



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA
RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

Aline Rodrigues Gama

**Identificação de bactérias ambientais obtidas em amostras de
água em comunidades quilombolas de Goiás**

Goiânia, GO
2020.

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE
TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

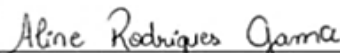
Nome completo do autor: Aline Rodrigues Gama

Título do trabalho: Identificação de bactérias ambientais obtidas em amostras de água em comunidades quilombolas de Goiás

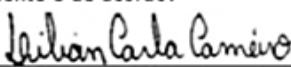
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 19/03/2020

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

Aline Rodrigues Gama

**Identificação de bactérias ambientais obtidas em amostras de
água em comunidades quilombolas de Goiás**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da
Universidade Federal de Goiás como requisito
parcial para obtenção do título de Doutora.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lilian Carla Carneiro

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus

Goiânia, GO

2020.

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Gama, Aline Rodrigues

Identificação de bactérias ambientais obtidas em amostras de água em comunidades quilombolas de Goiás [manuscrito] / Aline Rodrigues Gama. - 2020.

150 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Lilian Carla Carneiro; co-orientador Dr. Luiz Artur Mendes Bataus .

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2020.

Bibliografia. Apêndice.

Inclui siglas, mapas, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Qualidade da água. 2. resistência antimicrobiana. 3. imagem hiperespectral. 4. gene 16S rRNA. 5. SWIR. I. Carneiro, Lilian Carla , orient. II. Título.

CDU 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

ATA DE DEFESA DE TESE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE ALINE

RODRIGUES GAMA - Aos dezessete dias do mês de março do ano de 2020 (17/03/2020), às 14:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. LILIAN CARLA CARNEIRO (UFG), JOSÉ DANIEL GONÇALVES VIEIRA (UFG), ELLEN FLÁVIA MOREIRA (UFG), MÔNICA DE OLIVEIRA SANTOS (UFG) e ARLINDO RODRIGUES GALVÃO FILHO (PUC-GO) para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: "**Parâmetros avaliados na água para consumo de duas comunidades quilombolas de Goiás e métodos de identificação de bactérias ambientais**", em nível de **DOUTORADO**, de autoria de **ALINE RODRIGUES GAMA**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. LILIAN CARLA CARNEIRO, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida à autora da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1492/2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando a candidata **Aprovada ou Reprovada**:

Banca Examinadora	Aprovada / Reprovada
Profa. Dra. Lilian Carla Carneiro	<u> Aprovada </u>
Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira	<u> Aprovada </u>
Profa. Dra. Ellen Flávia Moreira	<u> Aprovada </u>
Profa. Dra. Mônica de Oliveira Santos	<u> Aprovada </u>
Prof. Dr. Arlindo Rodrigues Galvão Filho	<u> Aprovada </u>

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata **Habilitada** , (**Habilitada ou não Habilitada**), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de DOUTORA EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 17h05min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, HELOÍSA DE SOUSA VIEIRA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora.

TITULO SUGERIDO PELA BANCA

Identificação de bactérias ambientais obtidas em amostras de água em comunidades quilombolas de Goiás

Documento assinado eletronicamente por **Lilian Carla Carneiro, Professor do Magistério Superior**, em 01/04/2020, às 12:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **José Daniel Gonçalves Vieira, Professor do Magistério Superior**, em 01/04/2020, às 15:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Arlindo Rodrigues Galvão Filho, Usuário Externo**, em 01/04/2020, às 15:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mônica de Oliveira Santos, Usuário Externo**, em 01/04/2020, às 16:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ellen Flávia Moreira Gabriel, Técnico de Laboratório**, em 03/04/2020, às 09:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1259367** e o código CRC **940DF233**.

**Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da
Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno (a): Ma. Aline Rodrigues Gama

Orientadora: Prof^a. Dr^a Lilian Carla Carneiro

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Artur Mendes Bataus

Membros:

- 1. Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - IPTSP/UFG (membro)**
- 2. Prof^a Dr^a Mônica de Oliveira Santos – Faculdade de Medicina - FM/UFG (membro)**
- 3. Prof. Dr. Arlindo Rodrigues Galvão Filho – Escola de Ciências Exatas e da Computação - ECEC/PUC-GO (membro)**
- 4. Dr^a Ellen Flávia Moreira – Faculdade de Engenharia - FE/UFG (membro)**

Suplentes:

- 1. Prof. Dr. Paulo Sérgio Scalize – Faculdade de Engenharia - FE/UFG**
- 2. Prof. Dr. André Corrêa Amaral – Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública - IPTSP/UFG**

Data: 17/03/2020

Ao Maurício Bruno, pessoa com quem amo partilhar a vida. À minha mãe e aos meus irmãos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me sustentar a cada dia tornando possível a construção dessa tese e por me presentear com aqueles que aqui prestarei meus agradecimentos.

Aos meus orientadores, Profa. Lilian Carla Carneiro e Prof. Luiz Artur Mendes Bataus, obrigada pela oportunidade concedida desde o mestrado, pelo conhecimento compartilhado e pela confiança depositada em mim.

Às comunidades quilombolas: Almeidas e Vila Del Fiori por nos permitir vivenciar suas realidades e ainda fornecer as amostras necessários para a realização deste trabalho.

Ao Prof. José Daniel Gonçalves Vieira por abrir as portas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia – UFG (LAMAB) e permitir a realização deste trabalho. Àqueles que fizeram ou fazem parte do LAMAB, Ariana, Renan, Camila, Dulce, Ana Karullina grata por compartilharem comigo cada aprendizado. Ariana e Renan obrigada por serem até hoje tão prestativos e me oferecer importantes orientações.

Aos meus parceiros do Laboratório de Biotecnologia de Microrganismo (LBMic). Raylane obrigada por sua amizade e por estar sempre pronta para ajudar. Fernando, como foi importante nossa busca conjunta pelo entendimento de nossos resultados. Aline Cristine (Aline das tonsilas, para os íntimos), Renata Kikuda, Carolina, Célia, Paulo, Venine, Thais Oliveira, Adailton, Núbia, Wanderleia, Aroldo, Moniquinha obrigada por tornar os meus dias mais leves com nossas conversas e por me fazer crescer com as discussões científicas.

A todos do Núcleo de Estudos em *Helicobacter pylori*, Profa. Mônica, Lucas, Jaqueline, Ana Caroline, Amanda, Gabriela obrigada pela parceria científica e pelos bons cafés compartilhados.

Aos responsáveis técnicos, Viviane, Elaine e Alex dos Laboratórios Multiusuários do IPTSP por me auxiliarem nos experimentos.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro que com atenção e cordialidade me atenderam durante as dúvidas e questões relacionadas à Pós-graduação.

Ao Prof. Paulo Scalize por ceder o Laboratório de Análises de Águas - UFG, tornando possível a realização de parte importante desse trabalho.

Ao Prof. Clarimar José Coelho e ao Prof. Arlindo Rodrigues por compartilharem o Laboratório de Computação Científica/PUC-GO possibilitando as importantes análises realizadas.

A todos do Laboratório de Genética e Biodiversidade – UFG e do Laboratório de Nanotecnologia-UFG.

Aos professores da banca examinadora (qualificação e defesa) pelas valiosas contribuições.

Ao auxílio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

À minha família (irmãos, cunhados e cunhadas, sobrinhos e sobrinhas, sogros, tias e tios), em especial à minha mãe, razão pela qual cheguei até aqui, obrigada pelo amor incondicional e pelo apoio em todos os momentos.

Ao meu marido, Maurício Bruno, pelo companheirismo, incentivo e por ser aquele que me faz acreditar na realização dos nossos sonhos. Obrigada por me fazer acreditar que chegaria o final desta difícil, mas gratificante etapa.

O meu mais sincero agradecimento a todos aqueles que contribuíram, seja cientificamente ou emocionalmente, para a concretização dessa tese!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A. Mapa da área de estudo desenvolvido no software ArcGis 10.5. B. Imagem de satélite da região da “igrejinha” (São Sebastião da Garganta), onde estão concentradas algumas famílias da Comunidade Almeidas em Silvânia – GO. Fonte: Google Earth 2019.	26
Figura 2. A. Mapa da área de estudo desenvolvido no software ArcGis 10.5. B. Imagem de satélite da Comunidade Jardim Cascata na Vila Del Fiori em Aparecida de Goiânia – GO. Fonte: Google Earth 2019.....	27
Figura 3. Principais agentes patogênicos e suas vias de transmissão/exposição. Fonte: Adaptado de WHO (2011).	28
Figura 4. Mecanismos de transferência genica horizontal. Cada quadrante representa um processo diferente sendo, A: conjugação; B: transformação; C: Transdução; D: Agentes de transferência gênica. Fonte: Adaptado de Wintersdorff et al., 2016.	41
Figura 5. Estação de trabalho SisuCHEMA para aquisição de imagens SWIR. Fonte: Próprio autor.	47
Figura 6. Uma ilustração de um hipercubo espectral criado através da combinação de duas dimensões espaciais (x; y) e uma de comprimento de onda (λ) na imagem hiperespectral. Adaptada de: Sandasi et al., 2014.	48
Figura 7. Mapa da área de estudo desenvolvida no software ArcGis 10.5. C1: Comunidade em Aparecida de Goiânia, C2: Comunidade em Silvânia. Fonte: Próprio autor.	54
Figura 8. Distribuição das amostras em tubos de caldo lactosado. Fonte: Próprio autor.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos pontos de coleta nas comunidades 1 e 2.	55
Tabela 2. Antibióticos utilizados no teste de suscetibilidade.	58
Tabela 3. Cepas bacterianas utilizadas em análise de HSI.	60

LISTA DE ABREVIATURAS

μS/cm	Microsiemens por centímetro
2D	Duas dimensões
ABAS	Associação Brasileira de Águas Subterrâneas
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ADCT	Ato das Disposições Constitucionais Transitórias
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA	<i>American Public Health Association</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CTT	Coliformes Termotolerantes
ddNTP	Didesoxirribonucleotídeo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EC	<i>Escherichia coli</i>
FCP	Fundação Cultural Palmares
FUNASA	Fundação Nacional da Saúde
GPPCQ	Guia de Políticas Públicas para Comunidades Quilombolas
HSI	<i>Hyperspectral Imaging</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPCS	Programa Internacional de Segurança Química
LAMAB	Laboratório de Microbiologia Ambiental
LGBio	Laboratório de Genética & Biodiversidade
NMP	Número Mais Provável
ODS	Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLS	<i>Partial Least Squares</i>

PRC	Portaria de Consolidação
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossomal
SANEAGO	Companhia Saneamento de Goiás
SIM	Sulfito de Hidrogênio, Indol e Motilidade
SNG	Sequenciamento de Nova Geração
SWIR	<i>Short Wave Infrared</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
uH	Unidade de Hazen
UNEP	Programa Ambiental das Nações Unidas
UNICEF	Fundo das Nações Unidas pela Infância
VMP	Valor Máximo Permitido

SUMÁRIO

ESTRUTURA DA TESE.....	20
<i>Capítulo 1</i>	22
1. INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Comunidades tradicionais e seu acesso à água	23
1.1.1. Comunidades Almeidas e Jardim Cascastas em Goiás.....	25
1.2. A qualidade da água como fator de desenvolvimento social e indicador de saúde	27
1.3. Aspectos qualitativos da água para consumo	29
1.3.1. Águas superficiais	29
1.3.2. Águas subterrâneas	30
1.3.3. Legislação aplicável à água para consumo	31
1.3.4. Parâmetros físico-químicos.....	32
1.3.4.1. Potencial hidrogeniônico (pH).....	32
1.3.4.2. Cor aparente	33
1.3.4.3. Dureza total.....	33
1.3.4.4. Turbidez	33
1.3.4.5. Alcalinidade	34
1.3.4.6. Condutividade elétrica	34
1.3.4.7. Nitrato	35
1.3.4.8. Contaminação por metais potencialmente tóxicos.....	35
1.3.5. Contaminação microbiológica	36
1.3.5.1. Enterobacteriaceae	37
1.3.5.2. Resistência a antimicrobianos em bactérias isoladas de água	39
1.4. Identificação de bactérias ambientais	42
1.4.1. Fenotipagem.....	42
1.4.2. Genotipagem.....	43
1.4.3. Imagem hiperespectral	45
2. JUSTIFICATIVA	50
3. OBJETIVOS.....	53
4. METODOLOGIA DETALHADA	54
4.1. Coleta das amostras	54
4.2. Testes físico-químicos	55
4.3. Análise de metais potencialmente tóxicos	55
4.4. Análise de coliformes totais e termotolerantes por tubos múltiplos.....	56
4.5. Análise microbiológica e identificação fenotípica de bactérias.....	57
4.6. Teste de disco de difusão – Antibiograma.....	58
4.7. Amplificação do gene codificador para a subunidade 16S rRNA	59
4.8. Sequenciamento da região codificante 16S rRNA e análise dos resultados.	60
4.9. Obtenção de imagens hiperespectrais	60
<i>Capítulo 2</i>	63

Evaluation of water quality for consumption and prevalence of antibiotic-resistant bacteria: a study in quilombola communities of Goiás, Brazil.....	64
<i>Capítulo 3</i>	83
Evaluation of phenotypic and molecular methods in the identification of environmental bacteria.....	84
<i>Capítulo 4</i>	101
Differentiation of environmental bacteria using hyperspectral imaging technology and multivariate analysis	102
<i>Capítulo 5</i>	117
Considerações finais	118
Perspectivas	120
<i>Referências bibliográficas</i>	121
<i>Apêndice I</i>	139
HPV detection in oral mucosa samples in pediatric patients.....	140
<i>Apêndice II</i>	149
Providencia rettgeri CRR isolated from water for human consumption	150

RESUMO

A qualidade da água já esteve relacionada a apenas aspectos estéticos e sensoriais, tais como cor, odor e sabor. Hoje, em resposta aos avanços na compreensão da relação existente entre água contaminada e doenças, está proposta uma série de normatizações por parte da Organização Mundial da Saúde e Ministério da Saúde, que regulamentam os parâmetros de potabilidade da água própria para o consumo humano. A partir de estudos e levantamentos acerca do modo de vida de duas comunidades quilombolas localizadas em Aparecida de Goiânia e Silvânia, no estado de Goiás, o presente trabalho propôs a verificação da qualidade da água de consumo dessas comunidades e a análise dos métodos de identificação das bactérias isoladas. Para as análises foram realizadas coletas de amostras de água diretamente das torneiras que fornecem água utilizada para o consumo nas comunidades quilombolas supracitadas. O processamento das amostras para a análise microbiológica deu-se início com a detecção de coliformes seguido do isolamento e identificação fenotípica das colônias isoladas, com finalidade de reconhecimento dos gêneros/espécies que foram posteriormente submetidos a análise do perfil de resistência a antibióticos. O DNA dos isolados bacterianos foi extraído e utilizado para amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA. Uma comparação entre os resultados obtidos na identificação fenotípica e os baseados nas sequências genômicas foi realizado. Além disso, a imagem hiperespectral (HSI) dos isolados foi obtida em câmara SWIR para classificação baseada em assinatura espectral. A análise físico-química se deu por meio da verificação do pH, da alcalinidade, da dureza, da cor, da turbidez, da concentração de nitrato e metais potencialmente tóxicos. Os resultados demonstraram que as amostras obtidas da comunidade quilombola de Aparecida de Goiânia, apresentaram 16 isolados bacterianos, considerando que *Klebsiella pneumoniae* foi a mais frequente (quatro isolados) dentre os pontos coletados, seguida de *Escherichia coli* (três isolados). As amostras coletadas na comunidade de Silvânia, apresentaram 32 isolados, destes *Acinetobacter lwoffii* foi a espécie mais frequente (nove isolados), seguida de *Staphylococcus auricularis* (sete isolados), dentre os isolados um grande número de bactérias apresentaram resistência a múltiplos antibióticos. Expressivas foram as divergências geradas entre a identificação fenotípica e a baseada em sequências genômicas; menos de 20 % dos isolados obtiveram concordância em nível de gênero. Foi possível, por meio da análise das HSI, separar os isolados bacterianos em grupos distintos, isso no conjunto de isolados, a nível de gênero e de espécie. Com base na técnica utilizada, não houve valores significativos para as análises físico-químicas e de metais potencialmente tóxicos. A partir dos resultados aqui observados, torna-se importante a execução de ações, por parte do poder público, que visem a melhoria na qualidade da água e em consequência na qualidade de vida das pessoas que vivem nas comunidades estudadas. Além disso, ressaltamos aqui a importância do uso de metodologias adequadas de identificação de bactérias de origem ambiental, não sendo possível, para o mesmo, apenas o uso de características fenotípicas. Mediante a necessidade de metodologias de identificação bacteriana, consideramos que o uso de HSI para esse fim, será brevemente uma prática comum assim que bancos de dados mais robustos forem construídos.

Palavras-Chaves: Qualidade da água, resistência antimicrobiana, imagem hiperespectral, gene 16S rRNA, SWIR.

ABSTRACT

Water quality has already been related to only aesthetic and sensory aspects, such as color, odor and taste. Today, in response to advances in understanding the relationship between contaminated water and disease, a series of regulations are proposed by the World Health Organization and the Ministry of Health that regulate the potability of water for human consumption. Based on studies and surveys on the way of life of two quilombola communities located in Aparecida de Goiânia and Silvânia, in the State of Goiás, the present work proposed the verification of the microbiological, physicochemical and toxicological quality of the water consumed by the residents of these communities. For the analyzes, samples of water from artesian wells and cisterns that supply the residences were collected and used for consumption in the Quilombola communities mentioned. A physical-chemical analysis was carried out by means of pH verification, alkalinity, hardness, physicality, turbidity, nitrate concentration and potentially toxic metals. The process of demonstration for a microbiological analysis began with the detection of coliforms followed by iso-regulation and phenotypic identification of isolated colonies, with the final recognition of two genera / species, which were subsequently submerged in the analysis of antibiotic resistance profile. The DNA of two bacterial isolates has been extracted and used for amplification and sequencing of the 16S rRNA gene. A comparison between the results obtained from the phenotypic identification and the ones based on the genomic sequence was carried out. In addition, at hyperspectral image (HSI) two isolates were obtained in camera SWIR, for classification, based on spectral signature. The results show that, as we have obtained, the Quilombola community of Aparecida de Goiânia has 16 bacterial isolates, considering that *Klebsiella pneumoniae* was more frequent (four isolates) with the collected points; followed by *Escherichia coli* (three isolated). As we have collected from the community of Silvânia, we show that there are no significant values for physicochemical analyzes and potentially toxic metals. The microbiological data showed 32 isolates, weaning, *Acinetobacter lwoffii* was a species more frequent (nine isolates), followed by *Staphylococcus auricularis* (seven isolates), with a large number of bacteria showing resistance to multiple antibiotics. Expressive were the differences generated between a phenotypic identification and genomic sequences; less than 20% two isolates achieved gender level agreement. It was possible, by means of HSI analyzes, to separate the bacterial isolates in different groups, and is not a group of isolates, in genus and species. Based on the technique used, there were no significant values for the physical-chemical and potentially toxic metal analyzes. Based on two observed results, it becomes important to perform actions, by the public power, that aim to improve water quality and in consequence of the life quality of people that live in studied communities. In addition, the use of appropriate methodologies for identifying environmentally-based bacteria, not being confidential or using phenotypic characteristics, is highlighted. Through the need for bacterial identification methodologies, it is considered that or use of HSI for this purpose, it will briefly be a common practice, for the construction of more robust data banks.

Keywords: Water quality, antimicrobial resistance, hyperspectral imaging, 16S rRNA gene, SWIR.

Estrutura da

Tese

ESTRUTURA DA TESE

A tese encontra-se subdividida em cinco capítulos: no primeiro capítulo consta a introdução, a justificativa, os objetivos e a metodologia detalhada. Os três seguintes estão organizados na forma de artigos científicos e o quinto capítulo apresenta as considerações finais. A estrutura está disposta da seguinte forma:

Capítulo 1. Apresenta a Introdução, a Justificativa, os Objetivos e a Metodologia detalhada.

Capítulo 2. Evaluation of water quality for consumption and prevalence of antibiotic-resistant bacteria: a study in quilombola communities of Goiás, Brazil. Este estudo propôs avaliar a qualidade microbiológica e físico-química da água consumida em duas comunidades quilombolas presentes no estado de Goiás. Este artigo foi aceito para publicação na Revista Sapiência: sociedade, sabers e práticas educacionais em 16 de setembro de 2019 e publicado em 20 de janeiro de 2020.

Capítulo 3. Evaluation of phenotypic and molecular methods in the identification of environmental bacteria. O estudo almejou avaliar e comparar a identificação realizada por métodos fenotípicos e moleculares de bactérias de origem ambiental. O artigo foi submetido ao Journal of Microbiological Methods em 30 de dezembro de 2019.

Capítulo 4. Differentiation of environmental bacteria using hyperspectral imaging technology and multivariate analysis. Este estudo avaliou o uso de imagem hiperespectral e de análise multivariada para a diferenciação de isolados bacterianos a nível de gênero e espécie. A versão final do artigo foi submetida à Current Microbiology em 22 de fevereiro de 2020.

Capítulo 5. Apresenta as considerações finais e as perspectivas.

Apêndice I. HPV detection in oral mucosa samples in pediatric patients at University Hospital of Goiás, Brazil. Consta na íntegra o artigo aceito para publicação em 29 de novembro de 2019 no Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine. Este trabalho versa sobre o uso de PCR convencional e PCR em tempo real para detecção de

HPV na mucosa oral de crianças. Embora não faça parte do propósito principal da tese, foi um importante trabalho desenvolvido durante o doutorado.

Apêndice II. *Providencia rettgeri* CRR isolated from water for human consumption. Este trabalho versa sobre a identificação de uma bactéria com alto potencial patogênico isolada de amostras de água para consumo. Este estudo gerou uma short communication que foi submetida à Anais da Academia Brasileira de Ciências em 11 de julho de 2019.

Capítulo 1

Introdução, Justificativa, Objetivos e Metodologia detalhada

1. INTRODUÇÃO

1.1 Comunidades tradicionais e seu acesso à água

Segundo o Decreto 6040/2007, comunidades tradicionais são definidas como grupos culturalmente diferenciados que assim se reconhecem e que apresentam formas próprias de organização social, além disso, tais grupos ocupam e usam territórios e seus recursos naturais como condição para sua reprodução cultural, social, religiosa, ancestral e econômica, fazendo uso de conhecimentos, inovações e práticas geradas e transmitidas pela tradição. No Brasil há muitas comunidades tradicionais, as quais podem viver aquém das condições ideais de vida de uma população (Silva & Hespanhol, 2016).

Dentre as comunidades tradicionais destacam-se as comunidades indígenas, quilombolas, geraizeiros (populações tradicionais que vivem no Cerrado do norte de Minas Gerais), seringueiros, vazanteiros. As comunidades quilombolas surgiram no Brasil ainda durante a administração colonial, no decurso do regime escravagista. Muitos foram os que lutaram contra esse sistema, criando unidades de apoio denominadas de quilombos. Mas, foi apenas em 1988 que as comunidades quilombolas foram reconhecidas por meio do Artigo 68 do Ato das Disposições Constitucionais Transitórias (ADCT) (Silva, 2010; Brasil, 1988).

Em 12 de março de 2004 foi instaurado o Programa Brasil Quilombola que trazia como objetivo a instituição de marcos da política de Estado para as áreas quilombolas. A partir desse programa foi instituída a Agenda Social Quilombola (Decreto 6261/2007) que apresentou ações voltadas às comunidades quilombolas em diferentes áreas, tais como certificação e regularização fundiária de áreas de quilombo, obras de infraestrutura na área de saneamento, habitação, eletrificação, comunicação e vias de acesso, desenvolvimento produtivo e autonomia econômica e iniciativas de garantia de direitos promovidas por órgãos públicos e sociedade civil (Brasília, 2013).

Presentes em 24 estados da federação, as comunidades quilombolas, dispõem-se em sua maior parte nos estados do Maranhão, Bahia, Pará, Minas Gerais e Rio Grande do Sul, não estando presentes nos estados do Acre e Roraima e no Distrito Federal (Brasília, 2013).

O Artigo 3º do Decreto nº 4.887, de 20 de novembro de 2003, reserva a Fundação Cultural Palmares (FCP) a competência de emitir certidão às comunidades quilombolas e sua inscrição em cadastro geral. Dessa forma, de acordo com os arquivos da FCP atualizados até a Portaria nº 36/2020 publicada no Diário Oficial da União em 21 de

fevereiro de 2020, há em todo o território brasileiro 2.775 comunidades quilombolas devidamente certificadas. Destas, 64 encontram-se no estado de Goiás considerado o maior quilombo e extensão territorial (Fundação Cultural Palmares, 2020).

Em países em desenvolvimento, muitas comunidades não recebem serviços de saneamento básico. A falta de água potável leva as pessoas dessas comunidades a irem à busca de outras fontes de água que muitas vezes não são seguras. A utilização de água não própria para o consumo tem levado muitas pessoas das comunidades a sofrerem com problemas de saúde (Aziz et al., 2015).

A realidade vivida por pessoas residentes nas comunidades quilombolas atrai a atenção de grupos de direitos humanos e de pesquisa, uma vez que muitos vivem em condições precárias de qualidade de vida sem serem assistidos pelo poder público. Em 2013, segundo o Guia de Políticas Públicas para Comunidades Quilombolas (GPPCQ), da Secretaria de Políticas Públicas para Comunidades Tradicionais, 55,21 % da população quilombola não possuía água canalizada, 33,06 % não possuía banheiro ou sanitário, 54,07 % não dispunha de saneamento adequado (sendo, 15,07 % com esgoto a céu aberto e 39 % possuía apenas fossa rudimentar).

O Ministério da Saúde por meio da Fundação Nacional da Saúde (FUNASA), propôs ações de saneamento sanitário e abastecimento de água potável para todas as comunidades quilombolas com a criação do Programa Saneamento Básico. A ampliação da cobertura de ações e serviços de saneamento básico em comunidades rurais, tradicionais e especiais é o principal objetivo do programa, que de maneira prática, visa a implementação e/ou a manutenção dos sistemas de abastecimento de água e esgoto sanitário, além de promover melhorias sanitárias domiciliares (Brasília, 2013).

Além do Programa Saneamento Básico, o Governo Federal criou o Programa Água para Todos, sendo este parte integrante do Plano Brasil Sem Miséria. Por meio desse programa o governo visa universalizar o acesso a água para populações que não possuem esse serviço, sendo as comunidades quilombolas priorizadas nesse ato. O fornecimento da água de qualidade se faz pela instalação de equipamentos como: cisternas (consumo e produção), sistemas simplificados de produção, pequenas barragens e kits de irrigação (Presidência da República, decreto nº 7.535, 2011).

Entretanto, mesmo existindo tantos programas de alcance social, muitas comunidades quilombolas não tem acesso às melhorias propostas. Estudos realizados em comunidades quilombolas do interior de Minas Gerais (Pinho et al., 2015), Bahia (Gomes et al., 2013), Alagoas (Ferreira et al., 2011), São Paulo (Volochko & Batista, 2009), revelam condições

precárias no que tange a qualidade da água, à coleta e tratamento de esgoto e ao descarte de lixo. Grande parte das pessoas que residem em tais comunidades utiliza água de poços ou nascentes, sem nenhum tratamento e destes a maioria não dispõem de destinação para o esgoto. As más condições enfrentadas por essa população tendem a contribuir com o surgimento de doenças causadas por bactérias, vírus e outros parasitos de disseminação hídrica.

1.1.1. Comunidades Almeidas e Jardim Cascastas em Goiás

O estudo em questão foi realizado em duas comunidades quilombolas, estas comunidades estão localizadas em dois municípios do estado de Goiás, o município de Silvânia e o município de Aparecida de Goiânia. O município de Silvânia surgiu por volta do ano de 1774, com a descoberta de lavras de ouro na região. A presença do ouro atraiu aventureiros que chegaram à região de Silvânia carregando consigo uma imagem de Nosso Senhor do Bonfim, por essa razão o arraial que surgiu recebeu esse nome. Apenas em 1943 é que a região recebeu o nome de Silvânia em homenagem a família Silva que ocupavam cargos importantes na cidade (Governo Municipal de Silvânia, 2017).

A cidade está localizada a 82 km de Goiânia, situada ao sul do estado apresentando uma área de 2.264,769 km². Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o município apresentou no último censo realizado em 2010 um total de 19.089 pessoas. Segundo dados do mesmo instituto, apresenta uma população estimada de 20.573 pessoas em 2018 (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2018).

A comunidade quilombola presente no município de Silvânia está localizada na zona rural e em 2005 foi reconhecida e denominada comunidade Almeidas. Nesta comunidade residem cerca de 40 famílias. Aproximadamente 12 famílias moram próximas umas das outras em uma região denominada “igrejinha” e as demais moram em locais mais afastados (Figura a). Por ser uma comunidade rural, os moradores enfrentam problemas característicos desses ambientes, tais como falta de saneamento básico, água tratada e coleta de lixo (Santos & Silva, 2014).

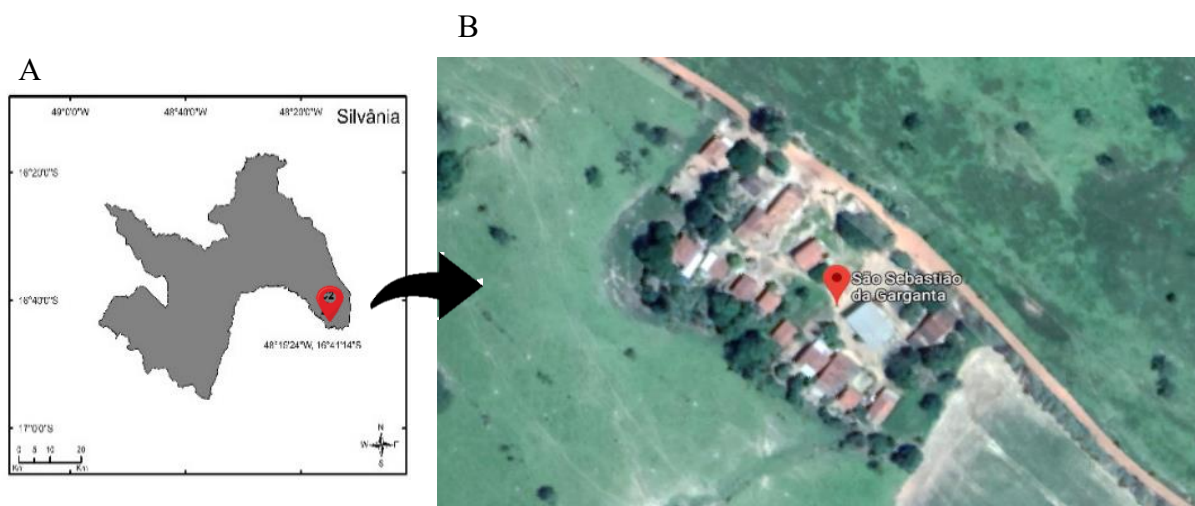


Figura 1. A. Mapa da área de estudo desenvolvido no software ArcGis 10.5. B. Imagem de satélite da região da “igrejinha” (São Sebastião da Garganta), onde estão concentradas algumas famílias da Comunidade Almeidas em Silvânia – GO. Fonte: Google Earth 2019.

A segunda comunidade quilombola desse estudo está localizada na zona urbana no município de Aparecida de Goiânia. A fundação de Aparecida de Goiânia ocorreu em 1922 favorecida pela doação de terras feita por fazendeiros moradores da região. Possui uma população de aproximadamente 595.957 habitantes, distribuída em uma área de 288,4 km² (Prefeitura de Aparecida de Goiânia, 2018).

Denominada comunidade Jardim Cascata, a comunidade quilombola do município de Aparecida de Goiânia foi criada em 1991, mas foi reconhecida apenas em 2007, nessa comunidade vivem cerca de 20 famílias. As casas se localizam próximas umas das outras na Vila Del Fiori, em um conjunto habitacional construído pelo poder público municipal com recursos do programa Minha Casa Minha Vida do Governo Federal (Figura 2). A água utilizada para consumo na comunidade é proveniente de cisternas ou fornecida pela Companhia Saneamento de Goiás (SANEAGO) (Santos & Silva, 2014; Borges & Santana, 2017).

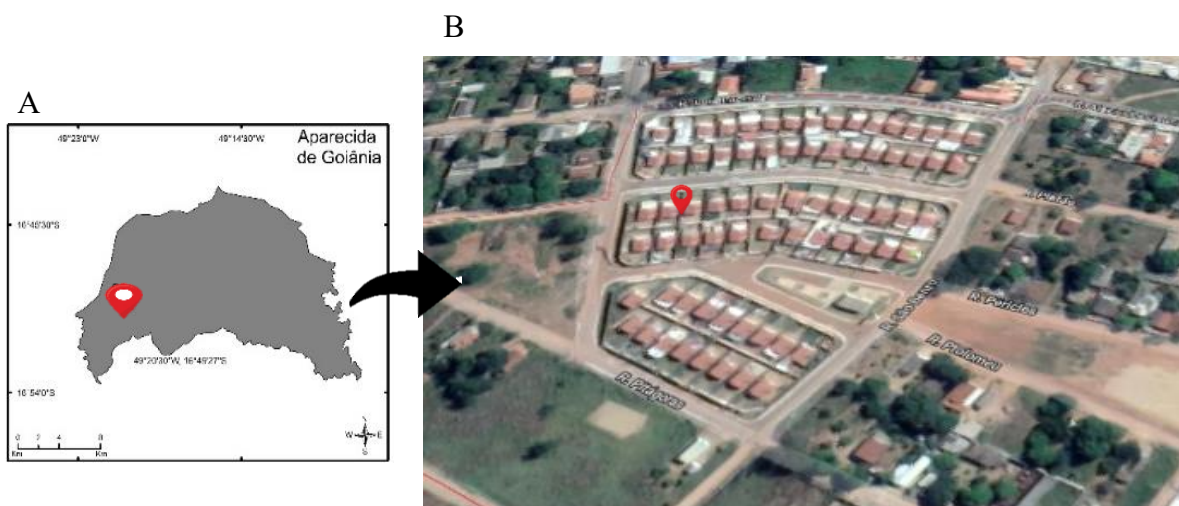


Figura 2. A. Mapa da área de estudo desenvolvido no software ArcGis 10.5. B. Imagem de satélite da Comunidade Jardim Cascata na Vila Del Fiori em Aparecida de Goiânia – GO. Fonte: Google Earth 2019.

1.2. A qualidade da água como fator de desenvolvimento social e indicador de saúde

A água é essencial para o sustento da vida e por isso seu suprimento deve ser adequado, seguro e disponível a todos. Não há dúvidas de que o acesso à água potável de qualidade pode trazer benefícios à saúde, baseados nessa verdade e incentivados pela comunidade científica a Organização das Nações Unidas (ONU), votou no ano de 2010, pela inclusão do acesso a água potável e a recursos sanitários como parte dos direitos humanos (World Health Organization - WHO, 2010).

De acordo com o novo relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgado juntamente com o Fundo das Nações Unidas pela Infância (UNICEF) cerca de três em cada 10 pessoas (aproximadamente 2,1 bilhões) no mundo, não tem acesso a água potável e disponível em suas casas e um número ainda maior de pessoas (cerca de 4,5 bilhões) não dispõe de condições adequadas de saneamento básico. Como resultado desse cenário todos os anos milhares de crianças, especialmente as menores de cinco anos, morrem devido a diarreia ocasionada por saneamento deficiente e água contaminada (Ramírez-Castilho et al., 2015).

Anualmente cerca de um bilhão de dólares são gastos, apenas nos Estados Unidos, com despesas médicas para tratamento de doenças ligadas a água e em todo o mundo é estimado uma perda de 12 bilhões de dólares. Embora, as doenças de associação à água sejam mais prevalentes em países em desenvolvimento, os países desenvolvidos não estão livres desse problema (Pandey et al., 2014; Ramírez-Castilho et al., 2015).

Conhecendo a realidade da qualidade da água e as conseqüentes infecções por veiculação hídrica, a ONU em 2015, destacou dentre os 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), o acesso universal e equitativo a água potável e saneamento básico, determinando por meio de metas a eliminação de doenças transmitidas pela água até o ano de 2030 (Organização das Nações Unidas - ONU, 2015).

Com o objetivo de promover a proteção e manutenção da saúde pública a OMS criou em 2011 um guia denominado *Guidelines for drinking-water quality*, que apresenta diretrizes para minimizar os riscos de contaminação microbiológica e química da água potável. Para tanto, a OMS estipula alguns requisitos básicos para a garantia de uma água potável segura, dentre esses requisitos estão: metas baseadas na saúde estabelecidas por uma autoridade sanitária competente, sistemas de tratamento adequados e devidamente geridos e um sistema de vigilância. Medidas efetivas aplicadas a melhoria de saneamento e que levem a população a ter acesso à água adequada ao consumo e que em continuidade melhorem as condições de higiene, podem promover a redução de cerca de ¼ (uma de quatro partes) das mortes em decorrência de doenças diarreicas no mundo (WHO, 2011).

O sétimo capítulo do *Microbial Fact Sheets*, do Guia para a Qualidade da Água de Consumo da OMS (WHO, 2011), apresenta as principais doenças de rota fecal-oral veiculadas pela água e transmitidas por ingestão, contato em feridas na pele e inalação. Neste texto, a Figura 3 foi obtida do documento referenciado e modificada para ressaltar os principais microrganismos patogênicos encontrados no Brasil.

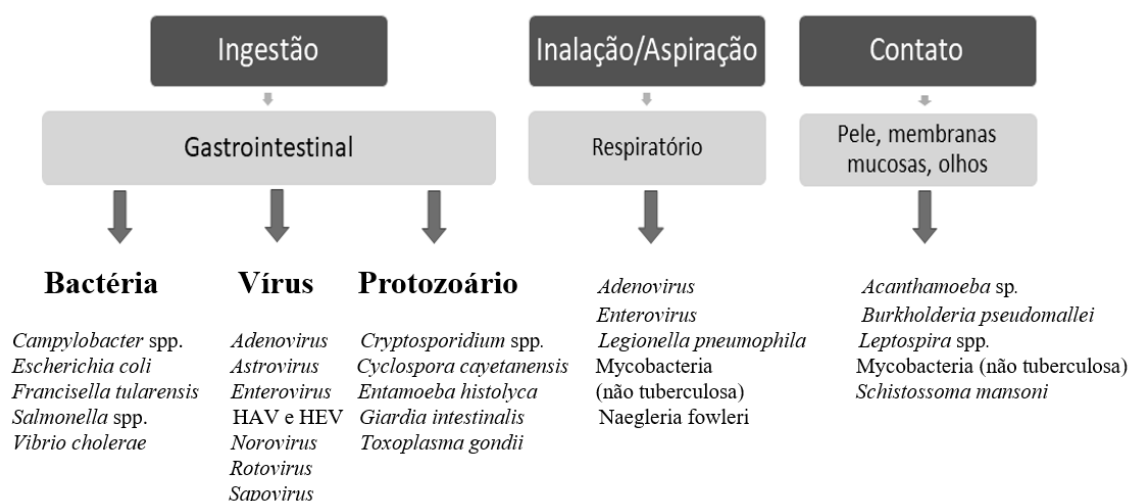


Figura 3. Principais agentes patogênicos e suas vias de transmissão/exposição. Fonte: Adaptado de WHO (2011).

O monitoramento e a aplicação de regulamentações relativas à qualidade da água somada a sistemas microbiológicos eficazes, a rápida identificação de patógenos e a avaliação de risco à saúde podem levar ao alcance de água para consumo livre de patógenos, melhorando assim a qualidade de vida das pessoas (Ramírez-Castilho et al., 2015).

1.3. Aspectos qualitativos da água para consumo

1.3.1. Águas superficiais

As águas superficiais são consideradas pela Agência Nacional de Águas (ANA), como águas que não penetram no solo, permanecendo na superfície, dando origem a rios, riachos, lagoas e córregos. Por estar mais acessível, essa fonte de água é considerada umas das principais fontes de abastecimento de água potável no planeta.

Diferentes fatores determinam a qualidade das águas superficiais, dentre eles destacam-se os fatores naturais como o tipo de solo e a cobertura vegetal predominante, o uso e manejo do solo e principalmente os diversos tipos de ações antrópicas (Pedroso et al., 1998).

Dentre os fatores naturais que exercem significativo impacto nas características das águas superficiais destacam-se os geológicos, topográficos, meteorológicos, hidrológicos e biológicos. Dentre estes, os meteorológicos, os geológicos e os hidrológicos são os fatores que mais afetam as águas superficiais pois influenciam diretamente na qualidade e quantidade da disponibilidade de água (Meybeck et al., 2001).

Ações antrópicas nas águas superficiais podem acarretar em alterações relevantes em sua qualidade, podendo tornar essa fonte de água imprópria para usos estabelecidos na legislação ambiental. As ações antrópicas prejudiciais são entendidas como fontes de poluição que representa a entrada de substâncias químicas, físicas ou biológicas, que apresentam a capacidade de alterar os corpos hídricos. Em ambientes aquáticos a poluição química promove a deficiência de oxigênio, a eutrofização e toxicidade. Enquanto que a poluição física leva ao aumento da turbidez e pode alterar o parâmetro cor da água diminuindo seus padrões de qualidade, por sua vez a poluição biológica é caracterizada pela introdução de microrganismos patogênicos que ocorre especialmente pelo lançamento de águas residuárias nas bacias hidrográficas (Sperling, 2005).

Considerando que o uso de águas superficiais para o consumo humano ainda é uma prática comum em muitas localidades e que a qualidade desta água está relacionada a riscos à saúde pública, é de extrema importância que haja o monitoramento constante dessas fontes, para que as populações que dela fazem uso, recebam uma água com os padrões de qualidade estabelecidos pelas legislações (Koch et al., 2017).

1.3.2. Águas subterrâneas

Segundo a Associação Brasileira de Águas Subterrâneas (ABAS), a água subterrânea é a água encontrada abaixo da superfície da Terra, presente em poros ou vazios intergranulares das rochas sedimentares, ou por vezes fazendo o preenchimento de fraturas, falhas ou fissuras das rochas compactas. A água subterrânea disponível em lençóis freáticos é largamente utilizada em todo o mundo, como fonte primária de abastecimento público. No Brasil importantes cidades tais como Ribeirão Preto – SP, Maceió – AL, Recife – PE, Barreiras – BA, fazem uso dessa água, como fonte exclusiva ou complementar de abastecimento (IBGE, 2000).

Diante do seu intenso uso a contaminação dessa fonte de água pode acarretar em graves problemas de saúde pública. Essa situação tem despertado interesse na esfera científica, pois ao contrário do que muitos acreditavam, estudos tem mostrado que a água subterrânea também apresenta contaminação por patógenos, elementos tóxicos e parâmetros físico-químicos distantes dos padrões estabelecidos. Acredita-se que a contaminação da água subterrânea está associada à matéria fecal, lixo doméstico, agricultura, escoamento urbano e de pastagens (Asamoah e Amorin 2011; Pandey et al., 2014).

Os aquíferos livres, conhecidos por serem uma formação geológica permeável e superficial, também apresentam água subterrânea com potencial uso pelo ser humano e por estarem em regiões com menor profundidade apresentam alto risco de contaminação química e microbiológica em decorrência da infiltração de águas superficiais contaminadas ou dos resíduos de fossas sépticas (Pandey et al., 2014).

Estudos têm demonstrado que muitos agentes patogênicos tais como: *Salmonella* spp., *E. coli*, *S. faecalis* e enterovírus, são encontrados em condições viáveis em águas subterrâneas. A presença de bactérias em águas subterrâneas está intimamente relacionada com a contaminação do solo, acima dos lençóis freáticos e das reservas de água (Pang et al. 2004). Solos muito permeáveis favorecem a contaminação das águas subterrâneas, pois

quanto maior são os poros menor será a taxa de remoção dos microrganismos durante o processo de percolação da água (Darnault et al., 2004; Wang et al., 2014).

1.3.3. Legislação aplicável à água para consumo

O Anexo XX da PRC n° 5 em seu Art. 1º, estabelece os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano, destinada à ingestão, preparação e produção de alimentos e à higiene pessoal, e seu padrão de potabilidade aplicável a água para esse fim, proveniente de sistema e solução alternativa de abastecimento de água, não sendo aplicável à água mineral natural, à água natural e às águas adicionadas de sais destinadas ao consumo humano e as outras águas utilizadas para fabricação de produtos. De acordo com essa legislação, toda a água utilizada para o consumo humano, distribuída coletivamente por sistemas ou soluções alternativas coletivas ou individual de abastecimento deve ser passível de controle e vigilância da qualidade da água exercida pelas secretarias municipais de saúde (Ministério da Saúde - MS, 2017).

As soluções alternativas coletivas de abastecimento são definidas como sendo uma modalidade de abastecimento destinada a oferecer água potável obtida de reservas subterrâneas ou superficiais, com ou sem canalização e sem rede de distribuição, ao responsável por esse sistema compete: exercer o controle da qualidade da água e manter a qualidade da água segundo os termos da lei, garantir o funcionamento e a manutenção das instalações de abastecimento de acordo com as normas estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), fornecer às autoridades de saúde pública os dados dos parâmetros mensais, trimestrais e semestrais da qualidade da água, realizar o monitoramento da qualidade da água no ponto de captação e comunicar sobre qualquer alteração, contribuir com ações para proteção dos mananciais e bacias hidrográficas e comunicar à autoridade de saúde pública e a população, quando houver detecção de qualquer risco à saúde (MS, 2017).

Além dos padrões microbiológicos, a água potável deve estar em conformidade com o padrão de substâncias químicas que representam riscos a saúde, além de obedecer ao padrão organoléptico descrito no Anexo 10 do Anexo XX da PRC n° 5 (2017). Quando for detectado amostras com resultado positivo, para contaminação microbiológica, deve-se proceder com ações corretivas e novas amostras devem ser coletadas até ser atingido resultados satisfatórios. Além da avaliação mensal da presença de bactérias relacionadas à contaminação fecal, é recomendado o monitoramento de vírus entéricos nos pontos de

captação de água, proveniente de mananciais superficiais com o objetivo de amparar estudos de avaliação de risco microbiológico (MS, 2017).

O monitoramento de cisto de *Giardia* spp. e de oocistos de *Cryptosporidium* spp. é recomendado apenas para sistemas de abastecimento e soluções alternativas coletivas de abastecimento que utilizem mananciais superficiais e deve ser realizado quando for identificado por média aritmética anual um valor igual ou superior a 1.000 *E. coli*/100 mL (Grott et al., 2016).

Deve ser observado o padrão de turbidez das amostras de água como método complementar da garantia da qualidade da água. Os Valores Máximos Permitidos (VMP) devem ser observados de acordo com cada ponto de coleta. As soluções alternativas coletivas de abastecimento supridas por mananciais subterrâneos devem realizar cloração da água e a verificação mensal de contaminação por *E. coli*, utilizando amostras de ponto anterior a desinfecção (MS, 2017).

1.3.4. Parâmetros físico-químicos

A caracterização físico-química da água é importante para se entender os efeitos de ações naturais e antrópicas exercidas sobre ambientes aquáticos (Piratoba et al., 2017). Para a caracterização da água potável os parâmetros físico-químicos são imprescindíveis.

A seguir os parâmetros pH, cor, dureza, turbidez, alcalinidade, condutividade e concentração de nitrato são descritos.

1.3.4.1. Potencial hidrogeniônico (pH)

O pH (potencial hidrogeniônico), é utilizado para representar a atividade do íon hidrogênio na água de forma logaritimizada. Essa característica química da água representa o equilíbrio entre íons H^+ e OH^- , podendo variar entre 0,0 a 14,0, quando inferior a 7,0 indica que a água é ácida, quando igual a 7,0 indica que é neutra e quanto superior a 7,0 indica que a água é alcalina (Telles & Góis, 2013).

O pH, juntamente com outros parâmetros, pode fornecer indícios da intensidade da poluição, do metabolismo de organismos produtores de ácidos ou ainda de impactos no ambiente aquático, podendo em águas naturais variar entre 4,0 e 9,0 (Zuin et al., 2009).

1.3.4.2. Cor aparente

Substâncias dissolvidas na água dão a ela uma característica física denominada de cor aparente (Piratoba et al., 2017). Para a determinação da potabilidade da água a cor é um parâmetro avaliado de acordo com o Anexo XX da PRC n° 5 (2017), sendo o VMP para esse parâmetro, de 15 uH (unidade de Hazen)

A decomposição de matéria orgânica origina dentre outras substâncias a lignina, os taninos, as substâncias húmicas e fúlvicas que potencializam o parâmetro cor da água. Além das razões naturais que explicam o aumento no parâmetro cor, ações humanas tais como lançamento de esgoto doméstico e industrial, também causam influência na constituição da cor da água. Compostos inorgânicos como ferro e manganês, também podem causar a coloração da água. Esses compostos fazem parte da constituição do solo e podem ser carregados pela água da chuva e dissolvidos na água (León, 2005).

1.3.4.3. Dureza total

A dureza é caracterizada como sendo a concentração de cátions multimetálicos em solução. Os cátions mais comumente associados à dureza são o cálcio, o magnésio, o ferro, o manganês, o estrôncio e o alumínio. Fatores naturais, como por exemplo, dissolução de rochas calcárias ricas em cálcio e magnésio ou ações antropogênicas como o lançamento de esgotos, estão relacionados com o aumento da dureza na água (MS, 2006).

O Anexo XX da PRC n° 5 (2017), estabelece como VMP de dureza o valor de 500 mg/L que representa o equivalente ao carbonato de cálcio (CaCO_3). A Secretaria de Vigilância em Saúde (MS, 2006), afirma que há evidências de que a ingestão de águas duras (entre 150 e 300 mg/L), podem contribuir para uma menor incidência de doenças cardiovasculares.

1.3.4.4. Turbidez

A turbidez é entendida como sendo uma medida do grau da interferência à passagem de luz através de um líquido, devido a presença de material em suspensão. Ocorrências naturais tais como presença de solos com alta capacidade de sofrer erosão ou antrópicas como lançamento de esgotos domésticos e industriais e práticas agrícolas inadequadas pode potencializar a turbidez da água (MS, 2006).

A garantia do padrão de qualidade microbiológica da água pode ser verificada pelo padrão de turbidez, sendo o VMP para a água potável de 5 mg/L. Essa exigência se justifica no fato de que há influência da turbidez nos processos de desinfecção, uma vez que o material em suspensão pode envolver os organismos e dificultar a ação do desinfetante (Brasil, 2014). Por essa razão, água com um alto grau de turbidez pode ser associada com presença de microrganismos (MS, 2017).

1.3.4.5. Alcalinidade

A alcalinidade da água é devido primeiramente à presença de sais do ácido carbônico, tais como bicarbonatos e carbonatos, e hidróxidos em sua maioria metais alcalinos ou alcalinos-terrosos e secundariamente por sais de ácidos fracos como fosfatos, sulfetos, amônia e outros (Piveli & Kato, 2005).

A capacidade da água em neutralizar ácidos é verificada pela medição da alcalinidade, que determina o grau de tamponamento da água, ou seja, sua condição de resistir a mudança de pH. Ambientes aquáticos com valores altos de alcalinidade, podem manter aproximadamente o mesmo pH, mesmo quando estão constantemente recebendo soluções com teor ácido ou básico (MS, 2006).

Na maioria das vezes a alcalinidade apresenta significativa importância para a qualidade sanitária da água, apenas quando é devida a presença de hidróxidos ou quando causa influência na qualidade dos sólidos totais (Piratoba, 2017). De acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde (MS, 2006), a maioria das águas naturais apresenta valores de alcalinidade na faixa de 30 a 500 mg/L de CaCO_3 .

1.3.4.6. Condutividade elétrica

A concentração iônica da água, caracterizada pela presença de íons positivos (cátions) e negativos (ânions), determina sua capacidade de condução de corrente elétrica a esta capacidade dá-se o nome de condutividade elétrica (MS, 2006).

Segundo Piñeiro Di Blasi et al. (2013), a condutividade, é um importante parâmetro para a determinação da qualidade da água. Os períodos de sazonalidade podem afetar a condutividade, uma vez que, em períodos de chuva os íons podem encontrar-se mais diluídos. Além dos fatores naturais, atividades antrópicas como o descarte de esgoto em corpos de água podem também afetar a condutividade da mesma (Esteves, 2011). Não há

um padrão de condutividade descrito na legislação, mas segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde (MS, 2006) águas naturais apresentam condutividade na faixa de 10 a 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e em ambiente poluídos por esgotos domésticos ou industriais os valores podem chegar a 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

1.3.4.7. Nitrato

O nitrogênio apresenta-se na água sob várias formas, tais como a molecular, na forma de amônia, nitrito ou nitrato. É um elemento crucial para o desenvolvimento de todos os seres vivos, pois desempenha papel importante na constituição das moléculas de proteínas, vitaminas e hormônios (Braga et al., 2005).

O despejo de esgotos domésticos e industriais, fertilizantes e excrementos de animais é a principal causa de aumento do nitrogênio na água e esse aumento pode levar a processos de eutrofização prejudicando a qualidade da água (Telles & Góis, 2013).

Devido sua instabilidade na presença de oxigênio, o nitrito é encontrado em quantidades menores. Quando presente, o nitrito é rapidamente oxidado a nitrato, indicando se a poluição da água é recente ou antiga e se está próxima ou distante. As resoluções do CONAMA estabelecem o VPM nas águas para nitrito sendo de 1 mg/L e para nitrato de 10 mg/L (Resolução CONAMA, 1986).

1.3.4.8. Contaminação por metais potencialmente tóxicos

Alguns elementos químicos conferem a água capacidade de toxicidade, mesmo em concentrações muito baixas, a presença desses elementos pode tornar a água imprópria para a maioria de seus usos. Essas substâncias são denominadas de micropoluentes e apresentam como principais representantes os metais potencialmente tóxicos (MS, 2006).

Os metais podem ser definidos como elemento puro ou liga de elementos metálicos, são conhecidos como bons condutores de eletricidade e calor. Podem ser encontrados na atmosfera, solo, água, organismos vivos e sedimentos, controlados por processos físicos, químicos e biológicos (Faustino, 2015).

Corpos de água podem receber contaminação de metais potencialmente tóxicos tais como cobre, arsênio, cádmio, ferro, zinco, lítio, manganês e mercúrio, especialmente quando essa água passa por rochas sedimentares carbonáceas ou recebe constantemente

poluição proveniente de esgotos domésticos e industriais, agrotóxicos e fertilizantes (Beolchini et al., 2013).

Elementos tóxicos são altamente prejudiciais à saúde do homem devido a capacidade de se acumularem em tecidos e órgãos do corpo. Os efeitos a saúde, causados pela presença de metais tóxicos, dependem do tipo e da concentração do metal no meio. O acúmulo de cádmio, por exemplo, pode levar a problemas renais, nos ossos, vasculares, respiratórios e nervoso (Godt et al., 2006; Luparello et al., 2011).

A presença de arsênio no corpo humano pode acarretar em lesões na pele, desenvolvimento de câncer no fígado, pulmão, bexiga e pele, além de distúrbios neurológicos e prejuízos ao desenvolvimento cognitivo de crianças (Sarker, 2010).

Nas concentrações normalmente encontradas, o ferro e o manganês, não apresentam efeitos adversos a saúde. O Anexo XX da da PRC nº 5 (2017) estabelece que o VMP para o ferro em água destinada ao consumo deve ser de 0,3 mg/L e de 0,1 mg/L para o manganês. Altas concentrações desses elementos podem ser encontradas em situações de ausência de oxigênio dissolvido, como pode ser observado em águas subterrâneas ou em camadas profundas de lagos (MS, 2016).

A concentração de cobre na água também é importante para a determinação da potabilidade, uma vez que sua presença em altas concentrações pode afetar a qualidade organoléptica da água. A legislação preconiza que o VMP para o cobre é de 2 mg/L, dessa forma valores superiores a esse podem apresentar riscos à saúde (MS, 2017).

O lítio é utilizado na fabricação de baterias e pode chegar ao ambiente quando essas baterias são descartadas inapropriadamente com os resíduos sólidos domiciliares. Ao chegar ao solo, o lítio pode ser carregado e alcançar tanto a água superficial quanto a água subterrânea. A ingestão de elevadas concentrações de lítio pode levar ao desenvolvimento de alguns efeitos colaterais como hipotireoidismo, ganho de peso, diarreia, dor gastrointestinal, tremores e danos renais, além de promover risco aumentado de malformações nos fetos (Broberg et al., 2011). O MS estabelece 2,5 mg/L como VMP de lítio em água para consumo humano (MS, 2017).

1.3.5. Contaminação microbiológica

A maioria das doenças transmitidas ao ser humano é causada por helmintos e microrganismos como vírus, bactérias e protozoários. A ingestão de água contaminada é

uma importante via de transmissão desses organismos. As doenças decorrentes dessa transmissão são denominadas de doenças de veiculação hídrica (Dutra et al., 2016).

Doenças diarreicas de veiculação hídrica como febre tifoide, cólera, salmonelose, shigelose, poliomielite, hepatite A, verminoses, amebíase e giardíase são responsáveis por surtos e elevadas taxas de morbidade e mortalidade infantil no mundo todo (Nascimento et al., 2013).

Os surtos de doenças de veiculação hídrica podem ser causados por diferentes razões, sendo as mais frequentes: consumo de água não tratada, problemas na infraestrutura das estações de tratamento, revestimento químico de tubos e a arquitetura dos sistemas, além de quebras ou vazamentos permitindo a entrada de patógenos nos sistemas de tratamento (Ingerson-Mahar & Reid, 2012).

É comum a reincidência de patógenos de veiculação hídrica, devido a algumas razões que merecem destaque como água contaminada, aumento populacional, alterações no processo de tratamento da água, globalização e ainda o desenvolvimento de técnicas de detecção e rastreamento por meio de métodos moleculares (Pandey et al., 2014).

A maioria desses surtos bacterianos tem sido causado por bactérias da família Enterobacteriaceae, comumente conhecidas como enterobactérias e pertencentes ao maior subgrupo do filo das proteobactérias. *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *E. coli* spp. são algumas das bactérias que integram esta família (Hunter et al., 2005).

1.3.5.1. Enterobacteriaceae

A família Enterobacteriaceae é constituída por bactérias gram-negativas, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas e fermentadoras de glicose, convertendo-a em diferentes produtos finais. Algumas bactérias dessa família são chamadas de entéricas por estarem associadas a infecções no trato gastrointestinal tais como: *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Enterobacter* spp. Em seres humanos e também em outros animais as bactérias entéricas habitam principalmente o trato gastrointestinal onde podem produzir diferentes toxinas, aumentando seu poder de patogenicidade. Por parasitarem especialmente o intestino, podem ser liberadas nas fezes promovendo a contaminação de água e alimentos (Singh, 2015).

Algumas doenças com implicações crônicas que podem colocar o paciente em riscos de vida e que podem ser transmitidas por meio de água contaminada são: síndrome urêmica hemolítica (*E. coli*), síndrome de Guillain-Barré (*Campylobacter* spp.) e infecções

metastáticas (*Salmonella* não-tifóide). Por essa e outras razões é que a qualidade da água é indispensável para evitar a disseminação de tais doenças (Singh, 2015).

Inquestionavelmente, a falta da qualidade da água, somada a deficiências no saneamento básico são as principais causas de doenças diarreicas em todo o mundo. A avaliação dessa qualidade tem sido realizada por meio de organismos indicadores, definidos como marcadores que refletem a condição microbiológica geral de alimentos ou do meio ambiente. O grupo de organismos largamente utilizados como indicadores de contaminação, principalmente a contaminação fecal, são os coliformes (Chapin et al., 2014; Martin et al., 2016).

Coliformes são um grupo de bactérias gram-negativas, que compartilham algumas características em comum, tais como aerobiose ou anaerobiose facultativa, não formação de esporos e capacidade de fermentar a lactose com a produção de ácido e gás a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Há atualmente, cepas pertencentes aos coliformes, distribuídas em 19 gêneros contidos principalmente na família Enterobacteriaceae (Martin et al., 2016).

Leclerc et al. (2001), com intenção de aumentar a diferenciação funcional dos coliformes, propuseram três categorias de classificação: coliformes termofílicos, termofílicos e onipresentes e psicrotróficos. A criação dessas categorias foi baseada na taxonomia e nas características fisiológicas do grupo, sendo que as categorias termofílicos e onipresentes e psicrotróficos, incluem apenas bactérias ambientais.

Coliformes termotolerantes (CTT), são caracterizados por apresentarem a capacidade de crescer e fermentar a lactose a $44-45^\circ\text{C}$. Integra-se a este grupo a bactéria *E. coli*, sendo esta o indicador mais confiável de contaminação fecal e conseqüentemente da qualidade de produtos e do ambiente, pois em ambientes fora do trato intestinal de animais endotérmicos ela não sobrevive bem, enquanto que os outros integrantes desse grupo como espécies dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter*, podem se originar de fontes ambientais e não exclusivamente de matéria fecal (Hewage & Saleh, 2015; Hodge et al., 2016; Martin et al., 2016).

Por estarem presentes no trato intestinal de animais, os CTT podem ser liberados nas fezes e promover a contaminação de ambientes naturais, especialmente águas superficiais. Entretanto, a contaminação por CTT não se restringe à apenas esse tipo de ambiente. CTT podem se infiltrar pelas rochas, promovendo a contaminação também de águas subterrâneas. Há uma intensa relação da contaminação por CTT em águas subterrâneas onde se encontram principalmente rochas sedimentares carbonáticas, pois estas apresentam

composição primária baseada em carbonatos que favorecem o crescimento e a permanência de bactérias tais como os CTT (Hodge et al., 2016).

A OMS com o objetivo de minimizar o consumo de água com padrões fora daqueles destinados ao ser humano estabeleceu por meio do *Guidelines for Drinking-water Quality*, os parâmetros limites para a água utilizada com essa finalidade. Nesse documento é recomendado que a água utilizada para beber não deve apresentar coliformes totais e coliformes termotolerantes em amostra de 100 mL. Em concordância com o padrão estabelecido pela OMS a legislação brasileira por meio do Ministério da Saúde (MS), também versa sobre o assunto e determina os mesmos parâmetros (WHO, 2011; MS, 2017).

A presença de coliformes pode ser determinada pela realização de alguns métodos, sendo o mais utilizado o teste de tubos múltiplos, no qual se estabelece o Número Mais Provável (NMP) de coliformes em tubos contendo meio com lactose (Mujahid et al., 2015).

1.3.5.2. Resistência a antimicrobianos em bactérias isoladas de água

Uma das grandes dificuldades nos tratamentos médicos da atualidade, é a capacidade de resistência múltipla a antimicrobianos. Além de estarem presentes em ambientes hospitalares, as bactérias com mecanismos de resistência também podem ser encontradas em diferentes ecossistemas tais como: rios, solo, águas subterrâneas e águas residuais (Mulamattathil et al., 2014).

Em bactérias naturalmente presentes em recursos hídricos bem protegidos da interferência humana, não é expressivamente observado mecanismos de resistência aos antibióticos. Entretanto, além da seleção de bactérias resistentes na natureza por resultado da produção nativa de antibióticos por organismos presentes no solo, as ações antropogênicas tais como a exposição destas bactérias a resíduos contendo antibióticos provenientes de ambiente hospitalar, de indústrias farmacêuticas e de esgoto, tem intensificado ainda mais a seleção de bactérias resistentes. O esgoto doméstico contém uma grande quantidade de antibiótico, devido ao fato de que apenas 30 % dos antibióticos utilizados são metabolizados e 70 %, é excretado de forma inalterada na urina e atinge as águas residuais chegando a diferentes ambientes (Kummerer & Henninger, 2003; El-Zanfaly, 2015; Azzam et al., 2017).

As chamadas “superbactérias” podem assumir essa capacidade de resistência aos antimicrobianos por duas formas principais. A primeira, por meios naturais nos quais as

próprias características estruturais e funcionais tornam as bactérias menos sensíveis a determinados agentes. A segunda e mais frequente, é conhecida como resistência adquirida que ocorre por meio de mutações cromossômicas ou por aquisição de elementos genéticos móveis tais como plasmídeos e transposons transferidos de uma bactéria a outra por recombinação genética, conjugação ou transdução (Lupo et al., 2012).

A transferência de genes de maneira horizontal, efetuada pelas bactérias, pode ocorrer por vários meios, entre eles encontra-se a conjugação considerada a forma mais provável para a transferência de plasmídeos e transposons. Em resumo, a conjugação ocorre através do contato célula a célula, via *pili* ou adesinas da superfície celular. Há também a troca genética entre certas bactérias, que apresentam a capacidade de captar, integrar e expressar funcionalmente DNA extracelular, esse processo é denominado transformação natural (Wintersdorff et al., 2016).

Há ainda a transferência de genes via transdução, em que bacteriófagos podem transferir genes que são vantajosos para os seus hospedeiros microbianos, além do DNA cromossômico, os plasmídeos, transposons e ilhas genômicas podem também ser transferidos (Modi et al., 2013; Brown-Jaque et al., 2015). Por último, pode ainda ocorrer a transferência gênica por meio de agentes de transferência genética identificados como partículas semelhantes as estruturas de bacteriófagos, capazes por essa razão, de transferir conteúdo genético (Wintersdorff et al., 2016). A Figura 4 demonstra os diferentes mecanismos facilitadores na transferência gênica: conjugação, transformação, transdução e agentes de transferência genética.

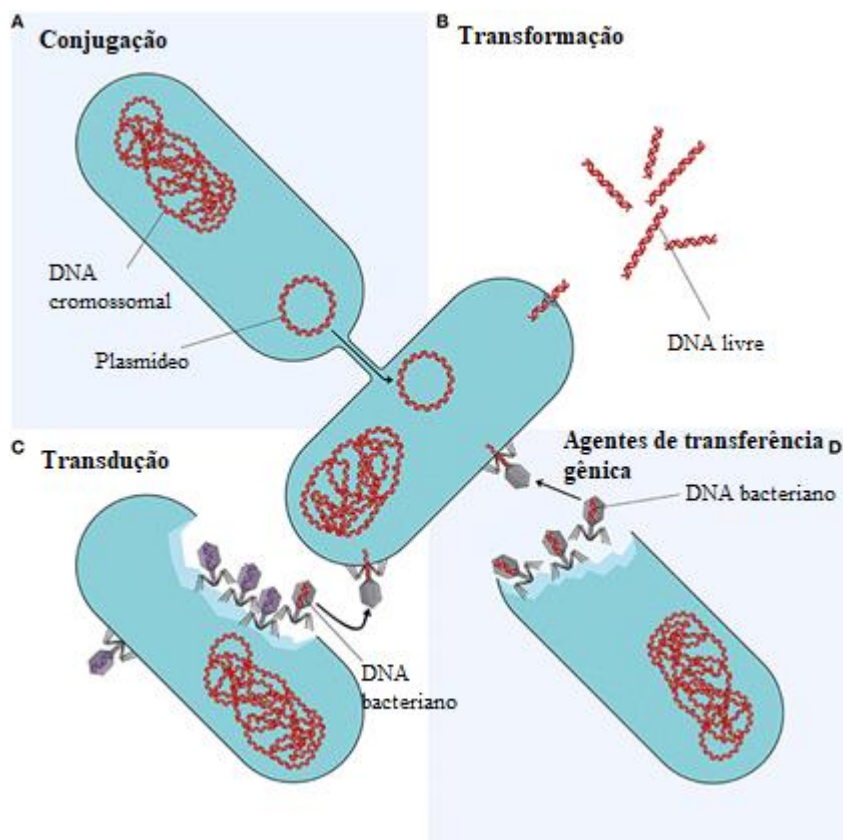


Figura 4. Mecanismos de transferência genica horizontal. Cada quadrante representa um processo diferente sendo, A: conjugação; B: transformação; C: Transdução; D: Agentes de transferência gênica. Fonte: Adaptado de Wintersdorff et al., 2016.

Além disso, bactérias filogeneticamente diferentes que vivem no ambiente, são capazes de utilizar antibióticos como única fonte de carbono (Dantas et al., 2008). Essas bactérias ambientais que subsistem em ambientes com antibióticos, são reservatórios de genes de resistência de bactérias que colonizam e infectam os seres humanos (Nesme et al., 2014).

Curiosamente, diferentes genes de resistência são continuamente encontrados em bactérias patogênicas ao ser humano, tais como as bactérias da família Enterobacteriaceae. Mas, é a origem de alguns desses genes que desperta maior atenção. A análise do DNA cromossômico de algumas espécies ambientais, tais como *Kluyvera* spp. (Canton & Coque, 2006), *Shewanella algae* (Poirel et al., 2005) e espécies de *Vibrionaceae* spp. (Poirel et al., 2012), revelou a presença de genes de resistência encontrados em espécies de Enterobacteriaceae com alta taxa de prevalência. Por essa razão, acredita-se que muitos genes de resistência de importância clínica tenham se originado de bactérias não patogênicas presente no meio ambiente (Wintersdorff et al., 2016).

Ambientes aquáticos tem se tornado verdadeiros reservatórios de bactérias resistentes a antimicrobianos. Tem sido comum o relato, em trabalhos científicos, de bactérias ambientais portadoras de genes de resistência a amoxicilina/ampicilina (Blatem), estreptomicina/espectinomicina (aadA), tetraciclina (Tet), cloranfenicol (CMLA) e vancomicina (van) (Thevenon et al., 2012).

1.4. Identificação de bactérias ambientais

1.4.1. Fenotipagem

Bactérias, sejam elas patogênicas ou não, podem ser identificadas por métodos clássicos, que envolvem cultura seguida de testes bioquímicos que exploram as características metabólicas utilizadas para diferenciar as várias espécies de bactérias (Pasternak, 2012).

As várias espécies bacterianas executam diferentes atividades bioquímicas fazendo uso de nutrientes obtidos diretamente do ambiente em que estão. Essas reações bioquímicas são catalisadas por enzimas, que podem ser detectadas por meio dos testes bioquímicos. Dentre os testes bioquímicos mais utilizados estão o teste de fermentação, de detecção de enzimas que catabolizam aminoácidos, teste da oxidase, produção de gases e de sulfeto de hidrogênio (H₂S) (Tortora et al., 2012).

A identificação fenotípica pode ser realizada por testes bioquímicos desenvolvidos manualmente ou por meio de sistemas automatizados disponíveis no mercado, como o sistema Vitek 2 (BioMerieux, São Paulo, Brasil). Esses sistemas automatizados permitem identificar espécies de bactérias obtidas a partir de colônias puras em menor tempo quando comparados aos métodos manuais, tal identificação se baseia no perfil bioquímico e nas atividades metabólicas dos isolados. O sistema Vitek 2 possui um amplo banco de dados nos quais se apoia para a identificação das colônias isoladas, além disso esse sistema realiza cerca de 43 testes bioquímicos, sendo gasto cerca de oito horas para a identificação de uma amostra (Biomérieux, 2010).

Embora a identificação fenotípica automatizada exiba uma maior especificidade quando comparada com a realizada manualmente, ambas apresentam alguns problemas, tais como: dificuldade em diferenciar cepas de uma mesma espécie com características bioquímicas diferentes, apresenta resultados diferentes ao ser utilizado isolados de culturas

antigas e ocorrência de interferência na precisão da identificação devido a variação fenotípica (Kim et al., 2008; Becker & Eiff, 2011).

Características fenotípicas são definidas como aquelas geradas pela expressão de genes de um organismo que são possíveis de serem detectadas e que podem ser amplamente moduladas por condições ambientais (Moore et al., 2010). Dessa forma, o ambiente em que as bactérias estão inseridas podem favorecer alterações de tais características dificultando assim a identificação apenas por métodos fenotípicos. O estudo fenotípico baseado nas características das colônias, formas de crescimento, morfologia celular, bem como as características bioquímicas continuam sendo importantes, especialmente para as descrições taxonômicas. No entanto, essas investigações devem ser somadas a métodos mais precisos e assertivos de identificação, como análises genômicas (Rosselló-Móra & Amann, 2015).

À vista disso, para proporcionar melhorias na identificação bacteriana, aconselha-se fazer o uso da identificação fenotípica por meio de testes bioquímicos, associada a técnicas de identificação molecular como o sequenciamento do gene 16S rRNA elevando assim a eficiência na identificação (Kim et al., 2008).

1.4.2. Genotipagem

A identificação de espécies bacterianas tem avançado ao longo do tempo especialmente pelo advento de novas tecnologias tais como a Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês: *Polymerase Chain Reaction* – PCR), seguida do sequenciamento do gene 16S rRNA (Yoon et al., 2017).

Nas últimas décadas, o sequenciamento do gene 16S rRNA tornou-se um dos procedimentos mais usuais na taxonomia bacteriana especialmente nos métodos de determinação de perfis e comparação de comunidades bacterianas, fornecendo a este gene o título de pedra angular da classificação taxonômica dos domínios *Archaea* e *Bacteria* (Ludwing & Klenk, 2001). Em parte, isso se deve as características inerentes a este gene, tais como estar presente em todos os organismos pertencentes aos domínios *Archaea* e *Bacteria* e apresentar tanto regiões conservadas como regiões variáveis e hipervariáveis, que podem ser utilizadas para organizar filogeneticamente táxons procarióticos (Yarza et al., 2014).

O sequenciamento de DNA pode ser realizado em diferentes métodos sendo as mais comuns o método de terminação de cadeia de Sanger, o Sistema 454 e o realizado na

plataforma Illumina. O método de sequenciamento de Sanger, também conhecido como método dideoxy consiste no uso de seqüências de nucleotídeos iniciadores, que são capazes de se anelar com o fragmento de DNA a ser sequenciado, dando início a replicação do DNA por meio da enzima DNA polimerase. Os dideoxirribonucleotídeos (ddNTPs), nucleotídeos modificados, promovem a parada da extensão da fita de diferentes pontos, de maneira aleatória, que eram antigamente analisadas manualmente por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida. Em alguns casos a análise do sequenciamento é realizada por meio de computadores, que detectam a fluorescência emitida por marcadores fluorescentes presentes em cada tipo ddNTPs, sendo a seqüência correta obtida através da ordem em que os diferentes fragmentos passam pelo detector de fluorescência. O método de sequenciamento de Sanger permite o sequenciamento de cerca de 400 a 700 pares de bases em uma única reação (Sanger & Coulson, 1975; Heather & Chain, 2016).

Após o sequenciamento de Sanger, surgiu o Sequenciamento de Nova Geração (SNG), que é o termo usado para as novas tecnologias de sequenciamento e que começaram a ser comercializadas em 2005 e a cada ano tornam-se mais avançadas. Essas novas tecnologias são tão avançadas, que é possível em apenas uma corrida obter informações sobre milhões de pares de base (Carvalho & Silva, 2010).

A primeira tecnologia de SNG foi o método de pirosequenciamento da plataforma 454 da Life Sciences (atual Roche) (Marguiles et al., 2005). Este método faz uso de uma combinação de reações enzimáticas que se inicia com a liberação de um pirofosfato, proveniente de um desoxinucleotídeo à cadeia. Em seguida, entra em ação a enzima ATP sulfúrilase, responsável por converter o pirofosfato em ATP, que é utilizado pela luciferase para oxidar a luciferina, produzindo um sinal de luz que será capturado por uma câmara CCD (*charge-coupled device*), conectada ao sistema. Esse método apresenta-se mais eficiente que o método de Sanger no entanto, apresenta um custo mais elevado devido ao uso de um maior número de reagentes (Carvalho & Silva, 2010).

Seguidamente, foi desenvolvido o sequenciamento na plataforma Solexa, mais tarde adquirida pela Illumina (Illumina, 2015a). Nessa plataforma de sequenciamento, a amplificação utilizada é por meio da técnica PCR em ponte, no qual os conjuntos de fragmentos de DNA são sintetizados diretamente em placas (*flow cell*) e os amplicons são utilizados como moldes para o sequenciamento. O emprego da plataforma Illumina pode ser dividido em quatro etapas, sendo elas: montagem das bibliotecas, geração de clusters, o sequenciamento e a análise das seqüências. (Mardis, 2008; Illumina, 2015b).

A superfície de clonagem (*flow cell*), pode ser utilizada para o sequenciamento de até oito bibliotecas, em suas oito linhas, adaptadores são fixados a superfície pela extremidade 5', deixando a extremidade 3' livre para servir de molde na reação de sequenciamento. Fragmentos de DNA da amostra são também ligados a adaptadores em ambas as extremidades e em seguida sofre hibridização com os oligonucleotídeos complementares ligados aos adaptadores. Após a hibridização da amostra com a superfície da *flow cell*, é gerada uma cópia da cadeia original pela adição DNA polimerase e dNTPs. Por uma rápida desnaturação, a cadeia original é removida e em seguida se liga novamente a *flow cell*. Esta cadeia gira e sofre nova hibridização, formando uma “ponte” em decorrência da extensão da fita, após a adição de polimerase e dNTPs. Esta cadeia é novamente desnaturada, as novas fitas obtidas ligam-se a outros oligonucleotídeos, continuando o processo conhecido por PCR em ponte (Carvalho & Silva, 2010; Illumina, 2015b).

Ao fim do processo, cerca de 50 milhões de clusters são formados por linha. A leitura do sinal de fluorescência é realizada após a incorporação de cada nucleotídeo no fragmento em construção. Para que a reação prossiga é necessário que seja feita uma lavagem para remoção de reagentes excedentes, da extremidade 3' e do fluoróforo do ciclo anterior. A interpretação das bases é realizada pela análise da sequência de imagens, obtidas em cada ciclo de sequenciamento, normalmente obtêm-se cerca de 25 a 35 bases em cada cluster (Figura 3) (Shendure & Ji, 2008).

A plataforma Illumina tem sido a mais utilizada ultimamente, pois gera leituras com comprimentos que variam de 25 a 600 bases em velocidade maior e custos menores, quando comparados aos observados em sequenciamento pelo método de Sanger (Liu et al., 2012). Uma outra vantagem apresentada pelo sistema Illumina é que os instrumentos de sequenciamento podem ser utilizados, tanto pequenas unidades quanto para grandes processamentos, para sequenciamento de todo o genoma. Por essa e outras razões, o sistema Illumina representa a maior quota de instrumentos no mercado de insumos, para sequenciamento em comparação com outras plataformas (Goodwin et al., 2016).

1.4.3. Imagem hiperespectral

Os métodos atualmente utilizados para identificação bacteriana, se baseiam em cultura e embora sejam reconhecidos como padrão ouro, apresentam importantes deficiências, tais como a grande demanda de tempo de execução e o trabalho laborioso, não sendo, portanto, adequado para a detecção do patógeno em tempo hábil (Feng et al.,

2018). Além disso, a triagem manual para identificação bacteriana é um trabalho suscetível a erros humanos no que diz respeito a inoculação dos isolados e a interpretação visual dos resultados, dificultando a diferenciação fenotípica de microrganismos geneticamente similares (Tillman et al., 2012). O longo tempo de incubação necessário para a cultura bacteriana impede a tomada de decisões terapêuticas rápidas e apropriadas, contribuindo assim com a disseminação de doenças infecciosas, além de incentivar o uso indevido de antibióticos culminando com o desenvolvimento de resistências a estes (Noiphung & Laiwattanapaisal, 2019).

Os recentes avanços das tecnologias de sequenciamento de DNA, permitem o uso de sequências genômicas para a classificação e identificação precisa dos membros de *Bacteria* e *Archaea* (Yoon et al., 2017). O principal marcador molecular para classificação/identificação bacteriana é o gene 16S rRNA, um gene de 1500 pares de bases que codifica o RNA catalítico que faz parte da subunidade 30S ribossomal. Está claro que o uso da sequência 16S rRNA é um meio fortemente aceitável para identificação bacteriana. Entretanto, esses métodos moleculares apresentam-se ainda com custos elevados e apenas são realizados com uso de equipamentos próprios (Srinivasan et al., 2015).

Diante dessa realidade, a imagem hiperespectral (Hyperspectral Imaging - HSI), tem espaço na microbiologia, tornando-se uma nova tecnologia de identificação microbiológica. A HSI pode possibilitar a identificação em menor tempo, quando comparada a metodologias tradicionais, como a fenotipagem, e ainda oferecer resultados mais precisos na identificação a nível de gênero e espécie por meio de análises de dados espectrais e de imagens. As informações químicas das colônias bacterianas específicas de cada espécie, é o foco das análises hiperespectrais que capturam tais variações refletidas nas imagens (Gowen et al., 2015).

As HSI podem ser obtidas em estações de trabalho de aquisição de imagens sendo o SisuCHEMA (Specim, Spectral Imaging Ltd., Oulu, Finlândia) (Figura 5), uma das mais utilizadas. A estação de trabalho SisuCHEMA, pode ser empregada em um grande número de aplicações, dentre as quais destacam-se a inspeção da autenticidade de documentos, a investigação de evidências da cena de crimes, a composição de substâncias químicas, a detecção de contaminantes, a medição do teor de proteínas em grãos, a inspeção da qualidade em alimentos e, mais recentemente descoberto, na identificação de microrganismos, especialmente bactérias. (Specim – Spectral Imaging, 2015; Gowen et al., 2015).



Figura 5. Estação de trabalho SisuCHEMA para aquisição de imagens SWIR. Fonte: Próprio autor.

A estação SisuCHEMA dispõe de um sensor MCT (controlador de temperatura) de alto desempenho com 320 pixels espaciais e 256 bandas espectrais e a câmara possui uma taxa de leitura de 400 linhas por segundo. Este equipamento funciona como uma estação de imagem química completa, onde usuários dispõe suas amostras em uma bandeja e com um software de aquisição a HSI é adquirida pela técnica de varredura e salva em tempo real. As configurações de uso do analisador SisuCHEMA dependem apenas da conexão dos cabos entre a unidade e o gabinete externo que aloja o computador, os controladores da câmara e as unidades de energia (Middleton Spectral Vision).

A HSI, conhecida como uma nova modalidade de imagem óptica, combina imagens digitais convencionais com espectroscopia vibracional, logo, por meio dessa modalidade, pode-se obter tanto uma assinatura digital espacial quanto espectral das colônias bacterianas, com base nos padrões fenotípicos observados. Através do reconhecimento da morfologia e dos padrões de distribuição das colônias bacterianas, pode-se obter uma informação espacial e a partir da observação de características como cor/espectro das colônias pode-se obter informações espectrais (Yoon; Lawrence; Park, 2015). Assim, o uso da HSI para a identificação bacteriana é executável, porque cada bactéria possui sua própria assinatura espectral sendo possível assim realizar sua diferenciação em relação às outras (Akbari & Halig, 2012).

Duas dimensões espaciais (x,y) e um comprimento de onda (λ) são utilizadas na HSI para criação de um hipercubo (Figura 6). Em qualquer comprimento de onda a imagem é composta por um grande número de pixels (quadrados 2D), onde cada pixel representa um espectro contendo informações químicas pontuais. Cada imagem é analisada para identificar regiões onde as informações químicas são observadas na amostra analisada (Sandasi et al., 2014). Embora, a análise dessas imagens apresente dificuldade devido ao tamanho dos dados gerados, sabe-se que a análise multivariada de imagens, pode eficientemente contornar essa situação através da compressão desses dados, reduzindo o tamanho e preservando a informação fundamental (Prats-Montalbán et al., 2011).

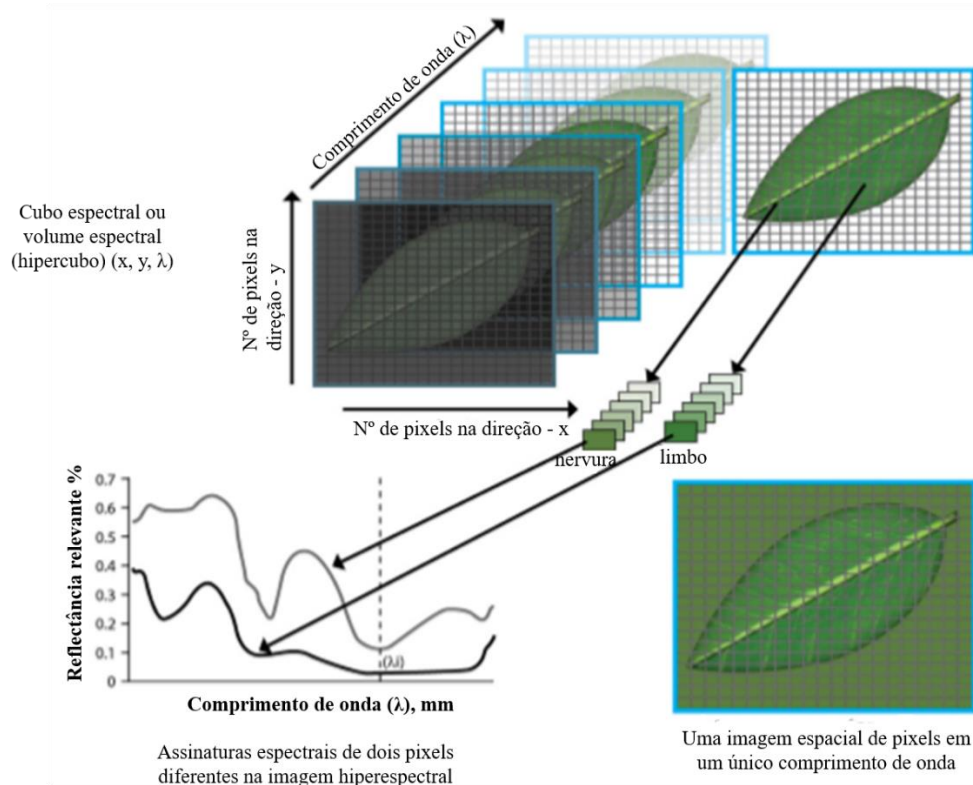


Figura 6. Uma ilustração de um hipercubo espectral criado através da combinação de duas dimensões espaciais ($x; y$) e uma de comprimento de onda (λ) na imagem hiperespectral. Adaptada de: Sandasi et al., 2014.

Como supracitado, a redução da alta dimensionalidade de dados e o desenvolvimento de modelos capazes de tornarem-se usuais, é possível graças a algumas ferramentas de análise multivariada, tais como análise de componentes principais (Principal Component Analysis – PCA) e mínimos quadrados parciais (Partial Least Squares – PLS). Além disso, tais ferramentas são ainda utilizadas para exibir diferenças de composição em uma

imagem, permitindo o desenvolvimento de modelos de comparação entre imagens (Gowen et al., 2007; Williams et al., 2009; Manley et al., 2011).

O passo inicial na redução da dimensionalidade e na exploração de dados é a PCA em seguida para se prever qualitativamente um conjunto de variáveis dentro de um conjunto de dados maior utiliza-se a PLS, caracterizada por ser uma técnica de classificação supervisionada (Gowen et al., 2007). Tanto a PCA como a PLS, podem ser realizadas utilizando uma abordagem baseada em pixels ou em objetos, estas abordagens diferem-se basicamente no número de pontos de dados (espectros) utilizados para os cálculos. Na abordagem baseada em objetos, grupos de pixels em uma imagem são reduzidos através de cálculos estatísticos, como média ou mediana e os valores obtidos servem como ponto de dados, já na abordagem baseada em pixels, cada pixel representa um ponto de dados (Kucheryavskiy, 2013).

2. JUSTIFICATIVA

Em todo o mundo milhares de pessoas morrem anualmente, em decorrência de infecções causadas por microrganismos patogênicos presentes na água. Uma representativa parcela das doenças de veiculação hídrica é causada por bactérias que habitam principalmente o trato gastrointestinal de pessoas e animais e por essa razão são denominadas de bactérias entéricas. A presença dessas bactérias na água indica contaminação fecal, o que torna a água imprópria para o consumo humano (Nascimento et al., 2013; Singh et al., 2015).

A presença de bactérias patogênicas na água representa um grande problema de saúde pública e a existência de bactérias com mecanismos de resistência a antibióticos nesses ambientes torna ainda mais alarmante esse problema (Azzam et al., 2017). Ações antropogênicas tais como o lançamento de esgoto de diferentes origens em ambientes aquáticos tem comprovadamente intensificado o aumento numérico das “superbactérias”. Infecções por tais bactérias são uma das grandes dificuldades nos tratamentos médicos pois os antibióticos conhecidos até o momento não causam danos a elas (Mulamattathil et al., 2014; El-Zanfaly, 2015).

Os padrões microbiológicos estabelecidos para a água potável e os definidos para características físico-químicas da água utilizada para consumo humano, são necessários para promover a saúde e o bem-estar das pessoas. No Brasil, esses parâmetros são preconizados pelo Ministério da Saúde e visam propor critérios para o controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano (MS, 2017).

O cumprimento dos parâmetros preconizados por decretos, regulamentos ou especificações para as características físico-químicas, também são imprescindíveis para a qualidade da água de consumo humano, sendo o controle sistemático de tais parâmetros uma importante medida preventiva de saúde pública. Assim, a investigação dos parâmetros físico-químicos, realizados neste trabalho e sua posterior divulgação, chamam a atenção para a característica da água consumida nas populações quilombolas em estudo, podendo despertar interesse público para o controle sistemático dos parâmetros físico-químicos contemplados pelas portarias de regulação.

A água de qualidade, livre de patógenos e com características físico-químicas apropriadas não está acessível a todos. Diversas populações ao redor do mundo não dispõem de saneamento básico, o que torna essas pessoas ainda mais susceptíveis a adquirirem infecções por patógenos de veiculação hídrica (Ramirez-Castilho et al., 2015).

No Brasil, milhares de pessoas não dispõem de fornecimento de água tratada, coleta e tratamento de esgoto e resíduos. Uma parcela significativa dessas pessoas vive em comunidades tradicionais como as comunidades quilombolas distribuídas em todo o território nacional (Silva, 2010).

Muitos programas sociais são criados com a intenção de minimizar os problemas de ordem estrutural enfrentados por comunidades quilombolas, no entanto, muitos deles não são efetivos, inviabilizando o alcance das melhorias propostas. Estudos recentes apresentam dados que revelam esta situação vivida por diferentes comunidades quilombolas brasileiras, no que diz respeito ao saneamento básico (Pinho et al., 2015). Por esta razão, trabalhos de pesquisa e extensão que alcancem essas comunidades são importantes para promover ações diretas por meio de atividades práticas na melhoria da qualidade de vida dessa população, assim como ações indiretas por meio do despertamento de políticas públicas que alcancem tal população.

Bactérias ambientais, tais como as isoladas de fontes hídricas, apresentam uma alta diversidade, resultando em grandes desafios nos processos de identificação. Por essa razão o uso de um método robusto e preciso de identificação torna-se importante para a interpretação correta do gênero/espécie bacteriano. Dentre esses métodos de identificação, destacam-se os métodos fenotípicos, baseados nas características bioquímicas de cada organismo (Pasternak, 2012), os métodos moleculares dos quais o mais utilizado é o sequenciamento do gene 16S rRNA (Yoon et al., 2017) e um novo método aqui proposto baseado na assinatura espectral individual de cada bactéria (Gowen et al., 2015).

A identificação de bactérias baseada nos métodos fenotípicos é amplamente utilizada em organismos que sofrem pequenas variações em decorrência do ambiente em que vivem tais como bactérias de origem clínica. No entanto, métodos fenotípicos não são eficientemente empregados na identificação de bactérias ambientais já que estas apresentam uma ampla variação em resposta às condições do ambiente em que vivem, por esta razão a identificação de tais bactérias de origem ambiental não deve ser pautada apenas em características fenotípicas (Vithanage et al., 2014).

Como forma de reduzir os problemas inerentes a identificação fenotípica de bactérias ambientais, ferramentas que fazem uso de ácidos nucleicos, como sequenciamento genético, são amplamente utilizadas. Mas apesar de apresentarem maior especificidade e serem mais assertivos demandam o uso de reagentes e equipamentos próprios tornando esse método insustentável devido aos custos elevados (Srinivasan et al., 2015).

A real compreensão da biodiversidade das bactérias ambientais possibilita o desenvolvimento de estratégias no controle da veiculação de tais bactérias pelo ambiente, além de permitir o avanço de pesquisas de bioprospecção e biorremediação. Para isso métodos precisos e com menores custos devem ser utilizados. Por esta razão, propomos aqui o uso de imagem hiperespectral (HSI) para a diferenciação e posterior identificação de bactérias ambientais, fazendo uso de culturas bacterianas e uma câmera capaz de captar tais imagens. A diferenciação/identificação de bactérias por meio da HSI é possível pois essas imagens possuem informações químicas das colônias bacterianas próprias de cada espécie (Gowen et al., 2015).

Diante do exposto, esse trabalho se justifica pela ausência de estudos que envolvam a qualidade da água consumida por comunidades quilombolas no estado de Goiás e pela necessidade do desenvolvimento de novas metodologias de classificação e identificação de bactérias ambientais.

3. OBJETIVOS

Geral:

Avaliar a qualidade físico-química e microbiológica da água utilizada para consumo em duas comunidades quilombolas de Goiás e analisar os métodos de identificação bacteriana.

Específicos:

- Realizar análises das características físico-químicas e correlacioná-las aos parâmetros preconizados por órgãos competentes para a água de consumo humano.
- Verificar em que concentrações são encontrados metais potencialmente tóxicos de relevância a saúde.
- Verificar a contaminação por coliformes nas amostras coletadas.
- Identificar por fenotipagem os diferentes gêneros/espécies bacterianos isolados das amostras de água.
- Verificar por meio do teste de antibiograma a presença de bactérias resistentes aos antibióticos.
- Realizar PCR para amplificação do gene 16S rRNA seguida de sequenciamento do mesmo gene para confirmação da identificação de gêneros/espécies.
- Comparar as metodologias de identificação fenotípica e por sequenciamento, ressaltando as discordâncias e similaridades entre elas.
- Realizar a diferenciação de bactérias ambientais utilizando a imagem hiperespectral e análises multivariadas.

4. METODOLOGIA DETALHADA

4.1. Coleta das amostras

Entre maio e agosto de 2017, foram realizadas duas coletas de água, utilizada para consumo em comunidades quilombolas de Goiás, uma localizada no Município de Aparecida de Goiânia – GO (zona urbana) e outra no município de Silvânia-GO (zona rural) (Figura 7).

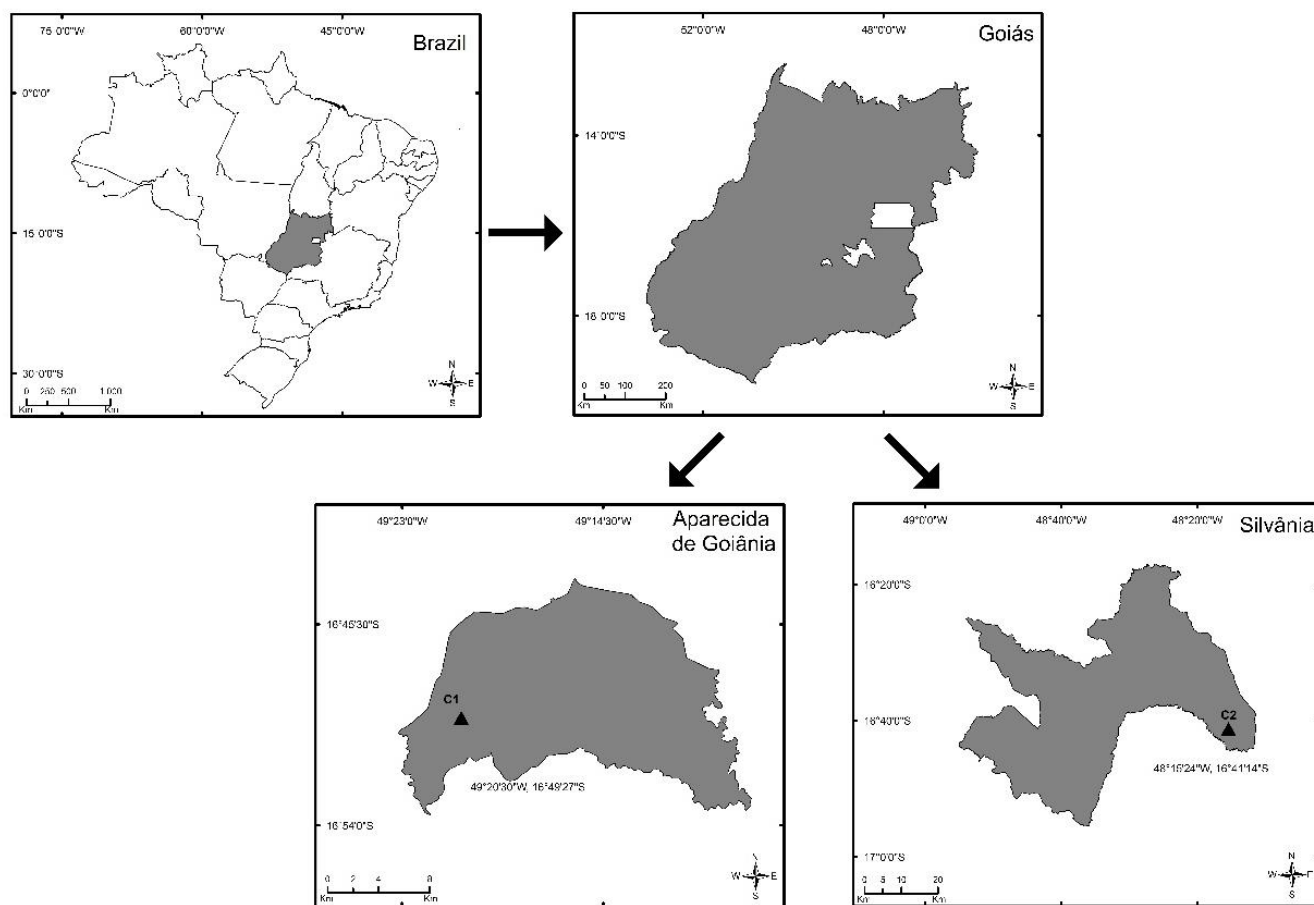


Figura 7. Mapa da área de estudo desenvolvida no software ArcGis 10.5. C1: Comunidade em Aparecida de Goiânia, C2: Comunidade em Silvânia. Fonte: Próprio autor.

Em cada comunidade foram coletadas cinco amostras de água nos pontos descritos na Tabela 1, as coletas foram realizadas diretamente nas torneiras domésticas. Para as amostras de água destinada aos testes microbiológicos, físico-químicos e de metais potencialmente tóxicos foram utilizados fracos de plástico estéreis. Após as coletas, as amostras foram colocadas em caixas térmicas com gelo e imediatamente transportadas até o Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAB) da Universidade Federal de Goiás.

Tabela 1. Descrição dos pontos de coleta nas comunidades 1 e 2.

Pontos	C1	C2
	Descrição	Descrição
1	Torneira de uma residência que recebe água de poço artesiano com adição de cloro	Reservatório do poço artesiano 1 sem adição de cloro
2	Torneira de uma residência que recebe água de poço raso sem adição de cloro	Torneira de uma residência que recebe água do poço artesiano 1 sem adição de cloro
3	Torneira de uma residência que recebe água de poço raso sem adição de cloro	Torneira de uma residência que recebe água do poço artesiano 2 sem adição de cloro
4	Torneira de uma residência que recebe água de poço artesiano com adição de cloro	Torneira de uma residência que recebe água do poço artesiano 3 sem adição de cloro
5	Reservatório de poço artesiano com adição de cloro	Torneira de uma residência que recebe água do poço artesiano 1 sem adição de cloro

4.2. Testes físico-químicos

Os testes físico-químicos foram realizados com 72 horas após as coletas e seguiram a metodologia determinada pelo *Standard Methods* (American Public Health Association-APHA, 1992).

O pH foi determinado por leitura direta em pHmetro. A cor aparente foi determinada por comparação visual da amostra com água destilada através do método colorimétrico, o disco graduado do aparelho utilizado (Colorímetro Policontrol) fornece diretamente o valor da cor expresso em unidades de cor. Para determinação da turbidez, utilizou-se o turbidímetro (2100q Hach), a turbidez foi obtida por leitura direta em NUT. Para determinação da dureza total foi utilizado o método de titulação com o indicador negro ericromo preto T. A condutividade elétrica foi analisada em condutivímetro (Tecnopon) e o resultado dado em mS/cm. O método adotado para determinação da alcalinidade total foi a titulação com ácido sulfúrico, sendo determinada em mg/L de CaCO₃. A determinação da concentração de nitrato foi realizada segundo o método UV no qual realizou-se a acidificação das amostras com HCL (1 mol L⁻¹), seguido de leitura da absorvância em 220 nm.

4.3. Análise de metais potencialmente tóxicos

As análises de metais potencialmente tóxicos foram realizadas no Laboratório de Instrumentação Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. As amostras foram previamente acidificadas com ácido nítrico à 0,1% e em seguida evaporadas em placa de aquecimento, no qual o volume inicial foi reduzido em cerca de dez vezes. No volume final de 50 mL realizou-se a determinação da concentração dos seguintes metais: cobre, manganês, ferro e lítio. As leituras foram realizadas em aparelho de absorção atômica (AAAnalyst 400 AA Spectrometer).

4.4. Análise de coliformes totais e termotolerantes por tubos múltiplos

Foi utilizado a técnica dos tubos múltiplos em conformidade com o American Public Health Association (APHA, 2012) para a realização da quantificação de coliformes totais e termotolerantes nas amostras coletadas. A técnica de tubos múltiplos é dividida em teste presuntivo e teste confirmativo. No teste presuntivo foram utilizados 15 tubos de ensaio com tubos de Durhan invertidos distribuídos de 5 em 5, aos primeiros 5 tubos foram adicionados 10 mL de caldo lactosado de concentração dupla e inoculado a eles 10 mL das amostras de água (diluição 1:1). Nos 10 tubos restantes foi adicionado individualmente 10 mL de caldo lactosado de concentração simples e inoculado 1 mL das amostras nos primeiros 5 tubos (diluição 1:10) e nos 5 tubos restantes foram adicionados 0,1 mL das amostras (diluição 1:100) (Figura 8). Todos os tubos foram incubados a 30 °C por 48 horas.

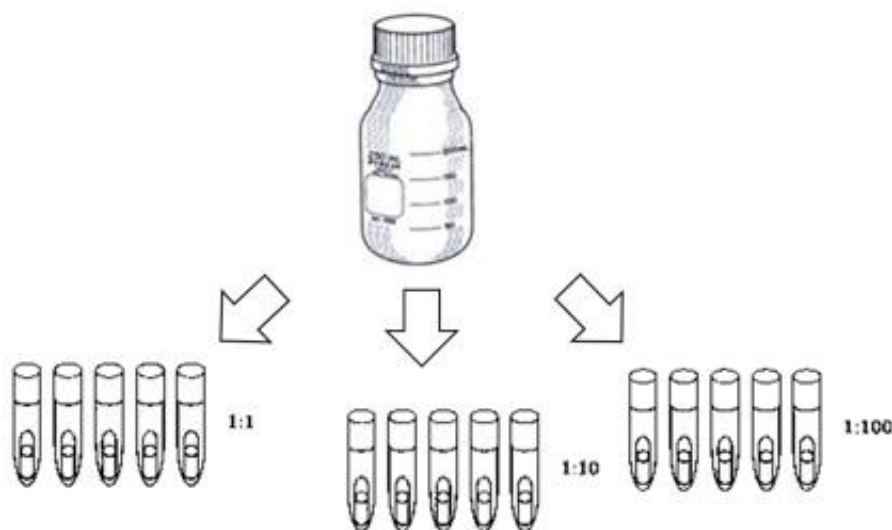


Figura 8. Distribuição das amostras em tubos de caldo lactosado. Fonte: Próprio autor.

Para o teste confirmativo foi utilizado 5 mL de meio de cultura Verde Brilhante Bile em tubos de ensaio contendo tubos de Durhan invertidos, de igual número aos tubos do teste presuntivo que foram positivos nas três diluições. Com a alça de platina, flambada e fria, foi retirado uma porção da amostra de cada tubo positivo e inoculado no tubo correspondente contendo o meio Verde Brilhante Bile. Após o inóculo, os tubos foram incubados à 30 °C por 48 horas.

O teste de coliformes termotolerantes foi realizado utilizando os tubos presuntivos previamente positivos. Em cada tubo foi adicionado 5 mL de caldo EC e transferido com alça de platina flambada e fria, uma porção dos inóculos dos tubos positivos. O inóculo foi incubado à 44 °C por 24 horas.

Em todos os testes, os tubos considerados positivos foram aqueles que apresentaram gás dentro do tubo de Durhan. Os resultados foram expressos em Número Mais Provável (NMP) por 100 mL de amostra.

4.5. Análise microbiológica e identificação fenotípica de bactérias

Um volume de 250 mL das amostras de água coletada, foi distribuído separadamente nos meios de cultura, R-2, MacConkey e Manitol. Após 48 horas de incubação à 30 °C, foi realizado a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) e realizado o isolamento das colônias que apresentaram características morfológicas diferentes. A identificação fenotípica dos isolados foi realizada submetendo-os a diferentes testes bioquímicos, por meio dos quais se verificaram reações metabólicas dos microrganismos e as características morfológicas das colônias.

Os testes realizados foram: método de coloração de Gram, verificação da enzima oxidase e catalase (Chester & Moskowitz, 1987), ágar SIM para teste de motilidade, produção de H₂S e indol, testes de lisina descarboxilase (Brooker et.al., 1973) e da fenilalanina desaminase, urease (Quadri et al., 1984), citrato (Simmons, 1926), provas fermentativas com glicose, maltose e lactose (Hugh & Leifson, 1953), hemólise e gelatinase. Em todos os ensaios os materiais utilizados, como placas de Petri, tubos, bem como os meios utilizados, foram devidamente autoclavados a 121°C por 20 min. Os ensaios foram incubados a 30 °C por 18 a 24 horas.

Os resultados dos testes bioquímicos foram confrontados com a descrição de diferentes grupos bacterianos presentes no Manual de Microbiologia Clínica para Controle de Infecções de Serviços de Saúde, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Manual

ANVISA) (ANVISA, 2013), no portal ABIS online (<http://www.tgw1916.net>) e no portal Online bacterial identification (<http://www.microrao.com>). Tais resultados foram ainda utilizados para o agrupamento fenotípico realizado no software Statistica 7 por meio da ferramenta Cluster Analysis que realizou o cálculo da distância Euclidiana usando o método Single Linkage.

4.6. Teste de disco de difusão – Antibiógrama

O teste de suscetibilidade a antimicrobianos foi realizado conforme o *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) - 2017* utilizando o disco de difusão para a maioria dos isolados e o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) para algumas não-enterobactérias. Os antibióticos utilizados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Antibióticos utilizados no teste de suscetibilidade.

Grupos bacterianos	Antibióticos
Enterobacteriaceae	AMI (30 µg/disk), AMC (20/10 µg/disk), AMP (10 µg/disk), AZT (30 µg/disk), CPM (30 µg/disk), CAZ (30 µg/disk), CRO (30 µg/disk), CIP (5 µg/disk), GEN/TOB (10/10 µg/disk), IPM (10 µg/disk), PPT (100/10 µg/disk), TET (30 µg/disk), TRI (1.25/23.75 µg/disk).
<i>Staphylococcus spp.</i>	CLI (2 µg/disk); CIP (5 µg/disk); ERY (15 µg/disk); GEN/TOB (10 µg/disk); LIN (30 µg/disk); NOV (30 µg/disk); PEN (10 µg/disk); RIF (5 µg/disk); TET (30 µg/disk); TRI (5 µg/disk); VAN (30 µg/disk).
<i>Acinetobacter spp.</i>	AMI (30 µg/disk); AMP (10 µg/disk); AZT (30 µg/disk); CPM (30 µg/disk); CAZ (30 µg/disk); CIP (5 µg/disk); IPM (10 µg/disk); GEN/TOB (10/10 µg/disk); PIP (100 µg/disk).
<i>Streptococcus spp.</i>	
<i>Aeromonas spp.</i>	e AMI (30 µg/disk), AMO (20/10 µg/disk), AMP (10 µg/disk),
<i>Plesiomonas spp.</i>	AZT (30 µg/disk), CPM (30 µg/disk), CAZ (30 µg/disk), CRO

(30 µg/disk), CIP (30 µg/disk), CLO (30 µg/disk), GEN/TOB (10/10 µg/disk), IPM (10 µg/disk), PIP (100 µg/disk), TET (30 µg/disk), TRI (5 µg/disk).

Outras não-enterobacteriaceae AMI (30 µg/disk), AZT (30 µg/disk), CPM (30 µg/disk), CRO (30 µg/disk), CAZ (30 µg/disk), CIP (5 µg/disk), CLO (30 µg/disk), IPM (10 µg/disk), GEN/TOB (10/10 µg/disk), NOR (30 µg/disk), PIP (30 µg/disk), TET (30 µg/disk), TRI (30 µg/disk).

AMI: Amikacin; AMC: amoxicillin + clavulanate; AMP: ampicillin; AZT: aztreonam; COM: cefepime, CAZ: ceftazidime; CRO: ceftriaxone; CIP: ciprofloxacin; CLI: clindamycin; CLO: chloramphenicol; ERY: erythromycin; GEN/TOB: gentamicin/tobramycin; IPM: imipenem; LIN: linezolid; NOR: norfloxacin; NOV: novobiocin; PEN: penicillin; PIP: piperacillin; PPT: piperacillin+tazobactam; RIF: rifampin; TET: tetracycline; TRI: trimethoprim-sulfamethoxazole; VAN: vancomycin.

4.7. Amplificação do gene codificador para a subunidade 16S rRNA

A identificação molecular dos isolados bacterianos iniciou-se com a extração do DNA genômico de acordo com a metodologia descrita por Van Soolingen et al. (1994). A integridade e pureza do DNA foram avaliadas em gel de agarose a 1 % e a concentração do DNA determinada em espectrofotômetro NanoVue Plus UV-Vis (GE Healthcare). O material genético foi mantido em freezer a -4 °C até a preparação para o sequenciamento.

Em seguida foi realizado a amplificação da região codificante para a subunidade 16S rRNA por PCR com a utilização dos *primers* universais 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1541R (5'- AAGGAGGTGATCCAGCC-3'). Para a reação foram utilizados 35,5µL de água (miliQ®), 5,0µL de tampão de amostra (10X) (Ludwig Biotec LTDA), 1,5µL de MgCl₂ (50mM) (Ludwig Biotec LTDA), 1,0µL de solução de cada primer (10mM) (Invitrogen™), 4,0µL de solução dNTP (2,5mM) (Ludwig Biotec LTDA), 1,0µL de Taq polimerase (5U) (Ludwig Biotec LTDA) e 1,0µL de DNA (50ng), volume final de 50µl. A reação foi realizada em termociclador (Veriti™ 96-Well Thermal Cyclers) com a seguinte ciclagem: 3min de desnaturação inicial a 94 °C e 30 ciclos de desnaturação 94 °C/1min, anelacão 55 °C/30s e extensão 72 °C/30s, extensão final 72 °C/10min. O produto obtido da PCR foi purificado com o Kit Agarose Extraction (Cellco).

4.8. Sequenciamento da região codificante 16S rRNA e análise dos resultados

Os *primers* 27F, 1541R, 926F (5'-AAACTYAAAKGAATTGACGG3'), 530F (5'-TGACTGACTGAGTGCCAGCMGCCGCGG-3'), 519R (5'-GTNTTACNGCGGCKGCTG-3') e 907R (5'-GTNTT ACNGCGGCKGCTG-3') foram utilizados para o sequenciamento, sendo a reação realizada em sequenciador ABI 3500 da Applied Biosystems® no Laboratório de Genética & Biodiversidade - UFG (LGBio-UFG).

As sequências obtidas foram analisadas no software CodonCode Aligner (CodonCode Corporation) e comparadas quanto a homologia com o banco de dados do GenBank NCBI usando o BLASTn, sendo este projetado para realizar a identificação de regiões semelhantes em sequências obtidas por sequenciamento com base em sequências já disponíveis.

Para realizar o agrupamento das sequências obtidas foi construído um dendrograma no software MEGA X. A matriz de distância e o método de construção foram calculados pelos algoritmos: Jukes Cantor e Neighbor-Joining com *bootstrap* de 500 repetições. As sequências foram depositadas no GeneBank NCBI.

4.9. Obtenção de imagens hiperespectrais

Um total de 29 isolados bacterianos obtidos em água para consumo foram classificados quanto as suas características bioquímicas a partir de suas HSI geradas (Tabela 3). Estes isolados foram previamente identificados por meio de sequenciamento da região codificante 16S rRNA e as sequências depositadas no GeneBank NCBI.

Tabela 3. Cepas bacterianas utilizadas em análise de HSI.

Cepas	N° acesso
<i>Klebsiella variicola</i>	MN116696
<i>Phytobacter diazotrophicus</i>	MN121840
<i>Shigella sonnei</i>	*
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MN121117
<i>Citrobacter murlinae</i>	MN120900
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MN121836
<i>Klebsiella michiganensis</i>	MN121832
<i>Kluyvera ascorbata</i>	MN120898

<i>Acinetobacter lactucaae</i>	MN121837
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	MN121763
<i>Staphylococcus hominis</i>	MN121834
<i>Klebsiella michiganensis</i>	MN121835
<i>Serratia marcescens</i>	MN164430
<i>Serratia nematodiphila</i>	MN121833
<i>Yokenella regensburgei</i>	MN121841
<i>Acinetobacter vivianii</i>	MN121839
<i>Bacillus paramycooides</i>	MN121849
<i>Burkholderia lata</i>	MN121848
<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	MN121853
<i>Serratia nematodiphila</i>	MN121854
<i>Enterobacter asburiae</i>	MN122007
<i>Yokenella regensburgei</i>	MN122008
<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	MN122009
<i>Pseudomonas entomophila</i>	MN122068
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	MN122071
<i>Staphylococcus hominis</i>	MN123232
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	MN122077
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	MN122131
<i>Chromobacterium alkanivorans</i>	MN122133

*Sequência não aceita para depósito devido ao tamanho insuficiente.

Após cultura de 24 horas em Ágar Nutriente, todas as cepas bacterianas foram ressuspensas em solução salina estéril (NaCl 0,85%) padronizadas com a turvação compatível com a escala de 0,5 de Mac Farland (1×10^6 UFC/mL). Um swab foi umedecido nesta suspensão bacteriana e esta foi semeada em uma placa de Ágar Nutriente por técnica de varredura. Sendo preparadas duas placas para cada cepa bacteriana aqui descritas. Todas as placas bacterianas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas a 30 °C, após esse período as imagens das placas contendo as culturas foram adquiridas em uma estação de trabalho sisuCHEMA (Specim, Spectral Imaging Ltd., Oulu, Finlândia) por meio de câmera capaz de capturar imagens de onda curta infravermelha (Short Wave Infrared – SWIR) com o software Evince 2.32.0.

A análise de componentes principais (Principal Component Analysis – PCA), que é o primeiro passo na análise de dados multivariados, foi aplicada com média centralizada em toda a imagem. A PCA é capaz de reduzir a alta dimensionalidade de dados decompondo variáveis inter-relacionadas em um novo conjunto de coordenadas (PCs).

Neste estudo, os comprimentos de onda < 1004 no início do espectro e > 2263 no final do espectro não continham informações químicas diferenciadoras e foram excluídos do conjunto de dados, resultando em uma melhor classificação de pixels. A imagem resultante foi então avaliada quanto a diferenças e semelhanças bioquímicas com o objetivo de diferenciar os isolados bacterianos.

Capítulo 2

Artigo 1: Evaluation of water quality for consumption and prevalence of antibiotic-resistant bacteria: a study in quilombola communities of Goiás, Brazil
(Avaliação da qualidade da água para consumo e prevalência de bactérias resistentes a antibióticos: um estudo em comunidades de Quilombola de Goiás, Brasil)

Evaluation of water quality for consumption and prevalence of antibiotic-resistant bacteria: a study in quilombola communities of Goiás, Brazil

Avaliação da qualidade da água para consumo e prevalência de bactérias resistentes a antibióticos: um estudo em comunidades de Quilombola de Goiás, Brasil

Aline Rodrigues Gama, Paulo Scalize, Raylane Pereira Gomes, Aroldo Moraes Filho, Mônica de Oliveira Santos, Núbia Aguiar Marinho, Wanderleia Eleutério Martins, José Daniel Gonçalves Vieira, Mônica Santiago Barbosa, Arlindo Rodrigues Galvão Filho, Luiz Artur Mendes Bataus, Lilian Carla Carneiro

Resumo

O consumo inadequado de água representa um risco para a saúde, porque leva a um aumento na incidência de doenças infecciosas propagadas pela água. Amostras de água coletadas em torneiras foram avaliadas quanto à presença de coliformes e outras bactérias, testes fenotípicos foram realizados para identificá-los e definir seus padrões de susceptibilidade antimicrobiana. Também foram analisadas a presença de metais potencialmente tóxicos e os padrões físico-químicos estabelecidos para a água consumida pelo homem. Por meio da avaliação microbiológica foi possível observar que a quantidade de coliformes na maioria das amostras é superior à recomendada pelos órgãos que regulam os padrões de potabilidade da água. Além disso, através da análise microbiológica foi possível identificar a presença de bactérias relacionadas a doenças comuns em humanos, das quais muitas apresentavam resistência a múltiplos antibacterianos. Os resultados das análises físico-químicas e dos metais potencialmente tóxicos demonstraram que esses parâmetros estão de acordo com os padrões estabelecidos para água potável pelas instituições normativas. Assim, o presente trabalho alerta para o problema da contaminação bacteriana em água para consumo de regiões quilombolas e também para o crescente problema da transmissão de genes de resistência antimicrobiana em água.

Palavras chave: Coliformes. Água subterrânea. Multidroga-resistente. Físico-químico. Metais tóxicos.

Abstract

Inappropriate water consumption represents a health risk because it leads to an increase in the incidence of infectious diseases propagated by water. Samples of water collected in taps were evaluated for the presence of coliforms and other bacteria, phenotypic tests were performed to identify them and define their patterns of antimicrobial susceptibility. Were also analyzed for the presence of potentially toxic metals and for the physico-chemical standards established for human consumed water. By means of the microbiological evaluation it was possible to observe that the quantity of coliforms in the majority of the samples is superior to that recommended by the organs that regulate the water potability standards. In addition, through the microbiological analysis it was possible to identify the presence of bacteria related to common diseases in humans, of which many presented resistance to multiple antibacterial. Physico-chemical analyzes and potentially toxic metals were performed, the results demonstrated that these parameters are in agreement with the standards established for potable water by the normative institutions. Thus, the present work alerts to the problem of bacterial contamination in

water for consumption of quilombola regions and also to the growing problem of the transmission of antimicrobial resistance genes in water.

Keywords: Coliform. Groundwater. Multidug-resistance. Physico-chemical. Toxic metals.

INTRODUCTION

The availability of good quality water is determinant for the socioeconomic development of a country, besides being one of the main parameters in the evaluation of the living conditions and well-being of a population (Pereira *et al.* 2010). The maintenance of the health of a population depends, among other factors, on the use of potable water, that is, free from pathogenic bacteria of water and health-damaging chemical materials (Pala *et al.* 2014).

Inadequate disposal of sewage interferes with microbiological quality, since this action may contaminate water with microorganisms present in the human intestinal microbiota, such as enterobacteria, which may be pathogenic and cause opportunistic infections (Nascimento *et al.* 2013).

In addition to diseases caused by bacteria in the water, another cause for concern is the transfer of antimicrobial resistance genes between bacteria in aquatic environments, which may make bacterial infections difficult or even impossible to treat (Laxminarayan 2013).

Some social groups suffer from the lack of good quality water, especially those that throughout history have been placed on the margins of society, as is the case of quilombola communities. Contemporary quilombolas are characterized by black Afro-Brazilian communities in situations of social vulnerability (Vieira and Monteiro, 2013).

The sanitary conditions of these communities are often insufficient, many suffer from the precarious access to treated water and sanitary sewage, and also suffer from the absence of local health services leading them in the event of diseases, to seek medical care in places far from their homes (Freitas *et al.* 2011).

In this sense, the objective of this study was to evaluate the quality of water used in the daily consumption of two quilombola communities in the state of Goiás, so that the observed results contribute to the evaluation of the quality of life of the residents of these communities and thus can subsidize public policies to them.

METHODS

Collect

In the period between May and August 2017, water was collected from artesian wells in two quilombola communities, one located in the urban area in Aparecida de Goiânia - GO (Community 1-C1) and another in the rural area in Silvânia-GO (Community 2-C2) (Fig. 1).

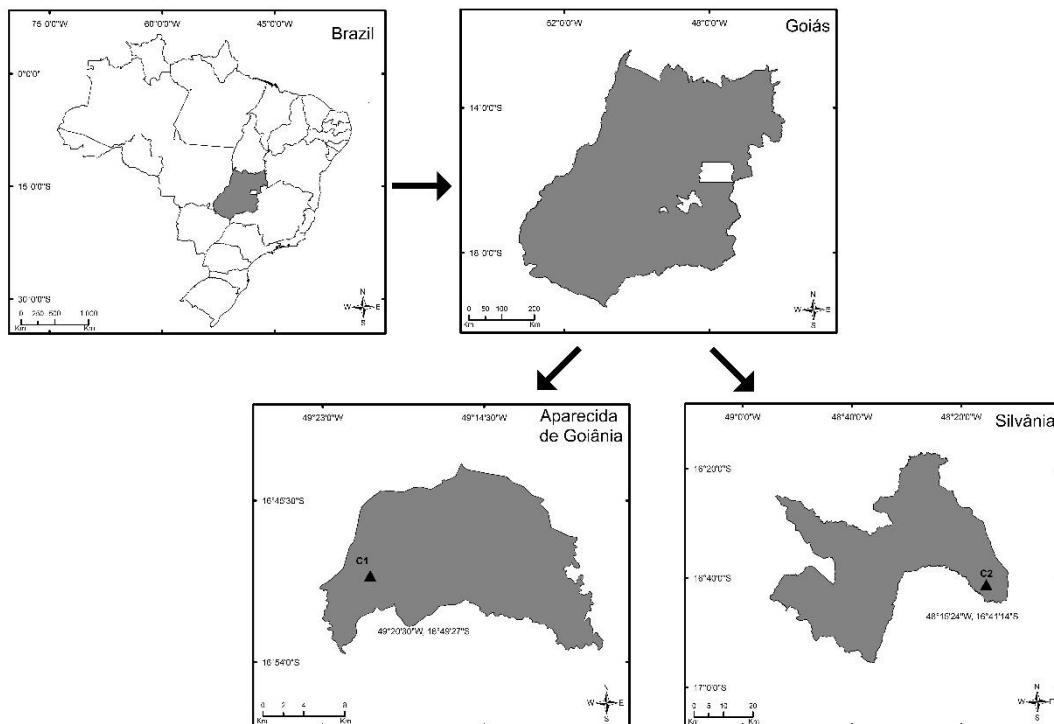


Fig. 1 Map of the study area developed in ArcGis 10.5 software. C1: Community in Aparecida de Goiânia, C2: Community in Silvânia.

In each community five water samples were collected in points described in Table 1, in duplicate, the collections were made directly from household taps originating from artesian wells that supply the residences. Water was collected for microbiological and physicochemical tests.

Table 1 Description of collection points in communities 1 and 2.

Points	C1	C2
	Description	Description

1	Faucet from a residence that receives water from artesian well with added chlorine.	Reservoir of the artesian well 1 without addition of chlorine
2	Faucet from a residence that receives water from shallow well without addition of chlorine	Faucet from a residence that receives water from artesian well 1 without addition of chlorine
3	Faucet from a residence that receives water from shallow well without addition of chlorine	Faucet from a residence that receives water from artesian well 2 without addition of chlorine
4	Faucet from a residence that receives water from artesian well with added chlorine.	Faucet from a residence that receives water from artesian well 3 without addition of chlorine
5	Reservoir of artesian well with addition of chlorine	Faucet from a residence that receives water from artesian well 1 without addition of chlorine

For samples of water intended for microbiological, physico-chemical and toxic metal tests, sterile plastic bottles were used. After the samples were placed in iceboxes and transported to the Environmental Microbiology Laboratory of the Federal University of Goiás. Samples were processed in the same day of collection.

The study was evaluated by the Research Ethics Committee of the Federal University of Goiás - CEP/UFG and obtained approval on April 7, 2017, under number 2007054.

Analysis of total and fecal coliforms by multiple tubes

In order to perform the quantification of total and thermotolerant coliforms in the collected samples, the multiple tube technique was used in accordance with the American Public Health Association - APHA (APHA 2012). In all tests, the tubes considered positive were those that had gas inside the Durham tube. The results were expressed as Most Likely Number (MPN) per 100 mL/sample.

Phenotypic identification of bacteria and Antibioqram

A volume of 250 mL of water was collected and plated separately in culture media, R-2, MacConkey and Mannitol. After 48 hours of incubation at 30 °C, the colony forming units (CFU) were counted and the colonies that had different morphological characteristics were isolated. The colonies that grew, were seeded on plates containing Nutrient Agar to continue the identification tests. The phenotypic identification of the bacteria was performed by subjecting the isolates to different biochemical tests, through which metabolic reactions of the microorganisms and the morphological characteristics

of the colonies were verified. Based on these characteristics, the Manual of Clinical Microbiology for Infection Control of Health Services of the National Sanitary Surveillance Agency was used to identify isolated bacteria (ANVISA, 2013).

The assays performed were: Gram staining method, enzyme oxidase and catalase, SIM agar for motility testing, H₂S and indole production, lysine decarboxylase tests, maltose and lactose, hemolysis and gelatinase. In all assays the materials used, such as Petri dishes, tubes, and media were properly autoclaved at 121 °C for 20 minutes. The assays were incubated at 30 °C for 18 to 24 hours.

The antimicrobial susceptibility test was performed according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017) and the diffusion disc was used for most of the isolates and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) test for some non-enterobacteria. The antibiotics used were: amikacin, amoxicillim+clavulanate, ampicillin, aztreonam, cefepime, ceftazidime, ciprofloxacin, clindamycin, chloramphenicol, erythromycin, gentamicin/tobramycin, imipenem, linezolid, norfloxacin, novobiocin, penicillin, piperacillin+tazobactam, rifampin, tetracycline, trimethoprim-sulfamethaxazole and vancomycin.

Physical-chemical tests and Potentially Toxic Metal

All physico-chemical tests of hardness, alkalinity and nitrate concentration were performed until 72 hours after collection and followed the protocols determined by APHA (APHA, 2012). The determination of the color, turbidity and conductivity of the samples were made using the equipment; colorimeter (Policontrol), turbidimeter (Hach) and conductivity meter (Tecnopon), respectively.

The samples were previously acidified with 0.1% nitric acid and then evaporated in a heating plate, where the initial volume of the samples was analyzed, reduced by about ten times. In the final volume of 50 mL the concentration of the following metals was determined: copper, manganese, iron and lithium. The readings were performed on an atomic absorption apparatus (AAAnalyst 400 AA Spectrometer).

Statistical analyzes

The data were statistically analyzed using the software Statistica ® 7.0 (Statsoft). The minimum values, maximum values, means and standard deviations (basic statistics)

were calculated for the data of the coliforms, of the physical-chemical test and of the metal concentrations. Pearson's correlation matrix was also calculated for this data. The significance level in this study was $p < 0.05$. Multivariate principal components analysis (PCA), was used to determine and interpret the variables of water quality and to measure the characteristic features of each region. The software METLAB (MATrix LABoratory) was used for PCA.

RESULTS

General water quality

The general water quality represented by coliform analysis, physical-chemical tests and metal concentration of the samples collected in C2 and C2 are summarized in Table 2. The basic statistics of these data are reunited in Table 3.

Table 2 General water quality in the samples of water for consumption in community 1 and community 2.

Samples	Parameters												
	TC ^d (/100 mL)	ThC ^d (/100 mL)	pH	Color (Uc)	Turbidity (NTU)	Nitrate (mg/L)	Alkalinity (mg/L)	Toughness (mg/L)	Conductivity mS/cm)	Iron (mg/L)	Lithium (mg/L)	Manganese (mg/L)	Copper (mg/L)
C1													
1 ^a Sample1	0	0	7,7	0,80	0,16	0,80	0,60	2,70	110,80	0,011	ND	ND	0,001
1 ^a Sample2	1600	1600	5,0	2,80	ND	4,40	0,01	0,20	48,50	0,012	ND	ND	ND
1 ^a Sample3	1600	1600	6,0	13,20	1,76	2,80	0,10	0,55	50,90	0,017	ND	ND	0,001
1 ^a Sample 4	0	0	7,8	1,30	0,14	ND	0,56	2,35	112,20	0,013	ND	ND	0,001
1 ^a Sample 5	0	0	7,9	1,90	0,17	ND	0,63	2,65	118,80	0,012	ND	ND	0,004
2 ^a Sample 1	0	0	7,9	9,90	0,23	ND	0,50	4,45	112,40	0,006	0,001	0,001	0,001
2 ^a Sample 2	1600	1600	5,4	12,60	1,40	3,80	0,05	1,00	45,20	0,011	0,001	0,001	0,001
2 ^a Sample 3	1600	1600	5,2	9,00	0,57	5,10	0,06	1,10	60,30	0,008	ND	ND	0,001
2 ^a Sample 4	0	0	7,9	10,40	0,27	ND	0,52	2,10	109,70	0,003	ND	0,001	0,001
2 ^a Sample 5	0	0	8,0	10,10	0,52	ND	0,50	2,10	112,20	0,017	0,001	0,001	0,001
C2													
1 ^a Sample 1	4	0	7,2	1,60	0,31	1,40	0,80	2,15	48,60	0,002	0,001	0,001	0,001
1 ^a Sample 2	50	6	7,1	1,20	0,84	0,20	0,70	4,00	138,90	0,003	0,001	ND	0,001
1 ^a Sample 3	27	11	7,6	2,00	0,17	0,20	0,67	2,20	140,20	0,004	0,001	ND	0,001
1 ^a Sample 4	0	0	7,0	2,10	0,24	0,10	0,23	1,50	43,00	0,003	ND	0,001	0,001
1 ^a Sample 5	26	0	7,0	1,30	0,14	0,10	0,24	2,80	42,60	0,003	ND	0,001	0,007
2 ^a Sample 1	23	23	5,6	1,10	0,28	1,20	0,25	2,60	47,20	0,011	ND	ND	0,001
2 ^a Sample 2	1600	240	7,0	2,00	0,64	ND	0,85	4,90	192,10	0,012	ND	0,001	ND
2 ^a Sample 3	1600	1600	7,2	1,90	0,18	0,10	0,66	4,95	157,50	0,012	ND	0,001	ND
2 ^a Sample 4	240	240	6,8	4,70	0,67	0,10	0,21	3,20	52,90	0,014	ND	0,001	0,001
2 ^a Sample 5	4	23	6,7	3,50	0,93	ND	0,30	3,35	62,50	0,011	ND	ND	ND
MAV ^b	0	0	6,0-9,5	15	5	10	-	500	-	0,300	2,500	0,100	2,000

^a Table based on Practical Handbook of Water Analysis (2013).

^b MAV: Maximum Allowed Value based in MS, Ordinance 2914 number, 2011 and Conama Resolution.

^c 1^a: first collection; 2^a: second collection

^d TC: Total Coliforms; ThC: Thermotolerant coliforms

ND: not detectable by the technique used.

Table 3 Basic statistics for parameters of the general water quality.

Parameters	C1			C2		
	Minimum	Maximum	Mean ± SD	Minimum	Maximum	Mean ± SD
TC ^a	0	1600	640 ± 826,23	0	1600	357,4 ± 658,67
ThC ^a	0	1600	640 ± 826,23	0	1600	214,3 ± 496,33
pH	5,0	8,0	6,88 ± 1,3	5,6	7,6	6,9 ± 0,52
Color	0,8	13,2	7,2 ± 4,91	1,1	4,7	2,14 ± 1,12
Turbidity	0,14	1,76	0,6 ± 0,56	0,14	0,93	0,44 ± 0,30
Nitrate	0	5,1	1,6 ± 2,15	0	1,4	0,34 ± 0,51
Alkalinity	0,01	0,63	0,35 ± 0,26	0,21	0,85	0,49 ± 0,26
Toughness	0,2	4,45	1,92 ± 1,25	1,5	4,95	3,16 ± 1,16
Conductivity	45,2	118,8	88,1 ± 32,04	42,6	192,1	92,55 ± 57,69
Iron	0,003	0,017	0,011 ± 0,004	0,002	0,014	0,007 ± 0,004
Lithium	0,000	0,001	0,000 ± 0,000	0,000	0,001	0,000 ± 0,000
Manganese	0,000	0,001	0,000 ± 0,000	0,000	0,001	0,000 ± 0,000
Copper	0,000	0,004	0,001 ± 0,001	0,000	0,007	0,001 ± 0,002

The water used by the quilombola communities under study is not within potability standards, since most of the analyzed samples had total and thermotolerant coliforms in 100 mL of water sample.

In relation to the physical-chemical parameters it is observed that the pH is the only parameter analyzed that is not in accordance with the organoleptic standards of potability established by Administrative Rule 2914 / 2011 of the Ministry of Health, being this one of the most frequent determinations of water quality is pH measurement. Samples 2 and 3 from C1 presented pH lower than or equal to 6.0 and a sample 1 of the second collection from C2 had pH equal to 5.6.

The results of the analysis of potentially toxic metals for the water samples collected from artesian wells indicate that the values found are below the MAV recommended by the CONAMA Resolution (CONAMA 1986).

Correlation between parameters for Principal component analysis and Pearson's correlation

The main components analysis (PCA) provided a clear visualization of the correlations between water quality parameters (Coliforms and physicochemicals) (Fig. 2).

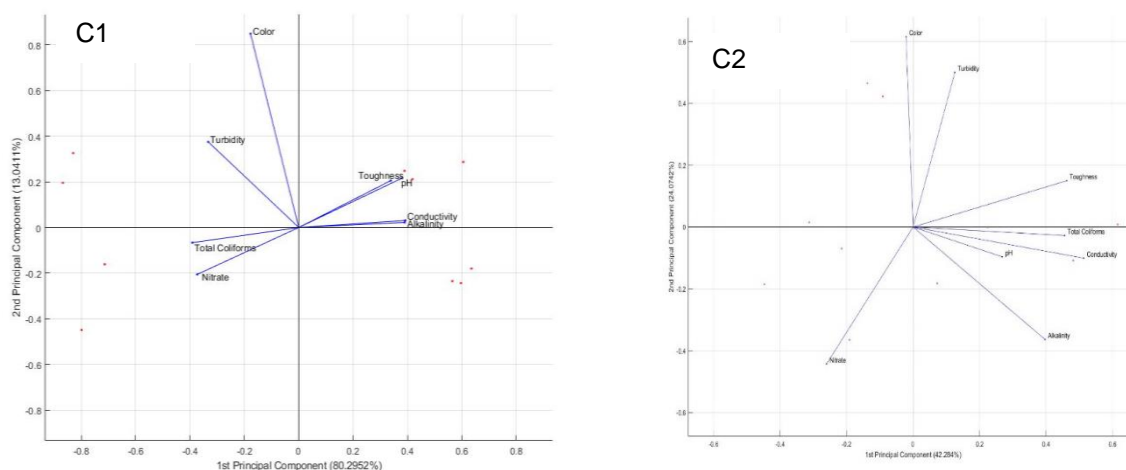


Fig. 2 Principal components analysis (PCA) to project general water quality (except metal concentration) in Quilombola communities of Goiás.

In PCA when two variables are far from the center and close to each other indicates that these variables are positively correlated. On the other hand, if the variables are perpendicular, they are not correlated. Thus, in C1, there was a strong correlation between: nitrate, toughness, pH, conductivity and alkalinity and weak correlation between: total coliforms, turbidity and color. In C2 there was a strong correlation between: toughness, total coliforms, conductivity and pH and between turbidity and color.

Phenotypic identification of bacteria and Antibigram

Samples from the first collection in C1, showed contamination by nine different bacterial species in a total of 16 isolates, being *Klebsiella pneumoniae* (4), *Escherichia coli* (3), *Aeromonas* spp. (2), *Acinetobacter baumannii* (2), *Acinetobacter haemolyticus* (1), *Serratia* spp. (1), *Pantoea agglomerans* (1), *Citrobacter freundii* (1), *Enterobacter aerogenes* (1). In the second collection, were obtained 17 isolated: *Bacillus* spp. (1), *Staphylococcus auricularis* (1), *Corynebacterium afermentans* (2), *Acinetobacter lwoffii* (2), *Arcanobacterium* spp. (1), *Acinetobacter haemolyticus* (1), *Klebsiella pneumoniae* (1), *Hafnia alvei* (1), *Providencia* spp. (1), *Salmonella choleraesuis* (1), *Sphingomonas* spp. (2), *Acinetobacter baumannii* (1), *Enterobacter cloacae* (1), *Escherichia coli* (1).

Water samples collected in the C2 presented 32 isolates in the first collection, being: *Staphylococcus auricularis* (8), *Staphylococcus capitis* (1), *Enterobacter aerogenes* (3), *Acinetobacter lwoffii* (9), *Streptococcus* spp. (1), *Micrococcus* spp. (1), *Stomatococcus* spp. (1), *Arcanobacterium* spp. (2), *Corynebacterium xerosis* (1), *Bacillus* spp. (1),

Pantoea agglomerans (2), *Hafnia alveia* (1), *Serratia* spp. (1). In the second collection were isolated 40 bacteria, being: *Acinetobacter haemolyticus* (2), *Corynebacterium afermentans* (1), *Acinetobacter lwoffii* (9), *Serratia marcescens* (4), *Aeromonas* spp. (3), *Hafnia alvei* (3), *Klebsiella pneumoniae* (2), *Plesiomonas* spp. (3), *Corynebacterium propinquum* (1), *Enterobacter aerogenes* (1), *Klebsiella oxitoca* (1), *Enterobacter cloacae* (1), *Arcanobacterium* spp. (1), *Staphylococcus capitis* (2), *Acinetobacter baumannii* (1), *Chryseobacterium indologenes* (1), *Staphylococcus kloosii* (1), *Listeria* spp. (1), *Bacillus* spp. (1), *Sphingomonas* spp. (1).

The profile of antibacterial resistance and susceptibility can be observed in Table 4. Bacteria multidrug-resistant (MDR) are highlighted in the table. The greatest number of resistances were observed in the drug class Penicilin and β -lactam, being 52,6 % (50/95) and 22,1% (21/95), respectively.

Table 4 Antimicrobial resistance profiles in bacteria isolates.

Species (n° isolates)	A	A	A	A	C	C	C	C	E	G	I	L	N	N	P	P	R	T	S	V		
	M	M	M	T	E	A	I	L	H	R	E	M	N	O	O	E	P	I	E	X	A	
	K	C	P	M	P	Z	P	I	L	Y	N	P	Z	R	V	N	T	F	T	T	N	
C1																						
<i>Acinetobacter haemolyticus</i> * (2)	■	■	■	■	■					■	■											
<i>Serratia sp.</i> * (1)			■	■	■						■											
<i>Pantoea agglomerans</i> (1)																						
<i>Citrobacter freundii</i> (1)			■																			
<i>Enterobacter aerogenes</i> (1)												■										
<i>Aeromonas sp.</i> (2)																				■		
<i>Acinetobacter baumannii</i> (3)			■																			
<i>Escherichia coli</i> *(4)	■	■	■	■	■						■	■										
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (5)			■	■	■	■	■															
<i>Staphylococcus auricularis</i> * (1)									■		■			■		■						
<i>Acinetobacter lwoffii</i> * (2)	■		■								■											
<i>Hafnia alvei</i> (1)			■																			
<i>Salmonella choleraesuis</i> * (1)			■						■		■			■	■	■		■				■
<i>Enterobacter cloacae</i> (1)			■																			
Others noenterobacteria (2)					■									■								
C2																						
<i>Staphylococcus capitis</i> * (1)									■		■				■		■					
<i>Streptococcus sp.</i> (1)																			■			
<i>Micrococcus sp.</i> (1)									■				■									
<i>Stomatococcus sp.</i> * (1)	■								■						■							
<i>Hafnia alveia</i> * (4)	■	■	■	■	■				■		■	■									■	
<i>Pantoea agglomerans</i> * (2)	■	■	■	■	■							■										
<i>Enterobacter aerogenes</i> * (4)	■	■	■	■	■					■		■	■				■			■	■	■
<i>Staphylococcus auricularis</i> * (8)	■									■		■				■	■	■	■			■
<i>Acinetobacter lwoffii</i> * (18)	■	■	■	■	■						■	■										

Here the majority of the samples present a quantity of coliforms superior to the one recommended by the legislation. A similar result was observed by Colvara *et al.* (2009), where contamination of 100% of water samples collected in artesian wells from five cities in the southern region of Rio Grande do Sul (Brazil) was observed. The high contamination rates (1600/100 mL) for total coliforms and thermotolerant well water reveal the risk situation found in most of the underground watersheds. Several factors are responsible for the contamination of well water, among them there is the lack of maintenance of the reservoir, inadequate location of artesian wells, and the lack of adequate treatment of the sewage near the wells (Colvara *et al.* 2009). All these factors may be causing interference in the water quality used in the quilombola communities under study.

Some samples (C1: 2 and 3; C2: 1), in this study, presented pH acid (≤ 6). The pH value recommended by the Ordinance should be between 6.5 and 9.5, values below 7.0 indicate that the medium is acidic, which can be an aggravating factor in the conservation of the materials constituting the pipes, reducing the useful life (Freitas *et al.* 2001).

The presence in certain quantities of metals such as copper, iron, manganese and lithium in drinking water can cause health damage by reducing the body's energy levels thus damaging the brain, lungs, kidneys, liver, blood composition and other organs (Gomes *et al.* 2017). For this reason, the study of these metals has been prioritized to the detriment of other chemical contaminants. The absence of high concentrations of metals in the analyzed water indicates that these sources of water are free from the main forms of contamination by metals such as industrial effluents containing potentially toxic metals, black ditches, and large quantities of cesspits in the region and the geochemical nature of the only (Freitas *et al.* 2001).

The parameters hardness, pH, conductivity and alkalinity present a strong correlation because all are influenced by the same factor: the concentration of positive ions (anions) and negative ions (cations) in water (MS, 2011). Turbidity is understood to be a measure of the degree of interference the passage of light through a liquid, this interference is due to the presence of suspended material, such fact justifies the positive correlation between turbidity and color. In addition, the turbidity makes the disinfectants unfeasible, therefore, water with a high degree of turbidity can be associated with the presence of microorganisms (MS 2017).

Among the bacteria isolated in this study are the genera: *E. coli*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. and *Klebsiella* spp., that are genera belong to family Enterobacteriaceae. Enterobacteria are often related to enteric diseases manifested by diarrhea, leading to a

large number of deaths in developing countries. Contamination by Enterobacteria occurs mainly by ingestion of contaminated food and water (Bublitz *et al.* 2014). The presence of these bacteria in water indicates contamination by human fecal material or other animals, in addition to indicating the presence of pathogenic organisms. Inadequate sewage disposal, septic leaching, wildlife population or inappropriate disposals of human and animal waste are the main sources of coliform contamination (An 2002).

The genus *Acinetobacter* spp., also isolated in this study, is commonly isolated in the hospital environment. Bacteria of this genus are closely related to infections in humans and this has aroused great public health concern due to the resistance of these bacteria to various antibiotics (Kulkarni *et al.* 2017). *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Serratia* spp., as well as gram-positive bacteria such as *Enterococcus* spp. and *Staphylococcus* spp. are associated with infections of the urinary tract that may present asymptotically or cause severe sepsis (Kashef *et al.* 2010).

Many of the isolates in this study showed to be MDR (Table 4), this characteristic being defined by the non-susceptibility to at least one agent in three or more antimicrobial categories (Basak *et al.* 2016). MDR bacteria are a world-wide problem, millions of people annually develop infections by these organisms and therefore are more prone to treatment failure, prolonged hospitalization, intensive care unit (ICU) stay, invasive procedures and death (Sanchez and Gustot, 2019).

Resistance of bacteria to antimicrobials has impaired the efficacy of these drugs. Resistant bacteria lead to infections that trigger higher morbidity, mortality, and higher treatment costs than those caused by susceptible bacteria of the same species (Alos 2015).

Phylogenetically different bacteria that live in the environment are able to use antibiotics as the only source of carbon (Dantas *et al.* 2008), these environmental bacteria that subsist on antibiotics are reservoirs of resistance genes of bacteria that colonize and infect humans. Mechanisms such as mutation, DNA recombination, gene transfer, have been used by bacteria to become able to survive even in environments loaded with antibiotics. Deciphering these bacterial mechanisms may be the key to making the present antibiotics more efficient in the future (Nesme 2014).

Gomes *et al.* (2017), observed a pattern of multiresistance in bacteria isolated from rivers, in the State of Goiás, Brazil. Holvoet *et al.* (2013), isolated 473 *E. coli* colonies from lettuce, irrigation water and soil samples and observed antimicrobial resistance in 11.4% of the isolates for one or more antimicrobial agents, these results suggest that the plants

and the environment in which are produced can act as an antimicrobial resistance vector reservoir.

CONCLUSION

The results for the bacteriological parameters observed in this study are outside the standards recommended by the Ministry of Health for water for human consumption. The bacteriological quality of the water observed indicates that the consuming population may be exposed to waterborne diseases, since most of the bacterial isolates are potentially causing diseases in humans.

The antimicrobial resistance patterns observed suggest that water has been a vehicle for the dissemination of resistance genes and that it is therefore necessary to observe this problem worldwide.

There were no significant values in the physical-chemical tests and of potentially toxic metals, leading us to deduce that there is no anthropological contamination that causes changes in these parameters.

Through the results observed here, it is important that the responsible governmental entities direct attention to the population that compose the quilombola communities, proposing to them public policies that will provide a better quality of life, with respect to the water supply within the parameters of consumption to these communities.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements: To CAPES, by scholarship.

References

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Brazil, 2013.
<http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/deteccao->

e-identificacao-de-bacterias-de-importancia-medica of subordinate document. Accessed Jan, 2018.

ALÓS JI. 2015. **Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global Antibiotic resistanc.** *Infec Microbiol Clin* 33:692-699. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X14003413> Accessed Feb, 2018.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, et al, 2012. **Standard methods for the examination of water and wastewater.** 22th ed. American Public Health Association.

AN YJ, KAMPBELL DH, BREIDENBACH GP. 2002. **Escherichia coli and total coliforms in water and sediments at lake marinas.** *Environ Pollut.* 120.3 (2002): 771-778. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749102001732>. Accessed Feb, 2018.

BASAK S, SINGH P, RAJURKAR M. 2016. **Multidrug resistant and extensively drug resistant bacteria: A study.** *J Pathog,* 5 pages. <https://www.hindawi.com/journals/jpath/2016/4065603/abs/>. Accessed Jan, 2018.

BUBLITZ DAC, WRIGHT PC, BODAGER JR, RASAMBAINARIVO FT, BLISKA JB, GILLESPIE TR. 2014. **Epidemiology of Pathogenic Enterobacteria in Humans, Livestock, and Peridomestic Rodents in Rural Madagascar.** *Plos One* 9(7):e101456. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0101456>. Accessed March, 2018.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2017. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ed. CLSI supplement M100S.** Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 27th ed., 1-256.

COLVARA JG, LIMA AS, SILVA WP. 2009. **Evaluation of groundwater contamination in artesian wells in the south of the Rio Grande do Sul.** *Braz J Food Technol II SSA.*

DANTAS G, SOMMER MO, OLUWASEGUN RD, CHURCH GM. 2008. **Bacteria subsisting on antibiotics.** Sci 320:100-10. <https://science.sciencemag.org/content/320/5872/100>. Accessed Jan, 2018.

FREITAS DA, CABALLERO AD, MARQUES AS, HERNÁNDEZ CIV, ANTUNES SLNO. 2011. **Saúde e comunidades quilombolas: uma revisão da literatura.** Rev CEFAC. 13. <http://www.scielo.br/pdf/rcefac/2011nahead/151-10.pdf>. Accessed Jan, 2018.

FREITAS MB, BRILHANTE OM, ALMEIDA LM. 2001. **Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio.** Cad Saúde Pública, Rio de Janeiro, 117(3), 651-660. <https://www.scielosp.org/article/csp/2001.v17n3/651-660/>. Accessed Fev, 2018.

GOMES RP, RODRIGUES AA, PINCERATI MR, BARBOSA MS, BRAGA CASB, VIEIRA JDG, CARNEIRO LC. 2017. **Assessment of the bacteriological quality of the raw water and the antimicrobial susceptibility profile of bacteria isolated in water surface of a river.** Int J Microbiol Res 9:949-953.

HOLVOET K, SAMPERS I, CALLENS B, DEWULF J, UYTTENDAELEA M. 2013. **Moderate Prevalence of Antimicrobial Resistance in Escherichia coli Isolates from Lettuce, Irrigation Water, and Soil.** Appl Environ Microbiol 79:6677–6683. <https://aem.asm.org/content/79/21/6677.short>. Accessed Jan, 2018.

KASHEF N, DJAVID GE, SHAHBAZI S. 2010. **Antimicrobial susceptibility patterns of community-acquired uropathogens in Tehran.** Iran J Infect Dev Ctries 4:202-206. <https://jidc.org/index.php/journal/article/view/540>. Accessed Fev, 2018.

KULKARNI SS, MADALGI R, AJANTHA GS, KULKAMI RD. 2017. **Identification of genus Acinetobacter: Standardization of in-house PCR and its comparison with conventional phenotypic methods.** J Lab Physicians 9(4):279-282. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5607758/>. Accessed Fev, 2018.

LAXMINARAYAN R *et al.* 2013. **Antibiotic resistance: The need for global solutions.** Lancet Infect Dis 13:1057-1098.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011. Portaria N° 2.914, 12 Dec 2011. **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.** Diário Oficial da União. 14 Dec 2011, Seção 1, 39. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html. Accessed Jan, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria de Consolidação n° 5, de 28 de setembro de 2017. Available in: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0005_03_10_2017.html. Accessed Nov, 2018.

NASCIMENTO VFS, ARAÚJO MFF, NASCIMENTO ED, SODRÉ-NETO L. 2013. **Epidemiology of waterborne diarrheal diseases in a Brazilian semiarid region.** ConScientiae Saúde 12:353-361. <https://search.proquest.com/info/openurldocerror?jsessionid=3BC437DDDF140D1DBDBCDC738945636A6.i-088b8f709acdd58b2>. Accessed Apr, 2018.

NESME J, CECILLON S, DELMONT TO, MONIER JM, VOGEL TM, SIMONET P. 2014. **Large-scale metagenomic-based study of antibiotic resistance in the environment.** Curr Biol 24:1096-1100. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982214003285>. Accessed Apr, 2018.

PALA A, HE Y, JEKEL M, REINHARD M, GIN KYH. 2014. **Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle.** Environ Int 71: 46-62. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412014001767>. Accessed Feb, 2018.

PEREIRA SFP, COSTA AC, CARDOSO ESC, CORRÊA MSS, ALVES DTV, MIRANDA RG, OLIVEIRA GRF. 2010. **Condições de potabilidade da água consumida pela população de Abaetetuba-Pará.** Rev Eest Amb 12: 50-62. <https://gorila.furb.br/ojs/index.php/rea/article/view/1783>. Accessed Feb, 2018.

RESOLUÇÃO CONAMA Nº 020/1986 - **Dispõe sobre a classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional.** Date of legislation: 18/06/1986 - Publication DOU, de 30/07/1986, pgs. 11356-11361 Status: Changed by Resolution nº 274, de 2000. Repealed by Resolution nº 357, de 2005. <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=43>. Accessed Feb, 2018.

SANCHEZ LO, GUSTOT T. 2019. **Multidrug-Resistant Bacterial Infection in Patients with Cirrhosis. A Review.** Curr Hepatol Rep 1-8. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11901-019-00447-3>. Accessed Mar, 2019.

VIEIRA ABD, MONTEIRO PS. 2013. **Quilombola community: analysis of the persistent problem in health attention under the focus of the Intervention Bioethics.** Saúde em Debate 37(99):610-618. http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-11042013000400008&script=sci_arttext. Accessed Feb, 2018.

Capítulo 3

**Artigo 2: Evaluation of phenotypic and molecular methods in the
identification of environmental bacteria
(Avaliação de métodos fenotípicos e moleculares na identificação de bactérias
ambientais)**

Evaluation of phenotypic and molecular methods in the identification of environmental bacteria

Aline Rodrigues Gama¹, Renan Souza Soares¹, Monica Santiago Barbosa¹, José Daniel Gonçalves Vieira¹, Lilian Carla Carneiro¹.

¹Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

Abstract

The great diversity added to high complexity of environmental bacterial strains makes it difficult to correctly identify these organisms by traditional methods. Methods based on the morphology, physiology and biochemistry of microorganisms require a database against which to compare the results. Such databases, if not judicious and complete, may generate misleading results. Because of that, bacterial identification methods are constantly being developed and improved, and the 16S rRNA gene is used in most of them. The aim of this study was to compare bacterial identification based on biochemical tests with sequence-based identification of the 16S rRNA gene and to evaluate the main methods for identifying environmental bacterial strains used in the latest scientific publications. Twenty-nine bacterial isolates obtained in water, were submitted to biochemical tests and DNA extraction. Biochemical test results were compiled to three different phenotypic identification platforms and the DNA was extracted and used for amplification and subsequent sequencing of the coding region for the 16S rRNA subunit. A total of 148 articles were evaluated for the methodology used to identify bacteria isolated from different environmental sources. The responses obtained in the three phenotypic identification platforms showed great divergence. Only four strains (13.79%) were identified as belonging to the same genre in the three platforms and few were in agreement with the 16S rRNA identification. Of the 148 articles, 102 (68.92%) used in their researches the 16S rRNA gene sequencing as a method to identify bacterial strains. Although bacterial identification based on phenotypic characteristics is especially important for bacteria of clinical origin, such methodologies should be combined with more accurate methodologies for the efficient identification of bacteria from external environments. Molecular methods based on conserved genes between species, such as the 16S rRNA gene, should be employed to advance environmental bacterial identification processes.

Keywords: Phenotyping; Sequencing; 16S rRNA; Identification.

1. Introduction

In the environmental microbiology fast and accurate techniques for bacterial identification are fundamental for defining new isolates and for understanding the

bacterial biodiversity of different ecological niches. In addition, knowledge of such bacteria broadens the study of bioprospecting enabling the development of new biotechnological applications (PANDEY *et al.*, 2019). Identifying environmental bacterial strains faces major challenges, especially when using methods that rely on previous databases. Databases developed for bacterial identification are mostly designed for clinical use and are therefore ineffective for very specific microbial groups, such as those isolated from external environments (TILLMAN *et al.*, 2012).

Most of the time bacterial identification is performed by observing the morphology and phenotypic responses of the isolates. Most of the time this identification is performed by observing the morphology and phenotypic responses of the isolates (SANTOS; HILDENBRAND; SCHUG, 2016). However, morphological and biochemical tests used for phenotypic responses are generally time consuming, laborious and difficult to interpret, since genetically similar microorganisms may have different phenotypic characteristics, being inadequate for rapid identification of a microorganism. In addition, platforms for comparing phenotypic responses are built based on clinical isolates and are not suitable for identifying environmental isolates (SANTOS; HILDENBRAND; SCHUG, 2016; TIMPERIO *et al.*, 2017).

One way to help identify environmental specimens without the use of phenotypic methods is to use the 16S rRNA gene, which is considered the gold standard for classification and identification of prokaryotic species (IBAL *et al.*, 2019). The use of this gene was first proposed by Woese and Fox (1977) and Woese *et al.* (1990) as a tool for the recognition of these microorganisms. The 16S rRNA gene is relatively short in length and has highly conserved regions and other hypervariable, making it easily sequenced and also an ideal marker for prokaryote identification (TAKHAMPUNYA *et al.*, 2019). The sequencing of 16S rRNA gene can be performed by different methods, and the Sanger method is still widely used for this purpose (SINCLAIR *et al.*, 2015; YANG; WANG; QIAN, 2016).

The use of sequencing for bacterial identification is a valuable tool as it provides information needed to distinguish isolates from the same lineage, overcoming the limitations of traditional phenotypic methods (RAVEN *et al.*, 2019). Although, the use of molecular techniques reveals important perceptions of microbial communities. The presence of Polymerase Chain Reaction (PCR) errors, sequencing and sequence analysis, may distort the identification of the samples under study, therefore, studies aiming at new bacterial identification technologies are important (SINCLAIR *et al.*, 2015).

Intense studies in this line led to the development of bacterial identification through the Matrix-assisted laser desorption–ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). MALDI-TOF technology is based on the analysis of the protein composition of a bacterial cell, which is characteristic of each species. This can be a useful tool if the database you use is available and detailed. The use of MALDI-TOF for bacterial identification has been a useful technique for clinical isolates where databases are considerably satisfactory, however major upgrades to these databases would be necessary to implement this technique for environmental bacteria (PANDEY et al., 2019).

Faced with different microbial identification methodologies, which should be employed when the objective is to identify environmental bacteria? The aim of this study was to compare the bacterial identification obtained on three different platforms based on phenotypic testing with the sequence-based identification of the 16S rRNA gene and to evaluate the identification methods of bacteria of environmental origin suggested in important publications of recent years, stressing here the importance of employing correct identification methods.

2. Material and Methods

2.1. Obtaining isolates and phenotypic identification

The bacterial isolates used in this study were obtained from drinking water samples collected from two quilombola communities in the state of Goiás - Brazil, being a community located in the urban area of Aparecida de Goiânia (16°49'28.4"S 49°20'30.7"W) and the other in rural Silvânia (16°41'25.6"S 48°15'20.9"W).

Five samples were collected from each community, and the samples were taken directly from home taps that are supplied by artesian wells located nearby. For bacterial isolation the water samples were sown on R-2 agar medium and after 48 hours of incubation colonies with different morphological characteristics were sown on another plate containing the same culture medium.

Phenotypic identification of the isolates was performed by subjecting them to different biochemical tests, through which the metabolic reactions of the microorganisms and the morphological characteristics of the colonies were verified. The tests performed were: Gram staining method, oxidase and catalase enzyme verification (CHESTER;

MOSKOWITZ, 1987), SIM agar for motility testing, H₂S and indole production, lysine decarboxylase testing (BROOKER; LUND; BLAZEVIC, 1973) and phenylalanine deaminase, urease, citrate (SIMMONS, 1926), fermentative tests with glucose, maltose and lactose (HUGH, 1953), hemolysis and gelatinase. The results obtained in the biochemical tests were submitted to three different identification platforms: ABIS online (<http://www.tgw1916.net>); Online bacterial identification (<http://www.microrao.com>) and Clinical microbiology for health care-related infection control (ANVISA manual) (ANVISA, 2013). These results were also used for the phenotypic grouping performed in the Statistical 7 software through the Cluster Analysis tool that performed the Euclidean distance calculation using the Single Linkage method.

2.2.DNA extraction, amplification and sequencing

Molecular identification of bacterial isolates began with the extraction of genomic DNA according to the methodology described by Van Soolingen *et al.* (1994). Next, PCR for amplification of the coding region for the 16S rRNA subunit was performed using universal primers 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1541R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'). For the reaction we used 35.5 µL of water (miliQ®), 5.0 µL of sample buffer (10X) (Ludwig Biotec LTDA), 1.5 µL of MgCl₂ (50 mM) (Ludwig Biotec LTDA), 1.0 µL solution from each primer (10mM) (Invitrogen™), 4.0 µL dNTP solution (2.5 mM) (Ludwig Biotec LTDA), 1.0 µL Taq polymerase (5 U) (Ludwig Biotec LTDA) and 1.0 µL DNA (50 ng), final volume 50 µL. The reaction was performed in a thermal cycler (Veriti™ 96-Well Thermal Cyclers) with the following cycling: 3 minutes initial denaturation at 94 °C and 30 cycles of denaturation 94 °C / 1 minutes, annealing 55 °C / 30s and extension 72 °C / 30s, final extension 72 °C / 10minutes.

The PCR product obtained from 16S rRNA gene sequencing, was purified with the Agarose Extraction Kit (Cellco) following the manufacturer's protocol. The primers 27F, 1541R, 926F (5'-AAACTYAAAKGAATTGACGG3'), 530F (5'-TGACTGACTGAGTGCCAGCMGCCGCGG-3'), 519R (5'-GTNTTACNGCGGCKGCTG -3') and 907R (5'-GTNTT ACNGCGGCKGCTG -3') were used for sequencing. For the reaction was used 1.5 µL of water (miliQ®), 1.5 µL of sequencing buffer (5X) (ThermoFisher), 1 µL of primers (1.5 pmol / µL), 1 µL of BigDye

Terminator v3 were used. .1 (ThermoFisher) and 5 μ L of the purification product (70 ng / μ L) with a final volume of 10 μ L. The reaction was performed in a thermal cycler (Veriti™ 96-Well Thermal Cyclers) with 25 cycles: 95 °C for 20 seconds, 50 °C for 15 seconds and 60 °C for 60 seconds. After the reaction, was performed purification with isopropanol and ethanol followed by denaturation with formamide. The reaction of sequencing was performed using Applied Biosystems® ABI 3500 Sequencer.

2.3. Identification based on 16S rRNA gene and sequence grouping

The sequences obtained were analyzed in CodonCode Aligner software (CodonCode Corporation) and compared as for the homology to the GenBank NCBI database using BLASTn, which is designed to identify similar regions in sequences obtained by sequencing based on sequences already obtained (KHANDELWAL *et al.*, 2017).

To perform the grouping of the obtained sequences, a dendrogram was built in the MEGA X software. The distance matrix and the construction method were calculated by the algorithms: Jukes Cantor and Neighbor-Joining with 500 repetitions bootstrap. The sequences were deposited at GeneBank NCBI.

2.4. Survey of methods for identification of environmental bacterial strains

A survey of articles was performed in the main search platforms (PubMed, Scopus and Scielo) with the descriptors: “environmental”, “bacteriology”; “environmental microbiology” “bacterial classification”; “characterization environmental microbiology”. Scientific articles published in the last five years that presented such descriptors were selected to search the applied methodology to identify environmental bacterial strains. Of the 300 articles surveyed, 148 articles were selected for presenting bacterial identification methodologies.

3. Results

3.1. Phenotypic and molecular identification

The results of phenotypic identification based on three different platforms and 16S rRNA gene-based identification of 29 bacterial isolates, obtained from water samples are contained in Table 1, as well as the accession numbers obtained after submission of partial 16S gene sequences to GeneBank NCBI.

Table 1. Identification of isolates based on biochemical tests correlated with different platforms of identification and identification based on 16S rRNA gene.

Strains	N° accession	Identification			
		ANVISA Manual (*)	Online bacterial identification (%)	ABIS online – Bacterial identification (%)	BLASTn – 16S rRNA Sequence (%)
2A	MN116696	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i> (97,94)	<i>Hafnia alvei</i> (90,8)	<i>Klebsiella variicola</i> (99,66)
3A	MN121840	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Escherichia coli</i> (49,94)	No matching!	<i>Phytobacter diazotrophicus</i> (95,39)
4A	-	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (64,46)	<i>Escherichia coli</i> (91,5)	<i>Shigella sonnei</i> (95,65)
6A	MN121117	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (83,66)	<i>Tatumella citrea</i> (91,5)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (99,48)
7A	MN120900	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Citrobacter freundii</i> (99,99)	<i>Salmonella enterica</i> (98,3)	<i>Citrobacter murlinae</i> (98,38)
10A	MN121836	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Pseudomonas mallei</i> (48,1)	No matching!	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (99,16)
13A	MN121832	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (94,98)	<i>Escherichia coli</i> (91,5)	<i>Klebsiella michiganensis</i> (99,76)
14A	MN120898	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> (98,98)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (91,5)	<i>Kluyvera ascorbata</i> (97,95)
2.2A	MN121837	<i>Staphylococcus auricularis</i>	<i>Streptococcus sanguis</i> (20,1)	No matching!	<i>Acinetobacter lactucae</i> (98,89)
2.7A	MN121763	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i> (95,88)	<i>Acinetobacter baumannii</i> (89,2)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (98,06)
2.9A	MN121834	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i> (90,44)	<i>Yersinia ruckeri</i> (81,5)	<i>Staphylococcus hominis</i> (99,57)
2.10A	MN121835	<i>Providencia</i> spp.	No matching!	<i>Escherichia coli</i> (81,2)	<i>Klebsiella michiganensis</i> (97,27)
2.11A	MN164430	<i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>Escherichia coli</i> (80,89)	<i>Serratia grimesii</i> (93,2)	<i>Serratia marcescens</i> (99,07)
2.12A	MN121833	<i>Sphingomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (52,29)	<i>Oligella urethralis</i> (81,9)	<i>Serratia nematodiphila</i> (99,34)
2.13A	MN121841	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Pseudomonas mallei</i> (55,16)	<i>Acinetobacter lwoffii</i> (80,4)	<i>Yokenella regensburgei</i> (98,55)
31S	MN121839	<i>Stomatococcus</i> spp.	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (24,55)	No matching!	<i>Acinetobacter vivianii</i> (99,50)
36S	MN121849	<i>Bacillus</i> spp.	No matching!	<i>Bacillus siamensis</i> (99)	<i>Bacillus paramycooides</i> (98,45)
2.1S	MN121848	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Pseudomonas mallei</i> (39,33)	No matching!	<i>Burkholderia lata</i> (99,43)
2.8S	MN121853	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Escherichia coli</i> (99,97)	No matching!	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> (93,63)
2.11S	MN121854	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i> (67,36)	<i>Escherichia blattae</i> (90,8)	<i>Serratia nematodiphila</i> (99,27)
2.15S	MN122007	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Escherichia coli</i> (99,97)	<i>Escherichia coli</i> (84,6)	<i>Enterobacter asburiae</i> (96,98)
2.19S	MN122008	<i>Corynebacterium propinquum</i>	No matching!	<i>Brevibacterium avium</i> (99)	<i>Yokenella regensburgei</i> (99,08)
2.20S	MN122009	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i> (71,2)	<i>Yokenella regensburgei</i> (89,2)	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> (99,51)
2.22S	MN122068	<i>Klebsiella oxitoca</i>	<i>Escherichia coli</i> (61,91)	No matching!	<i>Pseudomonas entomophila</i> (99,28)
2.23S	MN122071	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Citrobacter freundii</i> (70,64)	<i>Cedecea davisae</i> (91,1)	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> (99,13)
2.29S	MN123232	<i>Staphylococcus capitis</i>	<i>Staphylococcus</i> sp. (86,88)	<i>Staphylococcus pasteurii</i> (85,5)	<i>Staphylococcus hominis</i> (99,57)
2.30S	MN122077	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	<i>Xanthomonas maltophilia</i> (92,41)	<i>Pseudomonas duriflava</i> (81,1)	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (99,44)
2.33S	MN122131	<i>Staphylococcus kloosi</i>	<i>Arthrobacter</i> spp. (91,29)	No matching!	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (96,83)
2.38S	MN122133	<i>Aeromonas</i> spp.	<i>Pseudomonas pseudomallei</i> (97,95)	<i>Vibrio furnissii</i> (97,5)	<i>Chromobacterium alkanivorans</i> (98,27)

* It has no percentage of similarity.

- Not submission

% Percentage of similarity.

Of the 29 strains identified by the ANVISA Manual, 5 (17.24%) presented genres in agreement with Blastn. Only 3 genera (10.34%) identified by the platforms: Online bacterial identification and ABIS online - Bacterial identification were similar to the genera obtained from Blastn. The same answers obtained in the biochemical tests were submitted to the three platforms, so it was expected to find the same genera in the different searches, however we observed that only 4 strains (13.79%) were identified as belonging to the same genus and when analyzed by pairs the following agreement was obtained: ANVISA Manual and Online 6 concordant genres (20.68%), ANVISA Manual and ABIS 7 concordant genres (24.13) and Online and ABIS 5 concordant genres (17.24%). The deficiency of similarity between the phenotypic identifications found in the different platforms decreases the confidence in these results, making it difficult to identify based on this method alone.

3.2. Phenotypic and molecular grouping of isolates

The phenotypic characteristics of the isolates revealed the formation of 10 (C1 to C10) large phenotypic clusters (Fig. 1), being possible to observe the relationship between these strains based on the expressions of their biochemical parameters.

Tree Diagram for 29 Cases
 Single Linkage
 Euclidean distances

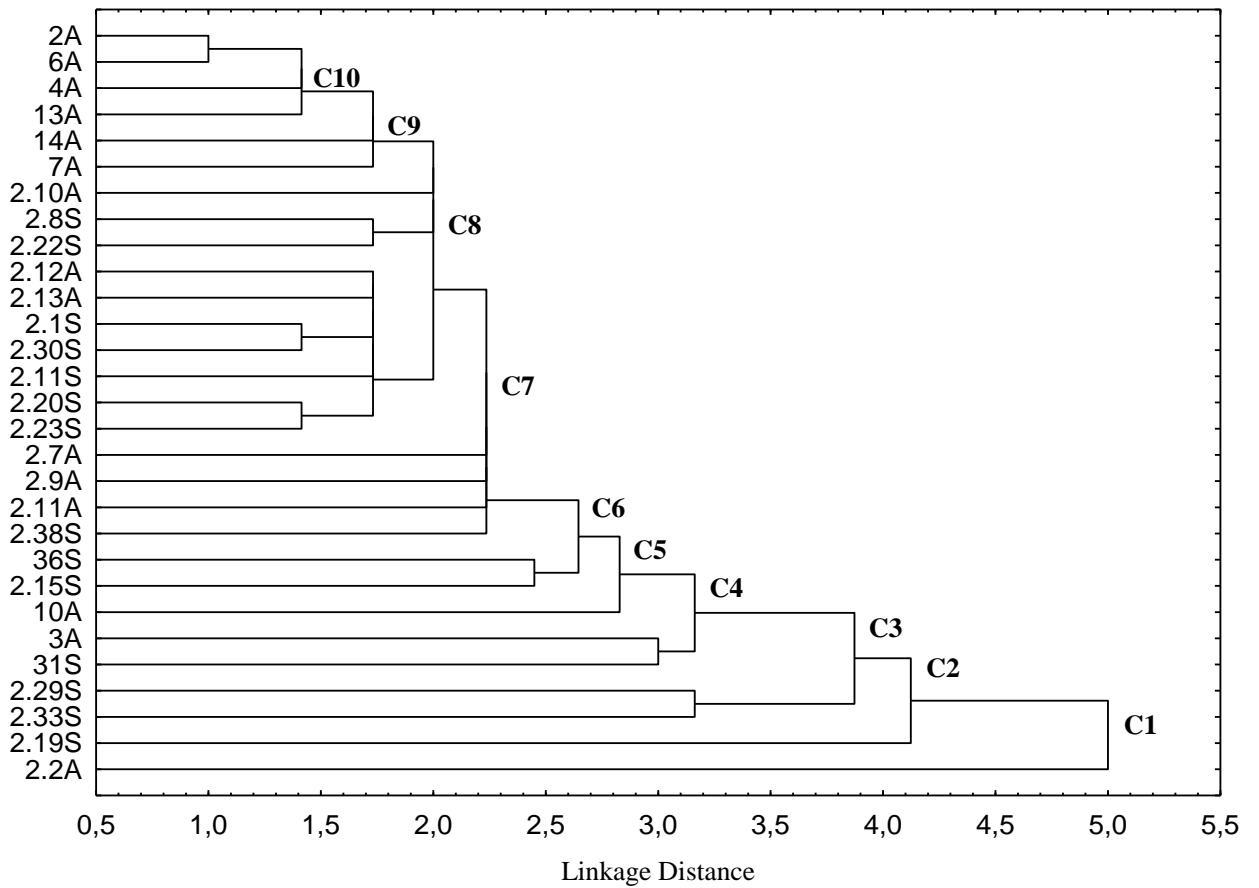


Fig. 1 Phenotypic grouping of 29 bacterial isolates constructed based on the Single Linkage method with Euclidean distances.

The genetic similarity relationship based on 16S rRNA gene sequences among the 29 isolates can be observed in the dendrogram present on Fig. 2.

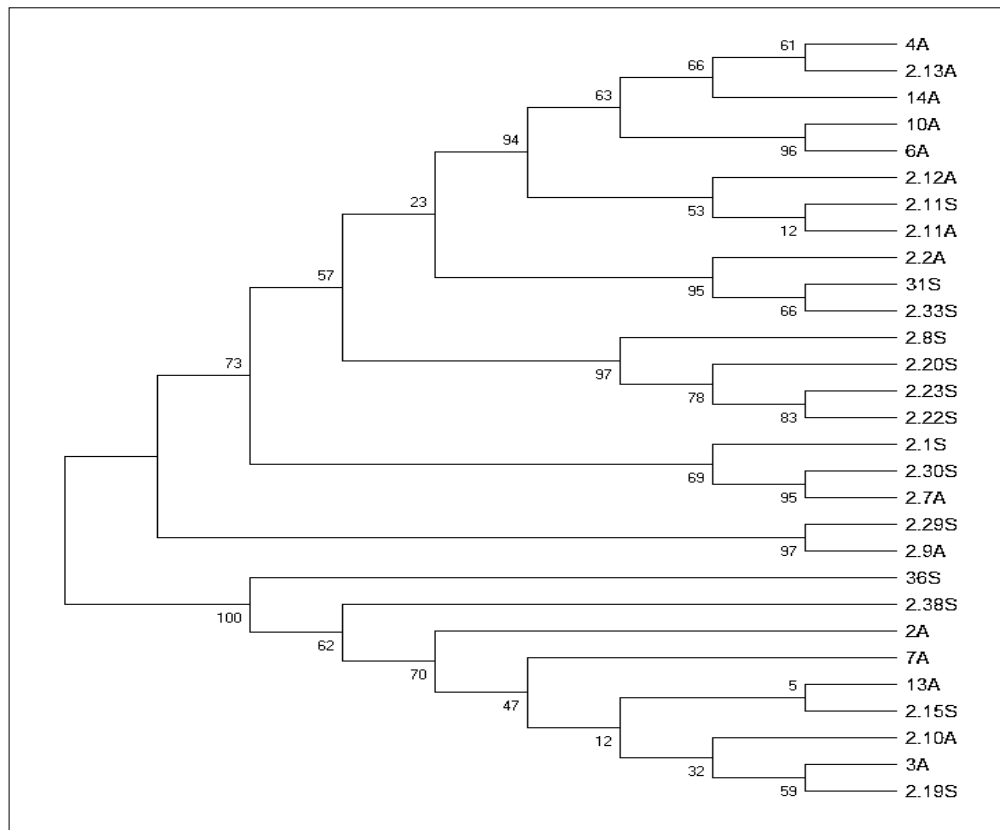


Fig. 2 Dendrogram of the genetic similarity of 29 bacterial isolates based on 16S rRNA gene sequences. Built by the following methods: Jukes Cantor and Neighbor-Joining with 500 reps bootstrap.

The phenotypic similarity relationships among the 29 isolates of this study, were eminently different from those obtained using the 16S rRNA sequences. Only 20.68% (6/29) isolated, have similar relationships in both groups. This reveals the lack of agreement between identification based on biochemical tests with the identification based on genetic sequences.

3.3. Bibliographic survey of bacterial identification methods

Using the descriptors mentioned in the methods, it was possible to survey 148 scientific articles. The Table 2 shows the methodologies used to identify the environmental bacterial strains obtained in each study. Through this analysis it can be observed that 68.92% of the articles selected in this study, used the 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification.

Table 2. Methodologies for identification of environmental bacterial strains described in articles.

Identification Methodologies	Articles number (%) n=148
Physiological profile analysis, high throughput sequencing and qPCR	1 (0,67)
MALDI-TOF MS	1 (0,67)
PCR gene 16S rRNA and MALDI-TOF MS	1 (0,67)
PCR-DGGE	1 (0,67)
PCR-DGGE and 16S rRNA gene sequencing	1 (0,67)
Biochemical tests, 16S rRNA sequencing and MALDI-TOF MS	1 (0,67)
Biochemical testing and complete genome sequencing	1 (0,67)
PCR specific genes	2 (1,35)
16S rRNA gene sequencing and other genes	2 (1,35)
MALDI-TOF MS and 16S rRNA gene sequencing	3 (2,02)
PCR gene 16S rRNA	4 (2,70)
Complete Genome Sequencing	5 (3,38)
Biochemical tests	5 (3,38)
Biochemical tests and PCR 16S rRNA gene	6 (4,05)
Biochemical testing and 16S rRNA gene sequencing	12 (8,10)
16S rRNA gene sequencing	102 (68,92)

In this search, biochemical tests coupled with 16S rRNA gene sequencing is the second method (8.10%) most used form to identify environmental specimens. Other methods such as MALDI-TOF MS, PCR-DGGE and PCR were also used, however in smaller proportions.

4. Discussion

When applying the results of biochemical tests of 29 bacterial isolates to different identification platforms, it was possible to observe a significant variation among the generated responses. Such variation can be explained by the presence of restrictions in the databases consulted leading to variability and misinterpretation of the results, besides that high complexity added to the diversity of environmental microorganisms results in great challenges in the identification of bacteria by conventional phenotypic techniques (VITHANAGE *et al.*, 2014; SANTOS; HILDENBRAND; SCHUG, 2016).

Phenotypic features are defined as those generated by the expression of genes of an organism that are observable and that can be largely modulated by environmental conditions (MOORE *et al.*, 2010). Thus, the environment in which the bacteria are inserted may lead to change such characteristics, thus making it difficult to identify only by

phenotypic methods. Phenotypic study based on colony characteristics, growth forms, cell morphology as well as biochemical characteristics remains important, especially for taxonomic descriptions, however these investigations should be coupled with more accurate and assertive identification methods such as genomic analyzes (ROSSELLÓ-MÓRA; AMANN, 2015).

VITHANAGE et al. (2014) compared five commercial identification systems (API 20NE/API 20E, API 50CH, Microbact 24E, Biolog GEN III, MALDI-TOF MS) with 16S rRNA gene sequencing of bacterial isolates obtained from raw milk and observed that genetic sequencing was the most reliable and robust to identify such bacteria. According to the authors, the commercial systems used are widely used in clinical microorganisms, but little applicable in the identification of environmental microorganisms due to the limited database available.

Sequences of the 16S rRNA gene in addition to being used to identify bacterial species are also used as a reference method for comparing identification systems. In this work, identification based on 16S rRNA gene was performed in order to confirm the identification obtained by biochemical tests (WICKHORST *et al.*, 2016). Analysis of such a gene remains a valid and non-subjective measure of bacterial identification as compared to phenotypic identification methodologies. Even one of the most widely used and respected manuals by microbiologists for bacterial identification, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, use 16S rRNA gene sequences for phylogenetic characterization of Bacteria and Archeas (SRINIVASAN *et al.*, 2015).

In order to minimize the difficulties encountered in phenotypic identification of environmental strains, molecular identification has been increasingly used through analysis for PCR and sequencing of specific genes. The 16S rRNA gene is considered useful for the identification of bacteria with unusual phenotypic profiles, rare bacteria, slow growing or uncultivated bacteria. A significant portion of the environmental bacteria have such characteristics, and therefore are not identifiable only by traditional phenotypic methods, making it necessary to use more robust methods such as those using the 16S rRNA gene (LAU; TENG; WOO, 2018).

In view of this, in order to provide improvements in the identification of environmental bacterial strains, it is advisable to use phenotypic identification techniques associated with genotypic and molecular methods in an attempt to increase the efficiency of bacterial identification (KIM et al., 2008). In this sense, WICKHORST et al., (2016) carried out the identification of *Arcanobacterium pluranimalium* bacteria isolated from

milk samples using phenotypic methods, MALDI-TOF MS and sequencing of various genotypic targets, including the 16S rRNA gene and observed that the concomitant use of these methods allowed a safe identification of the bacterial isolate.

In view of this, to provide improvements in the identification of environmental bacterial strains, it is advisable to use phenotypic identification techniques associated with genotypic and molecular methods in an attempt to increase the efficiency in bacterial identification (KIM et al., 2008).

Although methodologies using 16S rRNA are well known and recognized, there are still limitations of the techniques for certain bacterial groups, as those not yet identified and that do not have sequences deposited in databases. In such situations, the use of additional phenotypic or genotypic testing may be necessary for more accurate identification. In this scenario, stands out the identification through in Matrix-assisted laser desorption–ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).

Proteomic analysis by MALDI-TOF is considered an intermediate method between the phenotypic-genotypic dichotomy, since the proteins analyzed reflect gene products and metabolic functions (SINGHAL et al., 2015). Bacterial identification by MALDI-TOF reduces the chances of human error resulting from interpretation or judgment to determine results based on phenotypic characteristics determined by biochemical testing and microscopy (CHENG et al., 2016).

Despite being a high efficiency technique, the good result by MALDI-TOF identification is dependent on a database composed by spectra of mass spectrometry spectra. The better the quality of the available database, the more accurate the results will be of bacterial identification. These known mass spectrometry spectra are used for comparison with mass spectra obtained from samples to be identified. Some studies have reported that it was not possible to identify specimens based on MALDI-TOF MS, which is justified by the absence of this organism in the equipment database. In addition, most MALDI-TOF databases are restricted to private researchers because of the high costs of developing these databases (CARBONNELLE et al., 2012).

5. Conclusion

Bacterial identification by conventional biochemical tests is still widely used; however, this method addresses the identification of bacteria of clinical origin, and it is not

widely applicable to identify strains found in other environments or that have variable phenotypic characteristics, besides not being responsive to uncultivable bacteria. Identification methods based solely on biochemical characteristics are generally not sufficient for identification of microorganisms isolated from environmental samples, due to the high diversity of specimens in these environments resulting in insufficient databases. For this reason other methods, genotypic and phenotypic, should be employed to advance the identification of environmental bacteria.

References

ANVISA, A. N. DE V. S.-. Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa**, v. 6, p. 1–154, 2013.

BROOKER, D. C.; LUND, M. E.; BLAZEVIC, D. J. Rapid Test for Lysine Decarboxylase Activity in Enterobacteriaceae Downloaded from. **Applied Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 622–623, 1973.

CARBONNELLE, E. et al. Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification. **Journal of Microbiological Methods**, v. 89, n. 2, p. 133–136, 2012.

CHENG, K. et al. Recent development of mass spectrometry and proteomics applications in identification and typing of bacteria. **Proteomics - Clinical Applications**, v. 10, n. 4, p. 346–357, 2016.

CHESTER, B.; MOSKOWITZ, L. B. Rapid catalase supplemental test for identification of members of the family Enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 439–441, 1987.

HUGH, R. AND L. E. THE TAXONOMIC SIGNIFICANCE OF FERMENTATIVE VERSUS OXIDATIVE METABOLISM OF CARBOHYDRATES BY VARIOUS GRAM NEGATIVE BACTERIA. **Journal of Bacteriology**, v. 66, n. 1, p. 24–26, 1953.

IBAL, J. C. et al. Information about variations in multiple copies of bacterial 16S rRNA genes may aid in species identification. **PLoS ONE**, v. 14, n. 2, p. 1–15, 2019.

KHANDELWAL, M. et al. Function development for appraising brittleness of intact rocks using genetic programming and non-linear multiple regression models. **Engineering with Computers**, v. 33, n. 1, p. 13–21, 2017.

KIM, M. et al. Comparison of the MicroScan, VITEK 2, and Crystal GP with 16S rRNA sequencing and MicroSeq 500 v2.0 analysis for coagulase-negative Staphylococci. **BMC Microbiology**, v. 8, p. 1–7, 2008.

LAU, S. K. P.; TENG, J. L. L.; WOO, P. C. Y. Bacterial Identification Based on Universal Gene Amplification and Sequencing. In: **Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology**. Cham: Springer International Publishing, p. 1–29, 2018.

MOORE, E. R. B. et al. Microbial systematics and taxonomy: relevance for a microbial commons. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 6, p. 430–438, jul. 2010.

PANDEY, A. et al. 16S rRNA gene sequencing and MALDI-TOF mass spectrometry based comparative assessment and bioprospection of psychrotolerant bacteria isolated from high altitudes under mountain ecosystem. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 3, p. 1–12, 2019.

RAVEN, K. E. et al. Methodology for whole genome sequencing of MRSA in a routine hospital microbiology laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, n. March, p. 1–23, 2019.

ROSSELLÓ-MÓRA, R.; AMANN, R. Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 209–216, 2015.

SANTOS, I. C.; HILDENBRAND, Z. L.; SCHUG, K. A. Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. **Analyst**, v. 141, n. 10, p. 2827–2837, 2016.

SIMMONS, J. S. A CULTURE MEDIUM FOR DIFFERENTIATING ORGANISMS OF

TYPHOID-COLON AEROGENES GROUPS AND FOR ISOLATION OF CERTAIN FUNGI. **Oxford Journals**, v. 3, p. 209–214, 1926.

SINCLAIR, L. et al. Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons: Evaluating the illumina platform. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–18, 2015.

SINGHAL, N. et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in microbiology**, v. 6, n. August, p. 791, 2015.

VAN SOOLINGEN, D. et al. DNA Fingerprinting of mycobacterium tuberculosis. In: [s.l.: s.n.]. p. 196–205, 1994.

SRINIVASAN, R. et al. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0117617, 2015.

TAKHAMPUNYA, R. et al. Metagenomic Approach to Characterizing Disease Epidemiology in a Disease-Endemic Environment in Northern Thailand. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. February, p. 1–21, 2019.

TILLMAN, G. E. et al. Isolation of Shiga Toxin–Producing Escherichia coli Serogroups O26, O45, O103, O111, O121, and O145 from Ground Beef Using Modified Rainbow Agar and Post–Immunomagnetic Separation Acid Treatment. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 9, p. 1548–1554, set. 2012.

TIMPERIO, A. M. et al. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and MALDI BioTyper in comparison to 16S rDNA sequencing for the identification of bacteria isolated from Arctic sea water. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, p. 1–15, 2017.

VITHANAGE, N. R. et al. Comparison of identification systems for psychrotrophic bacteria isolated from raw bovine milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 189, p. 26–38, out. 2014.

WICKHORST, J. P. et al. Phenotypic and genotypic approach to characterize

Arcanobacterium pluranimalium isolated from bovine milk samples. **Folia Microbiologica**, v. 61, n. 5, p. 405–412, 2016.

WOESE, C. R.; FOX, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms (archaebacteria/eubacteria/urkaryote/16S ribosomal RNA/molecular phylogeny). **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 74, n. 11, p. 5088–5090, 1977.

WOESE, C. R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 12, p. 4576–9, 1990.

YANG, B.; WANG, Y.; QIAN, P. Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2016.

Capítulo 4

Artigo 4: Differentiation of environmental bacteria using hyperspectral imaging technology and multivariate analysis

(Diferenciação de bactérias ambientais usando tecnologia de imagem hiperespectral e análise multivariada)

Differentiation of environmental bacteria using hyperspectral imaging technology and multivariate analysis

Aline Rodrigues Gama^a, Venine Prado Saêta^a, Raylane Pereira Gomes^a, José Daniel Gonçalves Vieira^a, Luiz Artur Mendes Bataus^a, Arlindo Rodrigues Galvão Filho^b, Clarimar José Coelho^b, Lilian Carla Carneiro^a.

^a*Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, 235 street, Goiânia, GO, Brazil.*

^b*School of exact sciences and computing, Pontifical Catholic University of Goiás, avenue Universitária, Goiânia, GO, Brazil.*

Abstract

Efficiency in the identification of bacterial isolates is of paramount importance in clinical microbiology for the correct diagnosis of infections and their subsequent treatment and is also highly required in environmental microbiology, for the identification of new isolates and the knowledge of the biodiversity of an environment. This raises the need for the development of identification methodologies, which make this practice accessible, safe and at lower costs, with the emergence, in this sense, of the use of hyperspectral imaging technologies (HSI). In this study, we investigated the potential of HSI in differentiating different bacterial genera. For this, 28 bacterial isolates, obtained from water samples, were previously sequenced and identified based on the 16S rRNA gene and then grown in Petri dishes containing culture medium. The HSI of each isolate was acquired using an infrared Short Wave Infra Red (SWIR) at the SisuCHEMA workstation. Principal component analyzes showed a clear differentiation between genera and bacterial species. To transform these differentiation assays into an applicable identification methodology, it is necessary to build robust databases capable of covering the wide range of bacterial diversity. The primary results demonstrate that HSI is an objective tool and widely capable of promoting improvements in the identification of bacteria.

Keywords: Microbiology; SisuCHEMA; SWIR; biotechnology.

Introduction

Infectious diseases are the major causes of death reported worldwide, for this reason; the development of rapid and accurate diagnostic methods is an urgent need (NOIPHUNG; LAIWATTANAPAISAL, 2019). The initial step for the execution of a definitive and correct antimicrobial chemotherapy is the microbiological diagnosis that

determines the pathogen involved in the infection as well as the resistance profile observed in it (ÖZENCI; ROSSOLINI, 2019; SRINIVASAN et al., 2015).

In addition to the unquestionable relevance of identifying clinical isolates, the identification of bacteria of environmental origin is equally important, since it makes it possible to define new isolates, detect contaminants, analyze the quality of different environments and even knowledge of bacterial biodiversity in different niches; enabling the expansion of bioprospecting studies and consequent biotechnological applications (PANDEY et al., 2019).

The methods currently used for bacterial identification, are based on culture and although they are recognized as the gold standard, they have important deficiencies, such as the high demand for execution time and laborious work, therefore not being suitable for the detection of the pathogen in time skillful (FENG et al., 2018). In addition, manual screening for bacterial identification is susceptible to human errors, since genetically similar microorganisms can present important phenotypic differences (TILLMAN et al., 2012). The long incubation time required for bacterial culture prevents rapid and appropriate therapeutic decision making, thus contributing to the spread of infectious diseases, in addition to encouraging the misuse of antibiotics, culminating in the development of resistance (NOIPHUNG; LAIWATTANAPAISAL, 2019).

Recent advances in DNA sequencing technologies allow the use of genomic sequences for the accurate classification and identification of members of *Bacteria* and *Archaea* (YOON et al., 2017). The main molecular marker for bacterial classification / identification is the 16S rRNA gene, a 1500 base pair gene that encodes the DNA that transcribes the catalytic RNA, which is part of the ribosomal 30S subunit. It is clear that the use of the 16S rRNA sequence is a highly acceptable medium for bacterial identification. However, these molecular methods still have high costs and are only carried out using their own equipment (SRINIVASAN et al., 2015).

In view of this reality, the hyperspectral image (Hyperspectral Imaging - HSI), has been used as a new approach for the detection and identification of microorganisms present in different environments. The possibility of using HSI in the detection of genera and microbial species occurs through spectral and spatial assays, from a combination of spectroscopy and conventional images, based on the observed biochemical standards. This same tool has been used successfully in the analysis of the microbiological quality of raw materials and products in the agricultural, food and pharmaceutical industry (GOWEN et al., 2015; YOON; LAWRENCE; PARK, 2015; SANDASI et al., 2014).

The images obtained using a camera for the acquisition of HSI, are collected according to the wavelength, resulting in a hypercube composed of a pile of formed images. At any wavelength the image is formed by several pixels and each pixel represents a spectrum containing specific chemical information. From the analysis of wavelengths, chemical differences between samples can be observed. To reduce the high dimensionality of the generated data and display differences in composition in an image, multivariate analysis tools such as Principal Component Analysis (PCA) are used (SANDASI et al., 2014).

The objective of this study was to investigate the potential of HSI generated in short infrared waves (Short Wave Infrared - SWIR), in the differentiation of various bacterial species.

Materials and Methods

Bacterial samples

The Table 1 shows the 28 bacterial isolates obtained in drinking water, which were classified according to their biochemical characteristics, based on their generated HSI. These isolates were previously identified by sequencing the coding region for the 16S rRNA subunit gene and the sequences were deposited in the GeneBank NCBI.

Table 1. Bacterial strains used in HSI analysis.

Strains	Access Number.
<i>Klebsiella variicola</i>	MN116696
<i>Phytobacter diazotrophicus</i>	MN121840
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MN121117
<i>Citrobacter murlinae</i>	MN120900
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MN121836
<i>Klebsiella michiganensis</i>	MN121832
<i>Kluyvera ascorbata</i>	MN120898
<i>Acinetobacter lactucae</i>	MN121837
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	MN121763
<i>Staphylococcus hominis</i>	MN121834
<i>Klebsiella michiganensis</i>	MN121835
<i>Serratia marcescens</i>	MN164430

<i>Serratia nematodiphila</i>	MN121833
<i>Yokenella regensburgei</i>	MN121841
<i>Acinetobacter vivianii</i>	MN121839
<i>Bacillus paramycoides</i>	MN121849
<i>Burkholderia lata</i>	MN121848
<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	MN121853
<i>Serratia nematodiphila</i>	MN121854
<i>Enterobacter asburiae</i>	MN122007
<i>Yokenella regensburgei</i>	MN122008
<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	MN122009
<i>Pseudomonas entomophila</i>	MN122068
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	MN122071
<i>Staphylococcus hominis</i>	MN123232
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	MN122077
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	MN122131
<i>Chromobacterium alkanivorans</i>	MN122133

Sample preparation

After culturing for 24 hours on Nutrient Agar, all bacterial strains were resuspended in sterile saline (0.85% NaCl), standardized with turbidity compatible with the Mac Farland 0.5 scale (1×10^8 CFU / mL). A swab was moistened in this bacterial suspension and it was sown on a Nutrient Agar plate by scanning technique. Two plates are being prepared for each bacterial strain described here. All the bacterial plaques were incubated in a bacteriological incubator for 24 hours at 30 °C, and after that the images of the plates containing the cultures were acquired in their own equipment.

Image acquisition and spectral extraction

HSI were obtained using a sisuCHEMA workstation (Specim, Spectral Imaging Ltd., Oulu, Finland) (Figure 1), using a camera capable of capturing short wave infrared images (Short Wave Infra Red - SWIR). In addition to the images obtained in SWIR, the sisuCHEMA platform is also capable of capturing high resolution images, which together provide detailed information about the chemical components of the sample under study.

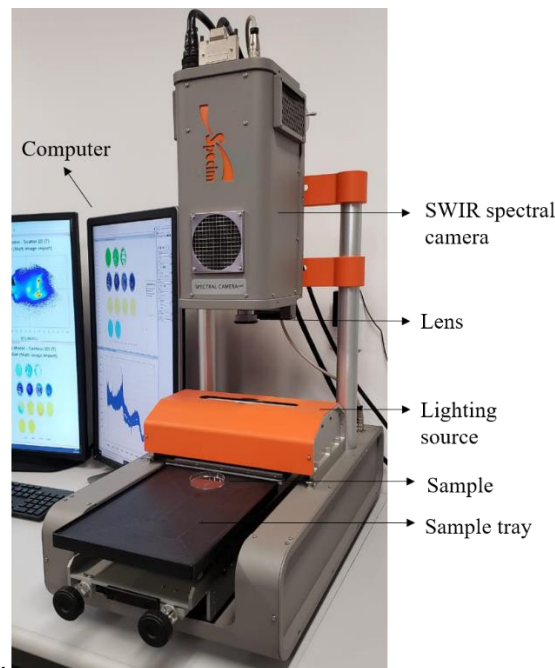


Figure 1. SisuCHEMA workstation for acquiring SWIR images. Source: Own authors.

SWIR image analysis

The principal component analysis (Principal Component Analysis - PCA) was applied with a centralized average over the entire image. The PCA is able to reduce the high dimensionality of data, decomposing interrelated variables into a new set of coordinates (PCs). In this study, wavelengths < 1004 nm, at the beginning of the spectrum and > 2263 nm, at end of the spectrum, did not contain differentiating chemical information and were excluded from the data set, resulting in a better classification of pixels. Images with 256×320 pixels were obtained. The resulting images were evaluated for differences and chemical similarities in order to differentiate bacterial samples.

The raw images were automatically corrected using the multivariate analysis software Evince 2.32.0. To remove background pixels and border effects, interactive scoring image and scatter density graphics were used. Different mathematical pretreatment methods (standard normal variate (SNV), multiplicative scatter correction (MSC) and derivatives) that minimized the variability not related to the chemical composition of the samples were investigated for spectral pre-processing (SANDASI et al., 2014). The method

that best performed the separation with relevant image differences in the score graph was chosen.

The resulting image was evaluated for biochemical variations, in order to differentiate bacterial isolates. For not having a sufficient number of isolates, the strains: *Phytobacter diazotrophicus*, *Citrobacter murlinae*, *Kluyvera ascorbata*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Staphylococcus hominis*, *Yokenella regensburgei*, *Bacillus paramycoides*, *Burkholderia lata*, *Enterobacter asburiae*, *Yokenella regensburgei*, *Staphylococcus hominis*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Chromobacterium alkanivorans*, were not used for the classification analysis, since this analysis was based on the comparison of similarities between the isolates. However, these strains were important for establishing the differences between the set of isolates. The data analysis process is shown in Figure 2.

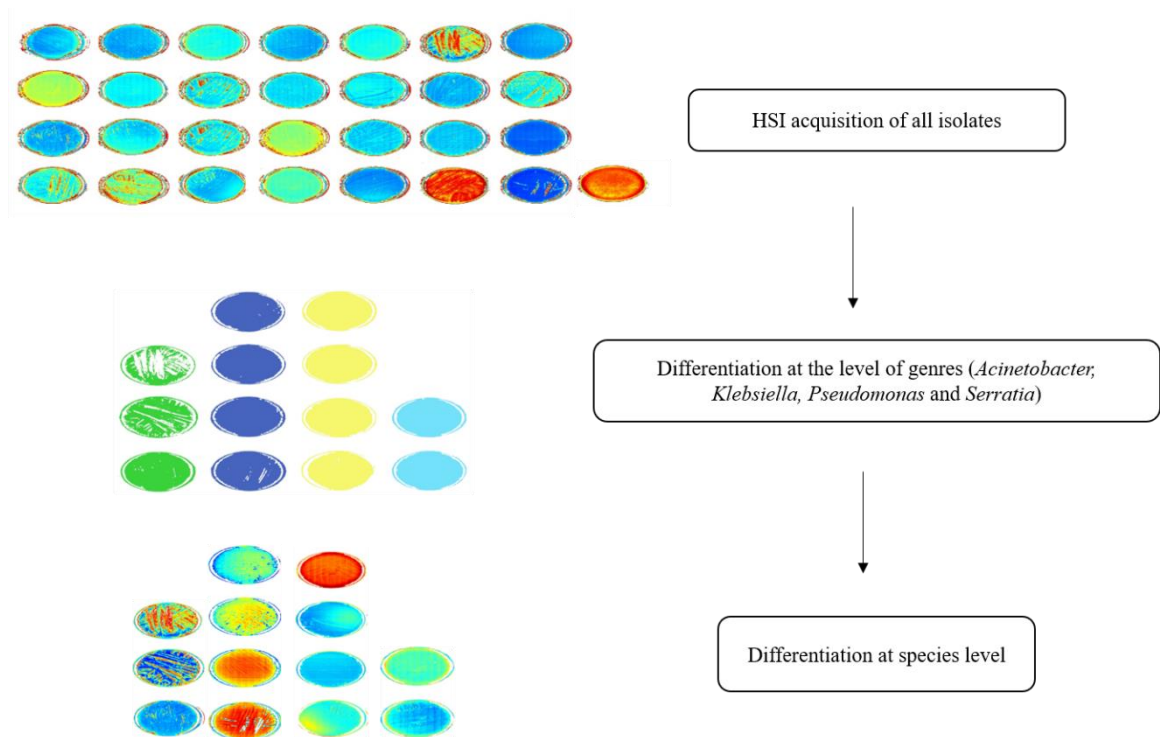


Figure 2. Schematic representation of the manual data analysis process.

Construction of phylogenetic tree

The phylogenetic tree for evaluating the evolutionary proximity relationship between species of the genus *Acinetobacter*, was built using the software MEGA X 10.1.

The distance matrix and the construction method were calculated by the algorithms: Jukes Cantor and Neighbor-Joining, with a 500 repetition bootstrap.

Results and discussion

The visual description of clusters referring to the 28 bacterial isolates, using graphs of PCA points, from individual pixels, is shown in Figure 3. It is possible to observe distinct groupings that may be related to the different genera and species analyzed.

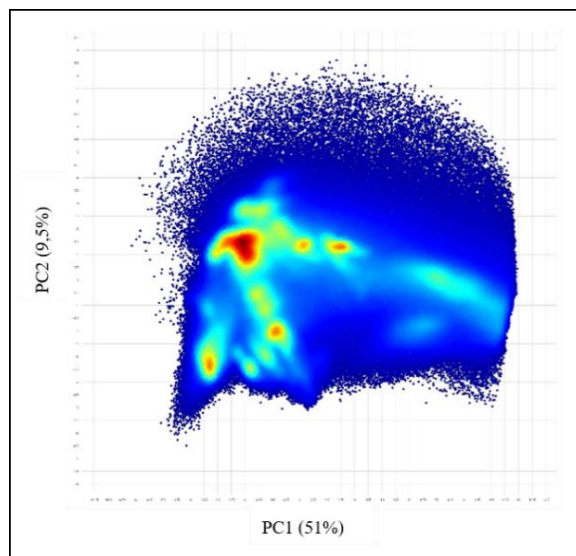


Figure 3. PC1 and PC2 scoring chart for grouping all isolates.

Acinetobacter spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp. and *Serratia* spp. were randomly selected for the classification analysis at the gender level (Figure 4). The PCA analysis of the images of the bacterial strains showed a clear separation between them. There is, however, an overlap of *Acinetobacter* spp., Possibly not caused by the similarity between the biochemical characteristics, but by the “grooves” observed in the third plate produced during the sowing of this bacterium, leaving this area with a lower reflectance index.

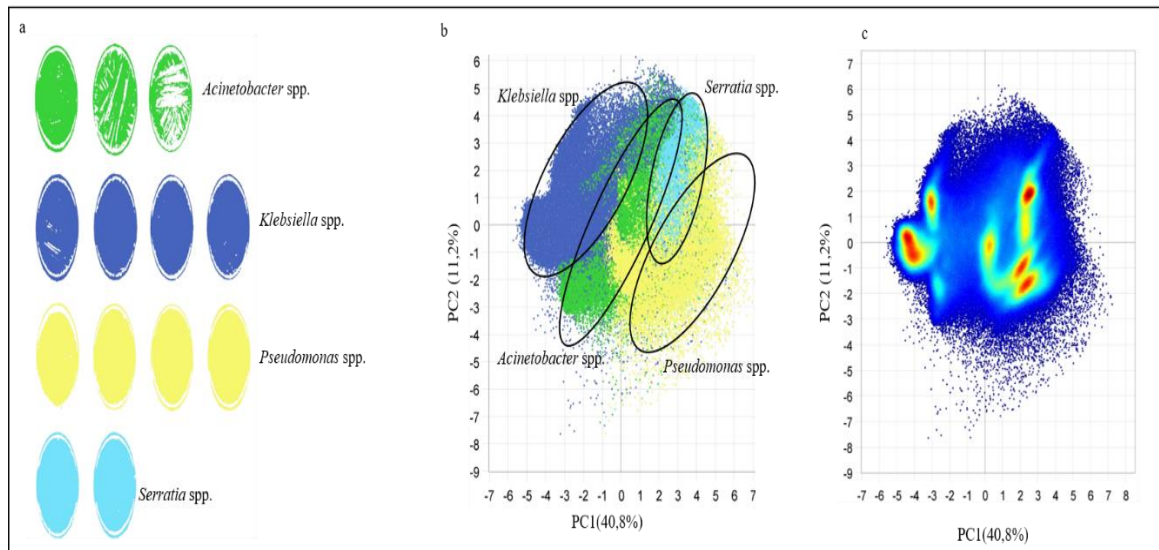


Figure 4. (a) Scoring graph of *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp. and *Serratia* spp. showing the distinction of the four genera based on colors. (b) Corresponding score graph (PC1 x PC2) shows groups of distinct colored pixels according to the color scale in (a). (c) Pixel wise PCA illustrating separation between isolates.

After evident differentiation between the aforementioned genera, an analysis was carried out to verify the separation between the species belonging to each genus. Figure 5 shows the analysis performed for *Acinetobacter* spp. The analysis of the images of the three species of *Acinetobacter* showed the separation of *A. lactucae* in relation to *A. calcoaceticus* and *A. vivianii* (Figure 5 B; C).

However, the overlap between *A. calcoaceticus* and *A. vivianii* is noticeable and to justify this fact, a phylogenetic tree was built based on the sequences of the 16S rRNA gene and thus to verify the evolutionary proximity relationship between species (Figure 5D). Through this phylogeny it was possible to observe that the species *A. calcoaceticus* and *A. vivianii* superimposed on the PCA graph, are separated in the same clade showing a higher degree of kinship and consequently more shared characteristics.

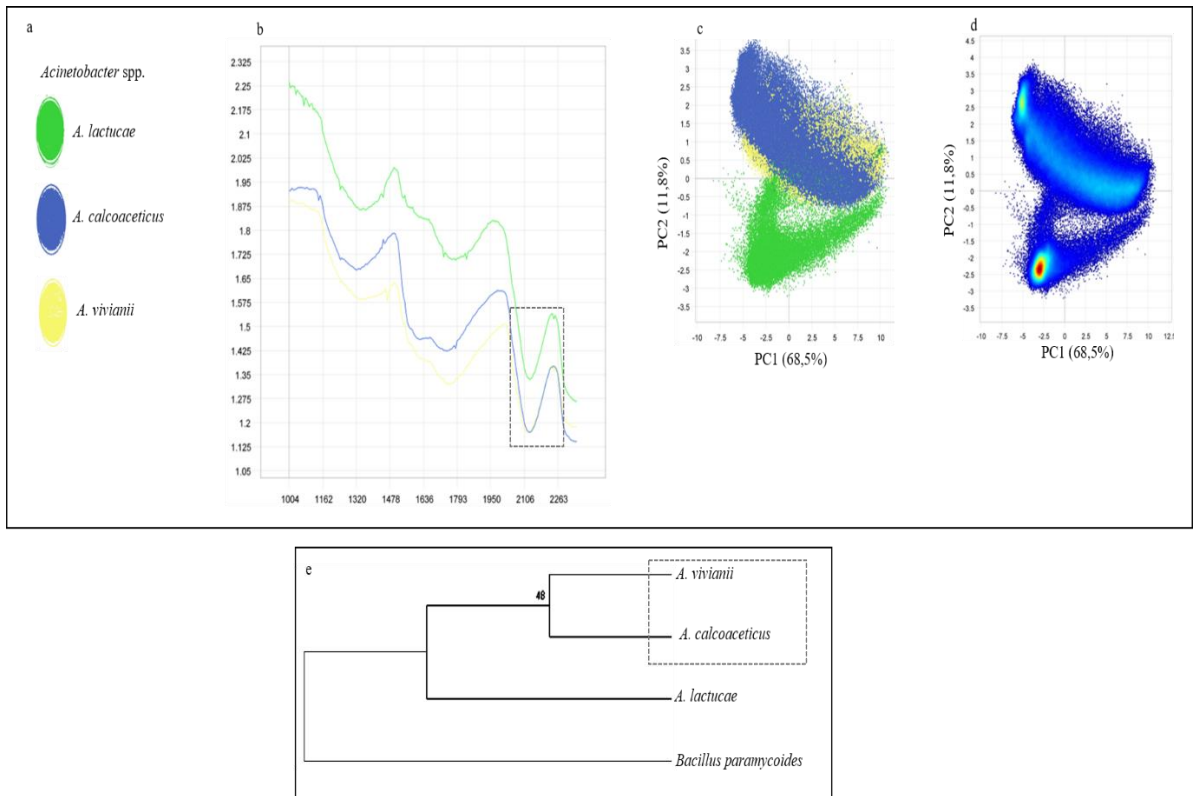


Figure 5. (a) Punctuation chart of three species of the genus *Acinetobacter* showing the distinction by colors. (b) Spectra for the images of the species of *Acinetobacter* showing overlapping regions. (c) Corresponding scoring graph showing the separation and overlap of clusters. (d) Pixel wise PCA illustrating separation between isolates. (e) Phylogenetic tree showing the clade formed by *A. vivianii* and *A. calcoaceticus*.

Based on the spectra and cluters formed from the PCA of *Klebsiella* spp. (Figure 6) it can be seen that the two isolates of *K. pneumoniae* and *K. variicola* are in a high degree of overlap while *K. michiganensis* forms a visibly separate cluster.

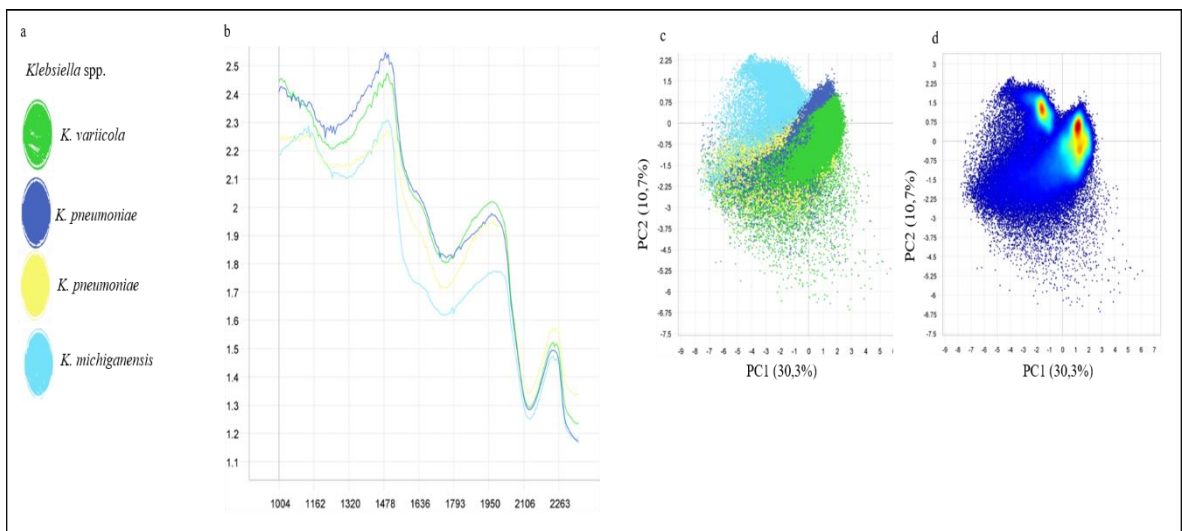


Figure 6. (a) Scoring graph of four species of the genus *Klebsiella*, showing the distinction by color. (b) Spectra for the images of the species of *Klebsiella*. (c) Corresponding scoring

graph showing the separation and overlap of clusters. (d) Pixel wise PCA illustrating separation between isolates.

K. variicola and *K. pneumoniae* have overlapping biochemical and phenotypic characteristics, considering that they belong to the same complex called the *pneumoniae* complex. *K. variicola* until 2004, was identified as *K. pneumoniae* and after numerous biochemical and genetic tests, *K. variicola* was proposed as a new bacterial species. As the bacterial differentiation from HSI is based on biochemical characteristics, it was not possible to establish significant differences that pointed out *K. variicola* as an organism distinct from *K. pneumoniae*, given these data, it is suggested that the correct differentiation of bacteria from *pneumoniae* complex, should be performed by associating HSI with different molecular, genomic and proteomic tools (RODRÍGUEZ-MEDINA et al., 2019; ROSENBLUETH et al., 2004).

The HSI images of *Pseudomonas* spp., were analyzed, and the results are shown in Figure 7, where the differentiation of *P. plecoglossicida*, present in a separate cluster, can be observed in relation to *P. entomophila* and *P. taiwanensis* presented in overlap.

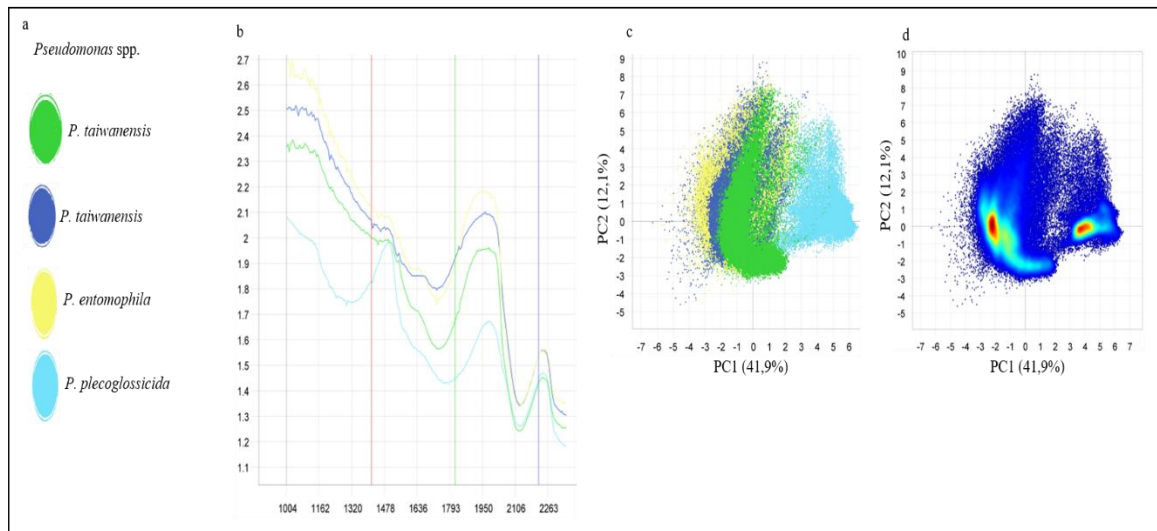


Figure 7. (a) Scoring graph of four species of the genus *Pseudomonas* showing the distinction by color. (b) Spectra for the images of the species of *Pseudomonas*. (c) Corresponding scoring graph showing the separation and overlap of clusters. (d) Pixel wise PCA illustrating separation between isolates.

When investigating the characteristics of *P. entomophila* and *P. taiwanensis* to understand the overlap between them, and consequent biochemical similarity, it was found that both *P. entomophila* and *P. taiwanensis* have a high degree of pathogenicity to flies of the genus *Drosophila*.

The insecticidal activity manifested by such bacteria is due to the expression of a gene known as the insecticidal toxin gene (*tccC*). The DNA sequence of the *tccC* gene encodes 980 amino acids and the alignment of the sequence of these amino acids from *P. taiwanensis* showed a high degree of identity with the insecticidal toxin from *P. entomophila*. The expression of this conclusively similar insecticide toxin between species may have contributed to the spectral similarity between *P. entomophila* and *P. taiwanensis* (CHEN et al., 2014; LIU et al., 2010).

Two species of the genus *Serratia* were evaluated (Figure 8), and based on the generated spectra, as well as on the separation of the clusters, a noticeable differentiation between the species *S. marcescens* and *S. nematodiphila* is revealed. *S. nematodiphila* was described in 2009 as a new species, because despite having great similarity with species of the genus *Serratia*, it exhibits its own phenotypic, biochemical and molecular characteristics, not evidenced in other species, such as the ability to emit fluorescence and establish an association symbiotic with nematodes (ZANG et al., 2009).

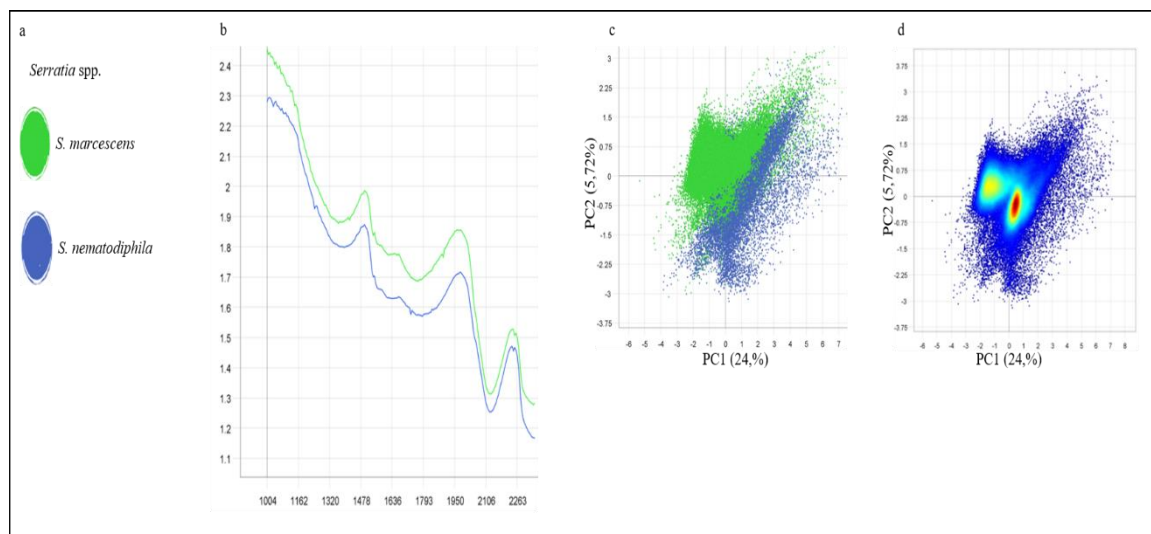


Figure 8. (a) Graph of scoring of two species of the genus *Serratia* showing the distinction by color. (b) Spectra for the images of the species of *Serratia* (c) Graph of corresponding score showing the separation and overlap of clusters. (d) Pixel wise PCA illustrating separation between isolates.

The classification results obtained from the samples, demonstrated high levels of precision in differentiation. In addition, it was possible to perceive that the hyperspectral analyzes performed, showed sensitivity to the general structure and the biochemical composition of the bacterial cells, being, therefore, possible to observe differences between bacteria with similar genotypes (LASCH et al., 2018).

Different studies have been carried out with the proposal to differentiate and identify microbial isolates in different environments using HSI. Park et al. (2017), performed the classification of five different *Salmonella* serotypes, obtaining an average accuracy of 84%, in this work the authors reinforce the importance of building spectral libraries with varied bacterial species to assist in the detection of pathogens in the food industry for birds.

Seo et al. (2016), developed classification models for five species of *Staphylococcus*, using hyperspectral microscopic imaging, and highlighted the use of HSI in the presumptive screening of foodborne pathogenic bacteria. Foca et al. (2016), evaluated by spectral and hyperspectral techniques the bacterial contamination by *Lactobacillus curvatus* and *L. sakei* in ham and observed that the techniques used can be effective for recognizing bacterial contamination and still recognize species to which the bacteria belong.

Even in the face of considerable applications, HSI microbial differentiation and identification presents important challenges such as: efficient standardization of culture conditions and sample preparation. Cultivation conditions that include growth time, type of culture medium, temperature, oxygen availability can have a strong impact on the manifested phenotypic characteristics and, therefore, on the spectra obtained.

Another factor seen as a difficulty with the HSI classification method is that it is an approach based on identification libraries and therefore requires validated spectral databases, covering a wide range of bacterial taxonomies. However, such bases are not yet available, which constitutes the biggest challenge in transferring this technology to laboratory practice. However, with the improvement of this method, we hope to obtain solutions to these problems and make possible the application of HSI in environmental, clinical and food microbiology (LASCH et al., 2018).

Conclusion

In the present study, HSI was used to differentiate bacteria isolated from water. The proposed method was effective, as it involved the culture of bacterial isolates followed by the pre-processing of the images at the SisuCHEMA station and subsequent application of multivariate analyzes to differentiate the HSI obtained.

The experiences acquired in this study suggest that the HSI analysis can enable the efficient differentiation of different bacterial species, however, in order to be able to

identify bacteria based on this technology, it is necessary to standardize the cultures, and especially the construction of a database that are able to cover the wide existing bacterial variety. But supported by the level of differentiation achieved so far, we are confident that this study will initiate new research that may make it possible to conduct this technology in different areas of microbiology.

Acknowledgment

We are grateful to the Scientific Computing Laboratory Pontifical Catholic University of Goiás, for carrying out the acquisition of hyperspectral images, as well as for enabling the entire analysis process. We would also like to thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for providing a scholarship.

References

- CHEN, W.-J. et al. Characterization of an Insecticidal Toxin and Pathogenicity of *Pseudomonas taiwanensis* against Insects. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 8, p. e1004288, 21 ago. 2014.
- FENG, Y. Z. et al. Invasive weed optimization for optimizing one-agar-for-all classification of bacterial colonies based on hyperspectral imaging. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 269, p. 264–270, 2018.
- FOCA, G. et al. The potential of spectral and hyperspectral-imaging techniques for bacterial detection in food: A case study on lactic acid bacteria. **Talanta**, v. 153, p. 111–119, 2016.
- GOWEN, A. A. et al. Recent applications of hyperspectral imaging in microbiology. **Talanta**, v. 137, p. 43–54, maio 2015.
- LASCH, P. et al. FT-IR Hyperspectral Imaging and Artificial Neural Network Analysis for Identification of Pathogenic Bacteria. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 15, p. 8896–8904, 2018.
- LIU, J.-R. et al. Molecular Cloning and Characterization of an Insecticidal Toxin from *Pseudomonas taiwanensis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 23, p. 12343–12349, 8 dez. 2010.
- NOIPHUNG, J.; LAIWATTANAPAISAL, W. Multifunctional Paper-Based Analytical Device for In Situ Cultivation and Screening of *Escherichia coli* Infections. **Scientific**

Reports, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.

ÖZENCI, V.; ROSSOLINI, G. M. Rapid microbial identification and antimicrobial susceptibility testing to drive better patient care: an evolving scenario. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, p. I2–I5, 2019.

PANDEY, A. et al. 16S rRNA gene sequencing and MALDI-TOF mass spectrometry based comparative assessment and bioprospection of psychrotolerant bacteria isolated from high altitudes under mountain ecosystem. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 3, p. 1–12, 2019.

PARK, B. et al. Classification of Salmonella Serotypes with Hyperspectral Microscope Imagery. **Ann Clin Pathol**, v. 5, n. 2, p. 1108, 2017.

RODRÍGUEZ-MEDINA, N. et al. Klebsiella variicola: an emerging pathogen in humans. **Emerging Microbes and Infections**, v. 8, n. 1, p. 973–988, 2019.

ROSENBLUETH, M. et al. Klebsiella variicola, A Novel Species with Clinical and Plant-Associated Isolates. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 27–35, jan. 2004.

SANDASI, M. et al. Hyperspectral imaging and chemometric modeling of Echinacea - A novel approach in the quality control of herbal medicines. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 13104–13121, 2014.

SEO, Y. et al. Identification of Staphylococcus species with hyperspectral microscope imaging and classification algorithms. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 10, n. 2, p. 253–263, 2016.

SRINIVASAN, R. et al. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0117617, 2015.

TILLMAN, G. E. et al. Isolation of Shiga Toxin–Producing Escherichia coli Serogroups O26, O45, O103, O111, O121, and O145 from Ground Beef Using Modified Rainbow Agar and Post–Immunomagnetic Separation Acid Treatment. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 9, p. 1548–1554, set. 2012.

YOON, S. C.; LAWRENCE, K. C.; PARK, B. Automatic Counting and Classification of Bacterial Colonies Using Hyperspectral Imaging. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 10, p. 2047–2065, 2015.

YOON, S. H. et al. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 1613–1617, 2017.

ZHANG, C.-X. et al. Serratia nematodiphila sp. nov., associated symbiotically with the

entomopathogenic nematode *Heterorhabditoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, n. 7, p. 1603–1608, 1 jul. 2009.

Capítulo 5

Considerações finais e perspectivas

Considerações finais

Objetivo específico 1: Realizar análises das características físico-químicas e correlacioná-las aos parâmetros preconizados por órgãos competentes para a água de consumo humano.

A análise das características físico-químicas revelou que o pH foi o único parâmetro que não está de acordo com os padrões organolépticos de potabilidade estabelecidos pelo Anexo XX da PRC n° 5 em seu Art. 1°.

Objetivo específico 2: Verificar em que concentrações são encontrados metais potencialmente tóxicos de relevância a saúde.

Os resultados da análise dos metais potencialmente tóxicos (ferro, lítio, manganês e cobre) indicam que as concentrações observadas estão abaixo do Valor Máximo Permitido recomendado pela Resolução do CONAMA n° 357.

Objetivo específico 3: Verificar a contaminação por coliformes nas amostras coletadas.

Os resultados para os parâmetros bacteriológicos demonstraram que os dados observados neste trabalho se encontram fora dos padrões preconizados pelo Anexo n° 5 do Ministério da Saúde para a água para consumo humano.

Objetivo específico 4: Identificar por fenotipagem os diferentes gêneros/espécies bacterianos isolados das amostras de água.

A qualidade bacteriológica da água observada, indica que a população consumidora pode estar exposta à possíveis doenças de veiculação hídrica, uma vez que grande parte dos isolados bacterianos são potencialmente causadores de doenças em seres humanos, tais como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter lwoffii* e *Staphylococcus auricularis*.

Objetivo específico 5: Verificar por meio do teste de antibiograma a presença de bactérias resistentes aos antibióticos.

Os padrões de resistência antimicrobiana observados sugerem que a água tem sido um importante veículo de disseminação de genes de resistência e que por isso é necessário a observação desse problema que se manifesta a nível mundial.

Objetivo específico 6: Realizar PCR para amplificação da região codificante para a subunidade 16S rRNA seguida de sequenciamento do mesmo gene para confirmação das identificações de gêneros/espécies.

Constatou-se que os métodos de identificação baseados somente em características bioquímicas geralmente não são suficientes para identificação de microrganismos isolados de amostras ambientais devido a elevada diversidade de espécies nesses ambientes resultando em bases de dados insuficientes. Por essa razão outros métodos, genotípicos e fenotípicos, devem ser empregados para o avanço nos processos de identificação de bactérias ambientais.

Objetivo específico 7: Comparar as metodologias de identificação fenotípica e por sequenciamento, ressaltando as discordâncias e similaridades entre elas.

Foi observado que a concordância entre a identificação fenotípica (provas bioquímicas) e a genotípica (baseada no gene codificante para 16S rRNA), apresenta significativas divergências. Por essa razão observa-se que a identificação bacteriana, baseada em provas bioquímicas convencionais está melhor elucidada à identificação de bactérias de origem clínica, não sendo amplamente aplicável a identificação de cepas encontradas em outros ambientes ou que apresentam características fenotípicas variáveis, além de não serem responsivos a bactérias não cultiváveis.

Objetivo específico 8: Realizar a diferenciação de bactérias ambientais utilizando a imagem hiperespectral e análises multivariadas.

O método proposto baseado em HSI para diferenciação de isolados bacterianos foi eficaz, sendo possível a separação dos isolados a nível de gêneros e espécies. Com base nesses resultados, sugere-se que a análise de HSI seja suficiente pra a diferenciação de cepas bacterianas distintas. Porém, para ser possível a identificação de bactérias baseada

nessa tecnologia faz-se necessário a padronização das culturas e principalmente a construção de bancos de dados que sejam capazes de abranger a ampla variedade bacteriana existente.

Perspectivas

As sugestões para a continuidade do trabalho são apresentadas a seguir:

1. Sugerimos que as entidades governamentais responsáveis direcionem atenção à população que compõem as comunidades quilombolas, propondo-lhes políticas públicas que venham proporcionar melhor qualidade de vida principalmente no que diz respeito ao fornecimento de água dentro dos parâmetros de consumo.
2. Propomos a realização de novos estudos sistematizados que apontem os principais métodos de identificação de bactérias ambientais utilizados não apenas nos últimos cinco anos, mas em um tempo superior a este.
3. Apesar de ter sido possível realizar a diferenciação dos isolados bacterianos a nível de gênero e espécie, se faz necessário a otimização do uso da HSI no que diz respeito a padronização dos procedimentos de cultura e a análise dos resultados.
4. Estender a análise de diferenciação bacteriana para identificação bacteriana utilizando HSI por meio da construção de bancos de dados com cepas padrão que abranjam a variabilidade de bactérias existentes nos diferentes ambientes.
5. Sugerimos que novos ensaios, como MALDI-TOF sejam realizados para se estabelecer diferentes parâmetros na padronização do uso de HSI na identificação bacteriana.
6. Propor novos modelos utilizando a HSI na identificação do perfil de resistência a antibacterianos expressados por uma ampla variedade de bactérias.
7. Potencializar o uso da HSI na identificação bacteriana, de modo que esta ferramenta não seja restrita ao ambiente de pesquisa, mas aplicável à microbiologia clínica, industrial e ambiental.

*Referências
bibliográficas*

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Brasil, 2013. Disponível em: <http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/deteccao-e-identificacao-de-bacterias-de-importancia-medica> of subordinate document. Acessado em: 15/10/2018.
2. Akbari H, Halig LV. Hyperspectral Imaging and Spectral-Spatial Classification For Cancer Detection, The 5th IEEE International Congress on Image and Signal Processing (CISP 2012) and the 5th International Conference on BioMedical Engineering and Informatics (BMEI 2012), Chongqing, China, 16-18, 2012.
3. Alós JI. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global Antibiotic resistance: A global crisis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 33:692-699, 2015.
4. American Public Health Association (APHA), 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th ed.
5. American Public Health Association (APHA), 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22th ed.
6. An YJ, Kampbell DH, Breidenbach GP. Escherichia coli and total coliforms in water and sediments at lake marinas. *Environmental Pollution*, 120(3):771-778, 2002.
7. A cidade de Aparecida de Goiania. Disponível em: <http://www.aparecida.go.gov.br/a-cidade/>. Acessado em 08/01/2019.
8. Asamoah DN, Amarin R. Avaliação da qualidade da água engarrafada / sachê no Município de Tarkwa-Nsuaem (TM) de Gana. *Revista de Pesquisa de Ciências Aplicadas Engenharia e Tecnologia*, 3:377-385, 2011.
9. Aziz RK, Khalifa MM, Sharaf RR. Contaminated water as a source of Helicobacter pylori infection: A review. *Journal of Advanced Research*, 6(4):539-547, 2015.
10. Azzam MI, Ezzat SM, Othman BA, El-Dougdoug KA. Antibiotics resistance phenomenon and virulence ability in bactéria from water enviroment. *Water Science*, 31:109-121, 2017.
11. Basak S, Singh P, Rajurkar M. Multidrug resistant and extensively drug resistant bacteria: A study. *J Pathog*, 5 pages, 2016.
12. Becker K, Eiff CV. Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase-positive Cocci. In: Versalovic J, Carroll KC, Jorgensen JH, Funke G, Landry ML, Warnock DW. Manual of clinical microbiology. 10 ed. Washington: ASM Press, cap. 19:308-330, 2011.

13. Beolchini F, Fonti V, Rocchetti L, Saraceni G, Pietrangeli B, Dell'Anno A. Chemical and biological strategies for the mobilization of metal/semi-metals in contaminated dredged sediments: experimental analysis and environmental impact assessment. *Journal of Chemical Ecology*, 29:415-426, 2013.
14. Biomerieux. Informação de produtos dos sistemas Vitek 2 Systems. Duham: Biomerieux, 2010.
15. Borges JC, Santana BP. Quilombo urbano Jardim Cascata: direitos sociais e cidadania de uma população etnicamente diferenciada. *Revista Acadêmica Educação e Cultura em Debate*, 3(1), 2017.
16. Braga B, Hespanhol I, Conejo JGL, Mierzwa JC, Barros MTL, Spencer M, Porto M, Nucci N, Juliano N, Eiger S. Introdução à engenharia ambiental: o desafio do desenvolvimento sustentável. 2 ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005.
17. Brasil. Decreto 6.040 de 07 de fevereiro de 2007. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2007/decreto/d6040.htm. Acesso em: 20/10/2018.
18. Brasil, Constituição da República Federativa do Brasil, 1988. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicaocompilado.htm. Acesso em: 08/01/2018.
19. Brasil. Constituição da Republica Federativa do Brasil de 1988. Ato das Disposições Constitucionais Transitórias. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/CcIVIL_03/Constituicao/Constituicao.htm. Acesso em: 10/10/2018.
20. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Manual de controle da qualidade da água para técnicos que trabalham em ETAS / Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. – Brasília : Funasa, 2014.
21. Brasil. Fundação Nacional de Saúde. 2013. Manual prático de análise de água / Fundação Nacional de Saúde – 4. ed. – Brasília : Funasa, 150 p.
22. Brasília. Guia de políticas públicas para comunidades quilombolas. Programa Brasil Quilombola, 2013. Disponível em: <http://www.seppir.gov.br/portal-antigo/arquivos-pdf/guia-pbq>. Acesso em: 08/10/2018.
23. Broberg K, Concha G, Engstrom K, Lindwall M, Grandner M, Vahtr M. Lithium in drinking water and thyroid function. *Environmental Health Perspective*, 119:6, 827-830, 2011.

24. Brooker DC, Lund ME, Blazevic DJ. Rapid test for lysine decarboxylase activity in *Enterobacteriaceae*. *Applied Microbiology*, 26(4):622-623, 1973.
25. Brown-Jaque M., Calero-Caceres W, Muniesa M. Transfer of antibiotic-resistance genes via phage-related mobile elements. *Plasmid*, 79:1–7, 2015.
26. Bublitz DAC, Wright PC, Bodager JR, Rasambainarivo FT, Bliska JB, Gillespie TR. Epidemiology of Pathogenic Enterobacteria in Humans, Livestock, and Peridomestic Rodents in Rural Madagascar. *Plos One*, 9(7), e101456, 2014.
27. Canton R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 9:466–475, 2006.
28. Carbonnelle, E. et al. Robustness of two MALDI-TOF mass spectrometry systems for bacterial identification. *Journal of Microbiological Methods*, v. 89, n. 2, p. 133–136, 2012.
29. Carvalho MCCG, Silva DCG. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. *Ciências Rural*, 40:735-744, 2010.
30. Chapin TK, Nightingale KK, Worobo RW, Wiedmann M, Strawn LK. Geographical and meteorological factors associated with isolation of *Listeria* species in New York State produce production and natural environments. *Journal of Food*, 77:1919–1928, 2014.
31. Chen, W.-J. et al. Characterization of an Insecticidal Toxin and Pathogenicity of *Pseudomonas taiwanensis* against Insects. *PLoS Pathogens*, v. 10, n. 8, p. e1004288, 21 ago. 2014.
32. Cheng, K. et al. Recent development of mass spectrometry and proteomics applications in identification and typing of bacteria. *Proteomics - Clinical Applications*, v. 10, n. 4, p. 346–357, 2016.
33. Chester B, MosKowitz LB. Rapid catalase supplemental test for identification of members of the family *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 25:439-441, 1987.
34. Choi W, Ji YS, Yoon KC. A case of bilateral keratitis caused by *Providencia alcalifaciens*: a rarely encountered ocular pathogen. *Int J Ophthalmol* 38 (3):1325–1328, 2018.
35. Clifford RJ, Hang J, Riley MC, Onmus-Leone F, Kuschner RA, Lesho EP, Waterman PE. Complete Genome Sequence of *Providencia stuartii* Clinical Isolate MRSN 2154. *J Bacteriol* 194(14):3736–3737, 2012.

36. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 27th ed., 1-256.
37. Colvara JG, Lima AS, Silva WP. Avaliação da contaminação de água subterrânea em poços artesianos no sul do Rio Grande do Sul. *Brazilian Journal of Food Technology*, II SSA, 2009.
38. Dantas G, Sommer MO, Oluwasegun RD, Church GM. Bacteria subsisting on antibiotics. *Science*, 320:100-10, 2008.
39. Darnault C, Rockne K, Stevens A, Mansoori GA, Sturchio N. Fate of environmental pollutants. *Water Environmental Research*, 77(6):2576-2658, 2004.
40. Dutra MTD, Silva JL, Oliveira CR, Lyra MRCC, Montenegro SMGL. Relações entre condições ambientais e doenças de veiculação hídrica em áreas do assentamento rural Serra Grande, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil. *Revista Brasileira de Geografia Física*, 09(06):1677-1689, 2016.
41. El-Zanfaly HT. Antibiotic Resistant Bacterial: A factor to be considered in safe drinking water. *Journal of Environmental Protection and Sustainable Development*. 1(3):134-143, 2015.
42. Esteves F. Fundamentos de limnologia. 3. ed. Rio de Janeiro: *Interciência*, 2011. 826 p.
43. Faustino MG. Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de metais em amostras de água por espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio (ICP-OES). 148p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2015.
44. Feng YZ, Yu W, Chen W, Peng KK, Jia GF. Invasive weed optimization for optimizing one-agar-for-all classification of bacterial colonies based on hyperspectral imaging. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 269, p. 264–270, 2018.
45. Ferreira HS, Lamenha MLD, Xavier Junior AFS, Cavalcante JC, Santos AM. Nutrição e saúde das crianças das comunidades remanescentes dos quilombos no Estado de Alagoas, Brasil. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 30(1):51-58, 2011.
46. Foca, G. et al. The potential of spectral and hyperspectral-imaging techniques for bacterial detection in food: A case study on lactic acid bacteria. *Talanta*, v. 153, p. 111–119, 2016.

47. Freitas DA, Caballero AD, Marques AS, Hernández CIV, Antunes SLNO. Saúde e comunidades quilombolas: uma revisão da literatura. Health and quilombolas communities. *Revista CEFAC*. 13, 2011.
48. Freitas MB, Brilhante OM, Almeida LM. Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. *Caderno de Saúde Pública*, 117(3):651-660, 2001.
49. Fundação Cultural Palmares (FCP). Certificação Quilombola, 2018. Disponível: http://www.palmares.gov.br/?page_id=37551. Acesso em : 15/10/2018.
50. Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, Groneberg D A. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 10:1-22, 2006.
51. Gomes KO, Reis EO, Guimarães MDC, Cherchiglia ML. Utilização de serviços de saúde por população quilombola do Sudoeste da Bahia, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, 29(9):1829-1842, 2013.
52. Gomes RP, Rodrigues AA, Pincerati MR, Barbosa MS, Braga CASB, Vieira JDG, Carneiro LC. Assessment of the bacteriological quality of the raw water and the antimicrobial susceptibility profile of bacteria isolated in water surface of a river. *International Journal of Microbiology Research*, 9:949-953, 2017.
53. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: the years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6):333-351, 2016.
54. Governo municipal de Aparecida de Goiânia. Aparecida de Goiânia, 2018. Disponível em: <http://www.aparecida.go.gov.br/a-cidade/>. Acesso em: 09/10/2018.
55. Governo municipal de Silvânia. Silvânia, 2017. Disponível: <https://www.silvania.go.gov.br/silvania>. Acesso em: 09/10/2018.
56. Gowen AA, O'Donnell CP, Cullen PJ, Downey G, Frias JM. Hyperspectral imaging—An emerging process analytical tool for food quality and safety control. *Trends in Food Science Technology*, 18:590–598, 2007.
57. Gowen AA, Feng Y, Gaston E, Valdramidis V. Recent applications of hyperspectral imaging in microbiology. *Talanta*, v. 137, p. 43–54, maio 2015.
58. Grott SC, Hartmann B, Filho HHS, Franco RMB, Goulart JAG. Detecção de cistos de *Giardia* spp. e oocistos de *Cryptosporidium* spp. na água bruta das estações de

- tratamento no município de Blumenau, SC, Brasil. *Revista Ambiente e Água*, 11(3), 2016.
59. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1): 1-8, 2016.
60. Hewage N, Saleh M. Evaluation of the pathogen detect system and anthracene-based enzyme substrates for the detection and differentiation of *E.coli* and total coliforms in water samples. *Journal of Water Resource and Protection*, 7:689-701, 2015.
61. Hodge J, Chang HH, Boisson S, Collin SM, Peletz R, Clasen T. Assessing the association between thermotolerant coliforms in drinking water and diarrhea: an analysis of individual-level data from multiple studies. *Environmental health perspectives*, 124(10):1560-1567, 2016.
62. Holvoet K, Sampers I, Callens B, Dewulf J, Uyttendaele M. Moderate Prevalence of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Lettuce, Irrigation Water, and Soil. *Applied Environmental Microbiology*, 79:6677–6683, 2013.
63. Hugh R, Leifson E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 66(1):24-26, 1953.
64. Hunter PR, Chalmers RM, Hughes S, Syed Q. Self-reported diarrhea in a control group: A strong association with reporting of low-pressure events in tap water. *Clinical Infectious Diseases*, 40:32–e34, 2005.
65. Ibal, J. C. et al. Information about variations in multiple copies of bacterial 16S rRNA genes may aid in species identification. *PLoS ONE*, v. 14, n. 2, p. 1–15, 2019.
66. Illumina. MiSeq System User Guide. Disponível em: >http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_instruments/miseq.html< Acesso em: 22/10/2018. 2015a.
67. Illumina. Nextera DNA Sample Preparation Guide. Disponível em:< http://support.illumina.com/sequencing/sequencing_kits/nextera_dna_kit.html> Acesso em: 22/10/2018. 2015b.
68. Ingerson-Mahar M, Reid A. Microbes in Pipes: The Microbiology of the Water Distribution System A Report on an American Academy of Microbiology Colloquium. *ASM Academy*: Boulder,CO, USA, p. 26, 2012.

69. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa Nacional de Saneamento Básico, 2010. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv45351.pdf>. Acesso em: 11/10/2018.
70. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Silvânia – GO, Brasil. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/go/silvania/panorama>. Acesso em: 15/10/2018.
71. Khandelwal, M. et al. Function development for appraising brittleness of intact rocks using genetic programming and non-linear multiple regression models. *Engineering with Computers*, v. 33, n. 1, p. 13–21, 2017.
72. Kashef N, Djavid GE, Shahbazi S. Antimicrobial susceptibility patterns of community-acquired uropathogens in Tehran. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 4:202-206, 2010.
73. Kim M, Heo SR, Choi SH, Kwon H, Park JS, Seong MW, Lee DH, Park KU, Song J, Kim EC. Comparison of the MicroScan, Vitek 2 and Crystal GP with 16S rRNA sequencing and MicroSeq 500 v2.0 analysis for coagulase-negative staphylococci. *BMC Microbiology*, 8:233-240, 2008.
74. Koch FF, Kauffmann C, Bica JB, Adami FS, Stevens JF, Eckhard CL, Marmitt LG, Oliveira EC. Análise de água superficial para consumo humano em um município do Rio Grande do Sul. *Revista Caderno Pedagógico*, v. 14, n. 1, 2017.
75. Kucheryavskiy S. A new approach for discrimination of objects on hyperspectral images. *Chemom Intell Lab Syst* 120:126–135, 2013.
76. Kulkarni SS, Madalgi R, Ajantha GS, Kulkarni RD. Identification of genus *Acinetobacter*: Standardization of in-house PCR and its comparison with conventional phenotypic methods. *Journal of Laboratory Physicians*, 9(4):279-282, 2017.
77. Kummerer K, Henninger A. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into influent. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(12):1203-1214, 2003.
78. Lasch, P. et al. FT-IR Hyperspectral Imaging and Artificial Neural Network Analysis for Identification of Pathogenic Bacteria. *Analytical Chemistry*, v. 90, n. 15, p. 8896–8904, 2018.
79. Lau, S. K. P.; Teng, J. L. L.; Woo, P. C. Y. Bacterial Identification Based on Universal Gene Amplification and Sequencing. In: *Advanced Techniques in*

- Diagnostic Microbiology. Cham: Springer International Publishing, p. 1–29. 2018.
80. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED, Cars O. Antibiotic resistance: The need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, 13:1057-1098, 2013.
81. Leclerc H, Mossel DA, Edberg SC, Struijk CB. Avanços na bacteriologia do grupo coliforme: sua adequação como marcadores de segurança microbiana da água. *Annual Review Microbiology*, 55: 201–234, 2001.
82. León JAC. Notas de clase. Facultad del medio ambiente y recursos naturales. Calidad de aguas para estudiantes de ciencias ambientales. Universidad Distrital Francisco José de Caldas Facultad del Medio Ambiente y Recursos Naturales, 1, 2005.
83. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, ID 251364:11 pag, 2012.
84. Liu, J.-R. et al. Molecular Cloning and Characterization of an Insecticidal Toxin from *Pseudomonas taiwanensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 23, p. 12343–12349, 8 dez. 2010.
85. Ludwig W, Klenk HP. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd edn (eds Boone, D. R., Castenholz, R. W. & Garrity, G. M.) 49–65, Springer, 2001.
86. Luparello C, Sirchia R, Longo A. Cadmium as a transcriptional modulator in human cells. *Critical Reviews in Toxicology*, 41:73–80, 2011.
87. Lupo A, Coyne S, Berendonk TU. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Frontiers in Microbiology*, 3:18, 2012.
88. Manley M, Du Toit F, Geladi P. Tracking diffusion of conditioning water in single wheat kernels of different hardnesses by near infrared hyperspectral imaging. *Analytica Chimica Acta Journal*, 686:64–75, 2011.
89. Mardis E. Next-generation DNA sequencing methods. *Annual review of genomics and human genetics*, 9:387-402, 2008.
90. Marguiles M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bembien LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Dodwin BC, He W, Helgesen S, He Ho C, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer MLI,

- Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, Mcdade KE, Mckenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt AK, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature International Journal of Science*, 437:376-380, 2005.
91. Martin NH, Trmcic A, Hsieh TH, Boor KJ, Wiedmann M. The evolving role of coliforms as indicators of unhygienic processing conditions in dairy foods. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 7:1549, 2016.
92. Meybeck M, Kuusisto E, Makela A, Malkki E. Water quality. In: Bartram J, Balanced R. *Water Quality. Water Quality Monitoring*. Spon Press, p. 9-32, 2001.
93. Middleton Spectral Vision. SisuCHEMA – SWIR chemical imaging system. Disponível em: <https://www.middletonspectral.com/product/sisuchema/>. Acessado em: 31 de janeiro de 2020.
94. Ministério da Saúde. Portaria de Consolidação nº 5, de 28 de setembro de 2017. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0005_03_10_2017.html. Acessado em: 10/11/2018.
95. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância e controle da qualidade da água para o consumo. Brasília, 2006. 212 p. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_controle_qualidade_agua.pdf acesso em: 10/10/2018
96. Ministério do desenvolvimento social e combate a fome. Quilombos do Brasil: Segurança alimentar e nutricional em territórios titulados. Cadernos de Estudos Desenvolvimento Social em Debate. 2014. Disponível em: https://www.mds.gov.br/webarquivos/publicacao/brasil_sem_miseria/cadernos_d_e_estudos20.pdf Acesso em: 09/10/2018.
97. Modi SR, Lee HH, Spina CS, Collins J. Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature*, 499:219–222, 2013.
98. Moore ERB. et al. Microbial systematics and taxonomy: relevance for a microbial commons. *Research in Microbiology*, v. 161, n. 6, p. 430–438, jul. 2010.

99. Mujahid TY, Siddiqui K, Ahmed RZ, Subhan SA, Ali ST, Wahab A. Bacteriological Quality Analysis of Tap Water of Karachi, Pakistan. *International Journal of Advanced Research*, 3(2):573-578, 2015.
100. Mulamattathil S, Bezuidenhout C, Mbewe M, Ateba C. Isolation of environmental bacteria from surface and drinking water in Mafikeng, South Africa, and characterization using their antibiotic resistance profiles. *Journal of Pathogens*, 214:1-11, 2014.
101. Nascimento VFS, Araújo MFF, Nascimento ED, Sodr -Neto L. Epidemiologia de doenas diarreicas de veiculao hídrica em uma região semi rida brasileira. *ConScientiae Saúde*, 12:353-361, 2013.
102. Nesme J, Cecillon S, Delmont TO, Monier JM, Vogel TM, Simonet P. Large-scale metagenomic-based study of antibiotic resistance in the environment. *Current Biology*, 24:1096-1100, 2014.
103. Noiphung J, Laiwattanapaisal W. Multifunctional Paper-Based Analytical Device for In Situ Cultivation and Screening of Escherichia coli Infections. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2019.
104. Ntshobeni NB, Essack SY. Draft Genome Sequence of *Providencia rettgeri* APW139_S1, an NDM-18-Producing Clinical Strain Originating from Hospital Effluent in South Africa. *Microbiol Resour Announc* 8(21):18–19, 2019.
105. Olaitan AO, Diene SM, Assous MV, Rolain JM. Genomic Plasticity of Multidrug-Resistant NDM-1 Positive Clinical Isolate of *Providencia rettgeri*. *Genome Biol Evol* 8(3):723–728, 2015.
106. Organizao das Nao es Unidas. Transformando nosso mundo: A agenda 2030 para o desenvolvimento sustentável. 2015. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/pos2015/agenda2030/>. Acesso em: 11/10/2018.
107. Organizao Mundial da Saúde. 2,1 bilhões de pessoas não tem água potável em casa e mais do dobro não dispoem de saneamento Seguro. 12 de julho de 2017. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5458:oms-2-1-bilhoes-de-pessoas-nao-tem-agua-potavel-em-casa-e-mais-do-dobro-nao-dispoem-de-saneamento-seguro&Itemid=839. Acessado em: 10/11/2018.
108. Ozenci V, Rossolini GM. Rapid microbial identification and antimicrobial susceptibility testing to drive better patient care: an evolving scenario. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 74, p. I2–I5, 2019.

109. Pala A, He Y, Jekel M, Reinhard M, Gin KYH. Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. *Environmental International*, 71:46-62, 2014.
110. Pandey PK, Kass PH, Soupir ML, Biswas S, Singh VP. Contamination of water resources by pathogenic bacteria. *AMB Express*, 4:51, 2014.
111. Pandey, A. et al. 16S rRNA gene sequencing and MALDI-TOF mass spectrometry based comparative assessment and bioprospection of psychrotolerant bacteria isolated from high altitudes under mountain ecosystem. *SN Applied Sciences*, v. 1, n. 3, p. 1–12, 2019.
112. Pang L, Close M, Goltz M, Sinton L, Davies H, Hall C, Stanton G. Estimation of septic tank setback distances based on transport of E. coli and F-RNA phages. *Environment International*, 29(7):907–921, 2004.
113. Park, B. et al. Classification of Salmonella Serotypes with Hyperspectral Microscope Imagery. *Ann Clin Pathol*, v. 5, n. 2, p. 1108, 2017.
114. Pasternak J. Novas metodologias de identificação de microrganismos: MALDI-TOF. *Einstein*, 10:118-119, 2012.
115. Pereira SFP, Costa AC, Cardoso ESC, Corrêa MSS, Alves DTV, Miranda RG, Oliveira GRF. Condições de potabilidade da água consumida pela população de Abaetetuba-Pará. *Revista de Estudos Ambientais*, 12:50-62, 2010.
116. Pedroso F, Bonetto CA, Zalocar YA. Comparative study on phosphorus and nitrogen transport in the Parana, Paraguay and Bermejo rivers. *Limnologia e manejo de represas. Séries: Monografias em limnologia*. Sao Paulo. ACIESP, v. 1 t. 1 p. 91-117, 1998.
117. Piñeiro di Blasi JI, Martínez Torres J, Gracia Nieto PJ, Alonso Fernández JR, Díaz Muñoz C, Taboada J. Analysis and detection of outliers in water quality parameters from ‘different automated monitoring stations in the Miño river basin (NW Spain). *Ecological Engineering*, v. 60, p.60-66, 2013.
118. Pinho L, Dias RL, Cruz LMA, Velloso NA. Condições de saúde de comunidade quilombola no norte de Minas Gerais. *Revista de Pesquisa: Cuidado é Fundamental*, 7(1):1847-1855, 2015.
119. Piratoba ARA, Ribeiro HMC, Morales GP, Gonçalves WG. Caracterização de parâmetros de qualidade da água na área poruária de Barbacena, PA, Brasil. *Ambiente e Água*, 12(3):435-456, 2017.

120. Piveli RP, Kato MT. Qualidade da água e poluição: aspectos físico-químicos. São Paulo: ABES, 2005.
121. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrobiology Chemother*, 67:1597–1606, 2012.
122. Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Mammeri H, Liard A, Nordmann P. Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob. Agents Chemother*, 49:3523–3525, 2005.
123. Prats-Montalbán JM, de Juan A, Ferrer A. Multivariate image analysis: a review with applications. *Chemon Intell Lab Syst* 107: 1-23, 2011.
124. Presidência da República. Decreto nº 4.887, de 20 de novembro de 2003. Regulamenta o procedimento para identificação, reconhecimento, delimitação, demarcação e titulação das terras ocupadas por remanescentes das comunidades quilombolas de que trata o art. 68 do Ato das Disposições Constitucionais Transitórias. Diário Oficial da União. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2003/d4887.htm. Acessado em: 15/10/2018.
125. Presidência da República. Decreto nº 7.535, de 26 de julho de 2011. Institui o Programa Nacional de Universalização do Acesso e Uso da Água “ÁGUA PARA TODOS”, destinado a promover a universalização do acesso à água em áreas rurais para consumo humano e para a produção agrícola e alimentar, visando ao pleno desenvolvimento humano e à segurança alimentar e nutricional de famílias em situação de vulnerabilidade social. Disponível em: <http://www.mi.gov.br/documents/10157/7552bcf2-8a6f-41f3-bd85-ff6d09f31adb>. Acessado em: 15/10/2018.
126. Quadri SM, Zubairi S, Hawley HP, Ramirez EG. Simple spot test for rapid detection of urease activity. *Journal of Clinical Microbiology*, 20(6):1198-1199, 1984.
127. Ramírez-Castillo RY, Loera-Muro A, Jacques M, Garneau P, Avelar-González FJ, Harel J, Guerrero-Barrera AL. Waterborne Pathogens: Detection Methods and Challenges. *Pathogens*. 4:307-334, 2015.
128. Raven, K. E. et al. Methodology for whole genome sequencing of MRSA in a routine hospital microbiology laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, n. March, p. 1–23, 2019.

129. Resolução CONAMA Nº 020/1986 - "Dispõe sobre a classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional". - Data da legislação: 18/06/1986 - Publicação DOU, de 30/07/1986, págs. 11356-11361 Status: Alterada pela Resolução nº 274, de 2000. Revogada pela Resolução nº 357, de 2005.
130. Riley LW. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect* 20(5):380–390, 2014.
131. Rodriguez-Medina, N. et al. *Klebsiella variicola*: an emerging pathogen in humans. *Emerging Microbes and Infections*, v. 8, n. 1, p. 973–988, 2019.
132. Rosenblueth, M. et al. *Klebsiella variicola*, A Novel Species with Clinical and Plant-Associated Isolates. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 27, n. 1, p. 27–35, jan. 2004.
133. Rosselló-Móra, R.; Amann, R. Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 38, n. 4, p. 209–216, 2015.
134. Sanchez LO, Gustot T. Multidrug-Resistant Bacterial Infection in Patients with Cirrhosis. A Review. *Curr Hepatol Rep* 1-8. 2019.
135. Sandasi M, Vermaak I, Chen W, Viljoen AM. Hyperspectral Imaging and Chemometric Modeling of Echinacea — A Novel Approach in the Quality Control of Herbal Medicines. *Molecules*, 19:13104-13121, 2014.
136. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determination sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94:441-448, 1975.
137. Santos I. C.; Hildenbrand, Z. L.; SCHUG, K. A. Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. *Analyst*, v. 141, n. 10, p. 2827–2837, 2016.
138. Santos RC, Silva MS. Condições de vida e itinerários terapêuticos de quilombolas de Goiás. *Saúde e Sociedade*, 23(3):1049-1063, 2014.
139. Sarker MMR. Determinants of Arsenicosis Patients' Perception and Social Implications of Arsenic Poisoning through Groundwater in Bangladesh. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(10):3644-3656, 2010.
140. Seo, Y. et al. Identification of *Staphylococcus* species with hyperspectral microscope imaging and classification algorithms. *Journal of Food Measurement and Characterization*, v. 10, n. 2, p. 253–263, 2016.

141. Sinclair, L. et al. Microbial community composition and diversity via 16S rRNA gene amplicons: Evaluating the illumina platform. *PLoS ONE*, v. 10, n. 2, p. 1–18, 2015.
142. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*, 26(10):1135-1145, 2008.
143. Silva JM, Hespanhol RAM. Discussão sobre comunidade e características das comunidades rurais no município de Catalão. *Sociedade e Natureza*, 28(3):361-374, 2016.
144. Silva R, Sato M. Territórios e identidades: mapeamento dos grupos sociais do estado de Mato Grosso – Brasil. *Ambiente & Sociedade*, 2:261-281, 2010.
145. Simmons JS. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon-aerogenes groups and for certain fungi. *The Journal of Infectious Diseases*, 39:209-214, 1926.
146. Singhal, N. et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in microbiology*, v. 6, n. August, p. 791, 2015.
147. Specim Spectral Imaging. SisuCHEMA chemical imaging analyzer. 2015. Disponível em: https://www.specim.fi/downloads/SisuCHEMA_2_2015.pdf. Acessado em: 31/01/2020.
148. Sperling, MV. Introdução à Qualidade das Águas e ao Tratamento de esgotos. 3. ed. Belo Horizonte: DESA - UFMG, 2005. v. 1.
149. Srinivasan R, Karaoz U, Volegova M, MacKichan J, Kato-Maeda M, Miller S, Nadarajan R, Brodie EL, Lynch SV. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. *PloS one*, 10(2), e0117617, 2015.
150. Takhampunya, R. et al. Metagenomic Approach to Characterizing Disease Epidemiology in a Disease-Endemic Environment in Northern Thailand. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. February, p. 1–21, 2019.
151. Telles DDA, Góis JS. Ciclo ambiental da água: da chuva à gestão. São Paulo, Blucher, 2013.
152. Tillman GE, Wasilenko JL, Simmons M, Lauze TA, Minicozzi J, Oakley BB, Narang N, Fratamico P, Cray WC. Isolation of Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Serogroups O26, O45, O103, O111, O121, and O145 from Ground Beef Using

- Modified Rainbow Agar and Post-Immunomagnetic Separation Acid Treatment. *Journal of Food Protection*, v. 75, n. 9, p. 1548–1554, set. 2012.
153. Timperio, A. M. et al. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry and MALDI BioTyper in comparison to 16S rDNA sequencing for the identification of bacteria isolated from Arctic sea water. *PLoS ONE*, v. 12, n. 7, p. 1–15, 2017.
154. Thevenon F, Adatle T, Wildi W, Poté J. Antibiotic resistant bacteria/genes dissemination in lacustrine sediments highly increased following cultural eutrophication of Lake Geneva (Switzerland). *Chemosphere*, 86(5):468-476, 2012.
155. Tortora GJ; Funke BR; Case CL. *Microbiologia tradução: Aristóbolo Mendes da Silva ... [et al.] ; revisão técnica: Flávio Guimarães da Fonseca. – 10. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre :Artmed, 2012.*
156. Van Soolingen, D. et al. DNA Fingerprinting of mycobacterium tuberculosis. In: [s.l: s.n.]. p. 196–205, 1994.
157. Vithanage, N. R. et al. Comparison of identification systems for psychrotrophic bacteria isolated from raw bovine milk. *International Journal of Food Microbiology*, v. 189, p. 26–38, out. 2014.
158. Vieira ABD, Monteiro PS. Comunidade quilombola: análise do problema persistente do acesso à saúde, sob o enfoque da Bioética de Intervenção. *Saúde em Debate*, 37(99):610-618, 2013.
159. Volochko A, Batista LE. Saúde dos quilombolas. São Paulo: Instituto de saúde, GTAE – SESSP, 2009.
160. Wang GH, Brucker RM. Genome Sequence of *Providencia rettgeri* NVIT03, Isolated from *Nasonia vitripennis*. *Microbiol Resour Announc* 8(3):01157-18, 2019.
161. Wang H, Wang T, Zhang B, Li F, Toure B, Omosa IB, Chiramba T, Abdel-Monem M, Pradhan M. Water and wastewater treatment in Africa – current practices and challenges. *Soil Air Water*, 42(8):1029-1035, 2014.
162. Wickhorst, J. P. et al. Phenotypic and genotypic approach to characterize *Arcanobacterium pluranimalium* isolated from bovine milk samples. *Folia Microbiologica*, v. 61, n. 5, p. 405–412, 2016.
163. Williams P, Geladi P, Fox G, Manley M. Maize kernel hardness classification by near infrared (NIR) hyperspectral imaging and multivariate data analysis. *Analytica Chimica Acta Journal*, 653:121–130, 2009.

164. Wintersdorff CJV, Penders J, Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, Alphen LB, Savelkoul PHM, Wolfs PFG. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers of Microbiology*, 7:173, 2016.
165. Woese, C. R.; Fox, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms (archaeobacteria/eubacteria/urkaryote/16S ribosomal RNA/molecular phylogeny). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 74, n. 11, p. 5088–5090, 1977.
166. Woese C. R.; Kandler O.; Whaeelis M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 87, n. 12, p. 4576–9, 1990.
167. World Health Organization (WHO). Guidelines for drinking-water quality. 4ª edição. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44584/9789241548151_eng.pdf;jsessionid=3795C73F25BFA5A8CDCE965EAD7375E4?sequence=1. Acessado em: 08/01/2019, 2011.
168. World Health Organization (WHO). Millennium Development Goals: Progress towards the Health-Related Millennium Development Goals; World Health Organization (WHO): Geneva, Switzerland, Disponível em: http://www.who.int/topics/millennium_development_goals/en/. Acessado em: 07/11/2018, 2010.
169. Yang B.; Wang Y.; Qian P. Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2016.
170. Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB, Euzéby J, Amann R, Rosselló-Móra R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*. 12:635-645, 2014.
171. Yoon SC, Lawrence KC, Park B. Automatic Counting and Classification of Bacterial Colonies Using Hyperspectral Imaging. *Food and Bioprocess Technology*, v. 8, n. 10, p. 2047–2065, 2015.
172. Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and

- whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 67:1613-1617, 2017.
173. Zhang, C.-X. et al. *Serratia nematodiphila* sp. nov., associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 59, n. 7, p. 1603–1608, 1 jul. 2009.
174. Zuin VG, Ioriatti MCS, Matheus CE. O emprego de parâmetros físicos e químicos para a avaliação da qualidade de águas naturais: uma proposta para a educação química e ambiental na perspectiva CTSA. *Química Nova na Escola*, 31(1):3-8, 2009.

Apêndice I

**Artigo: HPV detection in oral mucosa samples in pediatric patients at
University Hospital of Goiás, Brazil
(Detecção de HPV em amostras de mucosa oral de pacientes pediátricos em Hospital
Universitário de Goiás, Brasil)**

HPV detection in oral mucosa samples in pediatric patients

Detecção de HPV em amostras de mucosa oral em pacientes pediátricos

Aline R. Gama¹ 0000-0003-2167-3872, Marcos A. B. Carvalho-Júnior² 0000-0003-1513-3247, Isabela J. Wastowski³ 0000-0001-5441-4186, Stela O. Rodrigues⁴, Maria F. B. Sousa⁴, Laís S. Botacin⁴, Melissa A. G. Avelino⁴ 0000-0003-0342-0978, Lilian C. Carneiro¹ 0000-0003-4067-1506.

¹Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brasil.

²Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

³Universidade Estadual de Goiás (UEG), Goiânia, Goiás, Brasil.

⁴Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brasil.

RESUMO

Introdução: A detecção de HPV favorece os tratamentos para pacientes que apresentam manifestações clínicas e limita as consequências futuras para aqueles que apresentam infecções assintomáticas. **Objetivos:** Diante disso, o presente estudo teve por objetivo avaliar a sensibilidade da PCR para a detecção de HPV em diferentes amostras. **Material e métodos:** Um total de 49 amostras de pacientes pediátricos foram obtidas por esfoliação da mucosa oral com uma escova estéril. O DNA dessas amostras, após extraído, foi utilizado para detecção de HPV por PCR convencional e qPCR. **Resultados:** Das 49 amostras, oito eram de pacientes clinicamente diagnosticados com papilomatose laríngea, porém tanto na PCR convencional quanto na qPCR apenas uma amostra apresentou amplificação do fragmento esperado. **Discussão:** Esses resultados sugerem que o tipo de amostra, a metodologia empregada na coleta, a metodologia de extração empregada, a localização anatômica da lesão e os oligonucleotídeos utilizados influenciam fortemente na sensibilidade da detecção de HPV por PCR. **Conclusão:** Dessa forma, observa-se que mais estudos são necessário para a determinação de melhores técnicas de coleta e processamento das amostras para tornar a detecção de HPV por PCR mais eficiente. **Unitermos:** papiloma; reação em cadeia da polimerase; primers do DNA; biópsia.

ABSTRACT

Introduction: The HPV detection favors treatments for patients with clinical manifestations and limits future consequences for those with asymptomatic infections. **Objectives:** Therefore, the present study aimed to evaluate the sensitivity of PCR for HPV detection from oral mucosa samples, of asymptomatic patients and patients with clinical manifestations of laryngeal papillomatosis. **Material and methods:** A total of 49 pediatric patient samples were obtained by exfoliation of the oral mucosa with a sterile brush. The DNA samples was extracted and used for HPV detection, using GP5 and GP6 oligonucleotides, by conventional PCR and qPCR reactions. **Results:** Among the 49 samples, eight were from patients clinically diagnosed with laryngeal papillomatosis, but in both conventional PCR and qPCR technic, only one sample had presented positivity.

Discussion: These results suggest that the sample type, the methodology used to collect, the extraction methodology used, the anatomical location of the lesion and the oligonucleotides used; all factors strongly influence the sensitivity of HPV detection by PCR methodology. **Conclusion:** Thus, more studies are needed to better determine the sample collection, and the processing techniques present more reproducibility on PCR detection.

Keywords: papilloma; polymerase chain reaction; DNA primers; biopsy.

INTRODUCTION

Characterized as a DNA virus, the Human Papilloma Virus (HPV) can cause the development of different types of lesions that affect the skin and mucous membranes. About 13 types of HPV, among the more than 150 already described, are associated with the occurrence of several cancers, among which those affecting the gynecological and cervical regions stand out⁽¹⁾.

Laryngeal papillomatosis is also one of the presentations of HPV infection, which can manifest in both childhood and adult, being more prevalent in the first group. An estimated 4.3 cases to one hundred thousand in the US⁽²⁾. The disease may present in several forms, being classified as aggressive: characterized by the need for ten or more surgical procedures, three or more within a year or extension of the disease distal to the sub glottis and non-aggressive: characterized by less than ten procedures required, with less than three procedures, being performed within one year, and no distal involvement⁽³⁾.

The most common manifestations are those with warty or papillomatous lesions with progressive growth, which may lead to the imminent risk of airway obstruction. They are usually caused by HPV types 6 and 11. In some patients, spontaneous remission of lesions may occur. In other cases the lesions may evolve malignant transformations (1-4%)⁽⁴⁾.

HPV transmission is not yet fully established, being route of sexual and non-sexual transmission, including the vertical form, is recognized, especially during childbirth. Contamination can occur even in children of mothers with no previous or current history of genital papillomas⁽⁵⁾.

Although the clinical implications of HPV infection in children are known, there are few epidemiological studies on the prevalence of viral type in the pediatric population. Such studies are extremely relevant, since there is a high incidence of HPV in the sexually active population, and consequently high possibility of estimated vertical transmission in about 50 to 83.3% of infected mothers. Although there are a large number of infected children, only about 2% of them develop laryngeal papillomatosis or other clinical

implication, leading to the understanding that there are a high number of asymptomatic pediatric patients⁽⁶⁾.

Given the growing relationship between HPV and the pediatric population, the detection of this virus increases the effectiveness of treatments for patients with clinical manifestations and limits future consequences for those with asymptomatic infections, thus increasing both survival and quality of life these patients⁽⁷⁾. Thus, the establishment of accessible and reliable HPV collection and tracking methodologies is important. In this scenario stands out the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, which is considered as the most sensitive for detection of viral DNA, and is therefore an excellent method for the identification of HPV in human tissues⁽⁸⁾.

Although PCR is a highly efficient technique for HPV detection, the success of this procedure depends on the lesion localization, the presence or absence of keratinization, and of methodology used to collect the sample. One of the most common methods used is the biopsy, because this material enables the recovery of cells present in the basal layer, where HPV is usually in its latent form. However, performing the biopsy is dependent on the presence of a physician and proper surgical instruments, making this method relatively expensive and unavailable in some care units. In this situation, the removal of mucosal cells with the use of collection brushes and swabs, makes obtaining these samples more accessible and a good alternative for obtaining high DNA concentration without invasive procedures^(8;9).

OBJECTIVES

Thus, this study aimed to evaluate the sensitivity of PCR for HPV detection in oral mucosa samples from asymptomatic pediatric patients and patients with laryngeal papillomatosis.

MATERIAL AND METHODS

Patients

A molecular study of 49 samples obtained from children, with 12 years old and under, who were undergoing treatment and follow-up at the otorhinolaryngology outpatient clinic at the Federal University of Goiás Hospital das Clínicas, Goiânia city, Goiás state, Brazil; was carried out. Two groups of individuals were evaluated: patients who had laryngeal papillomatosis clinically and patients who were being followed up at the outpatient clinic for other clinical conditions not associated with HPV infection.

Inclusion criteria in this study were: being up to 12 years of age at the time of collection. Exclusion criteria include: patients immunized against HPV, patients older than 12 years at the time of collection. The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of the Hospital das Clínicas of the Federal University of Goiás, under the 016/2017 protocol number. The informed consent form was obtained from all responsible for the patients under study.

Sample Collection and Processing

For HPV molecular detection, the samples were collected by exfoliating of the oral mucosa, using a sterile brush. In one of the patients, the sample was collected directly exfoliating the lesion. After collection, the samples were stored at approximately 4 °C for a maximum of three days until processing.

Molecular detection

DNA from the sample brushes was extracted using the PureLink Genomic DNA extraction kit (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), according to the manufacturer's recommendations. After extraction, the DNA was stored at approximately - 20 °C until processing.

HPV sequence detection was performed by conventional polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR (qPCR) using GP5+ primers (5' - TTTGTTACTGTGGTAGATACYAC - 3') and GP6+ (5' - GAAAAATAAACTGTA AATCATATTC - 3'), amplifying a 150 bp fragment of the highly conserved L1 HPV gene⁽¹⁰⁾. Conventional PCR reactions were performed in a thermal cycler (MJ Research, Inc., Quebec, Canadian), according to standardized methodology by VENCESLAU et al., (2014) with some modifications. The reaction contained 1 µL DNTP (20 µM), 0.4 µL HotStart Taq DNA Polymerase (5U), 5 µL MgCl (50 mM), 2 µL each primer (10 mM), 10 µL each sample and Milli-Q water (Milipore) to complete a final volume of 50 µL. The conditions for this PCR were: initial denaturation for 1 minute at 95 °C, followed by 30 cycles of denaturation for 30 seconds at 95 °C, annealing for 30 seconds at 48 °C and extension for 3 minutes at 72 °C and extension final for 2 minutes at 72 °C. The amplicons were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis stained with Blue Green Loading dye (LGC Biotechnology, São Paulo, Brazil) and photographed using a photocomputer.

The qPCR reactions were performed in an thermocycler iQ5 (Bio-Rad, Hercules, California, USA), using contained 4 µL Hot FirePol (5X), 0.4 µL each primer (10 pMol),

1 μL each sample (4 ng / μL) and Milli- Q to complete a final volume of 20 μL . The conditions for this qPCR were: initial activation for 12 minutes at 95 °C, followed by 40 cycles of denaturation for 15 seconds at 95 °C, annealing for 30 seconds at 60 °C and extension for 30 seconds at 72 °C. At the end of the cycles the samples were subjected to melting analysis at 65-95 °C. After completion of the reaction, the generated files were submitted to visualization in the equipment software. Samples with melting temperature (T_m) close to 80 °C were considered positive⁽¹¹⁾.

RESULTS

Among the 49 samples, 41 samples were from asymptomatic patients and eight samples were from patients with a clinical diagnosis of laryngeal papillomatosis. HPV DNA was detected in only one sample out of eight that were extracted from patients known to have lesion. This detection was performed by both conventional PCR and qPCR. The positive sample was the only one among the others that was collected with the exfoliation of the lesion itself caused by laryngeal papillomatosis, thus suggesting that the presence of the lesion and the collection procedure is crucial for the detection of HPV DNA by PCR. Figure 1-A shows the agarose gel electrophoresis where we can observe the presence of a 150 bp fragment corresponding to the expected amplification.

The qPCR reaction, performed with the same samples as conventional PCR, generated a melting curve presenting a single positive sample with T_m equal to 77 °C, corresponding to the specific T_m for this amplification (Figure 1-B).

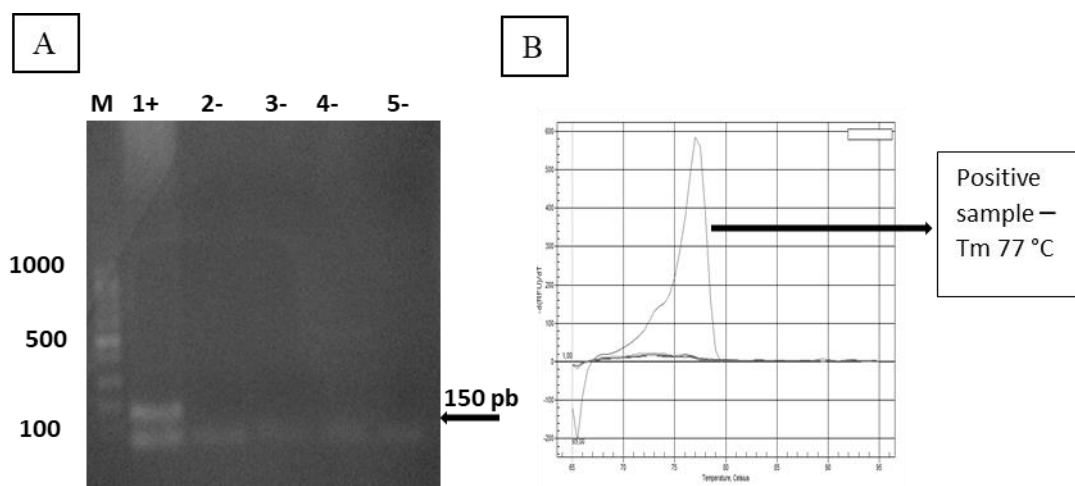


Figure 1. A- Agarose gel electrophoresis Legend: M: molecular weight marker; 1: positive sample; 2 to 5: negative samples. B- HPV melting curve obtained by amplifying the L1 region flanked by GP 5+ and GP 6+ primers.

DISSUSSION

The methodology employed in the collection of material for HPV DNA detection by PCR is decisive for the effectiveness of this procedure. This fact was observed in this study, since it was only possible to detect HPV DNA in the sample collected directly from the lesion. Castro and Filho⁽¹²⁾ study that even using sensitive techniques such as PCR, the detection rate may vary from 0 to 100% and, mention that the large difference between the results can be attributed to errors at the time of collection and highlight the great difficulty in performing detection HPV in swabs and biopsy samples.

Different rates of HPV DNA detection by PCR are observed in recent studies. This difference suggests a variation in the ability to amplify DNA fragments of different sizes and specific HPV types, and this difference may also be linked with the materials types used (smears, frozen, paraffin), the anatomical location of the injury, population issues and oligonucleotide designs⁽¹³⁾.

Tristão et al.⁽¹⁴⁾ performed conventional HPV PCR detection on 125 samples of oral mucosa scrapings collected using the “peace fields” brush and, viral DNA was found in only 29 samples (23.2%), according to the authors the samples were extracted from randomly chosen men and women.

In another study, researchers found a percentage of positive samples similar to the above, but for DNA extraction they did not use swabs or brushes, they used tumors in paraffin block, collected from patients with histological diagnosis of oral cavity and oropharynx squamous cell carcinoma. Of the 82 tumors extracted, 21 (25.6%) had HPV DNA⁽¹⁵⁾. This result suggests that the rate of viral DNA obtained from cell collection by brushes or swabs is very close to that obtained by direct extraction of biopsy samples⁽⁹⁾.

Obtaining only one positive sample in our work, may still be justified by the use of a commercial viral DNA extraction kit. Abrão et al.⁽⁹⁾, performed a comparison between DNA extraction from oral mucosa cells, using NaCl and commercial kit extraction and, observed that the DNA obtained by the extraction by kit, was of better quality, but had lower concentration and, a larger volumes were needed for PCR reactions performed below. Therefore, according to the authors, commercial kit extraction presents higher cost, lower yield and longer execution time when compared to extraction with NaCl. Thus, the use of DNA extraction from mucosal cells, using NaCl, could be an option to increase the DNA concentration obtained in the samples of this study and thus enable the detection of viral DNA.

CONCLUSION

The present study shows that the use of conventional PCR and qPCR for HPV detection in samples of asymptomatic pediatric patients, with clinically evaluated laryngeal papillomatosis, had low sensitivity. The sample type collected or even the DNA extraction kit used may have potential interference in the obtained results. Further studies are needed to determine a DNA collection and extraction technique to make PCR detection more efficient.

ACKNOWLEDGMENT

We thank CAPES for the scholarship.

REFERENCES

1. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Programa Nacional de controle do Câncer de Colo Uterino**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer; 2016.
2. DERKEY, C. S. **Recurrent Respiratory Papillomatosis**. *The Laryngoscope*, v. 111 (1), p. 57-69, 2001.
3. DOYLE, D. J., HENDERSON, L. A., LEJEUNE, F. E., & MILLER, R. H. Changes in human papillomavirus typing of recurrent respiratory papillomatosis progressing to malignant neoplasm. **Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery**, 120(11), 1273-1276, 1994.
4. El Achkar, V. N. R., Duarte, A., Carlos, R., León, J. E., Ribeiro-Silva, A., Pignatari, S. S. N., & Kaminagakura, E. (2019). Histopathological features of juvenile-onset laryngeal papillomatosis related to severity. *Head & neck*, 41(5), 1412-1417.
5. SYRJANEN, S. Current concepts on human papillomavirus infections in children. **Apmis**, 118(6-7), 494-509, 2010.
6. MERCKX, M., ARBYN, M., MEYS, J., WEYERS, S., TEMMERMAN, M., & BROECK, D. V. **Transmission of carcinogenic human papillomavirus types from mother to child: a meta-analysis of published studies**. *European Journal of Cancer Prevention*, 22(3), 277-285, 2013.
7. GIULIANO, A. R. et al. Methylation of HPV 16 and EPB41L3 in oral gargles: Associations with oropharyngeal cancer detection and tumor characteristics.

- International Journal of Cancer**, p. ijc.32570, 26 jul. 2019.
8. MARQUES, M. DA P. C. et al. Comparative study between biopsy and brushing sampling methods for detection of human papillomavirus in oral and oropharyngeal cavity lesions. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 81, n. 6, p. 598–603, 2015.
 9. ABRÃO, M. G. et al. Padronização da técnica de extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl: aplicação no estudo do gene PROP1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 6, p. 978–982, 2005.
 10. JACOBS, M. V. et al. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 901–905, 1995.
 11. CUBIE, H. A. et al. Rapid real time PCR to distinguish between high risk human papillomavirus types 16 and 18. **Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology**, v. 54, n. 1, p. 24–29, 2001.
 12. CASTRO, T. P. P. G.; FILHO, I. B. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 72, n. 2, p. 272–281, 2006.
 13. VENCESLAU, E. M. et al. HPV detection using primers MY09/MY11 and GP5+/GP6+ in patients with cytologic and/or colposcopic changes. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 50, n. 4, p. 280–285, 2014.
 14. TRISTÃO, W. et al. Estudo epidemiológico do HPV na mucosa oral por meio de PCR. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 78, n. 4, p. 66–70, 2012.
 15. PETITO, G. et al. Human papillomavirus in oral cavity and oropharynx carcinomas in the central region of Brazil. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 83, n. 1, p. 38–44, jan. 2017.

Artigo aprovado - Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial

Caixa de entrada x



JBPML - GNPapers <gnpapers@gnpapers.com.br>
para eu ▾

29 de nov. de 2019 20:23



JBPML | Jornal Brasileiro de
Patologia e Medicina
Laboratorial
Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine

Ilmo(a) Sr.(a) Prof(a), Dr(a) Aline Rodrigues Gama

Número do artigo: 234
Categoria: Artigo Original

Informamos que o artigo **Detecção de HPV em amostras de mucosa oral em pacientes pediátricos** encaminhado ao Corpo Científico recebeu parecer favorável para publicação na *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* em espaço e data a serem definidos.

Agradecemos pela escolha de nossa editora para o envio de seu trabalho, ressaltando que nos sentiremos honrados em receber outros artigos para futuras publicações.

Apêndice III

Artigo: *Providencia rettgeri* CRR isolated from water for human consumption

(*Providencia rettgeri* CRR isolado da água para consumo humano)

Providencia rettgeri CRR isolated from water for human consumption*Providencia rettgeri* CRR isolated from water

Gama AR^a, Kikuda R^b, Gomes RP^a, Barbosa MS^a, Vieira JDG^a, Carneiro LC^a

^a*Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, 235 street, Goiânia, GO, Brazil.*

^b*State University of Goiás, 14 street 625, Morrinhos, GO, Brazil.*

Academy Section: BIOLOGICAL SCIENCES*Abstract*

Providencia rettgeri is an opportunistic pathogen related to gastrointestinal and urinary infections. In this study, the phenotypic and molecular identification of a *P. rettgeri* isolated from a sample of water for human consumption in Brazil was carried out. The antibacterial susceptibility profile was also observed, characterizing it as a resistant multidrug bacterium.

Keywords: Microbiology, Multidrug-resistance, Enterobacteriaceae, Sequencing.

Providencia rettgeri is a gram-negative, mobile bacillus, belonging to the family Enterobacteriaceae, present in the soil and waters polluted mainly by human feces (CLIFFORD et al., 2012). Although it was initially identified as a member of the intestinal microbiome of nematodes, insects, birds and mammals, this bacterium has been considered an opportunistic pathogen in humans causing acute infections in the gastrointestinal and urinary tract (Choi and Yoon 2018; Ntshobeni and Essack 2019; Wang and Brucker 2019). Frames of infection by *P. rettgeri* can be difficult to treat, since this organism has a high resistance to antibacterials used in the medical clinic (Olaitan et al. 2016). We present here a phenotypic, molecular characterization and the antibacterial susceptibility profile of *P. rettgeri* isolated of water for human consumption.

P. rettgeri CRR was isolated from water samples from the lake in the city of Goiatuba in the state of Goiás, Brasil. The water of this lake is used by the local population for consumption and for the watering of animals that live in the park. The tests: Gram staining, production of catalase, oxidase, gelatinase, DNase, urease, H₂S, indole, acetoin e decarboxylases (arginine and lysine), fermentation of glucose, lactose, maltose and

sucrose, use of citrate, motility, phenylalanine deaminase and hemolytic profile were used for phenotypic identification.

P. rettgeri CRR was cultured in Nutrient Agar and incubated for 24 h at 30°C before DNA extraction. The genomic DNA was extracted according to a methodology described by Van Soolingen et al. (1994). Then, was performed the amplification of the coding region for the 16S rRNA subunit by PCR with the use of the universal primers 27F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1541R (5'- AAGGAGGTGATCCAGCC-3'). The obtained PCR product was purified with the agarose extraction kit (Cellco®) following the manufacturer's protocol. The 16S rRNA gene primers 27F, 1541R, 926F (5'-AAACTYAAAKGAATTGACGG3'), 530F (5'-TGACTGACTGAGTGCCAGCMGCCGCGG-3'), 519R (5'-GTNTTACNGCGGCKGCTG -3') and 907R (5'-GTNTT ACNGCGGCKGCTG -3') were used for sequencing, being this reaction carried out in an ABI 3500 sequencer from Applied Biosystems®. The sequences were not analyzed in the CodonCode Aligner software (CodonCode Corporation) and then compared with the available sequences in the GeneBank NCBI, using the BLASTn.

To verify the susceptibility profile of *P. rettgeri* CRR to antibacterials, the sample was submitted to the Difusion Disk test according to the recommendation of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Clinical and laboratory standards 2017). Following the CLSI recommendation the following antibacterials were used in the test: ampicillin (30 µg/disk), amoxicillin+clavulanate (20 µg/disk), ampicillin (10 µg/disk), aztreonam (30 µg/disk), ceftazidime (30 µg/disk), ceftriaxone (30 µg/disk), ciprofloxacin (5 µg/disk), gentamicin (10 µg/disk), imipenem (10 µg/disk), novobiocin (30 µg/disk), piperacilin 100/10 µg/disk), sulbactam (30 µg/disk), sulfazotrim (1.25/23.75 µg/disk) e tetracycline (30 µg/disk).

P. rettgeri CRR it has biochemical characteristics corresponding to the genus *Providencia* spp., such as catalase positivity, glucose fermentation, arginine, citrate, lysine and motility and negativity to acetoin, lactose fermentation, sucrose and maltose, DNase, esculin and phenylalanine. The comparative analysis in the BLASTn, from the getting of the *contig* in 1413 base pairs, demonstrated identity of the 96,12%, Query-cover of the 98% and E-value de 0.0, when compared to the deposited sequence of the strain *P. rettgeri* DSM 4542. *P. rettgeri* CRR was deposited in the GeneBank with the access number: MN116684.

P. rettgeri CRR presented resistance to ampicillin, ceftazidime, ceftriaxone, gentamicin, amoxicillin + clavulonate, imipenem, sulbactam and novobiocin and sensitivity to

aztreonam, ciprofloxacin, amikacin, tetracycline, sulfazotrim and piperacillin. Because it is resistant to multiple antibacterials belonging to different classes, this bacterium can be defined as a bacteria Multidrug Resistant (MDR). Bacteria with this profile are a serious global public health problem, people who get infections by these organisms are more prone to treatment failure, prolonged hospitalization, invasive procedures and in some cases death (Sanchez and Gustot 2019).

The presence of *P. rettgeri* in drinking water indicates fecal contamination, since enterobacteria are part of the gastrointestinal tract of humans and warm-blooded animals. Although the presence of such bacteria is already a public health concern in itself, the great problem is not only concerned with this, but also the multiresistance observed in bacteria isolated from the environment (Riley 2014). For this reason, practical measures should be taken by the consumer population and by the competent authorities to avoid contamination by this bacterium, since infections caused by *P. rettgeri* can lead to serious health problems.

Acknowledgements

To Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), by scholarship.

References

CHOI W, JI YS, YOON KC. 2018. A case of bilateral keratitis caused by *Providencia alcalifaciens*: a rarely encountered ocular pathogen. *Int J Ophthalmol* 38 (3):1325–1328.

CLIFFORD RJ, HANG J, RILEY MC, ONMUS-LEONE F, KUSCHNER RA, LESH O EP, WATERMAN PE. 2012. Complete Genome Sequence of *Providencia stuartii* Clinical Isolate MRSN 2154. *J Bacteriol* 194(14):3736–3737.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS. 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA Title.

NTSHOBENI NB, ESSACK SY. 2019. Draft Genome Sequence of *Providencia rettgeri* APW139_S1, an NDM-18-Producing Clinical Strain Originating from Hospital Effluent in South Africa. *Microbiol Resour Announc* 8(21):18–19.

OLAITAN AO, DIENE SM, ASSOUS MV, ROLAIN JM. 2015. Genomic Plasticity of Multidrug-Resistant NDM-1 Positive Clinical Isolate of *Providencia rettgeri*. *Genome Biol Evol* 8(3):723–728

RILEY LW. 2014. Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infect* 20(5):380–390.

SANCHEZ LO, GUSTOT T. 2019. Multidrug-Resistant Bacterial Infection in Patients with Cirrhosis. A Review. *Curr Hepatol Rep* 18(1):28–35.

VAN SOOLINGEN D, DE HAAS PE, HERMANS PW, VAN EMBDEN JD. 1994. DNA Fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. In *Methods in enzymology* 235:196–205.

WANG GH, BRUCKER RM. 2019. Genome Sequence of *Providencia rettgeri* NVIT03, Isolated from *Nasonia vitripennis*. *Microbiol Resour Announc* 8(3):01157-18.