

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

Samara Sant'Anna de Oliveira

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE BIOMARCADOR MOLECULAR DE
CONTAMINAÇÃO FECAL HOSPEDEIRO ESPECÍFICO EM ÁGUAS DE
RECREAÇÃO COSTEIRA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

Rio de Janeiro
2014

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE BIOMARCADOR MOLECULAR DE
CONTAMINAÇÃO FECAL HOSPEDEIRO ESPECÍFICO EM ÁGUAS DE RECREAÇÃO
COSTEIRA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.

Samara Sant'Anna de oliveira

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

Orientadores: Maysa Beatriz Mandetta Clementino
Alexander M. Cardoso

Rio de Janeiro
2014

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

Oliveira, Samara Sant'Anna de

Avaliação da presença de biomarcador molecular de contaminação fecal hospedeiro específico em águas de recreação costeira no estado do Rio de Janeiro / Samara Sant'Anna de Oliveira. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2014.

66 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2014.

Orientadores: Maysa Beatriz Mandetta Clementino e Alexander M. Cardoso

1. Poluição da Água. 2. Poluição das Praias. 3. Coliformes. 4. Methanobrevibacter. 5. Vigilância Sanitária. I Título

Evaluation the presence of molecular biomarkers of fecal contamination in specific host coastal recreation waters of the State of Rio de Janeiro.

Samara Sant'Anna de Oliveira

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE BIOMARCADOR MOLECULAR DE
CONTAMINAÇÃO FECAL HOSPEDEIRO ESPECÍFICO EM ÁGUAS DE
RECREAÇÃO COSTEIRA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.**

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

Aprovado em 21/08/2014

BANCA EXAMINADORA

Dr. Célia Maria Carvalho Araujo Pereira Romão (INCQS/FIOCRUZ)

Dra. Maria Regina Branquinho (INCQS/FIOCRUZ)

Dra. Jessica Many Bittencourt Dias Vieira (UEZO)

Dra. Maysa Beatriz Mandetta Clementino (INCQS/FIOCRUZ) - Orientadora

Dedico ao meu pai, minha eterna fonte de inspiração

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida por mais uma etapa vencida e pelo objetivo alcançado.

Agradeço aos meus pais, Welington e Lana, exemplos na minha vida.

Agradeço a minha professora orientadora Maysa Beatriz Mandetta Clementino que teve paciência e que me ajudou bastante á concluir este trabalho.

À Coordenação da Pós-Graduação em Vigilância Sanitária.

Aos meus amigos do Laboratório de Micro-organismos de Referência, meu muito obrigado. Em especial ao Kayo, Cátia, Carla, Teko e Mayara por todas as dúvidas resolvidas, pelas informações preciosas e pelo auxílio nos experimentos além da paciência, tranquilidade ao me ajudar nos experimentos.

Ao pesquisador Dr. Marcos Sorgine pelos valiosos conhecimentos transmitidos principalmente em PCR em tempo real e ao Dr. Alexander M. Cardoso por toda contribuição na análise dos resultados (bioinformática).

Aos professores membros da Banca Examinadora, pela gentileza em participar da banca, e pela contribuição com seus valiosos comentários, observações, críticas e sugestões.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e que não têm seus nomes presentes nestes agradecimentos, o meu muito obrigada!

RESUMO

Atualmente, indicadores bacteriológicos utilizados para avaliar a balneabilidade das águas de recreação estabelecidos em legislações, apresentam limitações como a correlação com seu hospedeiro. Uma variedade de micro-organismos anaeróbios vem sendo considerados alvos promissores no desenvolvimento de indicadores de poluição fecal hospedeiro-específico. A espécie *M. smithii* é a única espécie conhecida que coloniza exclusivamente o trato gastrointestinal humano e é altamente prevalente em esgoto. Sendo assim, este projeto tem como objetivo avaliar a presença de *M. smithii* como bioindicador de contaminação fecal hospedeiro-específico em águas de recreação costeira no estado do Rio de Janeiro. Para isso foram coletadas amostras de águas superficiais de 13 praias (Ilha do governador ($n=4$), Copacabana ($n=1$), Leblon ($n=2$), Prainha ($n=2$), Ramos (1), Araruama ($n=2$), Niteroi ($n=1$)) em seguida os parâmetros físico-químicos e as concentrações de coliformes termotolerantes foram determinados. Em seguida foi realizada a caracterização das comunidades de *Methanobrevibacter* spp. através da construção de bibliotecas do gene *rrs* do 16S rRNAe a detecção e quantificação do *M. smithii* pela qPCR do gene *nifH*. Os parâmetros físico-químicos, apresentaram alterações significativas em relação a salinidade e condutividade. Quando analisados em relação a balneabilidade, somente as praias Seca, Pontinha e Ramos apresentaram-se como próprias para atividade recreativa. As análises das bibliotecas demonstraram a prevalência de *M. smithii* e de organismos não cultivados, muito provavelmente novas espécies do gênero *Methanobrevibacter* ainda não descritas. A PCR convencional detectou *M. smithii* em 11 amostras, enquanto a qPCR detectou e quantificou cópias do gene *nifH* em 12 amostras. A partir dos dados obtidos podemos concluir que as aplicações de novos indicadores na determinação da origem da contaminação das águas de recreação contribuem para uma avaliação mais precisa da qualidade das águas e consequentemente da saúde da pública.

ABSTRACT

Currently, bacteriological indicators used to assess bathing water recreation established in laws, have limitations such as the correlation with its host. A variety of anaerobic micro-organisms has been considered promising targets in the development of host-specific indicators of fecal pollution. The specie *M. smithii* is the only known species that exclusively colonizes the human gastrointestinal tract and is highly prevalent in sewage. Thus, this project aims to assess the presence of *M. smithii* as bioindicator of host-specific fecal pollution in coastal recreation waters of Rio de Janeiro. For this surface water samples from 13 beaches (Ilha do Governador (n = 4), Copacabana (n = 1), Leblon (n = 2), Prainha (n = 2), Ramos (1), Araruama (n = 2), Niteroi (n = 1)) then the physico-chemical parameters and concentrations of fecal coliforms were determined. Then the characterization of communities *Methanobrevibacter* spp was performed. by constructing libraries rrs 16S rRNAe detection and quantification by qPCR of *M. smithii nifH*. The physico-chemical parameter settings showed significant changes in relation to salinity and conductivity. When analyzed for bathing, only Seca, Pontinha Ramos beaches and presented themselves as fit for recreational activity. Analyses of libraries demonstrated the prevalence of *M. smithii* and uncultivated organisms, most likely new species of the genus *Methanobrevibacter* not yet described. Conventional PCR detected in *M. smithii* 11 samples, while qPCR detected and quantified copies of the *nifH* 12 samples. From the data obtained we can conclude that applications of new indicators in determining the source of contamination of water recreation contribute to a more accurate assessment of water quality and consequently the health of the public.

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

16SrRNA - gene 16S do ácido ribonucléicoribossomal
16SrDNA - gene 16S do ácido desoxirribonucléicoribossomal
ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Art. - Artigo
ATCC - American Type Culture Collection
BLAST - Basic local alignment search tool
°C - Grau Celsius
CEDAE - Companhia Estadual de Águas e Esgotos
CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente
DNA - Ácido desoxirribonucléico
dNTPs - Deoxinucleotídeo trifosfato
EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
FIOCRUZ - Fundação Instituto Osvaldo Cruz
INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LB - Luria Bertani
LMR - Laboratório de Micro-organismos de Referência
MEGA - Molecular Evolutionary Genetics Analysis
mg - miligrama
MgCl₂ - cloreto de magnésio
mL - mililitro
mM - milimolar
mm - milímetro
mm³ - metros cúbicos
mS - miliSiemens
n^o - número
NaOAc - Acetato de sódio
NaOH - Hidróxido de sódio
NCBI - National Center for Biotechnology Information
ng - nanograma
nm - nanômetro
OD - Oxigênio dissolvido
OTU – Operational Taxonomic Units (unidades taxonômicas operacionais)
pb - pares de base
PBS - Tampão fosfato em salina
PCA - Principal components analyses (análise de componentes principais)
PCR –Polymerase chain reaction (reação em cadeia pela polimerase)
pH - potencial de hidrogênio
PM - peso molecular
pmol - picomol
ppm - parte por milhão
rDNA - DNA ribossomal
RDP II - RibosomalDatabase Project II
RJ - Rio de Janeiro
RNA - Ácido ribonucléico
RNase - Ribonuclease
rpm - rotações por minuto

SDS - sodiumdodecyl sulfate (dodecil sulfato de sódio)
TBE - Tris-borato EDTA
TAE - Tris-acetato EDTA
UniFrac - Uniquefractionmetric
UNT - Unidade Nefelométrica de Turbidez
UTI - Unidade de Tratamento Intensivo
X-GAL - 5-bromo-4-cloro-3-indoyl-beta-D-galactosídeo
µg - micrograma
µL - microlitro
µM - micromolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pontos de coleta.....	32
Figura 2. Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy.....	36
Figura 3. Árvore filogenética	44
Figura 4. Análise de Componentes Principais (PCA).....	45
Figura 5. Amplificação do gene <i>nifH</i> para <i>Methanobrevibacter smithii</i>	46
Figura 6. Curva padrão do controle interno positivo (IPC).....	47
Figura 7. Curva padrão do <i>M. smithii</i>	48
Figura 8. Perfil de amplificação.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Iniciadores e condições de PCR convencional	35
Tabela 2 Resultados dos parâmetros físico-químicos.....	42
Tabela 3 Resultado das análises microbiológicas.....	43
Tabela 4 Resultados de PCR convencional e PCR em tempo real.....	49

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 ÁGUA.....	17
1.2 SISTEMA SANITÁRIO NO RIO DE JANEIRO.....	18
1.3 CONTAMINAÇÃO HÍDRICA E SAÚDE PÚBLICA.....	19
1.4 BALNEABILIDADE	21
1.5 BIOINDICADORES DE POLUIÇÃO FECAL	22
1.6 RASTREAMENTO DE FONTES DE CONTAMINAÇÃO MICROBIANA	23
1.7 DOMÍNIO Archaea	26
1.8 PCR EM TEMPO REAL (qPCR)	28
1.9 RELAÇÕES DO MONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA COM A VIGILÂNCIA SANITÁRIA E A SAÚDE PÚBLICA	30
2. OBJETIVO	31
3. METODOLOGIA	322
3.1 COLETA DAS AMOSTRAS.....	322
3.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS.....	33
3.3 CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS GÊNICAS.....	33
3.3.1 Extração do DNA genômico.....	33
3.3.2 Amplificação do DNA pela PCR	34
3.3.3 Clonagem dos produtos de PCR para as bibliotecas	35
3.3.4 Transformação das células competentes através de eletroporação.....	36
3.3.5 Seleção dos clones após transformação.....	37
3.3.6 Mini-preparação (extração do DNA plasmidial).....	37
3.3.7 Sequenciamento dos clones	38
3.4 CONSTRUÇÃO DA CURVA-PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA.....	40
3.4.1 Quantificação absoluta das amostras	41
4. RESULTADOS	42
4.1 DOSAGEM DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	42
4.2 DOSAGEM DOS PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS	43
4.3 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS BIBLIOTECAS.....	44
4.4 DETECÇÃO DE <i>M. smithii</i> PELA PCR CONVENCIONAL.....	46
4.5 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO GENE <i>nifH</i> POR qPCR.....	46
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	57

1. INTRODUÇÃO

1.1 ÁGUA

Ao observar a grande superfície ocupada pela água na terra, tem-se a errônea impressão de que representa uma fonte abundante e inesgotável. A água formou-se com o planeta, há mais ou menos 3,8 bilhões de anos, e ao contrário do que muitos pensam, é um recurso esgotável. A água encontra-se distribuída da seguinte forma: 95,5% água salgada nos oceanos, 2,2% água doce nas calotas polares e geleiras, 2,3% água doce acessível. As águas acessíveis vêm sendo utilizada de três formas, uma parte para a agricultura (67%), outra para a indústria (23%) e outra para o abastecimento público (10%), que compreende o uso doméstico, com distribuição as residências, hospitais e escola, irrigação de parques e jardins, limpeza de ruas e logradouros, combate a incêndios, navegação e lazer, uso em estabelecimentos comerciais (MENDONÇA e MOTTA, 2005).

De acordo com a Agência Nacional de Águas - ANA, a Ásia apresenta o maior percentual de disponibilidade de água em relação aos recursos mundiais seguidos das Américas do Sul, Norte e Central. A Groelândia encontra-se em primeiro lugar em relação à oferta mundial de água com a participação de 10.767.857m³ por pessoa ao ano, seguidas pelo Alasca, Guiana, Islândia e Suriname, já o Brasil encontra-se em 25º lugar com 45.314m³ (MENDONÇA e MOTTA 2005).

A maior disponibilidade de água pode não necessariamente garantir a efetiva distribuição homogênea para as populações. A distribuição desigual dos recursos hídricos contrasta com as diferenças populacionais, por exemplo, a Ásia o continente mais populoso, concentra 59,8% dos habitantes e cerca de 31,6% da disponibilidade total de água doce superficial do planeta. Por outro lado, as Américas contam com 13,6% da população mundial e 41% da água disponível. Em relação às desigualdades intracontinentais, o Brasil possui 2,8% da população mundial e 12% da água doce do planeta, mas 70% dessas águas estão na Bacia Amazônica onde a densidade populacional é a menor do país, em contradição temos a região Nordeste que representa a região mais árida e pobre do Brasil, onde vive cerca de 30% da população, e dispõe somente 5% da água doce, enquanto que já as regiões Sul e Sudeste do país, onde vivem cerca de 60% da população dispõe de 12,5% de água doce. Fatores como a alta densidade populacional, a poluição, a agricultura, a indústria energético-intensiva e o desmatamento provocam crescente escassez na quantidade e conseqüentemente qualidade da água (MENDONÇA e MOTTA 2005).

Muito se sabe sobre a importância da água em relação à saúde e a vida em nosso planeta, é evidente a forte congruência entre dados relacionados a indicadores de desigualdades sociais e indicadores de acesso e de qualidade de água. Tal fato, não constitui uma novidade da mesma maneira que o reconhecimento decisivo do papel da água no desencadeamento direto e até indireto de uma diversidade de patologias e no condicionamento da mortalidade geral e em especial, a infantil na grande parcela dos países em desenvolvimento.

1.2 SISTEMA SANITÁRIO NO RIO DE JANEIRO

Atualmente, estima-se que 80% de todas as moléstias e mais de um terço de óbitos dos países em desenvolvimento sejam causados pela ingestão de água contaminada, e, em média, até um décimo do tempo produtivo de cada pessoa é perdido devido a doenças relacionadas à água. Os esgotos e excrementos humanos são as causas mais relevantes dessa deterioração da qualidade da água em países em desenvolvimento (VEGA *et al.*, 1996). Corpos hídricos que recebem despejo inadequado de resíduos podem apresentar uma variedade de compostos tóxicos como pesticidas metais pesados, e uma diversidade de outras substâncias ocasionando consequências sérias (VEGA *et al.*, 1996). A exposição humana seja ela ocupacional ou não, gera efeitos nocivos à saúde que podem ir desde dores de cabeça, náuseas, irritações cutâneas até sérias complicações como a reduções das funções neurológicas e hepáticas. Alguns trabalhos têm evidenciado efeitos genotóxicos à saúde, como câncer, defeitos congênitos e anomalias reprodutivas também têm sido relatados, o aumento de incidência de carcinomas gastrointestinais, de bexiga, anomalias reprodutivas e malformações congênitas tem sido fortemente relacionado a populações que vivem próximas a regiões onde o despejo é frequente (HOUK, 1992).

No Brasil, o início da pressão ambiental ocorreu em 1960 com o surgimento dos grandes empreendimentos hidrelétricos, o aumento populacional em regiões urbanas e a deterioração da qualidade da água em regiões próximas aos centros urbanos. Os inúmeros projetos de ocupação territorial, obras de engenharia e implantação de tecnologias ocasionaram graves conflitos em relação ao uso dos recursos naturais, provocando impactos ambientais, econômicos e sociais que passaram a fazer parte dos fatores limitantes do desenvolvimento urbano (TUCCI, 2001).

Quando se fala em fontes de abastecimento de água, o Rio de Janeiro passou toda sua história realizando grandes esforços na luta pela água e atualmente, a região metropolitana do Rio de Janeiro é abastecida pelas águas originadas no rio Guandu, considerada a maior estação de tratamento de água de produção contínua do mundo, com vazão de 43 m³/s de acordo o

“GuineesBook”, mas em relação aos canais de esgotos tanto sanitários quanto industriais, tem como ponto comum os rios, canais e córregos que permeiam a cidade desembocando em oceanos.

Em termos de coleta de esgotos e sistemas de drenagem, persiste na cidade do Rio de Janeiro uma série de estruturas e condições de operação que indicam o alto grau de interconexão entre os sistemas de esgotamento sanitário e de drenagem pluvial, o que contribui com a degradação ambiental e a vulnerabilidade desses sistemas de saneamento (PCRJ, 2001). Atualmente, sabe-se que a interconexão entre os sistemas de esgotos é uma das principais fontes de poluição dos corpos receptores nas cidades brasileiras, entretanto na maioria das vezes é negligenciada pelo poder público e pelas suas concessionárias (DIAS e ROSSO, 2011).

O estado do Rio de Janeiro é composto por um sistema hídrico, que inclui aproximadamente 250 rios, canais e complexos lagunares. A sua grandiosa costa litorânea, com cerca de 86 km encontra-se limitada ao leste pela baía de Guanabara, a oeste pela baía de Sepetiba e ao sul pelo Oceano Atlântico, e é composta por 72 praias (PCRJ, 2001). O sistema de esgotamento da Cidade do Rio de Janeiro pode ser considerado um bom exemplo, pois a vastidão da escala dos sistemas de saneamento implantados, aliados a escassez de recursos necessários para à sua operação e a consequente falta de manutenção adequada, além das dificuldades decorrentes das alternativas tecnológicas adotadas, associadas às especificidades da cidade, resultou em uma enorme complexidade e vulnerabilidade, na gestão das águas urbanas. No decorrer do processo de urbanização, inúmeras dificuldades de operacionalização dos sistemas de esgotamento sanitário e pluvial se acumularam e o despejo de esgoto sanitário se dá quase que em totalidade, nos corpos hídricos da cidade e sob diversas formas. Devido às restrições técnicas dos sistemas de esgotos, como a interconexão - situação indesejável que lança efluentes sanitários no sistema de drenagem pluvial, gera por consequência a contaminação deste sistema e de seus corpos receptores alterando os ecossistemas e submetendo as populações a riscos epidemiológicos (DIAS e ROSSO, 2011).

1.3 CONTAMINAÇÃO HÍDRICA E SAÚDE PÚBLICA

Hoje é muito comum a incorporação do termo saúde dentro das definições de saúde ambiental. As relações entre a saúde pública e a saúde dos oceanos estão em destaque, e são ocasionadas pelo crescimento populacional em regiões costeiras, principalmente em regiões tropicais e subtropicais que com isso, aumentam a vulnerabilidade socioambiental decorrente

das relações entre os desastres naturais que envolvem o oceano e a saúde (SANDIFER *et al.*, 2004).

No ano de 2012, a população mundial atingiu o número 7,2 bilhões e espera-se que em 2050 alcance um total de 9,6 bilhões de pessoas, sendo os países em desenvolvimento os principais responsáveis por este acréscimo (REGO FILHO, BRAGA e CURI, 2014). Nas regiões costeiras, os oceanos fornecem importantes fontes de proteína, qualidade de vida, recreação, além de ser parte integral das atividades econômicas em diversas localidades, entretanto, também pode ser fonte de vários agentes infecciosos presentes em hospedeiros marinhos, incluindo agentes bacterianos, virais e protozoários, resultam em doenças infecciosas em humanos (DEWAILLY, 2006).

Tratando-se de saúde pública, a contaminação de corpos d'água por material fecal, é uma das principais causas de doenças entéricas veiculadas à água no mundo, sendo responsáveis pela morte de aproximadamente 2 milhões de crianças por ano (WHO, 2007). Atualmente, essa situação tem se agravado devido à contaminação hídrica frequente, por patógenos emergentes como *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium*, *Escherichia coli* O157:H7, entre outros. Além da contaminação por dejetos de origem humana que atualmente encontra-se bem documentada, animais domésticos e agrícolas também apresentam e disseminam muitos patógenos, como *Campylobacter jejuni*, *Giardia* spp., *Salmonella* e o Vírus da hepatite A. O risco de contaminação a partir de patógenos presentes em fezes destes animais é considerado em geral, inferior em relação aos patógenos presentes em fezes humanas, e isso provavelmente seja explicado devido ao fato de que alguns patógenos, por exemplo, vírus, são altamente específicos em relação aos seus hospedeiros, entretanto são poucos os estudos que medem o risco de infecções zoonóticas por material fecal (DEWAILLY e KNAP 2006).

A exposição da população, principalmente crianças e idosos ou pessoas com baixa resistência, a águas contaminadas, pode acarretar no desenvolvimento de doenças ou infecções causadas por bactérias, vírus ou protozoários, causando vários desfechos que vão desde uma infecção assintomática até a morte, dependendo da interação entre o patógeno e o hospedeiro. A interação em geral, está relacionada a fatores como a infectividade do patógeno, ou seja, a quantidade capaz de iniciar uma infecção e de características do hospedeiro, como imunidade, sexo, estado nutricional, resposta imunológica, modo de vida, condição socioeconômica, histórico de doenças crônicas, bem como da natureza do patógeno (GERBA, 2000) e a virulência do micro-organismo. Também pode ocorrer o desenvolvimento de doenças crônicas e agudas após exposição a esses patógenos (WESTRELL, 2004).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, são relatados aproximadamente de 3 a 5 milhões de casos de cólera no mundo, que resulta em aproximadamente 100.000 mortes por ano. Países africanos foram responsáveis por quase todos os casos de cólera notificados entre 2000 e 2009. Ainda em 2009, foram relatados 217.333 casos de cólera na África, o que correspondeu à maioria de todos os casos notificados mundialmente (OMS, 2011). A carga global de febre tifoide tem sido de aproximadamente 10-100 casos por 100.000 pessoas por ano na Ásia, África e América latina. Entretanto, as regiões centro-sul e sudeste da Ásia apresentam níveis superiores a 100 casos por 100.000 pessoas (CRUMP, LUBY e MINTZ, 2004).

Dessa forma, a implantação e utilização de indicadores de desempenho dos sistemas de saneamento podem auxiliar na elaboração de índices ecológicos de eficiência para os ecossistemas urbanos contribuindo para o monitoramento e controle ambiental, que são ações indispensáveis em qualquer conjunto de intervenções que visem à saúde ambiental (DIAS e ROSSA, 2011).

1.4 BALNEABILIDADE

A balneabilidade é caracterizada por um conjunto de medidas destinado à avaliação do risco de contaminação das águas, sendo definida como “a medida das condições sanitárias das águas destinadas à recreação de contato primário, sendo este entendido como um contato direto e prolongado com a água (natação, mergulho, esqui-aquático, etc.) no qual, a possibilidade do banhista ingerir quantidades apreciáveis de água é elevada”. De acordo com a Resolução N°274/2000 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), a avaliação da condição de balneabilidade das praias é feita através da medição das concentrações de um ou mais organismos indicadores presentes nos resíduos humanos ou de animais de sangue quente, sendo os valores empregados na classificação do meio como próprio ou impróprio para balneabilidade. Esta resolução ainda determina que os micro-organismos indicadores de poluição fecal sejam o grupo dos coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e enterococos (BRASIL, 2000). De acordo com o INEA (Instituto Estadual do Ambiente), no estado do Rio de Janeiro, estão sendo monitoradas aproximadamente, 120 praias abrangendo um total de 15 municípios. O monitoramento é feito semanalmente em praias que variam de comportamento durante o tempo, e mensalmente, em praias onde o comportamento apresenta-se estável ao longo do tempo. O número de estações de amostragem pode variar em relação à extensão da praia, assim como a definição das estações que está relacionada à proximidade e o distanciamento de fontes poluidoras. As amostras são coletadas a 15 cm da superfície da água,

na profundidade média de um metro e levadas ao laboratório do INEA, onde serão analisadas em relação à presença de coliformes totais e *E. coli*, entretanto, também pode haver observações de campo, que é caracterizada pela identificação visual, de fontes de poluição que possam comprometer a qualidade das águas. Outras metodologias de avaliação também podem ser implantadas, tais como tendências de longo prazo e metodologias para análises de séries temporais, cujos objetivos visam, principalmente, acompanhar o comportamento das praias quando da realização de intervenções (INEA, 2012).

Para avaliação anual, de um modo amplo, o INEA utiliza as categorias ótima e muito boa, praias próprias, regular, má, péssima e impróprias para enquadrar as praias avaliadas. A divulgação desses resultados é feita por meio de boletins semanais (para as praias monitoradas semanalmente) e encaminhados para a imprensa, além disso, os dados elaborados e analisados são publicados na forma de relatórios; que se encontram disponíveis para consulta na Biblioteca (INEA, 2012).

1.5 BIOINDICADORES DE POLUIÇÃO FECAL

Como a detecção de agentes patogênicos em uma amostra de água é difícil em função da baixa concentração e da diversidade destes organismos, recomenda-se a adoção de organismos indicadores de contaminação fecal (DUARTE, 2011). Um indicador ideal de contaminação fecal deve ser um micro-organismo não patogênico capaz de ser detectado e quantificado por meio de técnicas simples e rápidas e de apresentar também, a capacidade de sobreviver no meio ambiente, assim como, àqueles potencialmente patogênicos (SCOTT *et al.*, 2002). A avaliação da qualidade de água é um componente essencial dos programas para a proteção da saúde humana de monitoramento. Indicadores microbiológicos como coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E. coli* são os indicadores utilizados no monitoramento da qualidade da água, de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2005).

O grupo dos coliformes totais é constituído por grande grupo de bactérias isoladas a partir de amostras de água e de solos poluídos ou não, bem como nas fezes de seres humanos e de outros animais de sangue quente (MACEDO, 2005). Este grupo foi utilizado como indicador de contaminação da água no passado e ainda de acordo com Sperling (2007), em alguns locais, ainda continuam sendo utilizados, muito embora bactérias de origem não fecal também façam parte deste grupo. Segundo o autor, o grupo dos coliformes totais poderia ser classificado como sendo constituído por bactérias de origem ambiental pelo fato de também representarem o grupo

de organismos de vida livre. Por tal razão, não são considerados indicadores de contaminação de origem fecal confiáveis.

A avaliação de bactérias fecais é realizada em temperatura mais elevada, objetivando a supressão de bactérias de origem não fecal, por esta razão são denominadas de bactérias termotolerantes (SPERLING, 2006). De acordo com a resolução CONAMA 274/2000, os coliformes termotolerantes são classificados como bactérias que pertencem ao grupo dos coliformes totais caracterizadas por apresentar a enzima β -galactosidase e por fermentar a lactose com produção de gás em 24 horas a 44-45°C em meios contendo sais biliares e outros agentes tenso-ativos como propriedades inibidoras semelhantes. Esses organismos estão presentes tanto em fezes humanas quanto de outros animais e também em solos, plantas ou quaisquer efluentes contendo matéria orgânica.

Dentro deste grupo encontra-se a *E. coli* das quais muitos pesquisadores sugerem sua utilização exclusiva como indicador de contaminação fecal, devido sua exclusividade em relação à origem e pela facilidade de diferenciação em relação aos outros membros deste grupo. Dessa forma, a presença de coliformes termotolerantes em águas é menos eficiente em relação à enumeração direta de *E. coli*, porém, muito mais significativa do que a presença de coliformes totais (MACEDO, 2005).

1.6 RASTREAMENTO DE FONTES DE CONTAMINAÇÃO MICROBIANA

O conceito de indicador microbiológico originalmente definido para avaliar a qualidade da água está baseado na presença ou ausência de bactérias ou de grupos de bactérias indicadoras em ambientes aquáticos (MACEDO, 2005). Entretanto, esses indicadores apresentam limitações quando se trata de discriminar a origem da contaminação (fezes humanas, de animais domésticos, silvestres, aves e outros), o que é considerado um fator relevante na implementação de medidas efetivas de gerenciamento e remediação de águas superficiais (MACEDO, 2005). Outra limitação apresentada por esses indicadores é a sua utilização em ambientes tropicais, pois esses microrganismos utilizados como indicadores possuem a capacidade de sobreviver em sedimentos, podendo ser encontradas em áreas distantes da atividade humana. Além disso, muitos métodos de detecção estão sujeitos a resultados falsos positivos (HAZEN e TORANZOS, 1990). Hardina e Fujioka (1991) demonstraram que no Havaí, coliformes termotolerantes depositados em solos foram capazes de sobreviver e serem transportados para corpos de água através de águas subterrâneas. Assim, a sua presença na coluna de água poderia não necessariamente estar associada a contaminação fecal recente. Além disso, estudos

laboratoriais têm demonstrado que os coliformes apresentam períodos de sobrevivência superiores a três anos em ambientes marinhos, além de diferentes taxas de sobrevivência o que levantou questionamentos na interpretação dos resultados de avaliações da qualidade da água (BYAMUKAMA et al; 2000).

No início dos anos 80, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency - USEPA) recomendou o uso de *Enterococcus* spp. para o monitoramento da qualidade das águas marinhas com base em pesquisas que indicavam a superioridade desses organismos quando comparado aos coliformes, uma vez que eles estariam fortemente associados somente ao material fecal humano e seriam mais resistentes a ambientes salinos (USEPA, 1986). Por outro lado, apesar dessas vantagens que favorecem seu uso como indicador, pesquisas vêm comprovando que esse grupo também apresenta limitações como a sobrevivência em solos tropicais, presenças em outros reservatórios, além da baixa relação com organismos patogênicos como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Cryptosporidium* e *Giardia* spp., enterovírus humanos incluindo adenovírus e colifagos. Dessa forma, apresentam as mesmas limitações dos representantes dos coliformes nas análises de qualidade da água apresentando também resultados questionáveis (WESTRELL, 2004).

Nas últimas décadas, devido aos questionamentos levantados em relação a eficácia dos indicadores microbianos de poluição hídrica estabelecidos em legislação, metodologias de Rastreamento de Fonte Microbiana (RFM) vem ganhando espaço, pois tais metodologias tornam possível a discriminação entre fontes de poluição fecal humanas de fontes fecais de outros animais (SANTO DOMINGO *et al.*, 2007). Os métodos microbiológicos de rastreamento de fonte microbiana estão baseados na premissa de que micro-organismos selecionam diferentes sistemas intestinais, devido a critérios como as diferenças na dieta e no sistema digestivo de hospedeiros, e tal metodologia não se restringe somente a avaliação de contaminação fecal, mas também pode ser aplicada em outras linhas de pesquisa, como segurança alimentar e microbiologia agrícola e veterinária (SANTO DOMINGO *et al.*, 2007). Em países desenvolvidos, as fontes de contaminação não caracterizadas são as maiores responsáveis pela poluição fecal dos recursos hídricos (SANTO DOMINGO *et al.*, 2007), nos Estados Unidos, a RFM foi incorporada tornando-se prioridade em virtude do requerimento federal de desenvolvimento e execução da quantidade máxima de poluente (TMDL - *total maximum daily load*) que um determinado corpo hídrico pode receber, conservando os padrões de qualidade já estabelecidos. Além disso, a TMDL também é utilizada para avaliar a poluição de fontes pontuais oriundas de estações de tratamento de esgoto ou efluentes industriais, que já apresenta legislações específicas bem definidas e fontes não pontuais, provenientes da

agricultura, reflorestamento, animais silvestres e escoamento dos solos urbanos, que são de complicado controle e responsáveis na maioria dos casos, por alterações na qualidade da água (SANTO DOMINGO *et al.*, 2007).

As metodologias de RFM em geral, podem ser divididas em duas técnicas que são as técnicas dependentes de cultivo e as técnicas independentes de cultivo. Nas técnicas dependentes de cultivo há a necessidade de se realizar uma biblioteca de origem ou um banco de dados do hospedeiro que é caracterizado como um conjunto de isolados bacterianos, ou de vírus de amostras de fezes padrões de origem conhecida para ser utilizada como fonte de discriminação e essa técnica baseia-se em uma comparação entre os perfis das bibliotecas do banco de dados em relação aos isolados ambientais. A maior parcela das técnicas dependente de biblioteca necessita de cultivo acrescentando assim cada vez mais isolados ambientais como padrão para identificação e rastreamento (STEWART, SANTO DOMINGO e WADE, 2007). As técnicas independentes de cultura estão baseadas na segmentação de marcadores genéticos de acordo com a individualidade microbiana que cada sistema gastrointestinal possui, influenciada por vários fatores, incluindo a anatomia, fisiologia, alimentação servindo tanto para humanos quanto para outros animais. Esta metodologia inclui testes químicos como presença de cafeína, esteróis e estanois fecais (SUPRIHATIN *et al* , 2003), pesticidas e policíclicos (STANDLEY, KARPLAN e SMITH, 2000) e testes moleculares como a reação em cadeia de polimerase (*Polymerase Chain Reaction* -PCR) que utiliza um grupo ou um único gene como marcador molecular para discriminação de hospedeiros específicos agrupando vantagens como especificidade, sensibilidade, rapidez, transportabilidade e principalmente economia (SIMPSON, SANTO DOMINGO e REASOVER, 2002).

No Brasil, as pesquisas na área de RFM ainda são escassas, dessa forma, o desenvolvimento e seleção de novos bioindicadores utilizando metodologias mais sensíveis capazes de discriminar as diferentes fontes responsáveis pela contaminação fecal em corpos hídricos é extremamente relevante a fim de assegurar a qualidades das águas e evitar consequentemente danos ao meio ambiente e à saúde da população (FIELD e SAMADPOUR, 2004).

1.7 DOMÍNIO Archaea

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

O filo Euryarchaeota apresenta organismos com fisiologias bem diferentes. Neste filo são encontrados organismos metanogênicos, halófilos, redutores de sulfato e hipertermófilos. As espécies metanogênicas são organismos obrigatoriamente anaeróbios e libera gás metano (CH₄) como resíduo metabólico. São encontradas em ambientes com ausência de oxigênio e abundância de matéria orgânica, como brejos, açudes, lagos, sedimentos marinhos e rúmen de bovinos. Elas retiram hidrogênio e gás carbônico desses ambientes e os utilizam em seu metabolismo. Vivem como simbioses de uma grande variedade de protozoários também anaeróbios, convertendo produtos finais de fermentação em gás metano ou CO₂. São de grande importância no ambiente no qual vivem pela alta eficiência de sua enzima hidrogenase, que mantendo uma baixa pressão parcial H₂ – para que a metanogênese ocorra – permite que os demais organismos fermentadores façam reoxidação do NADH o que corresponde a um maior rendimento de ATP e um aumento de biomassa. Esse fenômeno é conhecido como “transferência de hidrogênio interespecífica” (CARDOSO *et al.*, 2003). Dentre os halófilos, existem representantes extremos que habitam lagos ricos em carbonato de sódio, ambientes caracterizados por grandes concentrações de sal e extremos de pH.

O gênero *Methanobrevibacter* pertence a ordem Methanobacteriales dentro do domínio Archaea. Este gênero possui 15 espécies conhecidas que habitam o trato intestinal animal, plantas em decomposição e lodo anaeróbio de estações de tratamento de esgoto. As espécies de *Methanobrevibacter* incluem *M. ruminantium* (ruminantes); *M. arboriphilus* (plantas em decomposição); *M. cuticularis*, *M. curvatus* e *M. filiformis* (intestino de cupim); *M. oralis* (cavidade bucal humana); *M. gottschalkii* e *M. thauerii* (intestino de cavalo e porco); *M. woesei* (intestino de rato e ganso); *M. acididurans* e *M. wolinii* (intestino de carneiro); *M. boviskoreani*

e *M. millerae* (rumem bovino); *M. olleyae* (rumem ovino) e *M. Smithii* (intestino humano) (LAI *et al.*, 2004). Estudos comprovam que poucas espécies ocorrem em mais de um organismo, como *M. ruminantium* que tem sido encontrado em outros ruminantes, além de bovinos e *M. gottschalkii* e *M. thaueri* que vem sendo encontrados em cavalos e porcos. A espécie *M. smithii* é a única espécie conhecida que coloniza especificamente o intestino grosso e o trato vaginal humano e por esse motivo pode ser utilizado como indicador de poluição fecal humana no ambiente (LAI *et al.* 2004).

Há aproximadamente 40 anos, Nottingham e Hungate (1968), após observações isolaram um micro-organismo identificado como *M. smithii* a partir de fezes humanas, utilizando meio de cultura não seletivo e uma atmosfera anaeróbica composta por 80% de H₂ e 20% de CO₂. Alguns anos depois, Miller e colaboradores (1986) também descreveram o isolamento de *M. smithii* em fezes de adultos saudáveis, utilizando culturas anaeróbicas enriquecidas com atmosfera anaeróbica, e em 1985, esses mesmos pesquisadores encontraram uma segunda metanogênica também isolada de fezes humanas, denominada *Methanosphaera stadtmanae*. Mais recentemente em 1994, Ferrari e colaboradores isolaram uma terceira metanogênica, *M. oralis* da placa subgengival de indivíduos saudáveis (FERRARI *et al.*, 1994).

A espécie *M. smithii* apresenta-se sob a forma de cocobacilos, possui temperatura e faixa de pH ótimos de crescimento de 38°C e 6.9-7.4, respectivamente. Ela é capaz de colonizar o intestino grosso e o trato vaginal humano (LAI *et al.*, 2004) e segundo Ufnar e colaboradores (2006), *M. smithii* é encontrado no trato gastrointestinal de aproximadamente um terço dos indivíduos que residem nos Estados Unidos e Reino Unido, podendo compreender até 10% de todos os anaeróbios encontrados no intestino de adultos saudáveis e altamente prevalente em esgoto misto. Entretanto, estudos realizados demonstraram através de otimizações no protocolo de extração de DNA de fezes humanas, os resultados obtidos são mais satisfatórios, onde a todos os indivíduos testados apresentaram arqueas em seu organismo. Dentre os 650 indivíduos testados foi possível detectar uma elevada prevalência de *M. smithii* (95,5%) e *M. stadtmanae* (29,4%) no intestino humano (DRIDI, RAOULT D e DRANCOURT, 2011)

Pensando nisso, uma PCR convencional foi desenvolvida para detectar a presença de *M. smithii* através do gene *nifH*, uma região não funcional da enzima nitrogenase, exclusivo de arqueas metanogênicas (OHKUMA *et al.*, 1999; UFNAR *et al.*, 2006). Além disso, o gene *nifH* apresenta diferenças nas sequências de arqueas metanogênicas, o que o torna um bom alvo para a discriminação filogenética das espécies. Em seu trabalho, Ufnar *et al.* (2006) relatou ter encontrado um fragmento de aproximadamente 222 pb em 29% (20/70) das amostras fecais de humanos e em 93% (25/27) de amostras de esgoto analisadas. Devido à sua especificidade, em

relação ao hospedeiro humano, o *M. smithii* foi considerado um alvo promissor como indicador de poluição fecal humana no meio ambiente.

1.8 PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

É indiscutível que as técnicas de biologia molecular foram um dos maiores passos dentro da área de pesquisas no século XX. O desenvolvimento da técnica de PCR proporcionou grandes avanços, como o sequenciamento de genomas a expressão de genes em sistemas recombinantes, o estudo de genética molecular, a determinação rápida da paternidade e o diagnóstico rápido de doenças infecciosas. Uma inovação tecnológica a partir da PCR vem ganhando força dentro dos laboratórios de pesquisa e clínicas. Essa técnica chamada de PCR em tempo real permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida, em relação à PCR que apresenta somente resultados qualitativos (BRUCE, 1999).

Para que ocorra a amplificação de DNA a partir da técnica da PCR convencional um conjunto de fatores é necessário, como a ausência de inibidores, a quantidade de DNA, o estado de degradação do DNA, entre outros. Uma limitação da reação PCR tradicional está na característica qualitativa desta técnica. Dessa forma, para tornar possível o monitoramento simultâneo da qualidade e também da quantidade do DNA amplificado, desenvolveu-se uma técnica variante chamada de PCR em tempo real. Esta técnica descrita por Higuchi e colaboradores (1993) consistia em um sistema em que uma câmera de vídeo era acoplada a fim de monitorar a reação de PCR em todos os ciclos, dessa forma, era possível detectar o aumento de fluorescência durante a reação que ocorria a partir da ligação do brometo de etídio às moléculas de DNA de dupla fita recém-sintetizadas.

A técnica de PCR em tempo real é semelhante à técnica de PCR convencional, sua principal diferença está na possibilidade de quantificação do DNA amplificado em cada ciclo em tempo real. Nessa técnica, as fases de amplificação, detecção e quantificação são automatizadas, simultâneas e em tempo real (HEID *et al.*, 1996). O sucesso da técnica possibilitou seu aperfeiçoamento, como por exemplo, o desenvolvimento de sondas de oligonucleotídeos e a atividade exonuclease 5' -3' da Taq DNA. Atualmente, existe uma grande variedade de plataformas de instrumentação, entretanto, a maior parte é composta por um termociclador com um sistema óptico que capta a excitação e recolhe a emissão da fluorescência, e um computador com software próprio para o recolhimento e análises dos dados no final da reação (MACKAY *et al.*, 2007).

A técnica de PCR em tempo real segue o princípio geral da PCR convencional, dessa maneira, também apresenta as três fases características que são: a fase de crescimento exponencial, fase de crescimento linear e fase estacionária. Os compostos fluorescentes que são adicionados na reação geram sinais que são proporcionais à quantidade de produto que foi amplificado durante as fases e que podem ser demonstrados graficamente. A fase exponencial de crescimento é a melhor fase para estudar a reação, pois é possível registrar a eficiência em sua fase mais elevada, uma vez que a relação entre a quantidade de produto e do input de DNA é mais consistente. Dessa forma, todos os dados captados de fluorescência são em geral, recolhidos desde o início do processo de amplificação (PELT-VERKUIL, VAN-BELKUM e HAYS, 2008).

A análise dos produtos amplificados pela PCR em tempo real é realizada através da utilização de compostos fluorescentes, e uma variedade de protocolos tem sido desenvolvidos para permitir a detecção dos produtos da PCR, ao longo da amplificação. Os métodos químicos de fluorescência utilizados para PCR em tempo real são hoje em dia diversificados, recorrendo todos eles a um composto fluorescente cujo sinal seja passível de ser detectado por um laser do equipamento ao longo do processo. De acordo com a literatura, estes métodos agrupam-se de acordo com o tipo do composto fluorescente e respectivo comportamento durante o processo. Atualmente, existem dois grandes grupos de compostos que são os dos corantes intercalantes e das sondas de sequência específica (MACKAY *et al.*, 2007; PELT-VERKUIL, VAN-BELKUM e HAYS, 2008).

Os corantes intercalantes são fluorocromos que não apresentam especificidade em relação a uma sequência particular de DNA, dessa forma, se intercalam na dupla cadeia de qualquer produto da PCR permitindo a sua detecção (OLIVEIRA, 2009). Entretanto, a sintetização eficiente dos iniciadores permite um aumento na especificidade da detecção e quantificação por este método. Neste campo, a primeira tecnologia desenvolvida foi patenteada pela Molecular Probes®, Inc, em 1990, sendo denominada de SYBR® Green. Posteriormente foram desenvolvidas outras moléculas: a LCGreen® Plus (Idaho Technology) e a EvaGreen® (BiotiumInc), (OLIVEIRA, 2009).

As sondas de sequência específica são oligonucleotídeos que possuem um fluorocromo específico para uma dada sequência de DNA tornando-a capaz de detectar somente a dada sequência. Esta tecnologia permite que o resultado possa ser monitorado em tempo real, através do computador da plataforma de instrumentação. Atualmente, as sondas utilizadas na PCR, em tempo real, variam em função do fabricante e da tecnologia aplicada; as mais utilizadas são as sondas *TaqMan* (5' exonuclease), *fluorescent resonance energy transfer* (FRET), Molecular

Beacons e Scorpion, sendo que cada tipo de sonda promove a detecção dos fragmentos amplificados de forma diferente (GLYNN *et al.*, 2006).

1.9 RELAÇÕES DO MONITORAMENTO DA QUALIDADE DA ÁGUA COM A VIGILÂNCIA SANITÁRIA E A SAÚDE PÚBLICA

De acordo com a Lei 8.080/90 e com a CARTILHA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (2002) entende-se por Vigilância Sanitária um conjunto de ações capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente. Dentre essas ações, destacamos aquelas voltadas à saúde ambiental e em continuidade a isto, sua interferência na preservação do meio ambiente no tocante à manutenção da qualidade dos recursos hídricos. As doenças veiculadas através da água têm sido apontadas constantemente como um problema nos diversos tempos históricos da humanidade. A destinação dos resíduos produzidos pelas populações humanas, como por exemplo, os resíduos fecais sempre estiveram presentes entre os problemas de saúde pública (BARCELLOS e QUITÉRIO, 2006).

Em relação ao controle da qualidade das águas de recreação foram criados instrumentos para avaliar a evolução da qualidade das águas, em relação aos níveis estabelecidos para a balneabilidade, de acordo com a Resolução CONAMA nº 274, de 29 de novembro de 2000, que classifica os sistemas hídricos em 13 classes de acordo com o tipo e usos de suas águas. Apesar de essa definição apresentar limitações, é considerado um ponto de referência para a fiscalização e gerenciamento dos recursos hídricos (PEREIRA, 2004). Os componentes dos sistemas de abastecimento de água (tipo de manancial, estação de tratamento e pontos de amostragem) estão sendo cadastrados pelo Sistema de Informação do Programa de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (SISAGUA), de responsabilidade da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. O SISAGUA permite a recuperação de dados sobre o abastecimento de água de modo que se produzam periodicamente relatórios sobre o funcionamento do sistema e a qualidade da água, incluindo as chamadas soluções alternativas de abastecimento. A Agência Nacional de Águas (ANA) mantém um programa de monitoramento da qualidade da água com postos de monitoramento situados nos maiores rios do Brasil, o que permite a utilização dessas informações em um sistema integrado. O desenvolvimento de um sistema para a determinação da qualidade da água através da detecção e monitoramento de contaminação fecal animal e humana certamente irá colaborar para o aprimoramento dos serviços de vigilância ambiental e epidemiológica, que interferem na saúde da população.

2. OBJETIVOS

GERAL

O desenvolver de um sistema inovador para a determinação da qualidade da água através da detecção e monitoramento de contaminação fecal humana de águas de recreação costeira no Estado do Rio de Janeiro utilizando o biomarcador molecular hospedeiro específico para *Methanobrevibacter smithii*.

ESPECÍFICOS

- Avaliar os parâmetros físico-químicos nas amostras de águas de recreação costeira
- Detectar e determinar as concentrações de coliformes totais e *Escherichia coli*
- Caracterizar as comunidades *Methanobrevibacter* spp. por meio de bibliotecas do gene *rrs* do 16S rRNA
- Detectar e quantificar o gene *nifH* de *Methanobrevibacter smithii* pela qPCR

3. METODOLOGIA

3.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram selecionados 13 pontos de coleta de águas de recreação costeiras no estado do Rio de Janeiro (Figura 1), sendo 10 no município do Rio de Janeiro, 02 em Araruama, 01 em Niterói.

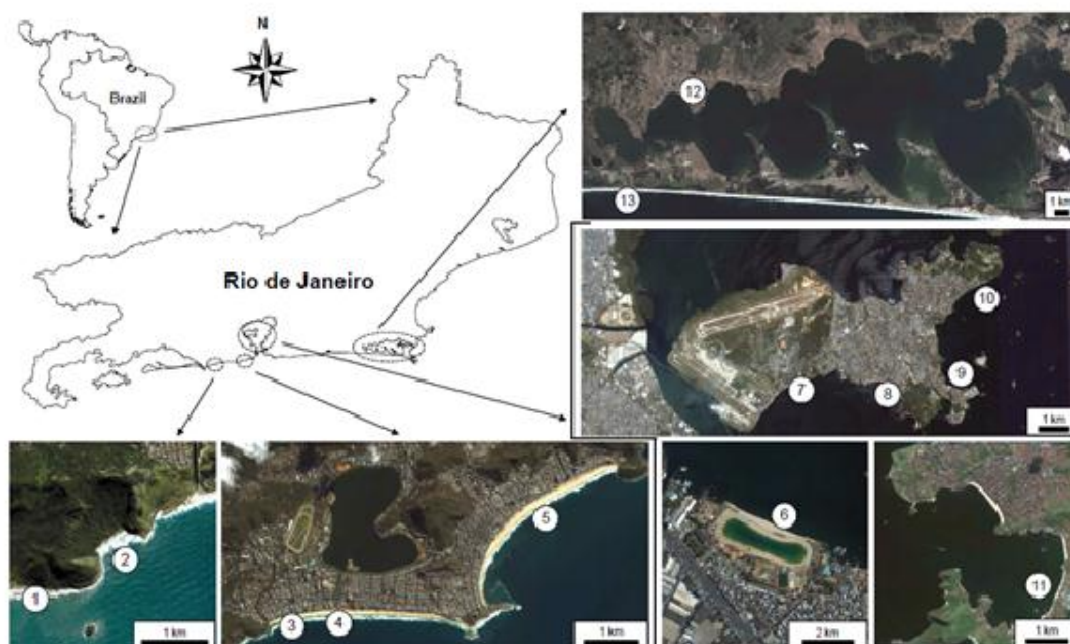


Figura 1. Pontos de coleta: (1) Prainha, RJ ($23^{\circ}04'08.97''S, 43^{\circ}50'57.77''W$), (2) Prainha, língua negra, RJ ($23^{\circ}04'08.97''S, 43^{\circ}50'57.77''W$), (3) Praia Leblon, RJ ($22^{\circ}98'75.13''S, 43^{\circ}22'21.1''W$), (4) Canal Leblon, RJ ($22^{\circ}98'68.32''S, 43^{\circ}21'54.74''W$), (5) Praia de Copacabana, RJ ($22^{\circ}58'31.2''S, 43^{\circ}11'12.6''W$), (6) Piscinão de Ramos, RJ ($22^{\circ}50'22.8''S, 43^{\circ}14'59.9''W$), (7) Praia São Bento, RJ ($22^{\circ}82'31.62''S, 43^{\circ}18'97.7''W$), (8) Praia da Bica, RJ ($22^{\circ}81'93.44''S, -43^{\circ}20'05.42''W$), (9) Praia da Engenhoca, RJ ($22^{\circ}82'13.22''S, 43^{\circ}17'05.87''W$), (10) Praia da Guanabara, RJ ($22^{\circ}79'07.42''S, 43^{\circ}16'50.29''W$), (11) Praia São Francisco, Niterói ($22^{\circ}92'67.77''S, 43^{\circ}10'42.79''W$), (12) Praia Seca, Araruama ($22^{\circ}88'81.95''S, 42^{\circ}34'00.43''W$), (13) Praia da Pontinha, Araruama ($22^{\circ}93'94.24''S, 42^{\circ}28'16.78''W$).

Foram coletadas duas alíquotas de 2,5 litros de águas superficiais totalizando 5 litros de cada praia selecionada neste estudo. Um litro foi reservado para realização das análises físico-químicas e microbiológicas. Os outros quatro litros foram filtrados, imediatamente após a coleta, em uma unidade filtradora Sterivex-GS de $0,22\mu m$, com auxílio de uma bomba peristáltica com fluxo de 80mL por min. Após a filtração, os filtros foram lavados com 1mL de tampão fosfato-salino (Phosphate Buffered Saline – PBS), homogeneizados, transferidos para microtubos e conservados a $-20^{\circ}C$ para posterior extração de DNA.

3.2 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS

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

3.3 CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS GÊNICAS

3.3.1 Extração do DNA genômico

A técnica utilizada para a extração do DNA foi uma versão modificada de protocolos anteriormente descritos (OGRAM *et al.*, 1987; GROBOKOPF, JANSSEN, e LIESACK, 1998). Os microtubos contendo os pellets das amostras foram ressuspensos em 1mL de PBS, centrifugados a 5000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante desprezado (2 vezes). O pellet foi então ressuspensado novamente em 1mL de PBS e submetido ao choque térmico freeze-thaw: -70°C por 2 minutos; 65°C por 2 minutos (3 vezes). Posteriormente, foram acrescentados 125µL de lisozima (5mg/ml) e incubado a 37°C por 2 horas. Seguindo, foi acrescentado SDS 2%, homogeneizado e incubado a 60°C durante 10 minutos. Foram acrescentados aproximadamente 300µg de Glass bead (0.1 mm-vidro ou zircão) e colocado no aparelho mini-beadbeater (Biospec Products) por 80 segundos à velocidade máxima (3 vezes) e centrifugado a 13000 rpm por 10 minutos e recolhido o sobrenadante. O sobrenadante foi recolhido para novos microtubos de 2mL e foram acrescentados 150 µL de solução CTAB/NaCl (10% CTAB/0,7M NaCl). As amostras foram homogeneizadas em vortex e incubadas à 65°C por 30 min e posteriormente armazenadas em freezer a -20°C overnight. Em seguida foram acrescentados de 80 µL de PBS com 1,5% BSA e 700 µL de fenol saturado com TE (pH = 7,5), sendo gentilmente misturados por 10 min e posteriormente centrifugadas a 8.000 rpm por 10 min. Após constatação da lise celular, com a formação de 3 fases, o sobrenadante foi recolhido para um novo tubo e foram acrescentados 800 µL de clorofórmio/isoamílico (24:1), agitando manualmente por 10 min. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min a 10°C. Foram acrescentados 250 µL de acetato de amônio (3 M) e as amostras foram colocadas no gelo por 15 min. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi recolhido para novo tubo e foram acrescentados 900 µL de isopropanol, agitando manualmente e incubando as

amostras a -20°C overnight. As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e foram acrescentados 800 µL de etanol a 70 %, para lavagem do pellet por inversão. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram deixadas secando de 10 a 30 min. As amostras foram suspensas em água ultrapura Gibco® (DNase&RNase-free, INVITROGEN). A purificação do DNA foi realizada com Kit DNeasy Blood&Tissue (QIAGEN), de acordo com protocolo descrito no manual do fabricante. Em seguida o DNA foi quantificado em equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer (INVITROGEN) conforme o manual do fabricante.

Foi realizada eletroforese em gel de agarose após a extração e purificação do DNA para verificar a integridade do DNA genômico. O gel foi preparado com 1% de agarose (SIGMA-ALDRICH) a 70 volts por 50 minutos em tampão Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE). Foi submetida também à corrida eletroforética, o padrão de peso molecular (100 pb DNA ladder). A coloração do gel foi realizada com solução de brometo de etídio (0,3 ng/mL) e analisada através do sistema de vídeo documentação Image Quant 300 (GE Healthcare).

3.3.2 Amplificação do DNA pela PCR

A mistura para a PCR totalizou o volume de 50 µL, contendo 0,5 µM de cada iniciador (Tabela 1). Os genes alvo, sequências dos iniciadores e as condições estão descritos na respectiva tabela. Também compõem a mistura: solução tampão 1X (20 mM Tris-HCl; 50 mM de cloreto de potássio (KCl)); 1,5 a 2,0 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂); 0,2 mM de cada desoxiribonucleotídeo trifosfato (dNTPs – dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 2,5 U de *Taq* DNA Polimerase Platinum (Life Technology); 5% de dimetilsulfóxido (DMSO); aproximadamente 25 ng do DNA da amostra e água Gibco® completando o volume. A amplificação foi realizada em termociclador *Mastercycler EP* (EPPENDORF). Como controle da reação, para avaliar a ausência de DNA contaminante na mistura, foi feita a substituição do DNA da amostra por 5 µL de água Gibco®. Como controle positivo da reação, foram adicionados 5 µL de DNA referência de *Methanobrevibacter smithii* (DSM 11975), que foram fornecidos pela Coleção Alemã de Microrganismos e culturas de células (DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) e como controle negativo, foi utilizada a cepa de *Klebsiella pneumoniae* (ATCC BAA-1706).

Após a PCR, a eletroforese foi realizada com a finalidade de observar os produtos gerados na amplificação. O gel foi preparado com 1% de agarose (SIGMA-ALDRICH) a 70

volts por 50 minutos em tampão Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE). A coloração do gel foi realizada com solução de brometo de etídio (0,3 ng/mL). 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). Após a confirmação da amplificação, os produtos foram purificados utilizando kit *QIAquick® PCR Purification* (QIAGEN), de acordo com o manual do fabricante e quantificado em pelo equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer (INVITROGEN) também conforme as especificações do fabricante.

Tabela 1. Iniciadores e condições de PCR convencional

Iniciadores /Sequência (5' -3')	Programa	Alvo/ Produto	Referência
MET105f	95°C	5min. 16S rRNA	
TGGGAAACTGGGGATAATACTG	92°C	} 1min. <i>Methanobrevibacter</i> 30 s. spp. 1min. 6min. 282 bp	UFNAR et al, 2006
MET386r	55°C 35x		
AATGAAAAGCCATCCCGTTAAG	72°C		
	72°C		
Mnif342F	95°C	5min.	
AACAGAAAACCCAGTGAAGA	92°C	} 1min. <i>nifH/ M. Smithii</i> 30s. 1min. 222bp 6min.	UFNAR et al, 2005
Mnif363R	58°C 45x		
GACGTAAAGGCACTGAAAAACC	72°C		
	72°C		

3.3.3 Clonagem dos produtos de PCR para as bibliotecas

Os produtos de PCR purificados obtidos a partir da amplificação do gene 16S rRNA para *Methanobrevibacter* dos 13 ambientes coletados foram ligados ao vetor de clonagem PGEM-T® Easy (Promega®) (figura2) com T4 DNA ligase de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos foram clonados utilizando o kit comercial pGEM-T Easy Vector System I (Promega®). A mistura de cada reação apresentou um total de 11 µL, composta por 50ng de vetor pGEM-T, produto de PCR (aproximadamente 20ng de DNA), 3 unidades de enzima T4 DNA ligase e tampão de reação (60mM Tris-HCl pH7,8, 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2Mm ATP, 10% polietilenoglicol).

Antes de realizar as transformações, todas as reações de ligação foram dialisadas. O mix de reação acondicionado em microtubo foi colocado em um beker com água corrente, onde permaneceu por 2 horas em temperatura ambiente. Decorridas às 2 horas, os microtubos foram incubados a 4°C overnight. No dia seguinte, todo o volume das ligações foi transferido para

membranas (Milipore 0,025 μ m, Type VS), onde ficaram em contato com água destilada estéril por aproximadamente 2 horas.

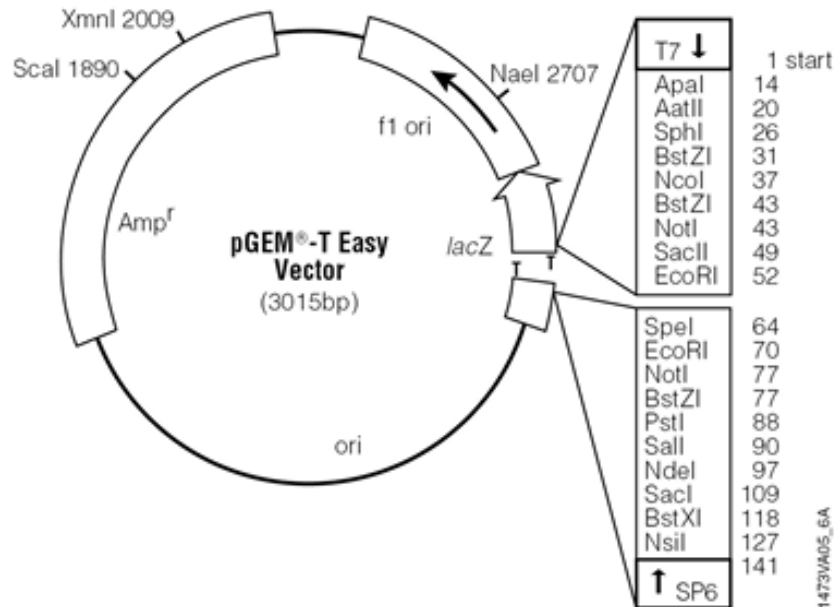


Figura 2: Mapa do vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega®).

3.3.4 Transformação das células competentes através de eletroporação

Foi adicionada em uma cubeta de eletroporação de 1 mm (BioRad) previamente resfriada, 5 μ L do produto da ligação dialisado com 45 μ L de células competentes (*E. coli*, DH10B). A eletroporação foi realizada em aparelho Gene PulserXcell™ (BioRad) nas seguintes condições: 1,8 Kv, 200 Ω 25 μ F. Em seguida, foi acrescentado 1mL de meio LB na cubeta, e transferido para tubos tipo falcon que ficaram em estufa sob agitação a 37°C durante 1 hora. Após tempo de recuperação, 200 mL da mistura foram plaqueadas em meio LB contendo 150 μ g/mL de ampicilina, 200 μ L de X-GAL (20 mg/mL) e 30 μ L de IPTG (1M) e incubadas *overnight* em estufa a 37°C. (Esse procedimento foi realizado para todos os pontos coletados).

3.3.5 Seleção dos clones após transformação

As placas que foram retiradas da estufa foram analisadas. As colônias azuis foram descartadas enquanto as colônias brancas (transformantes) foram coletadas aleatoriamente com o auxílio de palitos de madeira estéreis. Os clones foram distribuídos em microplacas “DeepWell” de 96 poços contendo 1mL de meio de cultivo CircleGrown (CG) com ampicilina (100 µg/mL) e 12% de glicerol. As placas foram então seladas por adesivos furados com o auxílio de uma agulha em cada poço correspondente para permitir a aeração e incubadas durante 24 horas em um saker a 37°C. Após incubação, as bibliotecas ficaram armazenadas a -70°C (CLEMENTINO *et al.*; 2007).

3.3.6 Mini-preparação (extração do DNA plasmidial)

As placas “DeepWell” foram descongeladas e centrifugadas (Excelsa® 3 modelo 280 FANEM ®) a 2000 rpm durante 20 minutos. O adesivo foi removido e o sobrenadante desprezado tornado possível à observação do pellet formado. Depois, as placas foram colocadas invertidas sobre o papel toalha, a fim de absorver o excesso de meio, por aproximadamente 1 minuto. Foram adicionados, em cada poço, 200 µL de GET (glicose anidra 0,92%, EDTA 0,5M pH 8, Tris-HCl (1M, pH7.4) para lavar o pellet. As placas foram agitadas vigorosamente até que todas as células ficassem ressuspensas de forma homogênea. Centrifugou-se por 16 minutos a 2000rpm. O sobrenadante foi desprezado, e adicionado 80 µL em cada poço de um mix composto por 19,8 mL de GET e 200 µL de RNase (40 mg/mL). As placas foram seladas e agitadas em vortex por 2 minutos para ressuspender o pellet. Após, as placas permaneceram em temperatura ambiente por 20 minutos e depois foi adicionado uma solução de lise (NaOH 0,2+ SDS1%) nos poços. As placas foram seladas e invertidas 10 vezes, e após, adicionou-se nos poços 100 µL de NaOAc 3M pH4,6 bem gelado. As Placas foram novamente seladas e invertidas 10 vezes. Passados três minutos, ficou *overnight* em freezer a -80°C. No dia seguinte, as placas foram descongeladas e centrifugadas a 2000rpm durante 30 minutos e depois foram fixadas com fita adesiva, uma placa Milipore (MAGV N22) no topo de uma microplaca de fundo “V” de 250 µL de polipropileno, sempre observando o alinhamento correto dos poços. Foram transferidos 150 µL do sobrenadante para a placa Milipore. As placas permaneceram por 15 minutos a -20°C para compactar “debri”. Passaram por centrifugação a 2000 rpm durante 40 minutos, e após, as placas foram removidas e descartadas. Foram adicionados aos filtrados

90 μL de isopropanol gelado e posteriormente seladas para passar pelo processo de inversão 10 vezes. O material foi centrifugado a 2000rpm por 90 minutos, depois, os sobrenadantes foram descartados e foram adicionados 150 μL de etanol 70% gelado em cada poço. As placas passaram por centrifugação a 2000 rpm durante 40 minutos, após, os sobrenadantes foram descartados. Para secagem do precipitado, as placas ficaram abertas em estufas a 37°C durante 10 minutos. O DNA foi ressuspensionado em 40 μL de água mili-Q estéril e coberta adesivo que ficou sob temperatura ambiente durante 30 minutos. Após, as placas foram agitadas e estocadas em geladeira.

3.3.7 Sequenciamento dos clones

3.3.7.1 Preparo das amostras para sequenciamento

Após extração plasmidial (mini-preparação), o DNA dos clones foram quantificados e ajustados para 200 ng/ μL . As amostras para sequenciamento foram preparadas sempre em triplicata em microplacas com 96 poços, com o Kit de reação *ABI Prim[®] BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready* (Applied Biosystems), nas seguintes proporções: 2 μL de iniciador (1,6 $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$) para o gênero *Methanobrevibacter*, 2 μL do tampão 5X (400mM Tris-HCl pH 9; 10mM MgCl_2), 1 μL de reativo BigDye (Applied Biosystems), 5,5 μL de DNA (200-300ng), totalizando 10 μL . A reação foi realizada no termociclador Peltier ThermalCycler, modelo PTC-200, MJ Research nas seguintes condições: 40 ciclos de 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos.

3.3.7.2 Purificação e precipitação da reação de sequenciamento

Nesta etapa, os produtos de amplificação foram precipitados e limpos para remover didesoxinucleotídeos fluorescentes não incorporados durante a síntese de moléculas de DNA, a fim de não interferir na leitura das bases durante o processo de sequenciamento.

A precipitação, para a reação de sequenciamento do DNA, ocorreu da seguinte forma: foram adicionados 30 μL de isopropanol 75% em cada poço. As placas foram levadas ao vortex e submetidas a pulso por 10 segundo a 1000 rpm. As placas ficaram ao abrigo da luz por 15 minutos e depois foram centrifugadas a 2000 rpm durante 90 minutos. Os sobrenadantes foram descartados invertendo a placa em papel toalha e depois foram realizados movimentos

circulares nas mesmas para retirar o possível excesso de isopropanol. Foi adicionado 50 µL de etanol a 75% e novamente centrifugado a 2000 rpm por 30 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados novamente, e foi repetido o mesmo processo descrito acima para remover o excesso de etanol. Após, as placas foram submetidas a centrifugação invertida e deu-se um pulso de 500rpm. As placas foram deixadas em temperatura ambiente, sob a proteção da luz, por 2 horas e depois ressuspensado em 5,5 µL de água (GIBCO®) e deixado em repouso por 1 hora. Após, as placas foram encaminhadas a plataforma de sequenciamento da Fiocruz (Plataforma PDTIS/FIOCRUZ).

3.3.7.3 Análise dos resultados

Após o sequenciamento, os cromatogramas obtidos foram enviados em arquivo de entrada para o programa PhredPhrap (EWING *et al.*, 1998), que reproduz em dois arquivos de saída; o primeiro é o arquivo “fasta” onde cada pico do cromatograma foi traduzido para sua base nitrogenada correspondente (A, T, C ou G) e um arquivo “qual” onde cada base recebeu um valor de qualidade, que reflete o grau de confiança que se tem naquela posição. As sequências com mais de 300 bases apresentando “Phred score” com qualidade maior ou igual a 20 foram incluídas nas análises subsequentes; e as demais descartadas. As sequências validadas foram comparadas com sequências do Ribosomal Database Project II (COLE *et al.*, 2003). A análise de similaridade das sequências foi realizada “online” através do programa BLASTn (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Os alinhamentos com as sequências de referência do banco de dados, foram realizados através do programa Clustal X (THOMPSON *et al.*, 1997).

Regiões iniciais contendo sequência de vetores foram retiradas com auxílio do módulo de análise de sequências da ferramenta VecScreen disponibilizada pelo NCBI. As sequências também foram analisadas para identificação de quimeras pelo programa “Bellerophon” (HUBER, *et al.*, 2004).

3.3.7.4 Análise filogenética de dados e índices de diversidade

As sequências foram agrupadas em OTU a um nível de estrigência de 97% através do software MOTHUR (SCHLOSS *et al.*, 2009). As árvores filogenéticas foram construídas através do método de “*neighbor-joining*” (SAITOU e NEI, 1987) baseadas na estimativa de

distância calculada pelo algoritmo Kimura-2 (KIMURA, 1980). A construção das árvores foi feita pelo programa MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011) e a análise de “*bootstrap*” foi conduzida com 1000 replicatas. Para verificar se as diferenças na composição das comunidades bacterianas foram relevantes estatisticamente, as bibliotecas foram comparadas utilizando a estatística de LIBSHUFF (SINGLETON *et al.*, 2001) que está baseado no método Monte Carlo para gerar curvas de cobertura homólogas e heterólogas a partir das bibliotecas do gene *rrs* do 16S rRNA.

Para visualizar melhor os padrões globais de variação, foi utilizado o UniFrac (LOZUPNE, HAMABY e KNIGHT, 2006) que baseado nas informações filogenéticas, nos permitiu observar graficamente, as diferenças entre os ambientes.

3.4 CONSTRUÇÃO DA CURVA-PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA

O DNA genômico de *M. smithii* (INCQS A45D/DSM 11975) foi utilizado para a construção da curva-padrão e as diluições seriadas com fator de [1:10] tiveram sua concentração de DNA determinadas pelo Qubit® 2.0 Fluorometer quantitates (Life Technologies). Foram estabelecidos cinco pontos de diluição seriada do DNA genômico de *M. smithii*. Foi utilizado também o kit *Exogenous Internal Positive Control* TaqMan® (IPC) (Integrated DNA Technologies) para verificar a presença de inibição das reações, de acordo com instruções do fabricante. Com base na quantificação inicial foram estabelecidos valores dos títulos de cada diluição e suas respectivas concentrações em ng/μl, valores posteriormente inseridos na planilha disponibilizada pelo Software” para obtenção da curva padrão. Os dados gerados pela curva padrão forneceram uma reta padrão através de regressão linear, integrando os valores de Ct (“Cycle threshold”) no eixo das ordenadas e o logaritmo da concentração de DNA no eixo das abcissas. A fórmula da regressão linear desta reta-padrão ($y=mx + b$) serve como base para os cálculos posteriores na determinação de amostras cuja as concentrações são desconhecidas.

3.4.1 Quantificação absoluta das amostras

As amostras coletadas foram submetidas à extração de DNA genômico conforme descrito e posteriormente, foram conduzidas a qPCR. A detecção e a quantificação do gene *nifH* de *M. smithii* foram realizadas por meio da técnica desenvolvida pelo sistema Taqman® em termociclador Applied Biosystems 7000/7500 fast Real-Time PCR System no Laboratório

de Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica Médica da UFRJ. As amplificações foram realizadas utilizando os iniciadores (**Mnif202F**5'-GAAAGCGGAGGTCCTGAA-3', **Mnif353R**5'-CTGAAAAACCTCCGCAAAC-3') e sonda (**Mnifprobe** - [FAM]CCGGACGTGGTGTAACAGTAG[BHQ-1]). A composição de cada reação totalizou 25µL, contendo: 1x PCR buffer (**50 mM** KCl, **20 mM** Tris-HCl, pH8.4), **5 mM** MgCl, **800 mM** dNTPs, **240 mM** da sonda, 2.3 U Taq DNA polymerase usando o kit Taqman Universal PCR Master Mix e 800µmol-1 oligonucleotídeos (Invitrogen), nas seguintes condições: 10 minutos a 95°C, 45 ciclos de 10 segundos a 95°C e 30 segundos a 57°C (JOHNSTON et al., 2010).

4. RESULTADOS

4.1 DOSAGEM DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Em relação aos valores de pH, houve uma variação de 5.13 no ponto (1) e 8.8 no ponto (4) (Tabela 2). Os valores de condutividade ficaram entre 14,6mS/cm no ponto (10) e 71.4mS/cm no ponto (12) (Tabela 2). Em relação a turbidez os valores encontrados foram considerados elevados, o menor valor foi o ponto de coleta (5) com 110 UNT enquanto que o maior valor turbidez foi no ponto (6) com 645 UNT (Tabela 2).

Os níveis de oxigênio dissolvido apresentaram-se em sua maioria superior a 6 mg/L, somente o os pontos (5) com 5.3 mg/L e o ponto (8) 5.08 mg/L ficaram abaixo (Tabela 2). As temperaturas variaram entre 21 e 27°C, o ponto (7) obteve a temperatura mais alta de 27°C em relação aos demais, porém dentro dos padrões considerados normais para regiões de clima tropical (Tabela 2). A salinidade variou entre 20 e 40%, somente os pontos (8) e (2) ficaram abaixo da concentração normalmente encontrada em ambientes salinos (acima de 30%), com as concentrações de 23.8% e 20% respectivamente.

Tabela 2. Resultados dos parâmetros físico-químicos

Pontos de coleta	pH	Condutividade (mS/cm)	Turbidez (UNT)	O.D (mg/L)	Temperatura (°C)	Salinidade (%)
(1) Prainha (Mar)	5.13	51.7	270	7.10	25.0	34.1
(2) Prainha (Língua negra)	5.40	48.7	233	8.76	22.6	20.0
(3) Praia do Leblon	7.00	49.3	122	8.51	24.1	38.0
(4) Leblon (canal)	8.80	50.7	231	13.57	21.0	32.5
(5) Praia Copacabana	7.90	47.5	110	5.30	24.0	38.1
(6) Piscinão de Ramos	6.40	23.6	645	10.30	22.0	33.0
(7) Praia de São Bento	7.80	40.0	180	9.80	27.0	36.0
(8) Praia da Bica	6.50	37.4	236	5.08	20.0	23.8
(9) Praia da Engenhoca	6.28	14.6	277	9.08	21.0	35.0
(10) Praia da Guanabara	7.90	25.0	238	8.55	23.0	30.0
(11) Praia São Francisco	8.30	64.8	465	6.08	23.0	40.0
(12) Praia Seca	8.27	71.4	380	6.42	25.0	40.0
(13) Pontinha	5.40	25.0	213	7.80	26.6	33.4

4.2 DOSAGEM DOS PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS

Baseado nos critérios estabelecidos na Resolução do CONAMA, N°274/00, as condições de balneabilidade dos locais coletados foram avaliadas. Praticamente a maioria dos pontos (n=10) foi considerada imprópria (>1000 coliformes totais por mL, >800 *E. coli* mL), somente os pontos (6, 12 e 13) foram considerados próprios para atividade recreativa como pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3. Análises microbiológicas

Locais	Coliformes totais (NMP/100mL)	<i>E. coli</i> (NMP/100mL)	CONAMA n°274/2000
(1) Prainha	> 2419,6	1119,9	IMPRÓPRIA
(2) Prainha (língua negra)	> 2419,6	1299,7	
(3) Praia Leblon	> 2419,6	> 2419,6	
(4) Leblon (canal)	> 2419,6	> 2419,6	
(5) Praia Copacabana	> 2419,6	> 2419,6	
(7) Praia São Bento	> 2419,6	1119,9	
(8) Praia da Bica	> 2419,6	> 2419,6	
(9) Praia da Engenhoca	> 2419,6	> 2419,6	
(10) Praia da Guanabara	> 2419,6	> 2419,6	
(11) Praia de São Francisco	> 2419,6	> 2419,6	
(6) Piscinão de Ramos	913,9	791,5	PRÓPRIA
(12) Praia Seca	119,1	99,2	
(13) Pontinha	209,1	211,4	

4.3 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS BIBLIOTECAS

Das 13 bibliotecas do gene 16S rRNA contendo 260 clones, 240 foram considerados como sequências válidas com Phred score ≥ 20 . Artefatos, regiões contendo sequências de vetores e àquelas identificadas como quimeras (2%) foram descartadas das análises, restando o total de 52 sequências válidas. Com o objetivo de revelar as espécies que compõem a comunidade microbiana nos ambientes estudados, as sequências de cada biblioteca foram classificadas através da ferramenta de classificação do Ribossomal Database Project II.

A análise taxonômica no RDP II demonstrou a presença de dois gêneros da família Methanobacteriaceae. Trinta e sete sequências foram identificadas como pertencentes ao gênero *Methanobacterium*, distribuídas em: *M. palustre* (n=1), *M. formicicum* (n=1), *M. alcaliphilum* (n=1) e *M. subterraneum* (n=34) nos pontos São Bento, Pontinha, Leblon, Bica e Engenhoca. As outras 15 sequências foram classificadas como pertencentes ao gênero *Methanobrevibacter* distribuídas em 2 espécies: *M. acididurans* (n=1) e *M. smithii* (n=14) nos pontos, Leblon, Bica, Engenhoca e Pontinha.

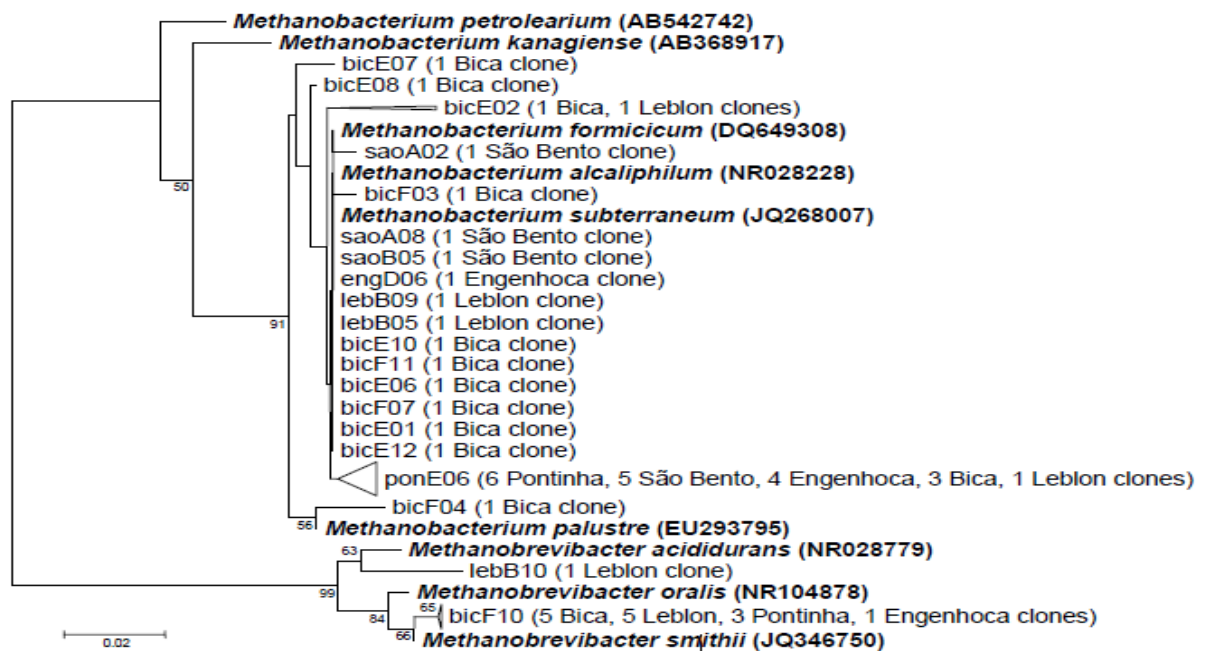


Figura 3: Árvore filogenética dos clones obtidos através das bibliotecas gênicas dos pontos coletados. As sequências referência retiradas do banco de dados do GenBank são mostradas em negrito. A topologia da árvore baseia-se na análise de neighbor joining e o *bootstrap* foram calculados com 1000 repetições. Apenas *bootstrap* > 50 são mostrados.

A árvore filogenética nos permitiu conhecer como as espécies pertencentes aos gêneros *Methanobacterium* e *Methanobrevibacter* estão distribuídas nos pontos analisados neste estudo (Figura 3). Dentro do gênero *Methanobacterium*, a espécie *M. subterraneum* apresentou o maior número de clones (92%) distribuídos entre as praias de São Bento (21%), Engenhoca (13%), Bica (38%), Leblon (11%) e Pontinha (17%). Um percentual bem menor de sequências foi associado as espécies *M. palustre*, *M. formicicum*, *M. alcaliphilum*. No gênero *Methanobrevibacter* foram detectadas sequências da espécie *M. smithii* (contaminação fecal humana), com o maior número (93%), distribuídas entre as praias da bica (33%), Leblon (33%), Engenhoca (20%) e Pontinha (7%), e a espécie *M. acididurans* com apenas 7% dos clones.

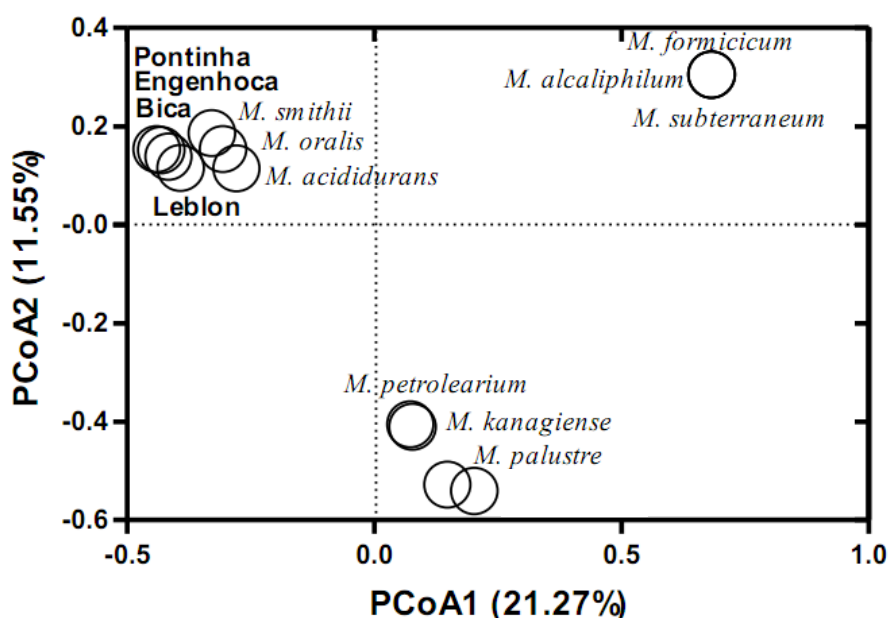


Figura 4. Análise de Componentes Principais (PCA) de *Methanobrevibacter* spp. e *Methanobacterium* spp. nas águas de praias estudadas, utilizando as distâncias geradas pelo UniFrac. Os eixos são rotulados com o percentual da variação explicada por cada componente principal.

A figura 4 mostra a análise de componentes principais (PCA) de comunidades de espécies metanogênicas nas águas de 13 praias analisadas por meio do software UniFrac (método filogenético). Pela análise do gráfico de componentes principais, *Methanobacterium formicicum*, *M. alcaliphilum* e *M. subterraneum* (São Bento, Engenhoca, Bica, Leblon e Pontinha) e *M. petrolearium*, *M. kanagiense* e *M. palustre* (Bica) foram separadas de *Methanobrevibacter smithii*, *M. oralis* e *M. acididurans* (São Bento, Engenhoca, Bica e Leblon) pelo eixo PC1. Em relação ao eixo PC2, *M. smithii*, *M. oralis* e *M. acididurans* (São Bento, Engenhoca, Bica e Leblon) e *Methanobacterium formicicum*, *M. alcaliphilum* e *M.*

subterraneum (São Bento, Engenhoca, Bica, Leblon e Pontinha) foram separados de *Methanobacterium petrolarium*, *M. kanagiense* e *M. palustre* (Bica). Embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas significantes nas análises comparativas, a água das praias analisadas mantém alguma diversidade entre os gêneros *Methanobrevibacter* e *Methanobacterium*. Através do gráfico de coordenadas principais gerado pela análise UniFrac (figura 4), PC1 e PC2 explicam respectivamente 21,27% e 11,55% da variabilidade encontrada.

4.4 DETECÇÃO DE *M. smithii* PELA PCR CONVENCIONAL

Das 13 amostras de água de praia analisadas, 11 apresentaram um único fragmento de aproximadamente 222 pb pela PCR convencional, compatível com o fragmento detectado no *M. smithii* (DSM 11975) utilizado como controle positivo da reação (Figura 5).

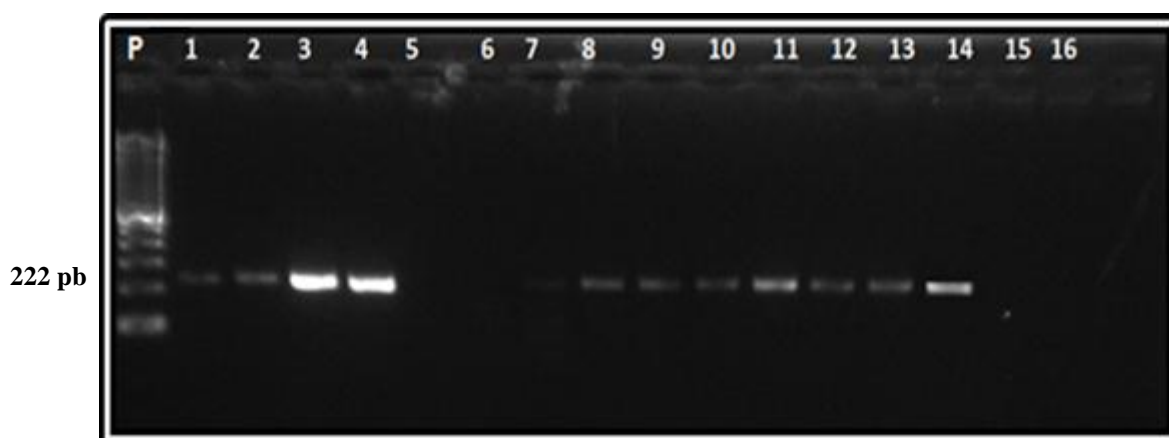


Figura 5. Amplificação do gene *nifH* para *Methanobrevibacter smithii*. Linha (P) Peso molecular (100 pb Invitrogen); Linhas (1) Prainha, (2) Prainha (língua negra), (3) Praia Leblon, (4) Leblon (canal), (5) Praia Copacabana, (6) Piscinão de Ramos, (7) Praia São bento, (8) Praia da Bica, (9) Praia da Engenhoca, (10) Praia da Guanabara, (11) Praia de São Francisco, (12) Praia Seca, (13) Pontinha, (14) *M. smithii* (DSM 11975), (15) *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706, (16) H₂O.

4.5 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO GENE *nifH* POR qPCR

Primeiramente, foram padronizadas as reações de amplificação do gene *nifH* com os iniciadores para construção da curva padrão. Para a construção da curva padrão do controle interno positivo (IPC) foram realizadas 5 diluições seriadas, de onde foram selecionados os 3 melhores pontos da curva utilizados nas reações seguintes (Figura 6).

A concentração dos iniciadores, bem como as reações foram otimizadas para um volume final de 25 μ L, sendo 5 μ L de amostra. Essa padronização permitiu definir as concentrações de

iniciadores em 800 nM e 240nM para sonda resultando em uma eficiência entre 90 % e 110%. Foram realizadas 10 diluições decimais seriadas de DNA genômico de *M. smithii* na construção da curva padrão (Figura 7). O ponto inicial da curva teve concentração de 90 ng/ μ L ($1.98 \text{ E}+12$ cópias/ μ l). O gene *nifH* de *M. smithii* foi detectado e quantificado em 12 das 13 amostras analisadas, variando entre $2,26\text{E}+10$ e $3,81\text{E}+12$ cópias/ μ l, na praia do Leblon e Prainha (língua negra) respectivamente (Tabela 4).

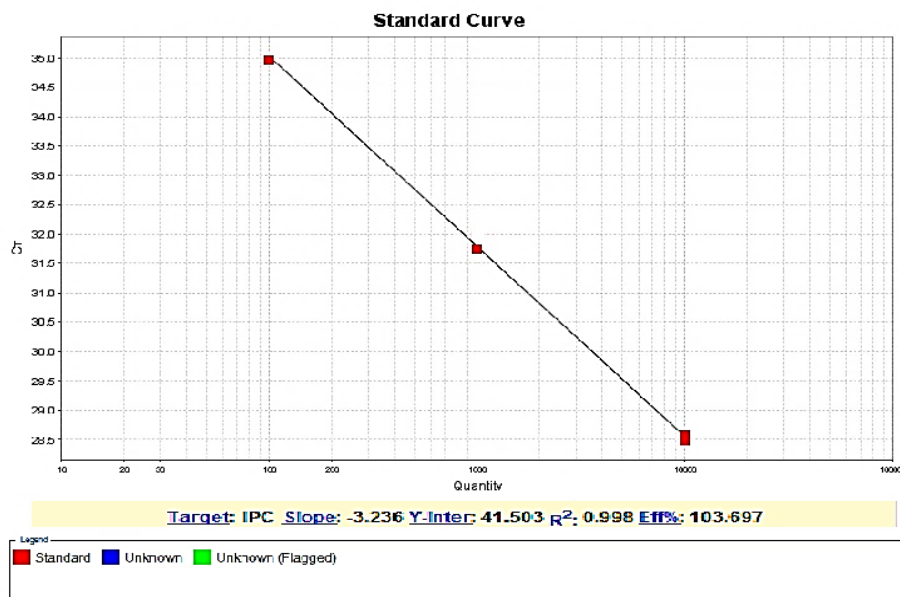


Figura 6: Curva padrão do controle interno positivo (IPC). (1) Diluição 10^0 (DNA 0.4 ng/mL); (2) Diluição 10^{-1} ; (3) Diluição 10^{-2} .

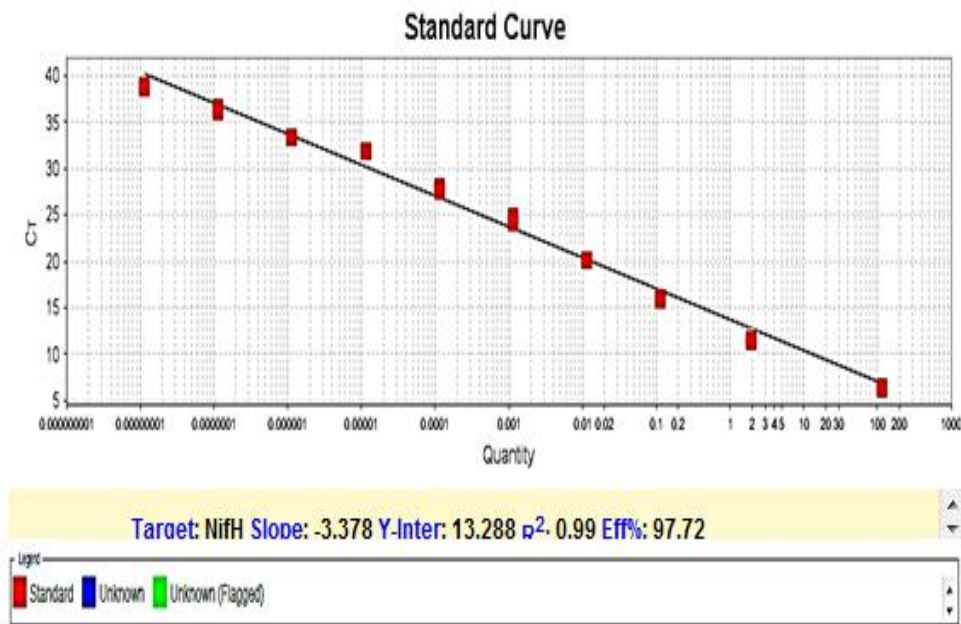


Figura 7: Curva padrão do *M. smithii*. (1) Diluição 10^0 (DNA 90 ng/ μ L); (2) Diluição 10^{-1} ; (3) Diluição 10^{-2} ; (4) Diluição 10^{-3} ; (5) Diluição 10^{-4} ; (6) Diluição 10^{-5} ; (7) Diluição 10^{-6} ; (8) Diluição 10^{-7} ; (9) Diluição 10^{-8} ; (10) Diluição 10^{-9} .

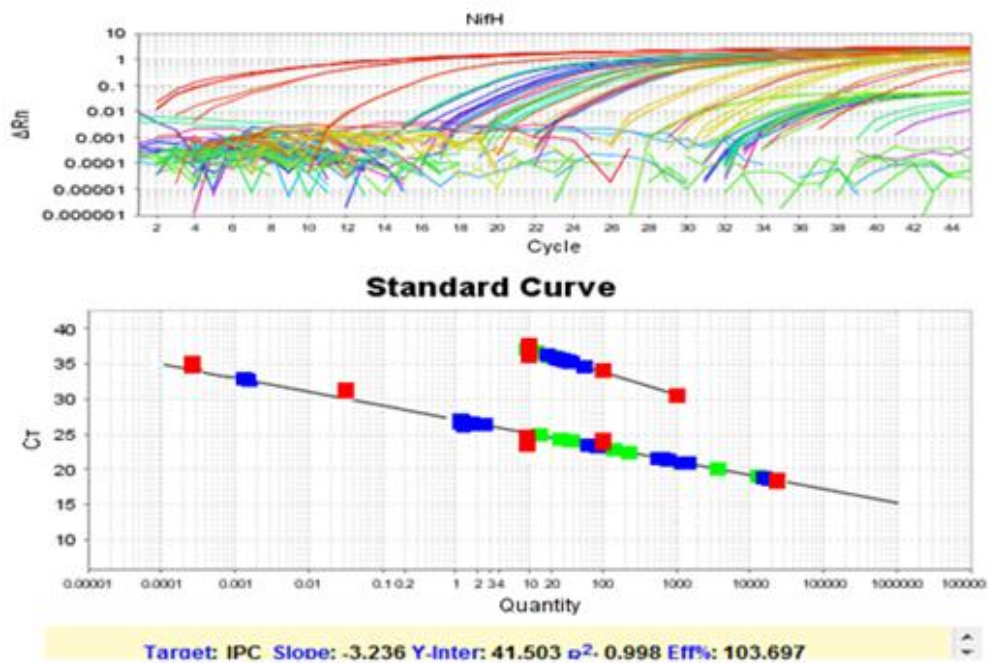


Figura 8: (A) Perfil de amplificação dos pontos de diluição da curva padrão, IPC e DNA ambiental. (B) Amplificação do DNA das amostras ambientais interpoladas com a Curva padrão de *M. smithii* e do IPC.

Tabela 4. Resultados de PCR convencional e PCR em tempo real do gene *nifH* de *M. smithii*.

Pontos coletados	PCR convencional	PCR em tempo real	Número de cópias/μl
(1) Prainha (mar)	+	+	2,70E+10
(2) Prainha (língua negra)	+	+	3,81E+12
(3) Praia do Leblon	+	+	2,26E+10
(4) Leblon (canal)	+	+	4,69E+11
(5) Praia Copacabana	ND	+	2,98E+10
(6) Piscinão de Ramos	ND	+	8,60E+10
(7) Praia de São Bento	+	-	ND
(8) Praia da Bica	+	+	2,45E+10
(9) Praia da Engenhoca	+	+	8,13E+10
(10) Praia da Guanabara	+	+	6,09E+11
(11) Praia São Francisco	+	+	2,78E+11
(12) Praia Seca	+	+	6,23E+10
(13) Pontinha	+	+	7,26E+10

5. DISCUSSÃO

A zona costeira pode ser utilizada para inúmeras atividades como pesca, transporte e turismo (OLIVEIRA, 2011). Entretanto, essas atividades e ou a descarga de poluentes químicos e biológicos, como o esgoto doméstico e resíduos industriais pode acarretar na contaminação do ambiente marinho gerando impactos negativos ao meio ambiente e à saúde pública (DEDIOS *et al.*, 2012).

Embora não seja considerada própria para consumo humano, a água do mar deve estar dentro dos limites da legislação. Além disso, não deve apresentar organismos patogênicos e substâncias tóxicas em concentrações que possam causar danos à saúde pelo contato com a pele ou por ingestão ocasional (SOUSA *et al.*, 2010). Sendo assim, o monitoramento microbiológico da qualidade das águas costeiras é uma medida essencial para garantir a balneabilidade e segurança dos banhistas. Apesar disso, o nível de sanidade das águas de praia é assunto pouco discutido na mídia se comparado com outros temas relacionados à saúde. No Rio de Janeiro, a população convive constantemente com diversas praias classificadas como impróprias para banho o que implica na atividade turística e principalmente na qualidade de vida da população (SOUSA *et al.*, 2010).

Avaliar as condições físico-químicas de um determinado ambiente nos permite traçar um perfil das condições e do potencial ecológico do mesmo, visando não somente a valorização biológica local, mas também evidenciando aspectos ambientais que permitam conduzir investigações e prevenir problemas ecológicos. Neste estudo, a temperatura das águas de praia investigadas variou entre 20°C e 27°C, pequenas variações podem estar associadas ao fato da coleta ter sido realizada em pequena profundidade e ao grau de turbulência da água, próprio do ambiente costeiro tropical. A temperatura é uma propriedade física que caracteriza o equilíbrio térmico de um sistema e ou o equilíbrio térmico de um sistema com outro e atua como fator limitante à reprodução, crescimento e distribuição de comunidades microbianas (PEREIRA & GOMES, 2002).

Já a salinidade, é um fator hidrológico importantíssimo relacionado à distribuição dos organismos de uma maneira geral, e está intimamente relacionada a condutividade elétrica, que é caracterizada pela quantidade de eletrólitos presentes responsável por conduzir corrente elétrica através de seus íons dissociados (SCHMIEGELOW, 2004). A água do mar apresenta elevada condutividade, pois os sais presentes na água se dissociam em [íons](#). Os valores de salinidade e condutividade obtidas neste estudo nos permitiu observar bem essa relação, as praias da Pontinha e praia Seca, ambas em Araruama, apresentaram valores de salinidade mais

elevados em relação aos outros locais e conseqüentemente obtiveram maiores valores de condutividade. Esta região costeira é considerada como a maior região hipersalina do Brasil, entretanto, é alvo constante de poluição ocasionada pelo crescimento urbano desenfreado e o nível de salinidade desse ambiente no último século variou de 57% para 52% devido ao constante despejo de esgoto urbano clandestino. Se compararmos esse dado com os valores de salinidade aqui encontrados podemos observar que a afirmação realmente é verdadeira, pois os níveis de salinidade desses locais estão realmente diminuindo com o passar dos anos e o aumento populacional (KJERFVE *et al.*, 1996). Entretanto, alguns locais como praia da Guanabara, Praia da Engenhoca e Leblon (canal) apresentaram valores próximos de salinidades entre si 30%, 35% e 32,5%, mas discrepantes em relação à condutividade (25.0 mS/cm, 14.6 mS/cm e 50.7mS/cm), respectivamente. A Prainha (língua negra) também apresentou nível de salinidade (20%), o que pode estar relacionado a um aumento de chuvas, evaporação e lançamento de matéria orgânica, que provocam a queda da salinidade devido a mistura entre a água doce e a água salgada.

Os valores de pH nos pontos analisados neste estudo variaram entre 8.8 e 6.0, na sua maioria. Vale ressaltar, que os 2 pontos coletados na Prainha (água o mar e língua negra) apresentaram valores de pH de 5.13 e 5.40, respectivamente, o que pode estar correlacionado com a presença de ações antropogênicas que podem influenciar diretamente resultando em acidificação do meio marinho (DUARTE *et al.*, 2013). Altos níveis de turbidez, como encontrado na Piscinão de Ramos (645 UNT) podem estar relacionados à dispersão de partículas em suspensão como resultado de correntes marítimas ou agitação do mar durante o ciclo das marés, uma vez que a mesma apresentou alta concentração de oxigênio dissolvido (10,30 mg/L) (PEÑA, *et al.*, 2006). Devido a sua relevância, a análise da turbidez foi acrescentada a outras medições, no intuito de aumentar o controle de critérios de balneabilidade em águas do sul da Califórnia (CLARK *et al.*, 2010).

A falta de balneabilidade já é considerada uma constante em praias no Brasil. Motta e Dias (2011) avaliaram o impacto causado pelo lançamento de poluentes por meio de emissários submarinos e fontes costeiras pontuais, na balneabilidade de praias do Rio de Janeiro e de Niterói. Os autores concluíram que os maiores responsáveis pelas alterações nas condições de balneabilidade foram as fontes clandestinas de lançamento de esgoto “in natura” e não os emissários submarinos. Análises microbiológicas das condições de *balneabilidade* das praias do Meireles e Iracema em Fortaleza (CE) também concluíram que duas praias encontravam-se impróprias para atividades recreativas (FERNANDES *et al.*, 2006).

Além das condições de balneabilidade, as areias das praias do Rio de Janeiro vêm apresentando altos índices de contaminação fecal. De acordo com dados da Secretaria Municipal de Meio Ambiente, nem mesmo a areia da Praia da Reserva - tida como uma das mais preservadas - está imune à contaminação. Há seis meses recebendo classificação entre boa e ótima, a areia da Reserva foi considerada não recomendada após análise referente à quinzena de 24 de dezembro a 8 de janeiro de 2013. Pesquisadores da Fundação Oswaldo Cruz, explicaram que cães, ratos e pombos são os principais responsáveis pela contaminação pela *Escherichia coli*. As areias de Quebra-Mar, Pepê e Barra também foram apontadas como não recomendadas (O GLOBO, 2014). A alta porcentagem de praias consideradas impróprias pode estar associada às fontes poluidoras, como por exemplo, foz de rios, despejo de água contaminada, presença de lixo, contaminação industrial, ponto de ancoragem de embarcações pesqueiras, movimento de marés, corrente marítima que pode trazer contaminação de locais mais distantes, entre outros fatores (OSTOICH *et al.*, 2011).

Estes dados nos levam a sugerir que esse quadro está associado a falta de recursos e de políticas públicas voltadas as questões de saneamento no Rio de Janeiro. Considerando que dos R\$ 759,4 milhões previstos para o tratamento de água e esgoto no ano de 2013, somente R\$ 127,6 milhões foram repassados à secretaria de obras e à CEDAE, o que representa 16,8% do total previsto no orçamento. Apenas cerca de 50% do esgoto da capital são tratados. O restante é descartado em rios, lagoas, praias e na baía de Guanabara, que recebe diariamente de 80 a 100 toneladas de detritos (O GLOBO, 2014).

Um relatório realizado pelo INEA comprovou que Copacabana, na Zona Sul, teve as águas mais limpas desde o início do ano. Apesar disso, nenhuma praia da cidade do Rio de Janeiro esteve 100% balneável em 2013. Neste estudo, as análises microbiológicas demonstraram que 70% das praias estudadas foram consideradas impróprias para atividade recreativa. Apesar do Piscinão de Ramos ter suas águas consideradas como própria para atividades recreativas, as concentrações de coliformes totais e *E. coli* ficaram muito próximas ao limite da legislação, além da baixa concentração de oxigênio dissolvido, o que compromete a qualidade da mesma. Vale ressaltar a presença de alta concentração de cópias do gene *nifH*, indicando a presença de contaminação fecal exclusivamente humana recente, o que compromete a qualidade das águas e principalmente a saúde da população (SCOTT *et al.*, 2002).

Águas contaminadas com fezes humanas são geralmente consideradas como um risco maior para a saúde humana, uma vez que essas águas são mais propensas a conter patógenos entéricos humanos específicos, incluindo *Salmonella entérica* sorovar *Typhi*, *Shigella* spp.,

vírus da hepatite A e o Norwalk-grupo. Os animais também podem servir como reservatórios para uma variedade de agentes patogênicos entéricos (por exemplo, diferentes sorotipos de *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Cryptosporidium* spp.). Portanto, compreender a origem da poluição fecal é fundamental para avaliar os riscos associados a saúde bem como, as ações necessárias para resolver o problema no momento em que ele é evidenciado e prevenir eventos futuros (SCOTT *et al.*, 2002).

É importante ressaltar que a presença de níveis elevados de coliformes totais e *E. coli* sugerem poluição fecal e potenciais riscos para a saúde pública, no entanto, muitas vezes é difícil de vincular bactérias indicadoras, tais como *E. coli* a uma fonte de poluição, principalmente devido à natureza ubíqua desses microrganismos o que dificulta a avaliação precisa de riscos (FIELD e SAMADPOUR, 2007). Além disso, já se sabe que as bactérias fecais indicadoras são capazes de persistirem tanto em sedimentos quanto em macrófitas aquáticas submersas (BADGLEY *et al.*, 2010). A suspensão de sedimentos via turbulências naturais ou induzidas pelo homem e a ressuspensão dessas bactérias podem elevar as concentrações de bactérias fecais indicadoras e assim superestimar o nível de contaminação fecal em águas (STALEY *et al.*, 2012).

Estudos têm demonstrado que surtos de gastroenterite têm sido associados com o fornecimento de águas que apresentaram contagem de coliformes aceitáveis, e que outras bactérias indicadoras têm sido propostas como indicadores confiáveis da presença de enterovírus (SCOTT *et al.*, 2002).

Hughes, Coyle e Connolly (1992) detectaram a presença de genomas de enterovírus quando bactérias indicadoras estavam abaixo do mínimo ou inexistentes. Estudos anteriores, usando métodos de cultura de células também apontaram pouca correlação entre os vírus entéricos e coliformes fecais em águas marinhas (YAMASHITA *et al.*, 1992). A falta de relação entre os dois pode ser derivado, em parte, pelas diferenças biológicas e químicas entre vírus e bactérias; as condições de dispersão do patógeno no efluente e problemas na amostragem (FLEISHER, 1990).

Como alternativa, o rastreamento de fonte microbiana (RFM) vem sendo proposto com o objetivo de identificar a origem da poluição fecal na água. Para isso, diversos marcadores microbianos humanos têm sido avaliados como o *Bacteroides thetaiotamicron*, Poliomavírus humano, *Faecalibacterium* e *M. smithii* (MCQUAIG *et al.*, 2006; CARSON *et al.*, 2005; UFNAR *et al.*, 2007; JOHNSTON *et al.*, 2010).

Neste estudo, a contaminação fecal humana foi detectada em 80 % (11/13) das praias analisadas pela detecção do gene *nifH* pela PCR convencional e 90% (12/13) pela PCR em

tempo real. Esta diferença de sensibilidade pode ser atribuída a uma combinação de fatores como, por exemplo, a presença de inibidores, condições de reações, a presença de sonda na qPCR, e o acréscimo no número de ciclos 35 e 45, na PCR convencional e qPCR, respectivamente.

Embora a metodologia padrão tenha identificado coliformes totais e *E. coli* nas 13 praias avaliadas neste estudo, a mesma não nos permitiu identificar a origem dessa contaminação. Outro dado relevante foi observado nas praias Seca e da Pontinha que apresentaram condições favoráveis nas análises físico-químicas e microbiológicas, entretanto, apresentaram altas concentrações do gene *nifH* e portando presença de fezes humanas. Sidhu e colaboradores (2013) também apresentaram resultados semelhantes analisando amostras de águas pluviais urbanas de seis microbacias na Austrália. Dentre as 23 amostras, 93% confirmaram a presença de contaminação fecal humana pela detecção de *M.smithii*.

Neste estudo, o biomarcador molecular *nifH* nos permitiu constatar que tanto as praias consideradas impróprias quanto as próprias para atividades recreativas foram impactadas com resíduos fecais de origem humana recentes. Pois o *M. Smithii*, habita exclusivamente o trato intestinal e vaginal humano, além de ser um organismo anaeróbio estrito, incapaz de se reproduzir no ambiente (UFNAR *et al.*2007).

Um outro resultado bastante relevante neste estudo foi a detecção de *M. Smithii* por meio da biblioteca metagenômica em 31% das praias analisadas, com isso, reforçando a presença deste organismo em águas de praias. Além disso, as bibliotecas também revelaram presença de espécies do gênero *Methanobacterium* nas praias analisadas. Espécies pertencentes a esses dois gêneros (*Methanobacterium* e *Methanobrevibacter*) também foram encontradas em efluentes urbanos e rurais de países como França, Espanha, Austrália, México, Canadá, Irlanda, Alemanha e Reino Unido (LECLERC, DELGÈNES e GODON2004).

Nenhum indicador individual pode prever de forma significativa a presença de todos os patógenos em água. Muitos estudos relatam que altas concentrações de coliformes totais, *E.coli* e enterococos em águas, geralmente, indicam a presença de contaminação fecal, independentemente da existência ou não da presença de patógenos específicos, isso quer dizer que, ausência de indicadores na água não garante a ausência de micro-organismos patogênicos (SETLER, 1984, PYMENT e LOCAS, 2010, CARTER *et al.*, 1987, LONG e SOBSEY, 2004).

Um estudo baseado em qPCR demonstrou a presença de *M.smithii* em todas as amostras de ecossistemas aquáticos analisadas. No entanto, a presença do gene *nifH* não apresentou boa correlação com a presença de *E. faecalis* e *E. coli* nesses ambientes. Este resultado não é surpreendente, uma vez que muitos indicadores alternativos e agentes

patogênicos humanos têm demonstrado baixas correlações com bactérias indicadoras tradicionais (JOHNSTON et al, 2013). Essa falta de correlação entre os indicadores pode estar relacionada com as diferenças das populações microbianas entéricas; a concentração de microrganismos nas fezes aos padrões de sobrevivência de espécies individuais.

Rosário e colaboradores (2009) verificaram que o gene *nifH* de *M. smithii* detectado em efluentes tratados apresentaram baixa correlação com enterococos cultiváveis, mas apresentaram alta correlação com Norovirus, *Cryptosporidium* e *Giardia*. Estes resultados indicaram que este bioindicador pode ser correlacionado com patógenos não removidos durante o processo de tratamento.

Vale ressaltar que, até onde é do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo utilizando o gene *nifH* de *M. smithii* como marcador de poluição fecal humana em águas de recreação costeira no Brasil.

A abordagem aqui apresentada demonstrou ser um indicador alternativo rápido e sensível no rastreamento de fontes de poluição fecal, que certamente irá colaborar para o aprimoramento dos serviços de vigilância ambiental e epidemiológica e de modelos de prevenção e monitoramento de doenças emergentes e reemergentes advindas da contaminação fecal que interferem na saúde da população.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados foi possível concluir que:

- Houve alterações significativas em relação aos parâmetros físico-químicos nas 13 praias avaliadas neste estudo.
- Foi observada a presença de coliformes totais e *E.coli* em todos os 13 ambientes, no entanto as praias Seca, Pontinha e Ramos foram consideradas próprias para atividade recreativa.
- Foi possível observar a presença contaminação fecal humana através do gene *nifH* de *M. smithii* em 11 praias pela técnica de PCR convencional e em 12 praias pela qPCR.
- A análise metagenômica demonstrou a presença de dois gêneros, *Methanobacterium* e *Methanobrevibacter*, e confirmou a presença *M. smithii* em 93% das sequências analisadas.
- Neste estudo, o biomarcador molecular *nifH* nos permitiu constatar que tanto as praias consideradas impróprias quanto as próprias para atividades recreativas segundo parâmetros da legislação, foram impactadas com resíduos fecais exclusivamente de origem humana recentes.
- A abordagem aqui apresentada demonstrou ser um indicador alternativo rápido e sensível, para o rastreamento de fontes de poluição fecal, que certamente irá colaborar para o aprimoramento dos serviços de vigilância ambiental e epidemiológica, para a prevenção e monitoramento de que interferem na saúde da população.

REFERÊNCIAS

- AHMED, W., SIDHU, J. P. S., & TOZE, S.. **Evaluation of the nifH Gene Marker of Methanobrevibacter smithii for the Detection of Sewage Pollution in Environmental Waters in Southeast Queensland, Australia**, *Environ. Science Tech.* **46**, 543-550, 2012.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., & LIPMAN, D. J. **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs**. *Nucleic. Acid. Res.* **25**(17), 3389–3402, 1997.
- AMARAL, L. A . **Avaliação da qualidade higiênico-sanitária da água de poços rasos localizados em uma área urbana: utilização de colifagos em comparação com indicadores bacterianos de poluição fecal**. *Rev. Saúde Pública.* **28**(5), 345-348, 1994.
- ANDERSON, K.L., WHITLOCK, J.E. & HARWOOD, V.J. **Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical water and sediments**. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(6), 3041-3048, 2005.
- ANVISA. **Competências Gerais da ANVISA**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/Institucional/anvisa/comp.htm#1>>. Acesso em 16 de março 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.
- ARAÚJO, A. C. V. **Diversidade molecular de arqueias em rios da Amazônia e caracterização de espécies cultivadas**. 2010. **123 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010**.
- BADGLEY, B.D., NAYAK, B.S. & HARWOOD, V.J. **The importance of sediment and submerged aquatic vegetation as potential habitats for persistent strains of enterococci in a subtropical watershed**. *Water Res.* **44**, 5857–5866, 2010.
- Balneabilidade, caderno Barra, **O Globo**, Rio de Janeiro, 17 jan. 2014, p. 15.
- BARCELLOS, C.; QUITÉRIO, L.A.D. **Vigilância ambiental em saúde e sua implantação no Sistema Único de Saúde**. *Rev. de Saúde Pública.* **40**(1), 170-77, 2006.
- BOEHM, A.B., N.J. ASHBOLT, J.M. COLFORD, JR., L.E. DUNBAR, L.E. FLEMING, M.A.GOLD, J.A. HANSEL, P.R. HUNTER, A.M. ICHIDA, C.D. MCGEE, J.A. SOLLER, & S.B. WEISBERG. **A sea change ahead for recreational water quality criteria**. *J. Water Health*, v.7, p.9–20, 2009..
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. 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/conama/res/res05/res35705>>. Acesso em: 21 de maio de 2014.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. 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.ima.al.gov.br/legislacao/resolucoes-conama>>. Acesso em: 21 de maio de 2014.

BROCHIER-ARMANET C, GRIBALDO S, FORTERRE P. **A DNA topoisomerase IB in Thaumarchaeota testifies for the presence of this enzyme in the last common ancestor of Archaea and Eucarya.** Biol. Direct. 3, 54, 2008.

BRUCE, A., BRAY, D., JOHNSON, A., LEWIS, J., RASS, M., ROBERTS, K & WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular: Uma introdução à biologia molecular da célula.** Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 95, 1999.

BYAMUKAMA, D., KANSIIME, F., MACH, R.L. & FARNELEITHER, H. **Determination of *Escherichia coli* contamination with chromocult coliform ágar showed a high level of discrimination efficiency for dirrering fecal pollution levels in tropical water of Kampala, Uganda.** Appl. Environ. Microbiol, 66, 864-868, 2000.

BYAPPANAHALLI, M., FOWLER, M., SHIVELY, D. & WHITMAN, R. **Ubiquity and persistence of *Escherichia coli* in a Midwestern coastal stream.** Appl. Environ. Microbiol. 69, 4549-4555, 2003.

CARDOSO, A.M., CLEMENTINO, M.M., MARTINS, O.B., VIEIRA, R.P., ALMEIDA, R.V., ALQUERES, S.M.C., & ALMEIDA, W.I. **Archaea: Potential Biotecnológico.** Ver. Biotec. Ciên. Desen. 30, 71-77, 2003.

CARSON, C.A., CHRISTIANSEN, J.M., YAMPARA-IQUISE, H., BENSON, V.W., BAFFAUT, C., DAVIS, J.V., BROZ, R.R., KURTZ, W.B., ROGERS, W.M. & FALES, W.H. **Specificity of a *Bacteroides thetaiotaomicron* marker for human feces.** Appl. Environ. Microbiol. 71(8), 4945–4949, 2005.

CARTER, A. M., PACHA, R. E., CLARK, G. W. & WILLAMS, E. A. **Seasonal occurrence of *Campylobacter* spp. in surface watersand their correlation with standard indicator bacteria.** Appl. Environ. Microbiol. 53(2), 523–526, 1987.

CARTILHA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Brasília, Agos. 2002, 2.edição.

CLARK, C.D., DE BRUYN, W.J., HIRSCH, C.M. & JAKUBOWSKI, S.D. **Hydrogen peroxide measurements in recreational marine bathing waters in Southern California, USA.** Water Research. 44(7), 2203–2210, 2010.

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. Microbiology. 103(1), 141-151, 2007.

COLE, J. R., CHAI, B., FARRIS, R. J., WANG, Q., KULAM, S. A., MCGARRELL, D. M. & IEDJE, J. M. **The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis.** Nucleic Acids Res. 33(1), 294-296, 2005.

CRUMP, J.A, LUBY, S.P., MINTZ, E.D. **The global burden of typhoid fever bull.** World Healt Organ. 82, 346-353, 2004.

DA COSTA, C.F.S.; MENDOZASASSI, R.A. **Identificação de patógenos humanos nas águas que margeiam a cidade do Rio Grande/RS.** Rev. Baiana de Saúde Pública. 31, 201-211, 2007.

DE DIOS, A.P.; SALVAT, M.C.; GARRIDO, E.M.; CABEZA, J.A.S **Environmental quality of sitges (Catalonia, NE Spain) beaches during the bathing season.** Ocean & Coastal Management. 55, 128- 134, 2012.

DEWAILLY E, KNAP A. **Food from the oceans and human health.Balancing risks and benefits.** Oceanography. 19(2), 84-93, 2006.

DIAS, P.A.; ROSSO, T.C.A. **Análise dos elementos atípicos do sistema de esgoto – separador absoluto – na cidade do Rio de Janeiro.** J. Engrev. 13(3), 177, 2011.

DICK, L.K., BERNHARD, A.E., BRODEUR, T.J., SANTO DOMINGO, J.W., SIMPSON, J.M., WALTERS, S.P. & FIELD, K.G. **Host distributions of uncultivated fecal Bacteroidales reveal genetic markers for fecal source identification.** Appl. Environ. Microbiol. 71, 3184–3191, 2005.

DOS FERNANDES, V.R. H. S., ATAYDE, M. A., CARVALHO, E. M. R., CARVALHO, F. C. T. & FONTELES FILHO, A. A. **Contaminação fecal da ostra *Crassostrearehizophorae* e da água de cultivo do estuário do Rio Pacoti (Eusébio, Estado do Ceará): Isolamento e identificação de *Escherichia coli* e sua susceptibilidade a diferentes antimicrobianos.** Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science. 45(3), 180-189, 2008.

DOWER, W.J.; MILLER, J.F.; RAGSDALE, C.W. **High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation.** Nucleic Acids Res. 16(13), 6127-6145, 1998.

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

DUARTE, C.M.; HENDRIKS, I.E.;MOORE, T.S.; OLSEN, Y.S.; STECKBAUER,A.; RAMAJO, L.; CARSTENSEN, J.;TROTTER, J.A.; MCCULLOCH, M. **Is Ocean Acidification an Open-Ocean Syndrome? Understanding Anthropogenic Impacts on Seawater pH.** Estuaries and Coasts. 36, 221-236, 2013.

EWING, B. et al. **Base-calling of automated sequencer traces using phred.I. Accuracyassessment.** Genome Res. 8(3), 175-185,1998.

FERRARI, A., BRUSA, T., RUTILI, A., CANZI, E. & BIAVATI, B. **Isolation and characterization of *Methanobrevibacteroralis* sp. nov.** Curr. Microbiol. 29, 7–12, 1994.

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

FLEISHER, J. M. **The effects of measurement error on pre-viously reported mathematical relationships between indicatororganism density and swimming associated illness: A quantit-ative estimate of the resulting bias.** Int. J. Epidemiol. 19, 1100–1106, 1990.

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde, **Vigilância Ambiental em Saúde**, Brasília, Funasa, Brasil, 2002.

GERBA, C. P. **Foundations and frameworks for human microbial risk assessment.** Environ. Microbiol. 34, 557-570, 2000.

GIOVANNOMI, S.J. **Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton.** Nature. 345, 60-63, 1990.

GLYNN, B. **Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety.** Int. J. Dairy Tech. 59(2), 126-139, 2006.

GROBOKOPF, R.; JANSSEN, P.H. & LIESACK, W. **Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence Retrieval.** Appl. Environ. Microbiol. 64(3), 960-969, 1998.

HAGEDORN, C., BLANCH, A.R. & HARWOOD, V.J., **Microbial Source Tracking: Methods, Applications, and Case Studies.** Springer, EUA, 2011.

HARDINA, C.M. & FUJIOKA, R.S. **Soil: The environmental source of Escherichia coli and enterococci in Hawaii's streams.** Environ. Toxicol. Water Quality: Int. J. 6, 185-195, 1991.

HAZEN, C.T & TORANZOS, A.G. **Tropical Source Water.** Drinking Water Microbiol. 32-53, 1990.

HEID.C.A., S., J., LIVAK, K.J. & WILLIAMS, P.M. **Real time quantitative PCR.** Genome Research. 6, 986-994, 1996.

HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., WATSON, R. **Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.** Biotechnol. Nature Publishing Company. 11, 1026-1030, 1993.

HOUK, V. S. **The genotoxicity of industrial wastes and effluents: a review.** Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology, 277(2), 91-138, 1992.

HUBER, T.; FAULKNER, G.; HUGENHOLTZ, P. **Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments.** Bioinformatics. 20(14), 2317-2319, 2004.

HUGHES, M. S., E. M. HOEY & P. V. COYLE. **A nucleotide sequence comparison of Coxsackievirus B4 isolates from aquatic samples and clinical specimens.** Epidemiol Infect. 110, 389-398, 1993.

HUGHES, M. S., P. V. COYLE & J. H. CONNOLLY. **Enteroviruses in recreational waters of Northern Ireland.** Epidemiol. Infect. 108, 529-536, 1992.

INEA - Instituto Estadual do Ambiente, Disponível em: <<http://www.inea.rj.gov.br/fma/praias.asp>>. Acesso em: 10 de maio de 2014.

JOHAN, J. A., VAN BRUGGEN, K. B., ZWART, R. M., VAN ASSEMA, STUMM, C. K., VOGELS G. G., **Methanobacterium formicicum, an endosymbiont of the anaerobic ciliate.** Arch. Microbiol. 139(1), 1-7, 1984.

JOHN, A., SONJA-VERENA, L., HARUYUKI, A. A. & ALLERS, T. **Model organisms forgenetics in the domain Archaea: methanogens, halophiles, Thermococcales and Sulfolobales.** FEMS Microbiol. 35, 577–608, 2011.

JOHNSTON, C, MURULEEDHARA N. B, JACQUELINE M. G, JENNIFER A. UFNAR, R. L. W, STEWART, J.R. **Probabilistic Analysis Showing That a Combination of *Bacteroides* and *Methanobrevibacter* Source Tracking Markers Is Effective for Identifying Waters Contaminated by Human Fecal Pollution.** *Environ. Sci. Technol.*, 47(23), 13621–13628, 2013.

JOHNSTON, S.C.; UFNAR, J.A.; GRIFFITH, J.F.; GOOCH, J.A.; STEWART J.R. A real-time qPCR assay for the detection of the *nifH* gene of *Methanobrevibacter smithii*, a pontencial indicator of sewage pollution. *J. of Appl. Microbiol.* 109, 1946-1959, 2010.

KEYSER, M., WITTHUHN, R. C., LAMPRECHT, C., COETZEE, M. P. A., BRITZ, T. J. **PCR-based DGGE fingerprinting and identification of methanogens detected in three different types of UASB granules.** *Syst. Appl. Microbiol.* 29, 77-84, 2006.

KIMURA, M.A. **A simple method for estimating evolutionary rates of bases substituitions through comparative studies of nucleotide sequences.** *J. Mol. Evol.* 16(2), 111-120,1980.

KJERFVE, B., SCHETTINI, C.A.F., KNOPPERS, B., LESSA, G., FERREIRA, H.O. **Hidrology and Salt Balance in large, Hypersaline Coastal Lagoon: Lagoa de Araruama, Brasil.** *Estuarine, Coastal and Shelf Science.* 42(6), 701-725, 1996.

LAI, M.C.; LIN, C.C.; YU, P.H.; HUANG, Y.F. AND CHEN, S.C. *Methanocalculus chunghsingensis* sp. nov., isolated from an estuary and a marine fishpond in Taiwan. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 183-18, 2004.

LECLERC, M.; DELGÈNES, JP.; GODON, JJ. **Diversity of the archaeal community in 44 anaerobic digesters as determined by single strand conformation polymorphism analysis and 16S rDNA sequencing.** *Environ. Microbiol.* 6(8), 809-819, 2004.

LIA, G. S. A, IDÊ, G. D. G , HENRIQUE, F. C. N, CARLOS, H. M. & ANDRÉ M.C.A. **O contexto global e nacional frente aos desafios do acesso adequado à água para consumo humano.** *Ciênc. Saúde Coletiva.* 17(6), 1511-1522, 2012.

LONG, S. C. & SOBSEY, M. D. **A comparison of the survival of FpRNA and FpDNAcoliphages in LakeWaterMicrocosms.** *J. Water Health.* 2(1), 15–22, 2004.

LOZUPNE, C.; HAMADY, M.; KNIGHT, R. **Unifrac - Na online tool for comparing microbial commnity diversity in a phylogenetic.** *BMC Bioinformatics,* 7, 371, 2006.

MACÊDO, JORGE ANTÔNIO BARROS. **Métodos Laboratoriais de Análises Físico-Químicas e Microbiológicas.** 3ª ed. 2005.

MACKAY, I. M., MACKAY, J.F., NISSEN, M.D., SLOOTS, T.P. **Real-Time PCR in Microbiology, From Diagnosis to Characterization.** Caister Academic Press Norfolk, UK, 2007.

MARTINS, J. P. S. **Agenda 21, proteção da qualidade e do abastecimento dos recursos hídricos: aplicação de critérios integrados no desenvolvimento, manejo e uso dos recursos hídricos.** Rev: Suplemento das Águas. 14-33, 1996.

MCQUAIG, S.M., SCOTT, T.M., HARWOOD, V.J., FARRAH, S.R., LUKASIK, J.O. **Detection of human-derived fecal pollution in environmental waters by use of a PCR-based human polyomavirus assay.** Appl. Environ. Microbiol. 72(12), 7567–7574, 2006.

MEDEIROS, P. R. P. **Determinação da Carga de Nutrientes do São Francisco na Região da Foz. 2003, 160 f. Tese (Doutorado em Geografia) - Universidade Federal de Alagoas, 2003.**

MENDONÇA, M. J. C. D., E MOTTA, R. S. D. **Saúde e saneamento no Brasil, 2005.**

MENDONÇA, R. **Como cuidar de seu meio ambiente.** 2º ed. São Paulo, 2004.

MILLER, T.L.; WOLIN, M.J.; KUSEL, E. **Isolation and characterization of methanogens from animal feces.** Syst. Appl. Microbiol. 18, 234-238, 1986.

MOTTA, L, AMARAL, T. F., DIAS, P. I. **Avaliação do Impacto do Lançamento de Poluentes por Emissários Submarinos e Fontes Costeiras Pontuais na Balneabilidade das Praias do Rio de Janeiro e Niterói.** Eng. Amb. 90, 90-91, 2013.

NOTTINGHAM, P.M.; HUNGATE, R.E. **Isolation of Methanogenic Bacteria from Feces of Man.** J. Bacteriol. 96(6), 2178–2179, 1968.

O Globo. **Verão torneiras secas,** Rio de Janeiro, 9 jan. 2014. Ciência, Saúde, p. 7.

OGRAM, A., G. S. SAYLER, AND T. BARKAY. **The extraction and purification of microbial DNA from sediments.** J. Microbiol. Methods. 7, 57–66, 1987.

OLIVEIRA, A.R.R. **Quantificação de DNA nuclear e DNA mitocondrial por PCR em tempo real. 2009. 131 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 2009.**

OLIVEIRA, D.P. **Análise de Contaminantes Ambientais.** In: Toxicologia Analítica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 119–128, 2011.

OMS - Organização Mundial da Saúde. **Cuidados inovadores para condições crônicas: componentes estruturais de ação: relatório mundial.** Brasília: OMS, 2011.

OSTOICH, M.; AIMO, E.; FASSINA, D.; BARBARO, J.; VAZZOLER, M.; SOCCORSO, C.; ROSSI, C. **Biologic impact on the coastal belt of the province of Venice (Italy, Northern Adriatic Sea): preliminary analysis for the characterization of the bathing water profile.** Environ. Sci. Pollut. Research. 18(2), 247-259, 2011.

PAYMENT, P. & LOCAS, A. **Pathogens in water: value and limits of correlation with microbial indicators.** Ground Water. 49(1), 4–11, 2010.

PAZINATO, J. M. **Isolamento e identificação de [microrganismos](#) metanogênicos em solos de Terra Preta Antropogênica (TPA) e de várzea (Gleissolos) da Amazônia Oriental. 2007. 187 f. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) - Universidade de São Paulo, 2007.**

- PCRJ. Secretaria Municipal de Urbanismo. **Desenvolvimento humano e condições de vida na Cidade do Rio de Janeiro e seus bairros**. Rio de Janeiro: IPEA/PCRJ/PNUD, 2001, 26 p.
- PELT-VERKUIL, E., VAN BELKUM, A., HAYS, J.P. **Principles and technical aspects of PCR amplification**, 332 p., Springer, 2008.
- PEÑA, O.S.; RUBALCABA, S.C.; NOVO, M.F.; RODRÍGUEZ, Y.H. & CABRERA, A.P. **Evaluación físico-química y microbiológica del agua de la presa El Cacao (Cotorro, Cuba)**. Higiene y Sanidad Ambiental. 6, 202-206, 2006.
- PEREIRA & GOMES. **Biologia Marinha**. 5 p. Ed. Interciência, Rio de Janeiro, 2002.
- REGINE, H.V.; RAKEL H. V. **Balneabilidade das praias de Iracema e do Meireles (Fortaleza – CE) – isolamento de cepas de *Escherichia coli* e sua sensibilidade a antimicrobianos**. Trop. J. Fisheries Aquatic Science. 6, 1, 2006.
- REGO FILHO, M. T. N., BRAGA, A. C. R., & CURI, R. C. **A dimensão da disponibilidade hídrica: uma análise entre a conjuntura brasileira e o relatório de desenvolvimento mundial da água**. *Ambiência*. 10, 111-124, 2014.
- RODRIGUES, F. P., AVISHAI, N., RABINOWITZ, C., MOISEEVA, E. & RINKEVICH, B. **Genotoxic evaluation of an industrial effluent from an oil refinery using plant and animal bioassays**. *Genet. Mol. Biol.* 33(1), 169-175, 2010.
- SAITOU, N. & NEI, M. **The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees**. *Mol. Biol. Evol.* 4(4), 406-425, 1987.
- SALES, A. M. DE J., SANTOS, V. S. DOS, CHAVES, M. DA S., ALVES, F. K. DE S. & BRITO, A. DOS S. **Avaliação da qualidade da água do açude do cumbe, no município do Barro-CE**. *Rev. Verde Agroecol. Desenvol. Sust.* 7, 4, 2012.
- SANDIFER, P.A.; HOLLAND, A.F.; ROWLES, T.K. & SCOTT, G.I. **The ocean and human health**. *Environ. Health Perspect.* 112, 454-455, 2004.
- SANTO DOMINGO, J.W., BAMBIC, D.G., EDGE, T.A., WUERTZ, S. **Quovadis source tracking. Towards a strategic framework for environmental monitoring of fecal pollution**. *Water Res.* 6, 10-31, 2007.
- SCHLOSS, P.D. **Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities**. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(23), 7537-7541, 2009.
- SCHMIEGELOW, J. M. M. **O Planeta Azul. Uma Introdução às Ciências Marinhas**. Ed. Interciência. Rio de Janeiro, 2004.
- SCOTT TM, ROSE JB, JENKINS TM, FARRAH SR, LUHASIK J. **Microbial source tracking: current methodology and future directions**. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5796-803, 2002.
- SERCU, B.; VAN DE WERFHORST, L. C.; MURRAY, J. L. S.; HOLDEN, P. A. **Sewage exfiltration as a source of storm drain contamination during dry weather in urban watersheds**. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7151–7157, 2011.

SÉRGIO F. DE AQUINO E CARLOS A. L. CHERNICHARO. **Acúmulo de ácidos graxos voláteis (AGVs) em reatores anaeróbios sob estresse: causas e estratégias de controle.** Eng. Sanit. Ambient. 10(2), 152-161, 2005.

SIDHU, J.P.S., AHMED, W., GERNJAK, W., ARYAL, R., MCCARTHY, D., PALMER, A., KOLOTELO, P. & TOZE, S., **Sewage pollution in urban stormwater runoff as evident from the widespread presence of multiple microbial and chemical source tracking markers.** Science of the Total Environ. 463–464, 488-496, 2013.

SIMPSON, J.M., SANTO DOMINGO, J.W., REASONER, D.J. **Microbial source tracking: state of the science.** Environ. Sci. Technol. 36(24), 5279–5288, 2002.

SINGLETON, D. R., FURLONG, M. A., RATHBUN, S. L., & WHITMAN, W. B. **Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples.** App. Environ. Microbiol. 67(9), 4374-4376, 2001.

SINGLETON, D.R. **Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples.** Appl. Environ. Microbiol. 67(9), 4374-4376, 2001.

SOARES, D. N. E. da S. Bases microbiológicas e químicas da qualidade ambiental da água e areia da orla de Manguinhos. **2009. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ecossistemas) – Centro Universitário de Vila Velha, Espírito Santo, Brasil, 2009.**

SOUSA, V.O.; BARRETO, N.S.E.; CATTER, K.M.; FILHO, A.A.F.; MACRAE, A.; HELENA R.S.; VIEIRA, F. **Specificity of a defined substrate method used to monitor balneability of tropical coastal waters impacted by polluted stormwater.** J. Water Health. 8, 543–549, 2010.

SPERLING, MARCOS. **Estudos e Modelagem da Qualidade da Água de rios.** 588 p., 1. Ed. Belo Horizonte: UFMG, 2007.

SPERLING, MARCOS. **Introdução à Qualidade das Águas e ao Tratamento de Esgotos.** 452 p., 3ª Ed. Belo Horizonte: UFMG, 2006.

STALEY, C.M., RECHKHOW, K.H., LUKASIK, J. AND HARWOOD, V.J. **Assessment of sources of human pathogens and fecal contamination in a Florida freshwater lake.** Water Res. 46, 5799–5812, 2012.

STANDLEY, L.J., KAPLAN, L.A., SMITH, D. **Molecular tracers of organic matter sources to surface water resources.** Environ. Sci. Technol. 34, 3124–3130, 2000.

STETLER, R. E. **Coliphages as indicators of enteroviruses.** Appl. Environ. Microbiol. 48(3), 668–670, 1984.

STEWART, J.R., SANTO DOMINGO, J.W., WADE, T.J. **Fecal pollution, public health, and microbial source tracking.** In: Microbial source tracking. Edited by: Santo Domingo, J. W., Sadowsky, M. J. 34, 1–32, 2007.

STEWART-PULLARO, J., DAUGOMAH, J.W., CHESTNUT, D.E., GRAVES, D.A., SOBSEY, M.D. & SCOTT, G.I. **F+ RNA coliphage typing for microbial source tracking in surface waters.** J. Appl. Microbiol. 101(5), 1015–1026, 2006.

STOECKEL, D.M., HARWOOD, V.J. **Performance, design, and analysis in microbial source tracking studies.** Appl. Environ. Microbiol. 73(8), 2405-2415, 2007.

SUPRIHATIN, I., FALLOWFIELD, H., BENTHAM, R., CROMAR, N. **Determination of faecal pollutants in Torrens and Patawalonga catchment waters in South Australia using faecal sterols.** Water Sci. Technol. 47, 283–289, 2003.

TAMURA, K. **MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.** Mol. Biol. Evol. 15(3), 2011.

TERRY L. MILLER, M.J. WOLIN, E.A. KUSEL, **Isolation and characterization of methanogens from animal feces.** Syst. Appl. Microbiol. 8(3), 10-18, 1986.

THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., & HIGGINS, D. G. **The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.** Nucleic Acids Res. 25(24), 4876-4882, 1997.

TUCCI, C. E.M; HESPANHOL, I; CORDEIRO N, OSCAR, M. **A Gestão da água no Brasil: uma primeira avaliação da situação atual e das perspectivas para 2025.** Rio de Janeiro: IPEA.< <http://www.ipea.gov.br>>. Acesso em: 21 de novembro de 2013.

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.** Appl. Environ. Microbiol. 45, 5209–5217, 2007.

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.

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

VALERIE J. H, MIRIAM, B, SHIAO W, JOE L.R.D. ELLENDER, A.A, KRISTEN N. H, ELIZABETH K.X.Y, CHRISTOPHER F. **Validation and field testing of library-independent microbial source tracking methods in the Gulf of Mexico.** Water Res. 43, 4812-4819, 2009.

VASCONCELOS, U.; MEDEIROS, L.V.; ANDRADE, M.A.G. de; CALAZANS, G.M.T. **Evidência do antagonismo entre *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias indicadoras de contaminação fecal em água.** Rev. Hig. Alim. 20(140), 127-130, 2006.

VEGA MM, FERNANDEZ TB, TARAZONA JV, CASTAÑO A. **Biological and chemical tools in the toxicological risk assessment of Jarama River, Madrid, Spain.** Environ. Pollut. 93(2), 135-9, 1996.

WALTER, K. M.; ZIMOV, S.A; CHANTON, J.P; VERBYLA, D.; CHAPIN, F.S. **Methane bubbling from Siberian thaw lakes as a positive feedback to climate warming.** Nature. 443, 71–75, 2006.

WESTRELL T. Microbial risk assessment and tis implications for risk management in urban water systems. **2004. 84 f. Tese (Doutorado) - University Sweden, 2004.**

WHEELER ALM, E., BURKE, J., SPAIN, A. **Fecal indicator bacteria are abundant in wet sand at freshwater beaches.** Water Res. 37(16), 3978-3982, 2003.

WHITMAN, R.L., SHIVELY, D.A., PAWLICK, H., NEVERS, M.B., BYAPPANAHALLI, M.N. **Occurrence of *Escherichia coli* and enterococci in Cladophora (Chlorophyta) in nearshore water and beach sand of Lake Michigan.** Appl. Environ. Microbiol. 69, 4714-4719, 2003.

WHO. **Guidelines for drinking-water quality.** 4th ed. Geneva, 541 p., 2011.

YAMASHITA, T., K. SAKAE, Y. ISHIHARA & S. ISOMURA. **A2-year survey of the prevalence of enteric viral infections in children compared with contamination in locally harvested oysters.** Epidemiol. Infect. 108, 155–163, 1992.