos, tendo em vista a eliminação do risco, o controle e a recuperação do meio ambiente (BRASIL, 2010). A vistoria e

manutenção da qualidade da água contra agentes microbiológicos e químicos é um importante tópico de investigação em saúde e ambiente (FUNASA, 2002). A realização de estudos relacionados à qualidade da água, avaliando os potenciais riscos que ela representa é essencial para o controle e a prevenção da transmissão de doenças e à manutenção da qualidade de vida e da qualidade ambiental.

1.2 ÁGUA

A água é o elemento fundamental da vida, sendo essencial para todas as formas de vida conhecidas na Terra. A manutenção da qualidade microbiológica e da segurança dos sistemas de água é imperativa, uma vez que a contaminação desses sistemas representa um sério problema de saúde pública (BONJOCH, BALLESTÉ & BLANCH, 2005). Patógenos oriundos de humanos e outros animais de sangue quente podem ser introduzidos no ambiente através de suas fezes, causando riscos à saúde e degradação ambiental (SCOTT *et al.*, 2002; BONJOCH, BALLESTÉ & BLANCH, 2005; BALLESTÉ *et al.*, 2010).

Para a OMS, segundo a Resolução 58.33 da Assembleia Mundial da Saúde de 2005, todas as pessoas, independente de sua classe sócio-econômica, têm o direito ao acesso a água potável (WHO, 2005). Águas contaminadas com fezes são propensas a conter diversos patógenos entéricos, incluindo *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Campylobacter* spp., *Leptospira* spp., *Vibrio cholerae*, vírus da hepatite A, verminoses, protozoários, entre outros (SOUZA *et al.*, 1983; HAGLER & MENDONÇA-HAGLER, 1988; SCOTT *et al.*, 2002; SAVICHTCHEVA & OKABE, 2006). As principais doenças de origem fecal e seus agentes causadores estão descritos na Tabela 1.

Ainda segundo a OMS, cerca de 2,2 milhões de pessoas no mundo morrem anualmente devido à diarreia, sendo 1,5 milhão de crianças menores de 5 anos (WHO, 2000; UNICEF & WHO, 2009). A diarreia ainda é a segunda maior causa de morte de crianças menores que 5 anos no mundo, responsável por 9% dos óbitos registrados (UNICEF, 2013). No Brasil, em 1999, foram registrados mais de 4 mil óbitos de crianças menores de 5 anos devido a diarreia, sendo mais de 2 mil casos localizados na região Nordeste (FUNASA, 2010; SIM/MS, 2014). A cada ano esse índice vem sendo reduzido, como pode ser observado na Tabela 2. Segundo o

Sistema de Informações de Mortalidade do Ministério da Saúde (SIM/MS), em 2013 foram notificados 839 óbitos devido à doença diarreica aguda em crianças menores de 5 anos, 19,7 % a menos do que o registrado em 2010, porém 5,5 % a mais que em 2012 (SIM/MS, 2015). Não foram encontrados dados de mortalidade a partir de 2014.

Tabela 1: Principais doenças transmitidas pela água e suas vias de entrada e saída do corpo humano (SAUNDERS & WARFORD, 1983).

Doença	Via de saída do corpo humano	Via de entrada do corpo humano	Agente causador
Amebíase	Fecal	Oral	<i>Entamoeba</i> spp.
Ancilostomose	Fecal	Percutâneo, Oral	<i>Ancylostoma duodenale</i>
Ascaridíase	Fecal	Oral	<i>Ascaris lumbricoides</i>
Cólera	Fecal	Oral	<i>Vibrio cholerae</i>
Diarreia	Fecal	Oral	<i>E. coli</i> ; rotavírus ^a ;
Disenteria bacilar	Fecal	Oral	<i>Shiggela</i> spp.
Enterobiose	Fecal	Oral	<i>Enterobius vermicularis</i>
Febre paratifóide	Fecal	Oral	<i>Salmonella paratyphi</i> A, B e C
Febre tifoide	Fecal	Oral	<i>Salmonella typhi</i>
Giardíase	Fecal	Oral	<i>Giardia lamblia</i>
Hepatite infecciosa	Fecal	Oral	Vírus da hepatite A
Leptospirose	Fecal	Percutâneo, Oral	<i>Leptospira</i> spp.
Salmonelose	Fecal	Oral	<i>Salmonella enterica</i>
Tricurose	Fecal	Oral	<i>Trichuris trichiura</i>

^a Rotavirus é o principal causador de mortalidade infantil devido à diarreia.

Tabela 2: Proporção de óbitos devido a doença diarreica aguda em menores de 5 anos de idade, por Região, de 1990 a 2013 (SIM/MS, 2015).

Ano	Norte	Nordeste	Sudeste	Sul	Centro-Oeste	Total
1990	1.848	4.805	3.846	1.302	516	12.317
1991	1.127	4.230	2.500	1.110	505	9.472
1992	932	4.746	2.512	866	493	9.549
1993	865	5.306	2.517	839	430	9.957
1994	806	4.757	2.587	862	458	9.470
1995	702	3.985	2.124	677	406	7.894
1996	564	2.987	1.653	496	348	6.048
1997	530	2.416	1.117	369	294	4.726
1998	612	3.365	1.063	432	278	5.750
1999	452	2.709	803	300	223	4.487
2000	443	1.912	726	290	226	3.597
2001	414	1.766	611	204	204	3.199
2002	422	1.775	492	177	204	3.070
2003	385	1.740	467	144	177	2.913
2004	380	1.416	399	149	184	2.528
2005	464	1.413	350	107	156	2.490
2006	363	1.291	348	91	143	2.236
2007	292	946	228	60	113	1.639
2008	266	844	205	63	95	1.473
2009	291	599	183	64	121	1.258
2010	226	454	185	53	87	1.005
2011	165	354	144	35	58	756
2012	194	354	124	46	75	793
2013	213	389	128	40	69	839

A diarreia é um sintoma de infecção provocada por uma série de organismos bacterianos, virais e parasitários, a maioria dos quais pode ser transmitido por água contaminada (WHO, 2000). A diarreia é a segunda maior causa de mortalidade infantil no mundo, responsável por mais óbitos do que a aids, a malária e o sarampo juntos, ficando atrás somente das doenças neonatais (UNICEF & WHO, 2009).

Globalmente, cerca de 88% das mortes por diarreia são atribuídas à má qualidade da água, saneamento inadequado e falta de higiene (UNICEF & WHO, 2009). A qualidade da água e da saúde da população depende de melhorias no saneamento básico, tendo em sua comunidade abastecimento de água potável, manejo de água pluvial, coleta e tratamento de esgoto, limpeza urbana, manejo de

resíduos sólidos e controle de pragas e qualquer tipo de agente patogênico (BRASIL, 2007). Em todo o mundo cerca de 1,1 bilhão de pessoas não têm acesso a fontes melhoradas de água e 2,4 bilhões não têm saneamento básico (WHO & UNICEF, 2000; UNICEF, 2016). No Brasil, dados da OMS de 2015 mostram que apenas 83% da população total tem acesso ao saneamento básico, sendo que em zonas rurais, somente 52% são atendidos por essas melhorias (UNICEF, 2016). Além disso, somente 48,3% das famílias brasileiras são atendidas por rede de coleta de esgoto, e somente 69,4% de todo o esgoto produzido é coletado e tratado, sendo o restante descartado diretamente em rios, baías, lagoas e no oceano (SNSA, 2014). Na Tabela 3 e na Figura 1 podem ser observados os índices estimados da cobertura de saneamento básico e abastecimento de água potável no país, e sua evolução ao longo dos últimos 25 anos, respectivamente.

Uma vez determinada a presença de contaminação fecal na água, investigar sua origem é de suma importância na avaliação dos riscos associados à saúde, bem como as ações necessárias para solucionar o problema, uma vez que os animais também podem servir como reservatórios para uma variedade de patógenos entéricos (SCOTT *et al.*, 2002).

Tabela 3: Índices estimados da cobertura de saneamento básico e abastecimento de água potável no Brasil de 1990 a 2015 (UNICEF, 2016; WHO & UNICEF, 2014).

Ano	Saneamento básico			Abastecimento de Água Potável		
	Zona Urbana	Zona Rural	Total	Zona Urbana	Zona Rural	Total
1990	79%	31%	67%	96%	68%	88%
1995	81%	35%	71%	97%	72%	91%
2000	83%	39%	75%	98%	76%	93%
2005	85%	44%	78%	98%	80%	95%
2010	86%	48%	80%	99%	84%	97%
2012	87%	49%	81%	100%	85%	98%
2015	88%	52%	83%	100%	87%	98%

O Ministério da Saúde é o órgão federal responsável pelas normas de controle e vigilância da qualidade de águas destinadas ao consumo humano através da Portaria Nº 2914/2011 (BRASIL, 2011), mas também é de responsabilidade dos governos federal, estadual e municipal a manutenção da qualidade de corpos d'água

destinados a outros fins, de acordo com as exigências de cada classe. No Brasil, os corpos hídricos recebem diferentes classificações de acordo com seu uso, tendo cada classe diferentes requisitos de qualidade (Tabela 4). Essa classificação e requisitos são determinados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), através das Resoluções nº 274/2000, 357/2005 e 430/2011 (CONAMA, 2000; CONAMA, 2005; CONAMA, 2011). Porém, não há uma norma que determine a obrigatoriedade da melhoria progressiva da qualidade hídrica (PIZELLA & SOUZA, 2007). Rios, lagos e lagoas que apresentem contaminação fecal acima dos limites determinados se tornam impróprias não só para consumo como também para atividades de pesca e recreação devido ao risco de exposição ou ingestão acidental, o que prejudica não só a saúde da população local, como todo o ecossistema.

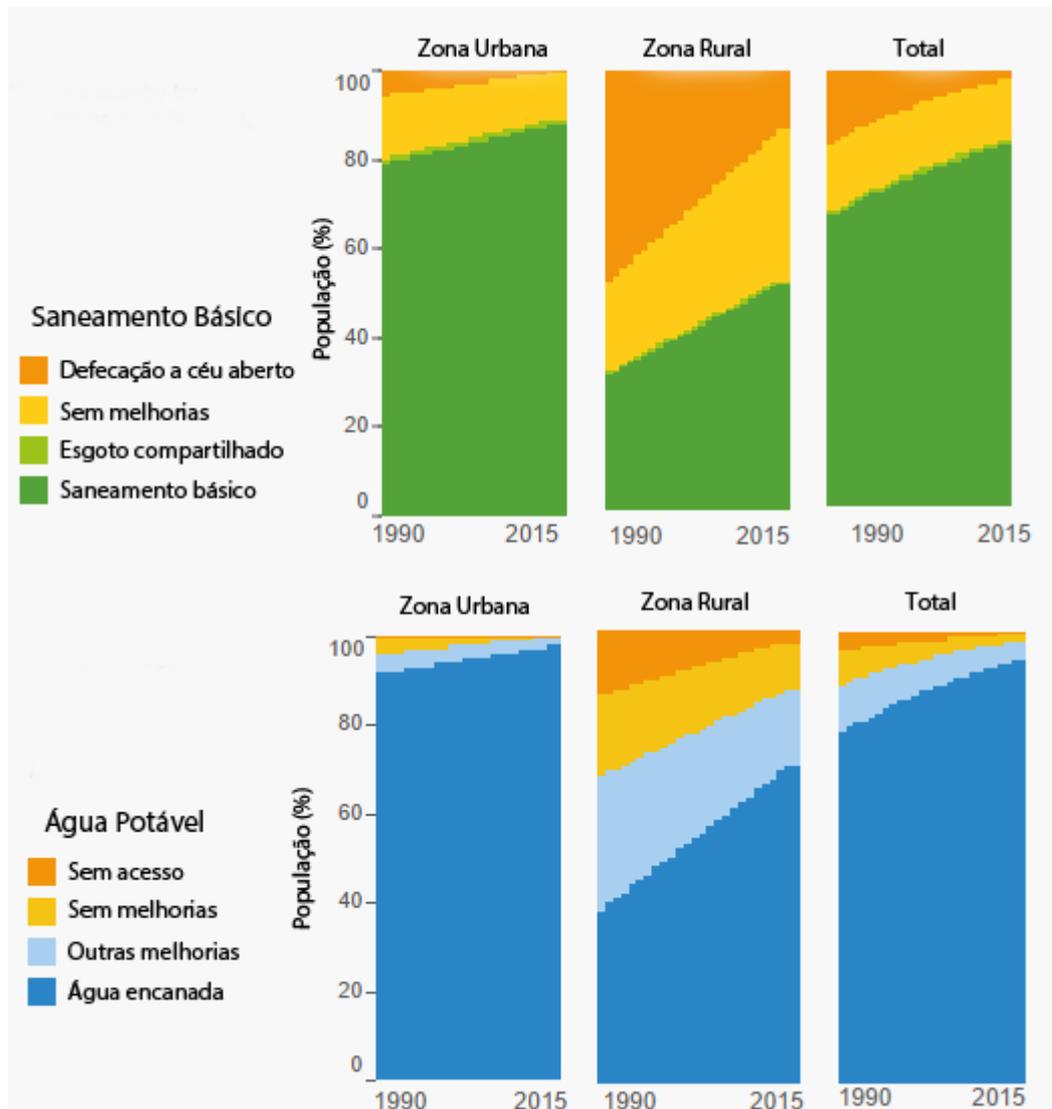


Figura 1: Evolução da cobertura de saneamento básico e abastecimento de água potável no Brasil nos últimos 25 anos (UNICEF, 2016).

Tabela 4: Classificação dos corpos d'água e principais requisitos de qualidade segundo Resolução CONAMA nº 357/2005 (CONAMA, 2005).

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

Classe 3	Navegação e Harmonia paisagística.	3,0	4000	-
-----------------	------------------------------------	-----	------	---

^a Oxigênio Dissolvido;

^b Numero Mais Provável;

^c Unidades Nefelométricas de Turbidez.

1.2.1 Lagoa Rodrigo de Freitas

O presente estudo foi realizado na lagoa Rodrigo de Freitas, localizada no estado do Rio de Janeiro (Figura 2). A bacia hidrográfica da lagoa Rodrigo de Freitas é formada pelos rios dos Macacos, Rainha e Cabeça, que desaguam na lagoa através do canal do Piraquê (SOARES *et al.*, 2012). A ligação com o mar ocorre através do canal do Jardim de Alah, renovando periodicamente suas águas (RIO-ÁGUAS, 2012). O canal, além de estreito, é constantemente obstruído, necessitando de frequentes dragagens para reestabelecer a entrada de água do mar (SMAC, 1998). A área da bacia é de aproximadamente de 30 km², incluída a lagoa, cujo espelho d'água possui aproximadamente 2,2 km² de área e 7,5 km de contorno (FEEMA, 2006), tamanho que foi reduzido devido a aterramentos ocorridos na década de 70 (SOARES *et al.*, 2012). A lagoa está localizada na Zona Sul da cidade e representa, atualmente, uma das principais atrações turísticas do Rio de Janeiro, tendo grande expressão na estrutura urbana do município (ALVES *et al.*, 1998).

De acordo com o Decreto nº 18.415 de 01 de março de 2000, *o uso das águas da lagoa Rodrigo de Freitas é destinado à proteção das comunidades aquáticas, à harmonia paisagística, à pesca artesanal e à recreação de contato secundário* (RIO DE JANEIRO, 2000), sendo classificada nas normas do CONAMA como água salobra de classe 2. Devido a sua importância, a lagoa é regulamentada como uma Área de Proteção Permanente (APP) pela Lei Orgânica do Município do Rio de Janeiro de 05 de abril de 1990, conforme artigo 463, e tem seu espelho d'água tombado pelo Decreto Municipal nº 9.396 de 13 de junho de 1990 (RIO DE JANEIRO, 1990a; RIO DE JANEIRO, 1990b).

O bairro da Lagoa recebe sua denominação devido à lagoa Rodrigo de Freitas, sendo um bairro de classes média-alta e alta, possuindo um dos maiores índices de desenvolvimento humano do país. É cercada por importantes bairros como Ipanema, Leblon, Gávea e Jardim Botânico, englobando uma extensa área de lazer com parques, quadras de esportes, pista de caminhada, ciclovia, e um centro gastronômico (PEREIRA & MEDEIROS, 2009), recebendo, em média, 120 mil pessoas por final de semana. Seu espelho d'água abriga eventos esportivos e

atividades recreativas, como remo, iatismo, esqui aquático, além de passeios de pedalinho (RIOTUR, 2013).

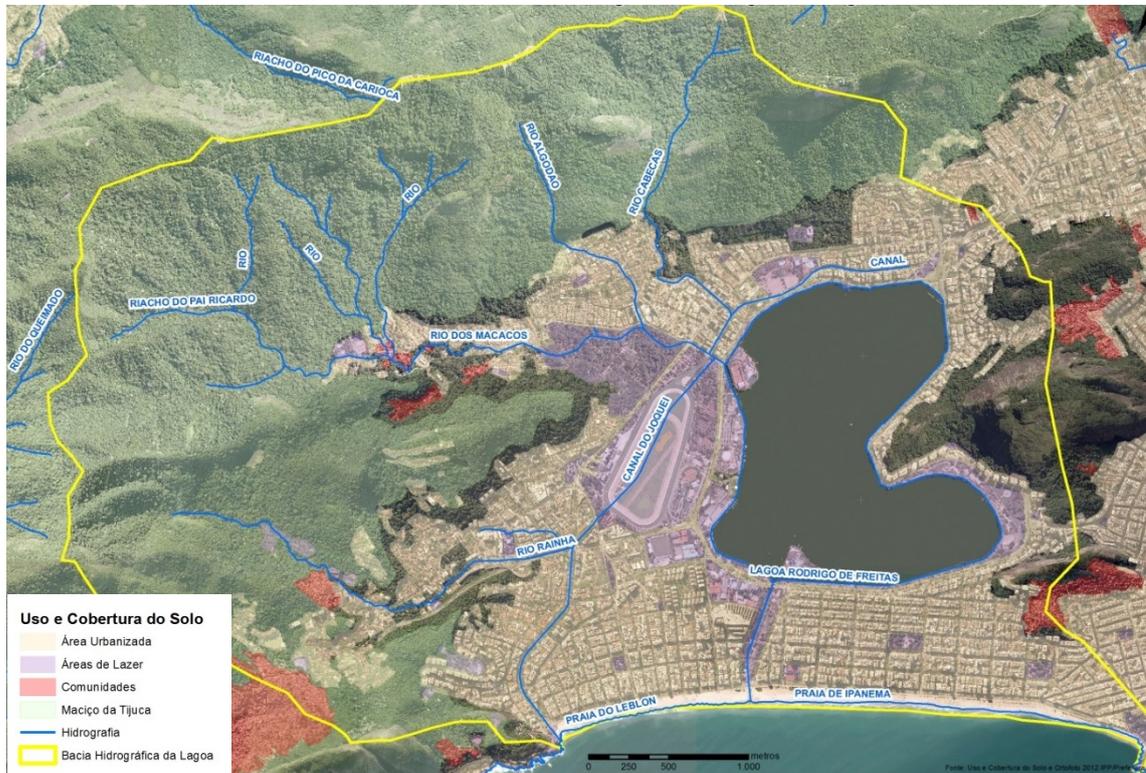


Figura 2: Uso e Cobertura do Solo da Bacia Hidrográfica da lagoa Rodrigo de Freitas (Fonte: Ortofoto 2012 – IPP/Prefeitura do Rio).

A intensa urbanização e os consequentes aterramentos levaram à redução do espelho d'água, restringindo a comunicação da lagoa com o mar (Figura 3). Essas condições, somadas com as elevadas quantidades de esgoto doméstico que são lançados – em sua maioria de maneira irregular – levaram à eutrofização da lagoa, gerando um quadro de diversos problemas ambientais e de saúde pública. A ocorrência de mortantade de toneladas de peixes é eventual (CRESPO & LA ROVERE, 2002a, CRESPO & LA ROVERE, 2002b).

Para evitar um maior comprometimento da qualidade das águas da lagoa, grande parte das águas dos rios Cabeça e dos Macacos é desviada por canais na Avenida Lineu de Paula Machado, na Rua General Garzon e no Jockey Club diretamente para o canal do Leblon, localizado na Avenida Visconde de Albuquerque, através de um sistema de comportas. O destino final, assim como de toda a rede de esgoto sanitário da Zona Sul da cidade é o mar, sendo descartado *in*

natura, ou seja, sem tratamento (SOARES *et al.*, 2012). A Secretaria Municipal do Meio Ambiente (SMAC) observou, em análises periódicas de cinco pontos da lagoa, o aumento de cerca de 93% do número de coliformes totais na coluna d'água, de 1996 a 2001. Em 60% dos 141 boletins de monitoramento, certas áreas da lagoa estavam impróprias para atividades de recreação de contato secundário (SCHMIDT, 2013). De 2000 a 2010, o Instituto Estadual do Meio Ambiente (INEA) efetuou o diagnóstico das condições sanitárias das águas da lagoa Rodrigo de Freitas. Os resultados obtidos foram semelhantes aos anos anteriores. No período inicial de 2010, foram encontrados índices de coliformes termotolerantes superiores a $1,6 \times 10^6$ NMP/100 mL nos canais do Piraquê e do Jardim de Alah (SOARES *et al.*, 2012). Isso mostra que são necessárias medidas urgentes para melhoria da qualidade sanitária da lagoa, a fim de diminuir o impacto no ambiente, na saúde e na qualidade de vida da população (CRESPO & LA ROVERE, 2002b; VAN WEERELT, SIGNORI & ENRICH-PRAST, 2012).



Figura 3: Lagoa Rodrigo de Freitas antes da ocupação urbana e depois, com seu tamanho reduzido devido aos aterramentos para construção de edifícios e do Jockey Club (SOARES, 2012).

1.3 QUALIDADE DA ÁGUA

O monitoramento da qualidade da água é um dos instrumentos de verificação e de avaliação dos riscos que ela pode representar para a saúde humana. A água deve atender a diversos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos de qualidade (FUNASA, 2009)

1.3.1 Parâmetros físico-químicos

1.3.1.1 *Temperatura*

A temperatura superficial da água é influenciada por fatores tais como estação do ano, período do dia, fluxo e profundidade. A elevação da temperatura de um corpo d'água também pode ser provocada por despejos industriais.

A temperatura desempenha um papel principal no controle do meio aquático, condicionando uma série de parâmetros físico-químicos. Em geral, à medida que a temperatura aumenta, a viscosidade, tensão superficial, compressibilidade, calor específico, constante de ionização e calor latente de vaporização diminuem, enquanto a condutividade térmica e a pressão de vapor aumentam (RENOVATO, SENA & SILVA, 2013).

A maioria dos micro-organismos patogênicos são mesófilos, ou seja, se desenvolvem entre 25 e 40°C. Elevações da temperatura aumentam a taxa metabólica dos micro-organismos, acelerando o processo de biodegradação da matéria orgânica, a assimilação de nutrientes e o consumo do oxigênio dissolvido do corpo aquático (VON SPERLING, 2005; SALLÔTO, 2012).

1.3.1.2 *Turbidez*

A turbidez é o grau de atenuação que um feixe de luz sofre ao atravessar a água, devido à presença de sólidos em suspensão e de detritos orgânicos. O aumento da turbidez pode ser causado pela erosão das margens ou pelo lançamento de esgotos sanitários e efluentes industriais. Alta turbidez prejudica o processo de fotossíntese de algas e da vegetação submersa, o que interfere em todo o ecossistema aquático (RENOVATO, SENA & SILVA, 2013). Além disso, pode reduzir a eficiência da cloração devido à proteção física dos micro-organismos do contato direto com os desinfetantes, e afeta adversamente os usos domésticos, industriais e recreacionais dos corpos d'água (SANTOS *et al.*, 1999).

1.3.1.3 *Condutividade*

A Condutividade refere-se à capacidade que a água tem de transmitir corrente elétrica devido aos íons presentes, a partir da dissociação de outras substâncias. Os

valores de condutividade indicam a quantidade de sais existentes na coluna d'água, e representam uma medida indireta da concentração de poluentes. A água pura contribui minimamente para a condutividade e, em geral, níveis superiores a 100 mS/cm indicam ambientes impactados (COSTA *et al.*, 2003).

1.3.1.4 *Salinidade*

A salinidade é a medida dos teores de sais dissolvidos na água. Esses sais favorecem o crescimento das plantas, mas em excesso tornam-se prejudiciais, e podem afetar o sabor da água (ESTEVEZ, 2011; SANTORO, 2011). Águas doces possuem salinidade igual ou inferior a 0,05%, águas salobras possuem salinidade entre 0,05 e 3% e águas salinas possuem salinidade superior a 3% (CONAMA, 2005).

1.3.1.5 *Oxigênio Dissolvido (OD)*

O oxigênio é vital para todas as formas de vida superior e para a maioria de micro-organismos. É o parâmetro mais importante no controle da qualidade das águas superficiais (RENOVATO, SENA & SILVA, 2013).

O oxigênio proveniente da atmosfera se dissolve nas águas naturais, devido à diferença de pressão parcial. Outra fonte importante de oxigênio nas águas é a fotossíntese de algas e da vegetação submersa. Baixos valores de OD são observados em águas que sofreram eutrofização, ou seja, onde a decomposição dos compostos orgânicos levou ao excesso de nutrientes, provocando um aumento da biomassa, reduzindo a concentração de oxigênio no meio devido a seu uso nos processos respiratórios. A redução do OD torna o ambiente propenso à proliferação de micro-organismos anaeróbios (COSTA *et al.*, 2003)

1.3.1.6 *Potencial Hidrogeniônico (pH)*

Neste parâmetro leva-se em consideração a concentração de íons de hidrogênio (H^+) numa faixa que vai de 0 a 14, sendo o pH considerado ácido quando menor que 7, neutro quando igual a 7 e básico quando maior que 7 (SALLÔTO, 2012; RENOVATO, SENA & SILVA, 2013).

A influência do pH sobre os ecossistemas aquáticos se dá diretamente devido aos efeitos sobre a fisiologia dos organismos. O pH também contribui para a precipitação de elementos químicos tóxicos, como metais pesados, e pode exercer efeitos sobre a solubilidade de nutrientes (COSTA *et al.*, 2003). A Resolução CONAMA nº357/2005 determina que o pH de águas salobras esteja entre 6,5 e 8,5 (CONAMA, 2005).

1.3.2 Parâmetros microbiológicos

A qualidade microbiológica é analisada pela detecção de micro-organismos indicadores de contaminação fecal (FUNASA, 2009). A sobrevivência de patógenos bacterianos, virais e parasitários variam sob condições ambientais, indicando que, provavelmente, nenhum organismo indicador pode prever a presença de todos os patógenos entéricos para todos os tipos de águas, sendo necessário descobrir em que medida e circunstâncias estes organismos podem ser utilizados como indicadores confiáveis de poluição fecal (SAVICHTCHEVA & OKABE, 2006).

Para um microrganismo ser considerado um indicador ideal, são necessárias algumas características, como: ser facilmente detectável e quantificável por técnicas simples e economicamente viáveis; ser aplicável a todos os tipos de água; não se multiplicar no ambiente; possuir relação direta com o grau de contaminação fecal; habitar o trato gastrointestinal de animais homeotérmicos, inclusive o homem; ter uma população mais numerosa no ambiente e ser mais resistente à ação dos agentes desinfetantes que outros patógenos (GERBA, 2008; FUNASA, 2009). Porém, atualmente nenhum micro-organismo apresenta todas essas características (GERBA, 2008).

Coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* têm sido mundialmente utilizados como indicadores da qualidade microbiológica da água (FUNASA, 2009; WHO, 2011; APHA, AWWA & WEF, 2012), já que são micro-organismos presentes em grande número na flora intestinal de humanos e outros animais de sangue quente, e são fáceis de serem enumerados por métodos simples de cultivo (CONAMA, 2005).

1.3.2.1 *Coliformes Totais*

Coliformes são bactérias encontradas nas fezes de animais de sangue quente, geralmente excretadas em grande número. Ainda que sejam também encontradas habitando naturalmente vegetais e o solo, sua densidade na água pode ser relacionada ao grau de poluição fecal. Por serem mais resistentes ao estresse do ambiente que os micro-organismos patogênicos que são transmitidos através da água, sua ausência indica que a mesma é bacteriologicamente segura para consumo humano, ao passo que sua presença pode indicar a existência desses patógenos, tornando a água imprópria para consumo. (GERBA, 2008). O grupo dos coliformes totais consiste de bacilos gram-negativos aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, capazes de desenvolver na presença de sais biliares ou agentes tensoativos, fermentadores de lactose com produção de ácido, gás e aldeído a $35,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ em 24-48 horas, e que podem apresentar atividade da enzima β -galactosidase. A maioria das bactérias do grupo coliforme pertence aos gêneros *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Enterobacter*, embora vários outros gêneros e espécies pertençam ao grupo (CONAMA, 2011).

1.3.2.2 *Coliformes Termotolerantes*

Nos anos 80 surgiu uma diferenciação no grupo dos coliformes, separando bactérias capazes de fermentar lactose a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em 24 horas, mais nitidamente associadas à contaminação de origem fecal (HOFSTRA & HUISIN'T VELD, 1988), sendo representados por algumas bactérias dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter* e, principalmente, pela *E. coli*. Esse grupo foi nomeado de coliformes fecais, termo que foi revisto após uma polêmica em 1996, nos Estados Unidos, quando foram encontrados micro-organismos do grupo dos coliformes em amostras de chá gelado de diversos locais. O uso do termo 'coliformes fecais' fez com que o chá fosse considerado supostamente contaminado com fezes, tendo sua venda suspensa em várias cadeias de restaurantes. Pesquisadores da Universidade da Georgia detectaram no chá cepas termotolerantes de *Klebsiella* e *Enterobacter*, gêneros de bactérias que também ocorrem naturalmente em fontes não fecais, como solo e plantas. Em várias amostras de chá analisadas, não foi encontrada contaminação por *E. coli* (DOYLE, 1996). Mais tarde, foi sugerida a extinção do termo 'coliformes fecais', devido aos constantes equívocos. Em 2000, foi publicada a

Portaria nº 1469 do Ministério da Saúde, onde foi adotado o termo 'coliformes termotolerantes' em substituição a 'coliformes fecais' (BRASIL, 2000).

1.3.2.3 *Escherichia coli*

O uso da *E. coli* como um micro-organismo indicador foi proposto em 1892 por Theobald Smith (PRESCOTT & WINSLOW, 1915). É um bacilo gram-negativo pertencente à família Enterobacteriaceae, não formador de esporo, fermentador de lactose e manitol com produção de ácido e gás a $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ em 24 horas, oxidase negativa, e caracterizada pela ação da enzima β -glucuronidase. Está dentro do grupo dos coliformes termotolerantes, sendo a única representante considerada exclusivamente de origem fecal, tendo como habitat o intestino humano e de outros animais homeotérmicos, ocorrendo em densidades elevadas (CONAMA, 2005). De acordo com a Portaria do Ministério da Saúde nº 2914, de 2011, que dispõe sobre as normas de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade no Brasil, a *E. coli* é atualmente considerada o mais específico indicador de contaminação fecal recente e da eventual presença de organismos patogênicos, não sendo permitida sua presença na água potável, devendo ter sua origem investigada quando encontrada (BRASIL, 2011).

1.3.2.4 *Indicadores alternativos*

Atualmente, existem controvérsias quanto ao uso do grupo dos coliformes como indicadores de contaminação fecal, uma vez que podem se adaptar ao meio ambiente e até se multiplicar em determinadas condições. Estudos demonstraram a permanência de altas concentrações de enterococos e *E. coli* em areia de praia e sedimentos de regiões tropicais e subtropicais, mesmo na ausência de fonte de contaminação fecal conhecida (SAVICHTCHEVA & OKABE, 2006; STEWART *et al.*, 2008). Também foi demonstrado que alguns micro-organismos podem exercer atividade inibidora através da produção de fatores de inibição, como antibióticos, ou pela competição nutricional, subestimando a contagem dos coliformes (DIAS & FILHO, 2007). Dentre os micro-organismos descritos, estão *Pseudomonas* spp., *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp. e actinomicetos (MEANS & OLSON, 1981). Além disso, esses indicadores não fornecem informação sobre a fonte de contaminação, além de outras limitações das metodologias tradicionais utilizadas atualmente, como

a necessidade de longos tempos de incubação, o que dificulta a detecção dos coliformes, principalmente das células viáveis mas não cultiváveis, ou de crescimento lento (SCOTT *et al.*, 2002; BALLESTÉ *et al.*, 2010). Devido a essas razões, indicadores alternativos vêm sendo propostos, como *Bifidobacterium* spp., *Clostridium perfringens*, vírus humanos, colifagos F-RNA, DNA mitocondrial (mtDNA) e arqueas metanogênicas (SCOTT *et al.*, 2002; MARTELLINI *et al.*, 2005; UFNAR *et al.*, 2006; STEWART *et al.*, 2008).

1.4 RASTREAMENTO DE FONTE MICROBIANA

Métodos de rastreamento de fonte microbiana (*Microbial Source Tracking* - MST) foram descritos como uma alternativa aos métodos tradicionais de detecção, sendo possível distinguir entre fontes de contaminação fecal humanas e de outros animais de sangue-quente, determinando a origem a partir de diferentes espécies animais (SCOTT *et al.*, 2002; MIESZKIN *et al.*, 2009). Muitos destes métodos são dependentes da construção de grandes bibliotecas genômicas de isolados provenientes de fontes conhecidas, requerendo um grande número de amostras a ser cultivadas e testadas, o que torna o método demorado e trabalhoso (ZHENG *et al.*, 2009; BALLESTÉ *et al.*, 2010). Por estas razões, são preferíveis os métodos independentes da construção de bibliotecas para a detecção de biomarcadores hospedeiro-específicos (MIESZKIN *et al.*, 2009). Diversos marcadores moleculares para MST já foram descritos, tendo como alvo tanto sequências genéticas de microorganismos quanto de sequências dos animais que os hospedam (ROSLEV & BUKH, 2011).

1.4.1 *Methanobrevibacter* spp.

O domínio Archaea consiste atualmente de cinco filos: Crenarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota, Thaumarchaeota e Nanoarchaeota (GRIBALDO *et al.*, 2006, PESTER *et al.*, 2011). O filo Euryarchaeota é representado principalmente por arqueas metanogênicas, porém, também compreende espécies halófilicas extremas, hipertermófilas e um grupo distinto de organismos termo-acidófilos (CLEMENTINO *et al.*, 2007).

Archaea metanogênicas são um grupo de anaeróbios estritos filogeneticamente diversos. Seu metabolismo energético é restrito à formação de metano a partir de CO₂ e H₂, metanol, metilamina e/ou acetato. Estes organismos representam um papel quantitativamente importante no ciclo global do carbono. Estima-se que cerca de 1 bilhão de toneladas por ano de metano seja formado por bactérias metanogênicas em ambientes anóxicos, como sedimentos de água doce, pântanos, arrozais, aterros e o trato intestinal de ruminantes e cupins (BIANCO, 2015; THAUER *et al.*, 2008).

O gênero *Methanobrevibacter* pertence à ordem Methanobacteriales do filo Euryarchaeota. Este gênero inclui 16 espécies descritas que possuem como habitat o trato gastrointestinal de animais, plantas em decomposição e lodo ativado de estações de tratamento de esgoto. Dentre as espécies conhecidas, estão *M. ruminantium*, *M. boviskoreani*, *M. millerae*, *M. arboriphilus*, *M. cuticularis*, *M. curvatus*, *M. filiformis*, *M. oralis*, *M. gottschalkii*, *M. thaueri*, *M. woesei*, *M. acididurans*, *M. wolinii*, *M. olleyae*, *M. smithii* e *M. stadtmanae* (UFNAR, 2006; LEE *et al.* 2013). Seu uso como bioindicador de contaminação fecal tem sido proposto, uma vez que estão presentes no trato gastrointestinal de animais homeotérmicos, sendo eliminados nas fezes. Poucas espécies foram encontradas habitando diferentes hospedeiros e, por esse motivo, podem ser utilizadas como bioindicadores hospedeiro-específicos da presença de poluição fecal no ambiente. Além disso, por serem anaeróbios estritos, não encontram condições adequadas para crescer em ambiente extra enteral. Com exceção das espécies que habitam lodo ativado de estações de tratamento de esgoto, poucos estudos demonstraram a presença desses micro-organismos em ambientes que não a cavidade oral ou o trato gastrointestinal, o que torna esses micro-organismos potenciais bioindicadores da presença de contaminação fecal (UFNAR, 2006; UFNAR, 2007a; UFNAR, 2007b).

Através do sequenciamento do gene que codifica a subunidade 16S do rRNA, estudos confirmaram a presença da espécie *M. smithii* exclusivamente no intestino humano. Segundo UFNAR *et al.* (2006), essa espécie pode ser encontrada no trato gastrointestinal de aproximadamente um terço dos indivíduos que residem nos Estados Unidos e Reino Unido. Estudos enumeraram a presença de *M. smithii* no intestino humano em concentrações de cerca de 10⁷ a 10¹⁰ células por grama de fezes (LIN & MILLER, 1998).

Outras espécies do gênero *Methanobrevibacter* vêm sendo consideradas como bioindicadores hospedeiro-específicos na detecção de contaminação fecal, como *M. ruminantium*, associada ao rúmen de bovinos (BRYANT, 1965; UFNAR, 2007a), *M. thaueri*, associada à microbiota suína (MILLER & LIN, 2002, UFNAR, 2007b), e *M. gottschalkii*, associada a equinos (MILLER *et al.*, 1986; MILLER & LIN, 2002).

O uso de métodos moleculares torna possível a detecção da presença desses micro-organismos, sem a necessidade de cultivo e isolamento, sendo viável seu uso como bioindicador de contaminação fecal.

1.4.2 DNA mitocondrial (mtDNA)

O uso de mtDNA como indicador de contaminação fecal foi proposto inicialmente por Martellini *et al.* (2005), baseado no fato de que as fezes contêm grandes quantidades de células do hospedeiro (por exemplo, células epiteliais do intestino e células sanguíneas), e que estas células são excretadas no meio ambiente. A principal vantagem do uso de mtDNA como alvo é que o organismo-fonte é identificado diretamente, em vez de potenciais micro-organismos que ele poderia hospedar. Além disso, são encontradas múltiplas cópias do mtDNA por célula, o que proporciona um elevado nível de sensibilidade (ROSLEV & BUKH, 2011).

Martellini *et al.* (2005) desenhou iniciadores para amplificação de genes do mtDNA associados a contaminação fecal de seres humanos, suínos, bovinos e ovinos em águas superficiais. Outro estudo, posteriormente, reportou a detecção de contaminação fecal de nove espécies de vertebrados, incluindo equinos, através do uso de mtDNA como biomarcador (SCHILL & MATTES, 2008).

Estudos anteriores sobre o perfil de contaminação fecal dos afluentes da bacia da lagoa Rodrigo de Freitas mostraram presença de contaminação fecal humana e equina, enquanto que contaminação fecal bovina e suína foram ausentes (BARRETO, 2013)

1.5 JUSTIFICATIVA

O monitoramento da qualidade da água é de importância não só para fins de consumo humano, como também é essencial em corpos d'água voltados para recreação, devido ao contato direto com pele e mucosas, e pelo alto risco de ingestão acidental. As metodologias utilizadas atualmente para análise microbiológica da água possuem limitações, tais como adaptação ou inibição dos micro-organismos indicadores, longos tempos de incubação e a não determinação do organismo fonte. O uso de métodos moleculares pode ser uma solução para se contornar essas limitações. Tais métodos possuem elevada sensibilidade, especificidade, e fornecem resultados de forma mais rápida, sem a necessidade de cultivo e etapas adicionais de confirmação. Consequentemente, permitem a detecção específica de micro-organismos viáveis, cultiváveis ou não, ao contrário dos métodos tradicionais. Nesse contexto, uma metodologia baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR) para detecção de biomarcadores moleculares hospedeiro-específicos pode ser promissora. O homem e outros animais de sangue quente diferem quanto à composição de suas fezes, podendo liberar diferentes patógenos e substâncias, como antibióticos e hormônios, capazes de provocar danos à saúde da população. Portanto, determinar a origem da contaminação fecal é essencial na avaliação dos riscos à saúde que ela representa. A lagoa Rodrigo de Freitas será palco das competições de remo e canoagem nas Olimpíadas de 2016. Sendo assim, o presente estudo tem como principal objetivo a detecção de contaminação fecal, identificando sua possível fonte através da análise comparativa de biomarcadores moleculares hospedeiro-específicos, visando um rastreamento da contaminação e monitoramento da qualidade do espelho d'água da lagoa. Esperamos com nossos resultados aprimorar as ações da Vigilância Sanitária a fim de monitorar e melhorar a qualidade da água e consequentemente da vida do cidadão e do meio ambiente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Aplicação de DNA mitocondrial e de archaea metanogênicas como biomarcadores moleculares hospedeiro-específicos na detecção de contaminação fecal humana e equina em águas superficiais da lagoa Rodrigo de Freitas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a coleta das amostras nos pontos selecionados;
- Avaliar os parâmetros físico-químicos;
- Detectar e quantificar coliformes totais e *E. coli* nas amostras;
- Verificar a especificidade dos iniciadores específicos para mtDNA e *Methanobrevibacter* spp.
- Detectar mtDNA humano e equino através de PCR;
- Detectar a presença de *Methanobrevibacter* spp. associados à microbiota humana e equina através de PCR;
- Determinar o limite de detecção dos biomarcadores moleculares em amostras de água e fezes;
- Sequenciar os produtos amplificados na PCR;
- Analisar a identidade das sequências em banco de dados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de água superficial (2 litros) foram coletadas de 6 pontos na lagoa Rodrigo de Freitas, abrangendo todo o espelho d'água, conforme ilustrado na Figura 4. Foram realizadas 3 coletas em intervalos de 6 meses, em março/2014, setembro/2014 e março/2015.



Figura 4: Localização dos pontos de coleta na lagoa Rodrigo de Freitas (22°57'22"S/43°11'09"W) (Fonte: SMAC – Boletim de Gestão Ambiental do Sistema da Lagoa Rodrigo de Freitas).

Zona 1 (remo, iatismo e canoagem): LRF1, LRF2, LRF3 e LRF5

Zona 2 (iatismo): LRF4

Zona 3 (esqui aquático): LRF6

3.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS

Após a coleta, foram analisados os seguintes parâmetros físico-químicos das amostras: temperatura, turbidez, condutividade, salinidade, OD e pH, e. As dosagens foram realizadas através do equipamento *Water Quality Checker U-10* (HORIBA) e por medidor de cloro (HOMIS). A determinação do número mais provável (NMP) para detecção de coliformes totais e de *E. coli* foi realizada através do método do substrato definido, pelo kit *Quanti-Tray®/2000* (COLILERT, IDEXX), conforme protocolo descrito em *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, AWWA & WEF 2012).

3.3 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras foram filtradas primeiramente em sistema Stericup® 0,45µm e 0,22 µm (MILLIPORE), em condições assépticas. Os filtros saturados foram então preenchidos com 2 mL de tampão fosfato salino (PBS) e raspados com auxílio de uma alça estéril. O material obtido da raspagem foi transferido para tubos tipo *ependorf* e então centrifugados por 10 min a 8.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* mantido a -20°C para posterior extração de DNA (MARTELLINI *et al.*, 2005).

3.4 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA total foi realizada através do kit PowerWater® DNA Isolation (MO-BIO), conforme protocolo do fabricante. Em seguida o DNA foi quantificado em equipamento Qubit 2.0 Fluorometer (INVITROGEN), conforme o manual do fabricante.

3.5 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

A sensibilidade (r) e especificidade (s) dos iniciadores foi testada usando o DNA fecal de humanos, suínos, equinos, bovinos e galinha. Os valores de r e s foram calculados de acordo com as seguintes fórmulas: $r = [TP/(TP + FN)]$ e $s = [TN/(TN + FP)]$, onde TP é o número de amostras que foram positivas para a PCR do marcador da espécie (verdadeiro positivo); FN é o número de amostras que foram negativas para a PCR do marcador da espécie (falsos negativos); TN é o número de amostras que foram negativas para a PCR do marcador de uma outra espécie (verdadeiro negativo); e FP é o número de amostras que eram positivas para um marcador de uma outra espécie (falsos positivos).

3.6 AMPLIFICAÇÃO DO DNA PELA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A padronização das reações foi realizada utilizando DNA extraído de fezes de bovinos, suínos, equinos, humanos e galinha. DNA extraído de fezes humanas e equinas também foi utilizado como controle positivo dos iniciadores para os respectivos mtDNA. DNA extraído das cepas de referência *M. smithii* DSM 11975 e *M. gottschalkii* DSM 11977 foram utilizados como controle das reações dos respectivos iniciadores específicos. Como controle negativo, foi utilizado DNA extraído das cepas de referência *Escherichia coli* INCQS 00033/ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* INCQS 00629/ATCC BAA-1706 e *Neisseria gonorrhoeae* INCQS 00604/IAL1894 (WHO-D). Como controle das reações, para avaliar a ausência de DNA contaminante na mistura, foi feita a substituição do DNA da amostra por 5 μ L de água Gibco®.

A mistura para a amplificação de *Methanobrevibacter* spp. pela PCR totalizou o volume de 50 μ L, contendo 0,4 pmol. μ L⁻¹ de cada iniciador, que estão descritos na Tabela 5. Os genes alvo e as sequências dos iniciadores estão descritos na respectiva tabela. Também compõem a mistura: solução tampão 1X (20mM Tris-HCl; 50mM de cloreto de potássio (KCl)); 0,2 mM de cada desoxiribonucleotídeo trifosfato (dNTPs – dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 1U de Platinum *Taq* DNA Polimerase; 5% de dimetilsulfóxido (DMSO); 25ng do DNA da amostra e água Gibco® completando o volume. A concentração ideal cloreto de magnésio (MgCl₂)

de cada iniciador está descrita na tabela 5. A amplificação foi realizada em termociclador *Mastercycler EP* (EPPENDORF), nas seguintes condições: 95°C por 5 min; 35 ciclos de 95°C por 1 min, temperatura de anelamento apropriada (Tabela 5) por 30 s e 72°C por 1 min; 72°C por 6 min.

Tabela 5. Sequências dos iniciadores específicos para *Methanobrevibacter* spp. hospedeiro-específicos e seus respectivos sítios-alvo.

Sítio-alvo	Sequência (5'– 3')	Tamanho Esperado (bp)	MgCl ₂ (mM)	T _a ^α (°C)	Referência
Humano: <i>Methanobrevibacter smithii</i> (<i>nifH</i>)					
Mnif-342F	AACAGAAAACCCAGTGAAGAG	222	2,0	58	UFNAR <i>et al.</i> , 2006
Mnif-363R	ACGTAAAGGCACTGAAAAACC				
Equino: <i>Methanobrevibacter gottschalkii</i> (<i>mcrA</i>)					
GoT285F	GCACAAACTGGTTTAAGCGGA	120	1,5	54	BIANCO, 2015
GoT404R	GGAGAATACGTTAGCAGCACCA				

T_a^α Temperatura de anelamento

Para a amplificação de mtDNA, a mistura totalizou o volume de 50 µL, contendo 0,5 pmol.µL⁻¹ de cada iniciador, que estão descritos na Tabela 6. Os genes alvo e sequências dos iniciadores também estão descritos na respectiva tabela. Ainda compõem a mistura: solução tampão 1X (20mM Tris-HCl; 50mM de cloreto de potássio (KCl)); 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂); 0,2 mM de cada desoxiribonucleotídeo trifosfato (dNTPs – dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 1U de Platinum *Taq* DNA Polimerase; 5% de dimetilsulfóxido (DMSO); 25ng do DNA da amostra e água Gibco® completando o volume. A amplificação foi realizada em termociclador *Mastercycler EP* (EPPENDORF), nas seguintes condições: 95°C por 5 min; 35 ciclos de 95°C por 1 min, 60°C por 1 min e 72°C por 1,5 min; 72°C por 5 min.

Tabela 6. Sequências dos iniciadores específicos para mtDNA humano (Humito) e equino (Homito) e seus respectivos sítios-alvo.

Sítio-alvo	Sequência (5'– 3')	Direção	Tamanho Esperado (bp)	Referência
Humano:	NADH desidrogenase (subunidade 5)			MARTELINNI

Humito11-G	CCACTACTAGGCCTCCTCCTA	<i>Forward</i>	612	<i>et al.</i> , 2005
Humito11-D	TAGCGATGAGAGTAATAGATAGGG	<i>Reverse</i>		
Equino: citocromo b				
Homito-F	AGGAGCAACAGTCATCACGAACCT	<i>Forward</i>	168	SCHILL & MATHES, 2008
Homito-R	AAATGTACGACTACCAGGGCTGTG	<i>Reverse</i>		

3.7 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A eletroforese em gel de agarose foi realizada após a extração e purificação do DNA para verificar o sucesso da extração. O gel foi preparado com 0,8% de agarose (SIGMA-ALDRICH) em tampão Tris-Borato-EDTA 0,5X (TBE), e a corrida foi realizada a 45 volts por 40 min e posteriormente 55 v por 20 min adicionais.

Após a PCR e, a eletroforese foi realizada a fim de verificar os produtos gerados na amplificação. O gel foi preparado com 2% de agarose (SIGMA-ALDRICH) em tampão Tris-Borato-EDTA 0,5X (TBE), e a corrida foi realizada a 55 volts por 40 min e posteriormente 65 v por 20 min adicionais.

A coloração do gel foi realizada com solução de brometo de etídio (10 mg/mL). Foi utilizado como tampão de corrida TBE 0,5X. Foram adicionados em cada poço 5 µL do DNA ou produto de PCR em 5 µL de *loading buffer*. O primeiro poço foi reservado para a adição do padrão de peso molecular (100 bp DNA Ladder, INVITROGEN). A análise foi realizada no equipamento de vídeo documentação Image Quant 300 (GE).

3.8 SEQUENCIAMENTO

Os produtos da PCR foram submetidos ao sequenciamento com objetivo de confirmar a identidade dos fragmentos amplificados. Após a amplificação, os produtos foram purificados utilizando kit *QIAquick® PCR Purification* (QIAGEN), de acordo com o manual do fabricante. Cerca de 200 a 300ng 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* (LIFE TECHNOLOGIES), e 3,2 pmol.µL⁻¹ dos respectivos iniciadores *forward*. 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 placa foi enviada para a Plataforma PDTIS/Fiocruz, onde a reação de sequenciamento foi realizada por eletroforese capilar em aparelho *ABI 3730 DNA Analyzer* (APPLIED BIOSYSTEMS) usando o kit *Big Dye Terminator* (LIFE TECHNOLOGIES). As sequências com mais de 300 bases apresentando “*Phred score*” maior ou igual a 20 foram consideradas boas e incluídas nas análises subsequentes.

3.9 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 através do programa *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), no GenBank (*National Center for Biotechnology Information* - NCBI).

4 RESULTADOS

4.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS

O pH dos seis pontos analisados se manteve entre 7,0 e 8,0, dentro da faixa de pH de crescimento da maioria dos micro-organismos e da faixa de 6,5 a 8,5 imposta pela Resolução CONAMA Nº 357/2005, para águas salobras de Classe 2 (Tabelas 7 e 8). A turbidez apresentou o valor mais elevado na segunda coleta do ponto LRF1, e se manteve entre 6 e 19 nos demais pontos. Com exceção do ponto LRF1, na segunda coleta os valores de turbidez foram levemente inferiores aos observados na primeira e terceira coletas (Tabelas 7 e 8).

Os níveis de oxigênio dissolvido (OD) apresentaram maior valor na segunda coleta e menor valor na terceira coleta. Em nenhum dos pontos analisados o OD estava abaixo do limite imposto para águas salobras de classe 2 (Tabelas 7 e 8), que segundo a resolução CONAMA Nº 357/2005 não deve estar abaixo de 4 mg/L. No entanto, os níveis de OD observados na terceira coleta estavam próximos do limite especificado.

A temperatura dos pontos de coleta manteve-se entre 20°C e 27°C (Tabelas 7 e 8).

Na primeira coleta, os valores obtidos de condutividade em todos os pontos analisados foi em torno de 22 mS/cm, e a salinidade entre 1,34 e 1,37% (Tabelas 7 e 8). Na segunda coleta foi observada uma leve redução em ambos os parâmetros, com a condutividade em torno de 19 mS/cm e salinidade entre 1,05 e 1,12%. Na terceira coleta, os valores de condutividade estavam em torno de 21 mS/cm, enquanto que a salinidade estava ente 1,27% e 1,32%. A condutividade é diretamente proporcional à salinidade, ou seja, a dissolução de eletrólitos na água aumenta a condutividade.

A contagem de coliformes da primeira e segunda coletas, em todos os pontos analisados, não apresentou valores superiores ao limite imposto pela Resolução

CONAMA N° 357/2005, onde é permitido o máximo de 2.500 coliformes termotolerantes ou *E. coli* em 100mL para águas voltadas a recreação de contato secundário, embora o valor observado na segunda coleta dos pontos LRF5 e LRF6 tenham se aproximado do limite imposto na legislação (Tabelas 7 e 8). No entanto, na terceira coleta, os pontos LRF5 e LRF6 apresentaram valores de *E. coli* quase três vezes acima do valor especificado. (Tabelas 7 e 8)

Tabela 7. Parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos pontos LRF1, LRF2 e LRF3, e principais requisitos de qualidade para corpos d'água salobra de classe 2, segundo Resolução CONAMA nº 357/2005 (CONAMA, 2005).

Parâmetro	LRF1			LRF2			LRF3			Resolução CONAMA
	Coleta 1 (12/03/14)	Coleta 2 (10/09/14)	Coleta 3 (10/03/15)	Coleta 1 (12/03/14)	Coleta 2 (10/09/14)	Coleta 3 (10/03/15)	Coleta 1 (12/03/14)	Coleta 2 (10/09/14)	Coleta 3 (10/03/15)	Nº 357/05
Temperatura (°C)	24,1	24,7	27,4	23,2	22,2	27,2	26,8	25,2	27,1	-
pH	7,12	7,16	7,6	7,3	7,41	7,5	7,43	7,48	7,65	6,5 a 8,5
Salinidade (%)	1,37	1,11	1,32	1,37	1,12	1,27	1,36	1,1	1,27	-
Condutividade (mS/cm)	22,5	19,4	21,8	22,4	19,4	21,2	22,3	19,3	21,2	-
OD ^a (mg/L)	5,94	7,85	4,77	5,65	7,83	4,75	6,53	7,87	5,21	> 4,0
Turbidez (NTU ^b)	18	90	17	19	15	11	19	15	12	-
Coliformes Totais (NMP ^c)	2.419,60	3.255,40	4.015,8	1.211,20	>2.419,6	6.488,2	2.753	5.172,10	4.351,7	-
<i>E. coli</i> (NMP ^c)	770,1	209,8	488,4	228,2	344,8	1.553,1	72,8	249,5	365,4	2.500

^aOxigênio Dissolvido;

^b Unidades Nefelométricas de Turbidez;

^c Número Mais Provável

Tabela 8. Parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos pontos LRF4, LRF5 e LRF6, e principais requisitos de qualidade para corpos d'água salobra de classe 2, segundo Resolução CONAMA nº 357/2005 (CONAMA, 2005).

Parâmetro	LRF4			LRF5			LRF6			Resolução CONAMA
	Coleta 1 (12/03/14)	Coleta 2 (10/09/14)	Coleta 3 (10/03/15)	Coleta 1 (12/03/14)	Coleta 2 (10/09/14)	Coleta 3 (10/03/15)	Coleta 1 (12/03/14)	Coleta 2 (10/09/14)	Coleta 3 (10/03/15)	Nº 357/05
Temperatura (°C)	22,9	24,9	27,1	20,3	22,8	23,7	23,3	25,1	21,5	-
pH	7,99	7,3	7,43	7,38	7,27	7,36	7,37	7,36	7,36	6,5 a 8,5
Salinidade (%)	1,35	1,11	1,28	1,35	1,05	1,28	1,34	1,08	1,26	-
Condutividade (mS/cm)	22,3	19,1	21,4	22,4	18,9	21,3	22,1	18,8	20,7	-
OD ^a (mg/L)	6	8,05	4,52	8,3	8,41	4,41	7,49	8,35	4,7	> 4,0
Turbidez (NTU ^b)	13	11	8	17	9	8	16	11	6	-
Coliformes Totais (NMP ^c)	2.612,50	19.862,90	8.164,1	12.996,50	>24.196,0	17.328,9	3.873,20	>24.196,0	15.531,2	-
<i>E. coli</i> (NMP ^c)	249,5	1.631,20	1.299,7	250,1	2.419,60*	7.227,0**	178,9	2.419,60*	6.396,0**	2.500

^aOxigênio Dissolvido;

^b Unidades Nefelométricas de Turbidez;

^c Número Mais Provável;

* Valor próximo ao limite estabelecido em legislação;

** Valor acima ao limite estabelecido em legislação.

4.2 SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE

A sensibilidade e a especificidade das reações de PCR para mtDNA humano e equino e *Methanobrevibacter* spp. hospedeiro específicos foram avaliadas utilizando 48 amostras fecais de 5 grupos de hospedeiros (Tabela 9). O DNA total de cada amostra fecal foi extraído, purificado, e então submetido à amplificação utilizando os iniciadores específicos, a fim de verificar sua sensibilidade e especificidade frente ao alvo.

A amplificação utilizando os iniciadores específicos para mtDNA humano e equino gerou fragmentos de aproximadamente 659bp e 168bp, respectivamente (Figura 5, A e B), enquanto que a amplificação utilizando os iniciadores específicos para o gene *nifH* de *M. smithii* e o gene *mcrA* de *M. gottschalkii* gerou fragmentos de aproximadamente 222bp e 120bp, respectivamente (Figura 6, A e B).

A sensibilidade dos biomarcadores na detecção de seu alvo, e a sensibilidade em diferenciar entre seu organismo alvo e outras amostras de fezes de animais foi de 1 (valor máximo de 1). Todos os resultados de sensibilidade e especificidade estão apresentados na Tabela 10.

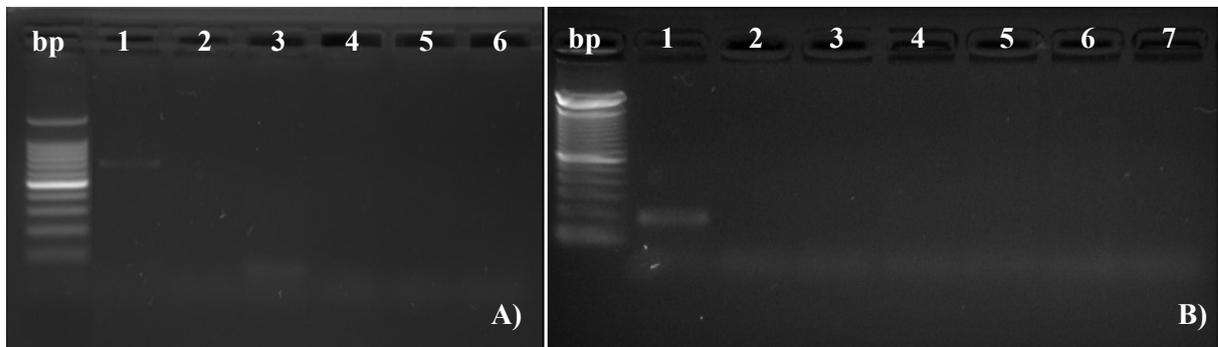


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos da PCR em material fecal. **A) mtDNA humano;** Poços: (bp) 100bp DNA ladder; (1) fezes humanas; (2) fezes bovinas; (3) fezes suínas; (4) fezes equinas; (5) fezes de galinha; (6) H₂O Gibco®. **B) mtDNA equino;** Poços: (bp) 100bp DNA ladder; (1) fezes equinas; (2) fezes bovinas; (3) fezes suínas; (4) fezes de galinha; (5) fezes humanas; (6) *K. pneumoniae* INCQS 00629/ATCC BAA-1706; (7) H₂O Gibco®.

Tabela 9: Detecção dos biomarcadores em amostras de fezes.

Alvo	N. de amostras testadas	N. de resultados positivos na PCR			
		Humano		Equino	
		mtDNA	Archaea	mtDNA	Archaea
Humano	15	15/15 (100%)	15/15 (100%)	-	-
Suíno	10	-	-	-	-
Bovino	10	-	-	-	-
Equino	10	-	-	10/10 (100%)	10/10 (100%)
Galinha	3	-	-	-	-

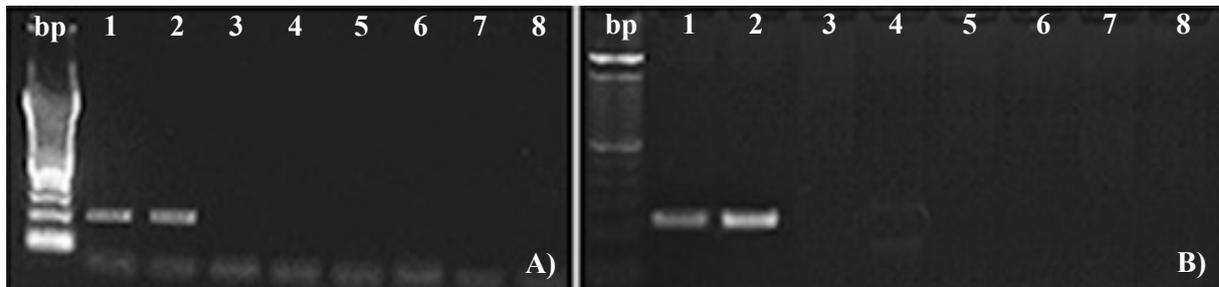


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos da PCR em material fecal. **A)** *M. smithii*; Poços: (bp) 100bp DNA ladder; (1) fezes humanas; (2) *M. smithii* INCQS A45D/DSM 11975; (3) fezes suínas; (4) fezes equinas; (5) fezes de galinha; (6) fezes bovinas; (7) *M. gottschalkii* INCQS A49D/DSM 11977; (8) H₂O Gibco®. **B)** *M. gottschalkii*; Poços: (bp) 100bp DNA ladder; (1) fezes equinas; (2) *M. gottschalkii* INCQS A49D/DSM 11977; (3) fezes suínas; (4) fezes de galinha; (5) fezes humanas; (6) fezes bovinas; (7) *M. smithii* INCQS A45D/DSM 11975; (8) H₂O Gibco®.

Tabela 10: Sensibilidade e especificidade dos biomarcadores

Valor	Humano		Equino	
	mtDNA	Archaea	Archaea	mtDNA
Sensibilidade (<i>r</i>)	1	1	1	1
Especificidade (<i>s</i>)	1	1	1	1

4.3 DETECÇÃO DE CONTAMINAÇÃO FECAL NAS AMOSTRAS ATRAVÉS DA PCR

O DNA total extraído e purificado das amostras foi submetido a reação de amplificação com iniciadores para os genes *nifH* de *M. smithii* (Mnif-342F e Mnif-

363R), *mcrA* de *M. gottschalkii* (GoT285F e GoT404R), mtDNA humano (Humito-11G e Humito 11-D) e mtDNA equino (Homito-F e Homito-R), segundo o protocolo descrito previamente no item 3.6.

A amplificação do gene *nifH* resultou em fragmentos de aproximadamente 222bp no controle positivo e nos 6 pontos analisados de todas as três coletas

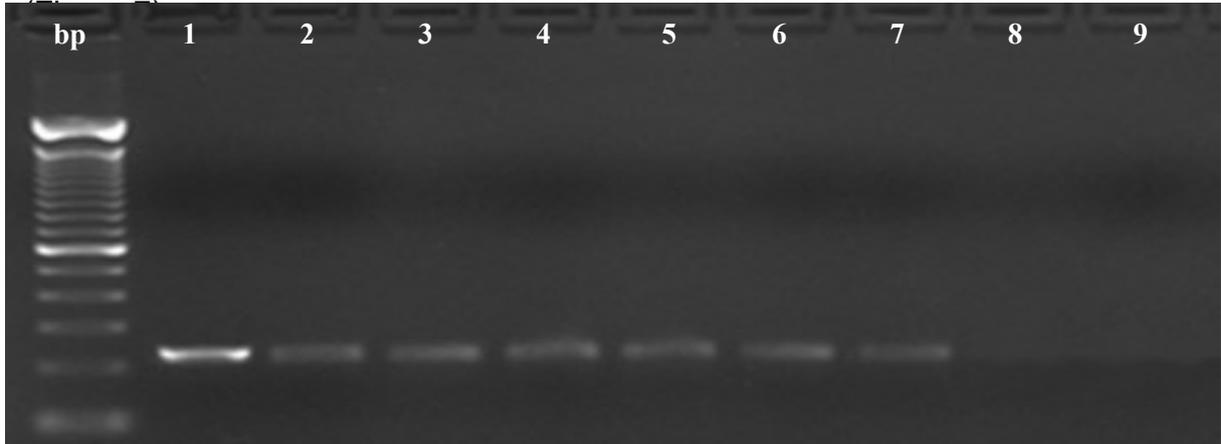


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos da PCR para detecção do gene *nifH* de *M. smithii* nas amostras da Lagoa Rodrigo de Freitas. Poços: (bp) 100bp DNA ladder; (1) *M. smithii* INCQS A45D/DSM 11975; (2) LRF1; (3) LRF2; (4) LRF3; (5) LRF4; (6) LRF5; (7) LRF6; (8) *K. pneumoniae* INCQS 00629/ATCC BAA-1706; (9) H₂O Gibco®.

A amplificação do gene *mcrA* resultou em fragmentos de aproximadamente 120bp no controle positivo e nos 6 pontos analisados de todas as três coletas (Figura 8).

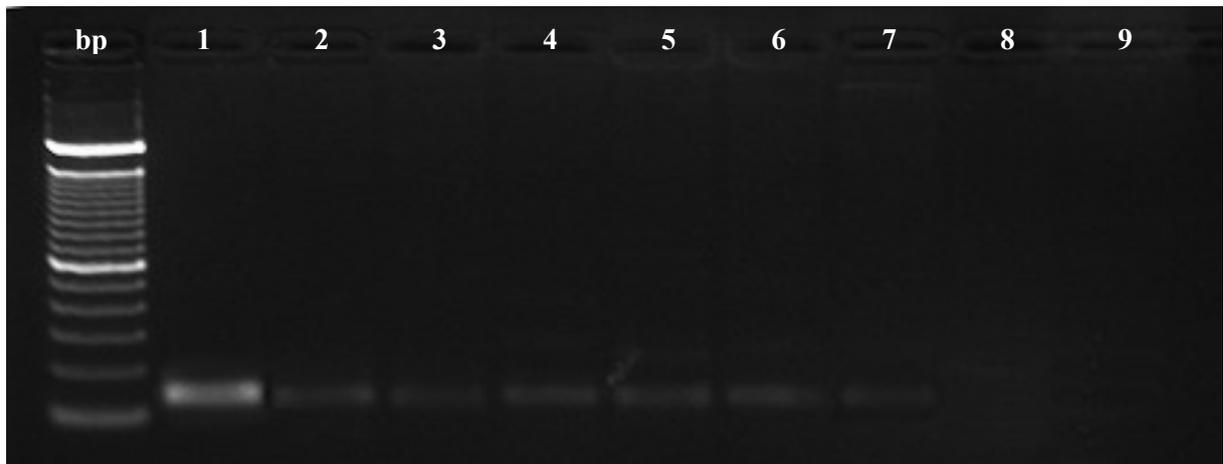


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos da PCR para detecção do gene *mcrA* de *M. gottschalkii* nas amostras da Lagoa Rodrigo de Freitas. Poços: (bp) 100bp DNA ladder; (1) *M. gottschalkii* INCQS A49D/DSM 11977; (2) LRF1; (3) LRF2; (4) LRF3; (5) LRF4; (6) LRF5; (7) LRF6; (8) *K. pneumoniae* INCQS 00629/ATCC BAA-1706; (9) H₂O Gibco®.

A amplificação de mtDNA humano resultou em fragmentos de aproximadamente 612bp no controle positivo e nos 6 pontos analisados de todas as três coletas (Figura 9).

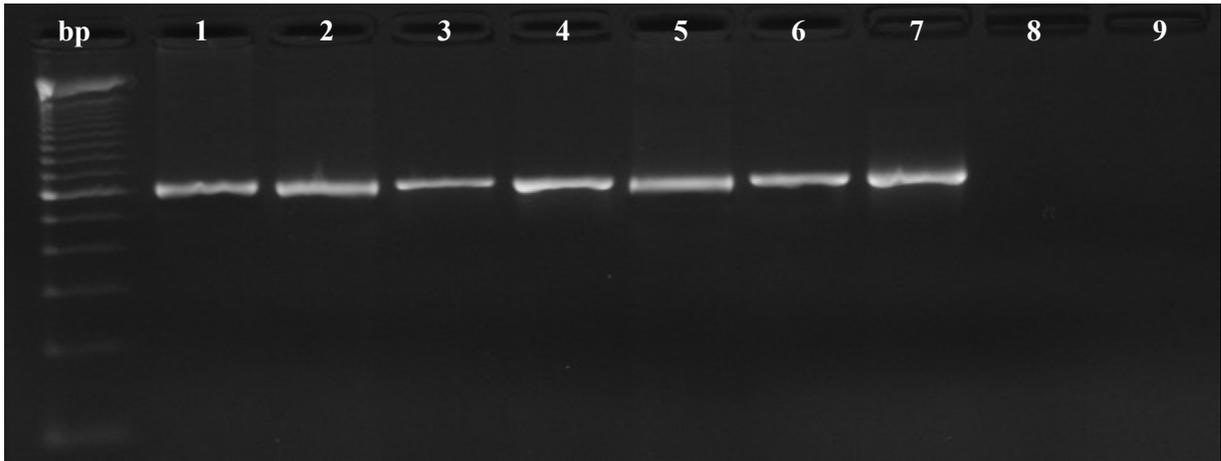


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos da PCR para detecção de mtDNA humano nas amostras da Lagoa Rodrigo de Freitas. Poços: (bp) 100bp DNA ladder; **(1) Fezes humanas;** (2) LRF1; (3) LRF2; (4) LRF3; (5) LRF4; (6) LRF5; (7) LRF6; (8) *K. pneumoniae* INCQS 00629/ATCC BAA-1706; (9) H₂O Gibco®

A amplificação de mtDNA equino resultou em fragmentos de aproximadamente 168bp no controle positivo e nos 6 pontos analisados de todas as três coletas (Figura 10).

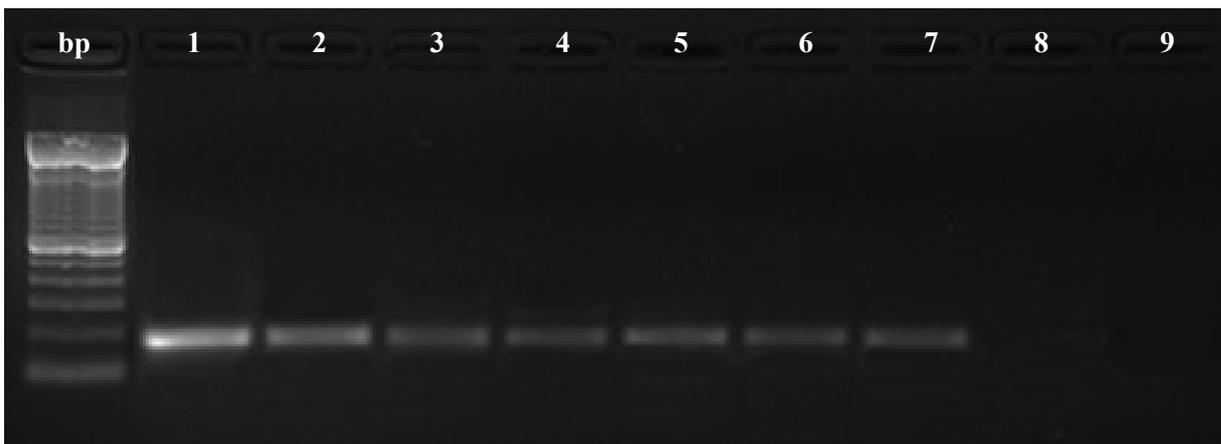


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos da PCR para detecção de mtDNA equino nas amostras da Lagoa Rodrigo de Freitas. Poços: (bp) 100bp DNA ladder; **(1) Fezes equinas;** (2) LRF1; (3) LRF2; (4) LRF3; (5) LRF4; (6) LRF5; (7) LRF6; (8) *K. pneumoniae* INCQS 00629/ATCC BAA-1706; (9) H₂O Gibco®.

4.3 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise das sequências através do BLASTn resultou na confirmação da identidade dos fragmentos. Os fragmentos amplificados de mtDNA humano e equino, e dos genes *mcrA* de *M. gottschalkii* e *nifH* de *M. smithii* apresentaram alta similaridade (96-99%) com os respectivos alvos (Tabela 11).

Tabela 11. Identificação dos fragmentos amplificados pela PCR através da análise BLASTn no GenBank, NCBI.

Fonte	BLASTn	Nº de Acesso (GenBank)	Identidade
Humano	<i>Homo sapiens mitochondrion, complete genome</i>	JX153945	99%
Equino	<i>Equus caballus cytochrome b, mitochondrial gene</i>	KF799993	96%
<i>M. gottschalkii</i>	<i>Methanobrevibacter gottschalkii strain PG methyl coenzyme reductase subunit A (mcrA) gene, partial cds</i>	EU919431.1	98%
<i>M. smithii</i>	<i>Methanobrevibacter smithii gene for nitrogenase iron protein, partial cds</i>	AB019138.1	99%

5 DISCUSSÃO

A água é um dos recursos naturais mais importantes do planeta, sendo elemento essencial para todas as formas de vida conhecidas. A importância do controle de qualidade da água vai além das águas destinadas a consumo humano, sendo também necessária em águas voltadas para outros fins, como pesca, agricultura e recreação, visando não só a saúde do ser humano como a manutenção da biodiversidade dos ambientes aquáticos.

A falta de saneamento básico é o principal fator que contribui para a entrada de esgoto nos corpos hídricos. De acordo com o levantamento realizado pelo Tribunal de Contas da União (TCU), somente 43 contratos firmados de saneamento em 2007, ano de início do Plano Nacional de Saneamento Básico (Plansab), resultaram em obras concluídas. Dos 491 contratos fiscalizados pelo TCU, 57,6% deles foram considerados não adequados, ou seja, eles estão atrasados, paralisados ou nem foram iniciados. Com isso, o Brasil só deve terminar a expansão da rede de esgoto em 2060, o que significa um atraso na evolução das metas estipuladas pelo Plansab, como a universalização dos serviços de água e esgoto até 2033 (NOVOS, 2016). Mais de 100 milhões de brasileiros ainda não possui acesso à coleta dos esgotos.

A lagoa Rodrigo de Freitas é um importante cartão-postal da cidade do Rio de Janeiro. Possui uma rica biodiversidade e abriga atividades esportivas, centros gastronômicos e áreas de lazer (PEREIRA & MEDEIROS, 2009). Durante décadas a lagoa vem sofrendo com diversos impactos ambientais, principalmente devido a atividades antropogênicas (CRESPO & LA ROVERE, 2002a; CRESPO & LA ROVERE, 2002b; GONZALEZ, PARANHOS & LUTTERBACH, 2010; LUTTERBACH *et al.*, 2001). Vários rios e riachos deságuam na lagoa, principalmente o rio dos Macacos, Cabeça e Rainha (ANDREATA *et al.*, 1997). A área densamente urbanizada que circunda a lagoa é responsável por um grande aporte de matéria orgânica nesses rios e nas galerias de águas pluviais, principalmente através de saídas clandestinas de esgoto (FONSECA *et al.*, 2014). Esses sedimentos desaguam no fundo da lagoa, favorecendo a atividade de bactérias heterotróficas e a floração de algas, que consomem o oxigênio em seus processos respiratórios, culminando com baixa qualidade da água, mortandade de peixes e perda da biodiversidade aquática (LAGOAS, 2012). Além dos danos ambientais causados

pelo acúmulo de matéria orgânica nos ambientes aquáticos, diversos micro-organismos oportunistas ou patogênicos podem ser inseridos no ambiente através das fezes (SCOTT *et al.*, 2002; BONJOCH, BALLESTÉ & BLANCH, 2005; BALLESTÉ *et al.*, 2010).

O oxigênio dissolvido é importante para a sobrevivência dos organismos aeróbios que habitam o ambiente aquático. Baixos níveis de OD podem provocar a mortandade de peixes, fenômeno visto com frequência na lagoa Rodrigo de Freitas. A diminuição do OD é consequência do acúmulo de matéria orgânica, uma vez que micro-organismos aeróbios que degradam a matéria orgânica fazem uso do oxigênio nos seus processos respiratórios, causando uma redução acentuada da sua concentração no ambiente (LAGOAS, 2012). Embora nenhum dos pontos analisados neste estudo tenha apresentado valores de OD abaixo do limite imposto para águas salobras de classe 2, que segundo a resolução CONAMA Nº 357/2005 não deve estar abaixo de 4 mg/L, os níveis de OD observados na terceira coleta estavam próximos do limite especificado (CONAMA, 2005).

Foi observada uma sazonalidade na turbidez, salinidade e condutividade dos pontos analisados. Isso pode ser devido ao aumento das chuvas no mês de março, onde em 2014 foi registrado, na cidade do Rio de Janeiro, uma média pluviométrica de 108 mm, contra 32 mm registrados no mês de setembro do mesmo ano (INMET, 2016). De acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), em 2015, a média pluviométrica registrada no mês de março foi de 138 mm (INMET, 2016). Com o aumento das chuvas, há uma elevação no volume de água escoado para a lagoa, ocasionando a diluição dos sais e gerando a redução da salinidade e consequentemente da condutividade. Esse aumento no volume de água também dilui os sólidos em suspensão, diminuindo a turbidez da água.

Os riscos à saúde ambiental e da população gerados pela presença de contaminação fecal não se limitam somente à lagoa, uma vez que, através do canal do Jardim de Alah, há constante troca de águas entre a lagoa e a praia de Ipanema. A praia do Leblon também recebe água proveniente da bacia da lagoa através do canal do Leblon. Em 2013, segundo o Histórico dos Boletins Semanais do INEA, a praia do Leblon esteve imprópria em cerca de 45% dos 98 boletins emitidos, enquanto que a praia de Ipanema esteve imprópria em 32,6%. Em 2014 e 2015, a praia do Leblon esteve imprópria em 43 e 44% dos boletins, respectivamente, enquanto que a praia de Ipanema esteve imprópria em 19 e 27%. No ano de 2016,

dos 10 boletins emitidos até o momento, a praia do Leblon esteve imprópria em 53%, enquanto que a praia de Ipanema esteve imprópria em 40% dos boletins (INEA, 2016).

O controle da qualidade microbiológica da água tem sido realizado através da quantificação de um grupo de micro-organismos indicadores de poluição fecal, os coliformes (APHA, AWWA & WEF, 2012). É uma metodologia simples e barata, porém possui algumas limitações, como a necessidade de longos períodos de incubação e a não determinação da fonte de contaminação. Além disso, a quantificação pode ser sub ou superestimada por inibição do crescimento ou adaptação das bactérias ao ambiente (SCOTT *et al.*, 2002; SAVICHTCHEVA & OKABE, 2006; DIAS & FILHO, 2007). Com isso, o uso de metodologias independentes de cultivo para detecção de contaminação fecal, com objetivo de complementar os ensaios utilizados atualmente, seriam uma alternativa no que se diz respeito ao controle da qualidade microbiológica da água.

Diversos micro-organismos já foram propostos como indicadores alternativos da presença de contaminação fecal em corpos d'água, mas a aplicação de mtDNA e *Methanobrevibacter* spp. como biomarcadores moleculares é uma metodologia relativamente recente, e seu uso em conjunto é inédito no Brasil.

A redução nos custos de amplificação e sequenciamento de DNA, aliada à rapidez e sensibilidade dos métodos, torna essa abordagem uma ferramenta eficiente e precisa no monitoramento dos corpos d'água, especialmente em relação às questões de saúde pública, como a propagação de doenças de veiculação hídrica (SALLÔTO, 2012; SAVICHETCHEVA & OKABE, 2006). Além disso, uma vez que as bactérias cultiváveis representam 1 a 10% da população microbiana estimada, é fundamental que técnicas independentes de cultivo sejam aplicadas na determinação da diversidade microbiana no ambiente (OSMAN *et al.*, 2008)

No presente estudo, a quantificação dos coliformes pelos métodos tradicionais, mostrou presença de contaminação fecal em todos os pontos de coleta, mesmo que em sua maioria dentro dos limites permitidos pela Resolução CONAMA Nº 357/2005, que determina um valor máximo de 2.500 NMP/100mL para águas doces e salobras voltadas à recreação de contato secundário. Na terceira coleta, os pontos LRF5 e LRF6, os mais próximos do Canal do Jardim de Alah, apresentaram valores de *E. coli* acima dos permitidos pela legislação. O Canal do Jardim de Alah liga a lagoa ao mar, e é frequentemente obstruído por matéria orgânica e areia,

restringindo a renovação da água da lagoa (GONZALEZ, PARANHOS & LUTTERBACH, 2010; TORRES, 1990). Essa estagnação, associada à alta disponibilidade de nutrientes e matéria orgânica, favorecem o desenvolvimento de comunidades microbianas e afetam as condições sanitárias do ambiente (LUTTERBACH *et al.*, 2001). Estes resultados trazem um alerta às condições sanitárias das águas da lagoa, sendo necessárias intervenções preventivas e corretivas que possam minimizar os efeitos dos aportes de esgoto, tanto na lagoa, quanto na praia de Ipanema.

A determinação da fonte de contaminação fecal é importante na avaliação dos riscos à saúde. O homem e outros animais de sangue-quente diferem quanto à composição de suas fezes, podendo liberar diferentes patógenos e substâncias, como antibióticos e hormônios, capazes de provocar danos à saúde da população.

A contaminação fecal humana, geralmente, é inserida nos corpos hídricos através do lançamento irregular de esgoto não tratado por ligações clandestinas de casas, prédios ou condomínios no entorno, que desembocam em galerias de águas pluviais ou diretamente nos rios (CPDMA, 2005). Em contraste, a contaminação fecal proveniente de outros animais possui origem nas encostas, que são varridas nos períodos de chuva (LAGOAS, 2012). Devido a isto, a contaminação fecal humana pode ser a mais expressiva em áreas urbanas.

Fezes humanas podem carrear desde antibióticos e hormônios a microorganismos patógenos ou oportunistas, como *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, vírus da hepatite A, helmintos e protozoários (SCOTT *et al.*, 2002; BAKER-AUSTIN *et al.*, 2010). Apesar dos resultados da quantificação dos coliformes pelos métodos tradicionais da maioria dos pontos analisados terem se mostrado dentro dos limites permitidos pela Resolução CONAMA Nº 357/2005, foram encontrados indícios de contaminação fecal humana em todos os pontos de coleta, através dos marcadores de mtDNA e *M. smithii*. Esse resultado mostra o elevado risco que as águas da lagoa representam à saúde da população, sujeitas ao contato direto ou à ingestão acidental durante a prática de atividades esportivas ou lazer.

Embora a lagoa seja localizada em uma região nobre da cidade, o risco de contaminação de suas águas com fezes de animais domésticos não pode ser descartada, uma vez que a bacia hidrográfica possui uma extensão de 30 km², e os

rios e riachos passam por diversas comunidades, onde é comum a criação de animais.

Fezes suínas costumam carrear diversos parasitas, como *Cysticercus cellulosae* (forma larval da *Taenia solium*), *Cryptosporidium* spp. e *Ascaris suum* (NISHI *et al*, 2000). Já fezes bovinas, além de parasitas intestinais, possuem forte expressão na liberação de hormônios e antibióticos no ambiente, substâncias utilizadas indiscriminadamente na criação de gado. Estudos anteriores não demonstraram presença de contaminação fecal proveniente de suínos e bovinos na Lagoa Rodrigo de Freitas, sinalizando a ausência de contaminação fecal desses animais ou a baixa sensibilidade dos biomarcadores (BARRETO, 2013).

Fezes equinas também são carreadoras de diversos parasitas intestinais, como *Salmonella* spp. e *Bacillus anthracis*. Além disso, fezes de cavalos de competição, por exemplo, podem conter resíduos de antibióticos e hormônios administrados nesses animais. Pela proximidade da lagoa com o Hipódromo da Gávea (Jockey Club Brasileiro), existe o risco de contaminação das águas da lagoa por fezes equinas, sendo o Canal do Jockey o principal ponto de entrada, atravessando o hipódromo e escoando nos dois sentidos, dependendo do sistema de comportas (MIGUEZ, REZENDE & VERÓL, 2012). A contaminação também pode ser proveniente da criação de animais nas comunidades do entorno da bacia, onde as fezes são varridas para o leito dos rios nos períodos de chuvas, porém em menor expressão. Em 2013, um estudo mostrou presença de contaminação fecal equina nos principais afluentes da Lagoa Rodrigo de Freitas, inclusive no Canal do Jockey e no Canal da Visconde de Albuquerque, que deságua na praia do Leblon (BARRETO, 2013). Nesse estudo, a detecção de mtDNA equino e *M. gottschalkii* em todos os pontos de coleta reforça o importante papel do hipódromo como fonte de entrada de contaminação fecal na lagoa.

Nossos resultados mostram a consequência da crescente urbanização da cidade do Rio de Janeiro. O saneamento básico da cidade não acompanhou o crescimento populacional, com baixos investimentos em infraestrutura e tratamento de esgoto, e com a falta de fiscalização das ligações clandestinas de esgoto. Os resultados também indicam que o Hipódromo da Gávea é uma importante fonte de contaminação fecal para a lagoa Rodrigo de Freitas. Até onde é de nosso conhecimento, não existe um controle específico ou legislação vigente, no Brasil,

para o descarte de resíduos provenientes de criação de animais em centros urbanos.

A lagoa Rodrigo de Freitas será palco das competições de remo e canoagem nas Olimpíadas de 2016, e os altos índices de coliformes encontrados trazem um alerta aos riscos à saúde aos quais os atletas estarão sujeitos, gerando uma preocupação a nível mundial.

6 CONCLUSÕES

Diversos micro-organismos já foram propostos como indicadores alternativos da presença de contaminação fecal em corpos d'água, mas a aplicação em conjunto de mtDNA e *Methanobrevibacter* spp. é inédita no Brasil.

A abordagem se mostrou específica na diferenciação da fonte em amostras fecais, não havendo nenhuma reação cruzada entre os marcadores e as fezes testadas.

A pesquisa de contaminação fecal na Lagoa Rodrigo de Freitas através da detecção de mtDNA e *M. smithii* mostrou presença de contaminação fecal humana e equina em todos os pontos estudados.

A aplicação de diversos biomarcadores em conjunto pode colaborar para resultados mais precisos e confiáveis em relação a qualidade dos corpos de água, uma vez que os biomarcadores podem apresentar variações dependendo da composição e tratamento das amostras, entre outros fatores.

A lagoa Rodrigo de Freitas apresentou sazonalidade quanto à turbidez, condutividade e salinidade, o que pode se justificar pelo aumento das chuvas em certos períodos do ano.

O Hipódromo da Gávea provavelmente desempenha importante papel na entrada de contaminação fecal proveniente de equinos nas águas da lagoa Rodrigo de Freitas.

A intensa urbanização no entorno da lagoa, em conjunto com a falta de fiscalização quanto a presença de ligações clandestinas de esgoto nas galerias de águas pluviais, contribuem fortemente para a entrada de contaminação fecal humana nos corpos d'água pertencentes à bacia hidrográfica da lagoa Rodrigo de Freitas.

Nossos resultados alertam para a necessidade de maiores investimentos em saneamento básico e fiscalização do poder público no que se refere às ações de saúde pública na cidade do Rio de Janeiro, uma vez que tratamento de água e coleta de esgoto são serviços fundamentais e contribuem com a qualidade de vida.

REFERÊNCIAS

ALVES, Daniella Tancredo de Matos. Qualidade ambiental da lâmina d'água da lagoa Rodrigo de Freitas - RJ Subsídios aos estudos de impactos ambientais em lagoas costeiras. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 9., 1998, Santos. **Anais...** Santos: INPE, 1998, p. 79-88.

ANDREATA, J. V.; MARCA, A. G.; SOARES, C. L. & SANTOS, R. S. **Distribuição mensal dos peixes mais representativos da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro, Brasil.** Rev Bras Zool. 14, 121-134, 1997.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Vigilância Sanitária no Brasil**, 29 de janeiro de 2014. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/1X9>>. Acesso em: 05 de setembro de 2014.

APHA - American Public Health Association, AWWA - American Water Works Association & WEF - Water Environment Federation. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 22. ed., Washington, APHA, USA, 2012.

BALLESTE, E.; BONJOCH, X.; BELANCHE, L. A. & BLANCH, A. R. **Molecular indicators used in the development of predictive models for microbial source tracking.** Appl. Environ. Microbiol. 76(6), 1789-1795, 2010.

BARRETO, C. C. Aplicação de biomarcadores moleculares hospedeiro-específicos para a detecção de contaminação fecal em águas da Lagoa Rodrigo de Freitas e seus afluentes. **2013. 50f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.**

BIANCO, K.; BARRETO, C.; OLIVEIRA, S.S.; PINTO, L. H.; ALBANO, R. M.; MIRANDA, C. C.; CLEMENTINO, M. M. **Fecal pollution source tracking in waters intended for human supply based on archaeal and bacterial genetic markers.** J. Water Health. 13(4), 985-995, 2015.

BONJOCH, X.; BALLESTÉ, E. & BLANCH, A. R. **Enumeration of bifidobacterial populations with selective media to determine the source of waterborne fecal pollution.** Water Res. 39(8), 1621-1627, 2005.

BRASIL. **CONSTITUIÇÃO DA REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL, 5 de outubro de 1988.** Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm>. Acesso em: 05 de setembro de 2014.

BRASIL. **LEI Nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes, e dá outras providências.** Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lei8080.pdf>>. Acesso em: 05 de setembro de 2014.

BRASIL. **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.** Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l9782.htm>. Acesso em: 05 de setembro de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **PORTARIA Nº 1.469, de 29 de dezembro de 2000. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.** Disponível em: <http://www.comitepcj.sp.gov.br/download/Portaria_MS_1469-00.pdf>. Acesso em: 05 de setembro de 2014.

BRASIL. **LEI Nº 11.445, de 5 de janeiro de 2007. Estabelece diretrizes nacionais para o saneamento básico; altera as Leis nº 6.766, de 19 de dezembro de 1979, 8.036, de 11 de maio de 1990, 8.666, de 21 de junho de 1993, 8.987, de 13 de fevereiro de 1995; revoga a Lei nº 6.528, de 11 de maio de 1978; e dá outras providências.** Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2007-2010/2007/lei/l11445.htm>. Acesso em: 05 de setembro de 2014.

BRASIL. **DECRETO Nº 7.335, de 19 de outubro de 2010. Aprova o Estatuto e o Quadro Demonstrativo dos Cargos em Comissão e das Funções Gratificadas da Fundação Nacional de Saúde - FUNASA, e dá outras providências.** Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Ato2007-2010/2010/Decreto/D7335.htm#art6>. Acesso em: 05 de setembro de 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **PORTARIA Nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.** Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis./gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 05 de setembro de 2014.

BRYANT, M.P. **Rumen methanogenic bacteria**, In: Physiology of digestion in the ruminant, 411-418. Edited by Dougherty, R. W., Washington, D.C., Butterworths, 1965.

CLEMENTINO, M.M., FERNANDES, C.C., VIEIRA, R.P., CARDOSO, A.M., POLYCARPO, C.R., MARTINS, O.B. **Archaeal diversity in naturally occurring and impacted environments from a tropical region.** J Appl Microbiol. 103(1), 141-151, 2007.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. **RESOLUÇÃO Nº 274, de 29 de novembro de 2000. Revisa os critérios de balneabilidade em águas brasileiras.** Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res00/res27400.html>>. Acesso em: 05 de setembro de 2014.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. **RESOLUÇÃO Nº 357, de 17 de março 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.** Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 05 de setembro de 2014.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. **RESOLUÇÃO Nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA.** Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Acesso em: 05 de setembro de 2014.

COSTA, L. L., CEBALLOS, B. S. O., MEIRA, C. M. B. S. & MÁRIO LUIZ FARIAS CAVALCANTI, M. L. F. **Eficiência de Wetlands construídos com dez dias de detenção hidráulica na remoção de colifagos e bacteriófagos.** Rev Biol Ciênc Terra. 3(1), 2003.

COSTA, E. A. **Fundamentos da Vigilância Sanitária.** In: Vigilância Sanitária: temas para debate. Edited by: Costa, E. A. Salvador, EDUFBA, Brasil, 2009.

CPDMA - COMISSÃO PERMANENTE DE DEFESA DO MEIO AMBIENTE. **Lagoa Rodrigo de Freitas: Poluição por metais pesados e substâncias orgânicas nos sedimentos.** Disponível em: <<http://minc.com.br/mandato/meioambi/relatoriolagoarodrigofreitas.htm>> Acesso em: 18 de dezembro de 2015.

CRESPO, S. & LA ROVERE, A. L. N. **Estado do Meio Ambiente.** In: Projeto geo cidades: relatório ambiental urbano integrado: informe GEO, 65-112. Edited by Crespo, S., La Rovere, A. L. N., Rio de Janeiro, Consórcio Parceria 21, Brasil, 2002.

CRESPO, S. & LA ROVERE, A. L. N. **Impactos.** In: Projeto geo cidades: relatório ambiental urbano integrado: informe GEO, 113-124. Edited by Crespo, S., La Rovere, A. L. N., Rio de Janeiro, Consórcio Parceria 21, Brasil, 2002.

DIAS, M. F. F. & FILHO, A. F. **Qualidade microbiológica de águas mineirais em embalagens individuais comercializadas em Araraquara-SP.** Alim. Nutr. 18(2), 177-181, 2007.

DOYLE, M. P. **Fecal coliforms in tea: what's the problem?** Food Technol. 50(10), 104, 1996.

ESTEVEZ, F. A. **Fundamentos de Limnologia.** 3ª ed., 790 p., Rio de Janeiro, Interciência, Brasil, 2011.

FEEMA – Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente. **Lagoa Rodrigo de Freitas e rios contribuintes: diagnóstico de qualidade de água.** Rio de Janeiro, Governo do Estado do Rio de Janeiro, Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Urbano, 2006.

FONSECA, E. M.; BAPTISTA NETO, J. A.; MCALISTER, J. J., SMITH, B.J.; CRAPEZ, M. A. C. **Bioavailability of pollutants in bacterial communities of Rodrigo de Freitas Lagoon, Rio de Janeiro, Brazil.** Braz J Microbiol. 45(3), 953-962, 2014.

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. **Vigilância ambiental em saúde**. Brasília, Funasa, Brasil, 2002.

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. **Manual prático de análise de água**. 3. ed. rev. Brasília, Funasa, 2009.

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. **Impactos na Saúde e no Sistema Único de Saúde Decorrentes de Agravos Relacionados a um Saneamento Ambiental Inadequado**: Relatório Final. Brasília, Funasa, 2010.

GERBA, C. P. **Indicator Microorganisms**. *In*: Environmental Microbiology, 2nd ed., 485-499. Edited by Pepper, I. L., Gerba, C. P., Maier R. M., California, Academic Press, USA, 2008.

GONZALEZ, A. M.; PARANHOS, R. & LUTTERBACH, M. S. **Relationships between fecal indicators and pathogenic microorganisms in a tropical lagoon in Rio de Janeiro, Brazil**. Environ Monit Assess. 164, 207–219, 2010.

GRIBALDO, S. & BROCHIER-ARMANET, C. **The origin and evolution of Archaea: a state of the art**. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 361(1470), 1007-1022, 2006.

HAGLER, A. N. & MENDONÇA-HAGLER, L. C. **Microbiologia Sanitária**. *In*: Tratado de Microbiologia, Vol. 1, 83-102. Edited by Roitman, I., Travassos, L. R., Azevedo, J. L., São Paulo, Editora Manole Ltda, Brasil, 1988.

HOFSTRA, H., HUISIN'T VELD, J.H. **Methods for the detection and isolation of Escherichia coli including pathogenic strains**. Soc Appl Bacteriol Symp Ser. 17, 197-212, 1988.

INEA – INSTITUTO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. **Histórico dos Boletins Semanais das Praias da Barra e Zona Sul**. Disponível em: <<http://www.inea.rj.gov.br/fma/balneabilidade-praias.asp>>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2016.

INMET – INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. **BDMEP - Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>>. Acesso em: 29 de janeiro de 2016.

NOVOS indicadores do saneamento não mostram avanços. **Instituto Trata Brasil**, 22 fev. 2016. Disponível em <<https://tratabr.wordpress.com/2016/02/22/novos-indicadores-do-saneamento-nao-mostram-avancos/>>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2016

LAGOAS brasileiras: saiba mais sobre suas dinâmicas e ecossistemas. **Globo Universidade**, Rio de Janeiro, 07 set. 2012. Disponível em <<http://redeglobo.globo.com/globouniversidade/noticia/2012/07/lagoas-brasileiras-saiba-mais-sobre-suas-dinamicas-e-ecossistemas.html>>. Acesso em: 18 de dezembro de 2015.

LEE, J. H., KUMAR, S., LEE, G. H., CHANG, D. H., RHEE, M. S., YOON, M. H., KIM, B. C. ***Methanobrevibacter boviskoreani* sp. nov., isolated from the rumen of Korean native cattle.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63(11), 4196-4201, 2013.

LIN, C. & MILLER, T.L. **Phylogenetic analysis of *Methanobrevibacter* isolated from feces of humans and other animals.** Arch Microbiol. 69(5), 397-403, 1998.

LUCCHESI, G. **A vigilância sanitária no Sistema Único de Saúde.** In: Gestão e vigilância sanitária: modos atuais do pensar e fazer, 33-47. Edited by De Seta, M. H., Pepe, V. L. E.; Oliveira, G. O., Rio De Janeiro, Fiocruz, Brasil, 2006.

LUTTERBACH, M. T. S.; VASQUEZ, J. C.; PINET, J. A.; ANDREATA, J. V.; DA SILVA, A. C. **Monitoring and spatial distribution of heterotrophic bacteria and fecal coliforms in the Rodrigo de Freitas Lagoon, Rio de Janeiro, Brazil.** Braz Arch Biol Tech, 44(1), 7-13, 2001.

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

MEANS, E. G. & OLSON, B. H. **Coliform inhibition by bacteriocin-like substances in drinking water distribution systems.** Appl. Environ. Microbiol. 42(3), 506-512, 1981.

MIESZKIN, S.; FURET, J. CORTIER, G. & GOURMELON, M. **Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by Real-Time PCR using two pig-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers .** Appl. Environ. Microbiol. 75(10), 3045-3054, 2009.

MIGUEZ, M.G.; REZENDE, O.M. & VERÓL, A.P. **Interações entre o Rio dos Macacos e a lagoa Rodrigo de Freitas sob a ótica dos problemas de drenagem urbana e ações integradas de revitalização ambiental.** Oecol. Aust. 16(3), 615-650, 2012.

MILLER, T. L.; WOLIN, M. J. & KUSEL, E. **Isolation and characterization of methanogens from animal feces.** Syst Appl Microbiol. 8(3), 234-238, 1986.

MILLER, T. L., & LIN, C. **Description of *Methanobrevibacter gottschalkii* sp. nov., *Methanobrevibacter thaueri* sp. nov., *Methanobrevibacter woesei* sp. nov. and *Methanobrevibacter wolinii* sp. nov.** Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 819-822, 2002.

NISHI, S. M.; GENNARI, S. M.; LISBOA, M. N. T. S.; SILVESTRIM, A.; CAPRONI JR., L & UMEHARA O. **Parasitas intestinais em suínos confinados nos estados de São Paulo e Minas Gerais.** Arq. Inst. Biol. 67(2), 199-203, 2000.

OSMAN, S.; LA DUC, M. T.; DEKAS, A; NEWCOMBE, D. & VENKATESWARAN, K. L. **Microbial burden and diversity of commercial airline cabin air during short and long durations of travel.** ISME J. 2(5), 482-97, 2008.

PEREIRA, R. M. V. & MEDEIROS, R. **A Aplicação dos instrumentos de gestão e do Sistema de Gerenciamento dos Recursos Hídricos na Lagoa Rodrigo de Freitas, RJ, Brasil.** *Ambi-Água*. 4(3), 211-229, 2009.

PESTER, M., SCHLEPER, C., WAGNER, M. **The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology.** *Curr Opin Microbiol*. 14(3), 300-306, 2011.

PIZELLA, D. G.; & SOUZA, M. P. **Análise da sustentabilidade ambiental do sistema de classificação das águas doces superficiais brasileiras.** *Eng. Sanit. Ambient*. 12(2), 139-148, 2007.

PRESCOTT, S. C., WINSLOW, C. E. A. **Elements of water bacteriology with special reference to sanitary water analysis.** New York Wiley, 1915. Disponível em: <<https://archive.org/details/elementsofwaterb00presuoft>>. Acesso em: 22 de setembro de 2014.

RENOVATO, D. C. C., SENA, C. P. S. & SILVA, M. M. F. Análise de parâmetros físico-químicos das águas da barragem pública da cidade de Pau dos Ferros (RN) – Ph, cor, turbidez, acidez, alcalinidade, condutividade, cloreto e salinidade. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DO IFRN, 9, 2013, Cidade Alta, **Anais...** Rio Grande do Norte: IFRN, p. 879-888.

RIO DE JANEIRO. **LEI ORGÂNICA DO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO, de 05 de abril de 1990.** Disponível em: <<http://www.leismunicipais.com.br/lei-organica/riodejaneiro-rj/3613>>. Acesso em: 27 de setembro de 2014.

RIO DE JANEIRO. **DECRETO Nº 9.396, de 13 de junho de 1990. Determina o tombamento definitivo do bem cultural que menciona e dá outras providências.** Disponível em: <<http://www2.rio.rj.gov.br/smu/caderno/site%20lagoa/legislacao/especifica/9396.htm>>. Acesso em: 27 de setembro de 2014.

RIO DE JANEIRO. **DECRETO Nº 18.415, de 01 de março de 2000. Estabelece parâmetros de uso para o espelho d'água da lagoa Rodrigo de Freitas.** Disponível em: <<http://200.141.78.79/dlstatic/10112/2972533/DLFE-245312.pdf/4DecretoMunicipal18415de2000.pdf>>. Acesso em: 27 de setembro de 2014.

RIO-ÁGUAS – Fundação Instituto das Águas do Município do Rio de Janeiro. 2012. **Plano de contingências e monitoramento da lagoa Rodrigo de Freitas.** Disponível em: <<http://200.141.78.79/dlstatic/10112/2972533/DLFE-245314.pdf/6RIOAGUASPlanodeContingencia2012.pdf>>. Acesso em: 27 de setembro de 2014.

RIOTUR – Empresa de Turismo do Município do Rio de Janeiro. **Lagoa Rodrigo de Freitas.** Disponível em: <<http://www.rio.rj.gov.br/web/riotur/exibeconteudo?article-id=157740>>. Acesso em: 27 de setembro de 2014.

ROSLEV, P. & BUKH, A. S. **State of the art molecular markers for fecal pollution source tracking in water.** *Appl Microbiol. Biotechnol*. 89(5), 1341-1355, 2011.

ROZENFELD, S. **Marcos históricos e conceituais**. In: Fundamentos da Vigilância Sanitária, 13-60. Edited by: Rozenfeld, S. Rio de Janeiro, FIOCRUZ, Brasil, 2000.

SALLÔTO, G. R. B. Avaliação metagenômica da microbiota do complexo lagunar de Jacarepaguá e seus impactos na saúde pública. **2012. 124 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.**

SANTORO, D. O. Avaliação da influência do tratamento do resíduo líquido hospitalar em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e na diversidade de *Pseudomonas spp.*. **2011. 112 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.**

SANTOS, M. A. S. P., CARVALHO, J. V., SILVA, M. A. B. & SORRINI, E. Qualidade da Água: estudo de casos, Sistema Rio Grande X Sistema Rio Claro. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE RECURSOS HÍDRICOS, 13, 1999, Belo Horizonte, **Anais...** Belo Horizonte: ABRH, 1999.

SAUNDERS, R. J & WARFORD, J. J. **Abastecimento de Água em Pequenas Comunidades: aspectos econômicos e políticos nos países em desenvolvimento**. 252p, Rio de Janeiro: ABES/CODEVASF/ BNH, Brasil, 1983.

SAVICHTCHEVA, O. & OKABE, S. **Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives**. Water Res. 40(13), 2463-2476, 2006.

SCHILL, W. B. & MATHES, M. V. **Real-Time PCR Detection and Quantification of Nine Potential Sources of Fecal Contamination by Analysis of Mitochondrial Cytochrome b Targets**. Environ. Sci. Technol. 42, 5229–5234, 2008.

SCHMIDT, S. Cartão-postal maltratado. **O Globo**, Rio de Janeiro, 05 jun. 2013.

SCOTT, T. M.; ROSE, J. B.; JENKINS, T. M.; FARRAH, S. R. & LUKASIK, J. **Microbial source tracking: current methodology and future directions**. Appl. Environ. Microbiol. 68(12), 5796-5803, 2002.

SIM – Sistemas de Informações de Mortalidade / MS – Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Proporção de óbitos por doença diarreica aguda em menores de 5 anos de idade**. Disponível em: <<http://tabnet2.datasus.gov.br>>. Acesso em: 5 de setembro de 2015.

SMAC – Secretaria Municipal do Meio Ambiente. **Programa de monitoramento dos ecossistemas costeiros urbanos do município do Rio de Janeiro**, 48p. Edited by: Graell, A. S.; Nacaratti, M. A.; Bueno, M. C. D. Rio de Janeiro: SMAC, Brasil, 1998.

SNSA – Sistema Nacional de Saneamento Ambiental. **Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgoto 2012**. 164 p. Brasília, SNSA/MCIDADES, Brasil 2014.

SOARES, M. F.; DOMINGOS, P.; SOARES, F. F. L.; & TELLES, L. F. R. **10 anos de monitoramento da qualidade ambiental das águas da lagoa Rodrigo de Freitas.** Oecol. Aust. 16(3), 581-614, 2012.

SOUZA, L. C.; IARIA, S. T.; PAIM, G. V. & LOPES, C. A. M. **Bactérias coliformes totais e coliformes de origem fecal em águas usadas na dessedentação de animais.** Rev. Saude Publica. 17(2), 112-122, 1983.

STEWART, J. R.; GAST, R. J.; FUJIOKA, R. S.; SOLO-GABRIELE, H. M.; MESCHKE, J. S.; AMARAL-ZETTLER, L. A.; DEL CASTILLO, E.; POLZ, M. F.; COLLIER, T. K.; STROM, M. S.; SINIGALLIANO, C. D.; MOELLER, P. D. R. & HOLLAND, A. F. **The coastal environment and human health: microbial indicators, pathogens, sentinels and reservoirs.** Environ. Health. 7(Suppl 2):S3, 2008.

THAUER, R.K., KASTER, A.K., SEEDORF, H., BUCKEL, W., HEDDERICH, R. **Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation.** Nat Rev Microbiol. 6(8), 579-591, 2008.

TORRES, J. M. **Lagoa Rodrigo de Freitas.** Rev Municipal Eng, XLI(1-4), 31-53, 1990.

UFNAR, J. A., WANG, S. Y., CHRISTIANSEN, J. M., YAMPARA-IQUISE, H., CARSON, C. A., ELLENDER, R.D. **Detection of the nifH gene of Methanobrevibacter smithii: a potential tool to identify sewage pollution in recreational waters.** J Appl Microbiol. 101(1), 44-52, 2006.

UFNAR, J. A.; WANG, S. Y.; UFNAR, D. F. & ELLENDER, R, D. **Methanobrevibacter ruminantium as an indicator of domesticated-ruminant fecal pollution in surface waters.** Appl Environ Microbiol. 73(21), 118-121, 2007.

UFNAR, J. A., UFNAR, D. F., WANG, S. Y. & ELLENDER, R. D., **Development of a Swine-Specific Fecal Pollution Marker Based on Host Differences in Methanogen *mcrA* Genes.** Applied and environmental microbiology, p. 5209–5217, 2007.

UNICEF – United Nations Children's Fund & WHO – World Health Organization. **Diarrhoea: Why children are still dying and what can be done.** New York: UNICEF, USA, 2009.

UNICEF – United Nations Children's Fund. **Committing to Child Survival: A Promise Renewed Progress Report 2013.** New York, UNICEF, USA, 2013.

UNICEF – United Nations Children's Fund. **Water and sanitation coverage.** Disponível em: <<http://data.unicef.org/water-sanitation/sanitation>>. Acesso em 19 de fevereiro de 2016.

VAN WEERELT, M. D. M; SIGNORI, C. & ENRICH-PRAST, A. **Balneabilidade da lagoa Rodrigo de Freitas: variação temporal e espacial.** Oecol. Aust. 16(3), 566-580, 2012.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** 3 ed., 542 p., Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Brasil, 2005.

WHO – World Health Organization & UNICEF – United Nations Children's Fund. **Global Water Supply and Sanitation Assessment 2000 Report.** Disponível em: <http://www.who.int/docstore/water_sanitation_health/Globassessment/GlobalTOC.htm>. Acesso em: 27 de setembro de 2014.

WHO – World Health Organization. **The world health 2000 report - Health systems financing: the path to universal coverage.** Disponível em: <<http://www.who.int/whr/2000/en/index.html>>. Acesso em: 27 de setembro de 2014.

WHO – World Health Organization. **WHA Resolution 58.33. Sustainable health financing, universal coverage and social health insurance.** In: Fifty- eighth World Health Assembly, Geneva, 16–25 May 2005. Geneva: World Health Organization, Switzerland. Disponível em: <www.who.int/entity/providingforhealth/topics/WHA58_33-en.pdf>. Acesso em: 27 de setembro de 2014.

WHO – World Health Organization. **Guidelines for drinking-water quality,** 4th ed., Geneva: WHO Press, Switzerland, 2011.

WHO – World Health Organization & UNICEF – United Nations Children's Fund. **Progress on sanitation and drinking-water – 2014 update.** Geneva: WHO Press, Switzerland, 2014.

ZHENG, G.; YAMPARA-IQUISE, H.; JONES, J. E. & CARSON, C. A. **Development of *Faecalibacterium* 16S rRNA gene marker for identification of human faeces .** J. Appl. Microbiol. 106(2), 634-641, 2009.