



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL
E SAÚDE PÚBLICA**

Eni Liudmiliza Leite Buma

**Identificação e distinção de fonte de poluição fecal na Bacia Hidrográfica Ribeirão
João Leite por metodologias moleculares**

**Goiânia
2017**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS 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

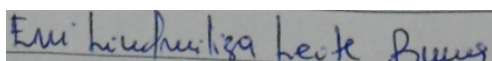
Nome completo do autor: Eni Liudmiliza Leite Buma

Título do trabalho: **Identificação e distinção de fonte de poluição fecal na Bacia Hidrográfica Ribeirão João Leite por metodologias moleculares**

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)

Data: 27 / 03 / 2017

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.

Eni Liudmiliza Leite Buma

**Identificação e distinção de fonte de poluição fecal na Bacia Hidrográfica
Ribeirão João Leite por metodologias moleculares**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Tropical e Saúde Pública da Universidade
Federal de Goiás para obtenção do Título
de Mestre em Medicina Tropical e Saúde
Pública.

Orientador: Prof. Dr. André Kipnis
Co-orientadora: Dr^a Maria das Graças
Cabral Pereira

**Goiânia
2017**

Buma, Eni Liudmiliza Leite

Identificação e distinção de fonte de poluição fecal na Bacia
Hidrográfica Ribeirão João Leite por metodologias moleculares
[manuscrito] / Eni Liudmiliza Leite Buma, André Kipnis, Maria das
Graças Cabral Pereira. - 2017.
xiv, 83 f.

Orientador: Profa. Dra. André Kipnis; co-orientadora Dra. Maria
das Graças Cabral Pereira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós
Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Cidade de Goiás,
2017.

Bibliografia. Anexos.

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

1. Água bruta superficial. 2. poluição fecal. 3. Bacteroidales. 4.
marcador genético 16S rRNA.. I. Kipnis, André. II. Pereira, Maria das
Graças Cabral . III. Kipnis, André , orient. IV. Pereira, Maria das Graças
Cabral, co-orient. V. Título.

CDU 579



ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE ENI LIUDMILIZA LEITE BUMA – Aos sete dias do mês de março do ano de 2017 (07/03/2017), às 08:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. ANDRÉ KIPNIS, DIVINA DAS DORES DE PAULA CARDOSO e MENIRA BORGES DE LIMA DIAS E SOUZA, para, sob a presidência do primeiro, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: **“IDENTIFICAÇÃO E DISTINÇÃO DE FONTE DE POLUIÇÃO FECAL NA BACIA HIDROGRÁFICA RIBEIRÃO JOÃO LEITE POR METODOLOGIAS MOLECULARES”**, em nível de MESTRADO, área de concentração em MICROBIOLOGIA, de autoria de ENI LIUDMILIZA LEITE BUMA, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo Orientador, Prof. Dr. ANDRÉ KIPNIS, 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 ao autor da dissertação 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. 1304/2014 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora

Prof. Dr. André Kipnis

Profa. Dra. Divina das Dores de Paula Cardoso

Profa. Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza

Aprovada / Reprovada

Aprovada
APROVADA
APROVADA

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Habilitada, cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de **MESTRE EM MEDICINA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA**, na área de concentração em MICROBIOLOGIA, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 10 h 20 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar eu, KARINY VIEIRA SOARES E SILVA, secretária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

Prof. Dr. André Kipnis (IPTSP/UFG)

Profa. Dra. Divina das Dores de Paula Cardoso (IPTSP/UFG)

Profa. Dra. Menira Borges de Lima Dias e Souza (IPTSP/UFG)

Secretário da Pós-Graduação:

Assinatura

André Kipnis
Divina das Dores de Paula Cardoso
Menira Borges de Lima Dias e Souza
Kariny Vieira Soares e Silva

DEDICATÓRIA:

Dedico esta dissertação, ao meu filho Enylson Hamide Mussá pela coragem e amor incondicional nutridos um pelo outro, aos meus exemplos de vida, meus pais Lucas Mocha Buma e Célia Marta Machalela Leite por terem me incentivado a lutar pelo que eu acredito e terem permanecido sempre do meu lado, pela felicidade, força, confiança que depositaram em mim nestes longos anos e me tornaram nesta mulher de sonhos! Por me ensinarem o “B ABA” da vida e o quão é importante respeitar e dar amor ao próximo sem precisar esperar algo em troca.

AGRADECIMENTOS

Ao Ser Supremo, pela vida, direcionamento, pela oportunidade de eu poder alcançar maturidade e sabedoria de abraçar os estudos, me conceder força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas difíceis e me enviar a luz quando muitas vezes procuro respostas, por ser essa pessoa que sou que insiste, persiste e acredita sempre que tudo neste mundo é possível desde que se tenha fé, força de vontade e coragem.

Ao MEU PAI Lucas e MINHA MÃE Célia, sempre companheiros e presente, pela força e apoio incondicional mesmo distante partilhando angustias, incertezas e muitas alegrias.

Ao MEU FILHO, tão pequeno te deixei para seguir um desafio que o destino me impôs.

Ao MEU IRMÃO Sicandar Rógerio Costley White, sempre esteve ao meu lado me apoiou e é meu suporte!

Dedico ainda, em especial ao meu ORIENTADOR André Kipnis e a minha CO-ORIENTADORA Maria das Graças Cabral Pereira pelo apoio, confiança, paciência, força, incentivo e excelente orientação,

Sem o vosso apoio este trabalho não teria tido um princípio, meio e fim. A ambos, o meu muito, MUITO OBRIGADA!

A PROFESSORA Ana Paula Junqueira Kipnis, pelos momentos de ensinamentos, que continue a ser essa “Professora-mãe” para seus orientandos.

AOS AMIGOS/COLEGAS do Lab 1 em 2 (Imunologia e Bacteriologia Molecular) por compartilharam comigo esses momentos de aprendizado, por me ajudarem no que não sabia, ao Rogerio, Lázaro, Fábio, Luma, Rayane, Larissa, Melissa, a Viviane, o André, Correia, não me esquecendo da Adeline, Monalisa, Tatiane, Bruno, Danilo, Victor, o meu muito obrigada pela paciência.

A todos os professores que fizeram parte desse caminhar, funcionários e técnicos de laboratórios do IPTSP/UFG (Elaine e o Alex), pelo apoio, paciência e dedicação, momentos partilhados e aprendidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de mestrado concedida para que eu pudesse trilhar este caminho acadêmico.

Ao Sistema de Saneamento de Água de Goiás (SANEAGO) e seus técnicos de campo o Daniel, a Dr^a Aline, pelo apoio e dedicação

AOS AFRICANOS, que tiveram coragem de atravessar o Pacífico para novos conhecimentos buscar, o meu grande respeito aos meninos da graduação pela força de vontade de longe de todos estarem aqui lutando para adquirirem novos conhecimentos.

AOS MEUS AMIGOS, IRMÃOS MOÇAMBIÇANOS Daniel Zacarias, Vanito Frei, Eduardo Humbana, Eduardo Bata, Emídio Luís, Oscar Namohopula, Quiraque, cotas Albino Massimacule e Ernesto Macarringue, a nossa menina (Niki) Nelsa Mondlhane, Lucinda Majamba, Roda Estevão sem vocês estar, estudar na Universidade Federal de Goiás e viver em Goiânia não teria o mesmo sentido e não seria tão agradável e inesquecível, o tempo seria longo e as horas não passariam, vocês me fizeram estar no Atlântico e ao mesmo tempo no Índico, no nosso belo Moçambique,

Muito abençoada por vos ter conhecido.

Sem me esquecer de todas amigas brasileiras, vocês tornaram meus dias menos dolorosos, MUITO GRATA!

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABELAS	ix
SÍMBOLOS, SIGLAS, E ABREVIATURAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1. Qualidade de água para o consumo humano	1
1.1.1. Parâmetros microbiológicos	4
1.1.2. Parâmetros físico-químico da qualidade da água	4
1.1.3. Histórico dos avanços no uso de microrganismos indicadores de poluição fecal na água.....	5
1.1.4. Indicadores microbiológicos de poluição fecal em água ambiental.....	6
1.2. Bactérias coliformes totais.....	7
1.2.1. Bactérias coliformes termotolerantes.....	7
1.2.2. Indicadores microbiológicos alternativos de poluição fecal	7
1.2.2.1. <i>Clostridium</i> spp.....	8
1.2.2.2. <i>Bifidobacterium</i>	8
1.2.2.3. <i>Bacteroides</i> spp.....	9
1.3. Marcadores moleculares na identificação da fonte de poluição fecal	10
1.4. Manancial Ribeirão João Leite.....	11
2. JUSTIFICATIVA	12
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivo geral	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1. Área de estudo e localização geográfica dos pontos de coleta de água bruta Superficial.....	16
4.1.1. Amostras de água bruta superficial	18
4.2. Estudo microbiológico	19
4.2.1. Indicador microbiológico de poluição fecal.....	19
4.2.2. Número de colônias de <i>E. coli</i> termotolerante por 100 mL de água bruta superficial.....	20

4.3. Estudo Molecular	20
4.3.1. Amostras fecais	20
4.3.2. Extração do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) total das amostras fecais	21
4.3.3. Produção do controle <i>Bacteroidales</i> 16S rRNA hospedeiro-específico	21
4.3.3.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	21
4.3.3.2. Purificação do produto amplificado por PCR	22
4.3.3.3. Clonagem do produto da PCR	22
4.3.3.4. Extração de DNA Plasmidial por lise alcalina com dodecil sulfato de sódio (SDS)	23
4.3.3.5. Digestão e Purificação do DNA Plasmidial	24
4.3.3.6. Sequenciamento do produto clonado	24
4.3.3.7. Quantificação do DNA plasmidial e do DNA de amostras fecais	25
4.4. Identificação do marcador 16S rRNA <i>Bacteroidales</i> em DNA de amostras fecais	25
4.4.1. PCR	26
4.4.2. PCR em tempo real	26
4.5. Sensibilidade e especificidade dos oligonucleotídeos 16S rRNA <i>Bacteroidales</i> em DNA de amostras fecais	28
4.6. Água bruta superficial	29
4.6.1. Extração do DNA total em amostras de água bruta superficial	29
4.6.2. Detecção e amplificação do marcador 16S rRNA <i>Bacteroidales</i> em água bruta superficial	29
5. RESULTADOS	31
5.1. Análise microbiológica dos pontos de estudo localizados na Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite	31
5.1.1. Variação da média de <i>E. coli</i> CFU/100 mL por município de coleta no período de setembro de 2015 a março de 2016	33
5.1.2. Análises físico-químicas da qualidade da água superficial dos pontos estudados na Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite	35
5.2. Análises moleculares para amostras fecais	38
5.2.1. Sensibilidade dos oligonucleotídeos iniciadores para detecção e amplificação do marcador 16S rRNA <i>Bacteroidales</i> universal	38
5.2.2. Sensibilidade e especificidade do oligonucleotídeos utilizados na técnica da PCR convencional	38
5.2.3. Sensibilidade e especificidade dos oligonucleotídeos iniciador hospedeiro	

específico utilizados na PCR em tempo real	39
5.3. Identificação do marcador genético 16S rRNA <i>Bacteroidales</i> em água bruta superficial da Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite	41
5.3.1. Aplicação do oligonucleotídeos iniciadores BacUni em água bruta superficial	41
5.3.2. Aplicação de oligonucleotídeos iniciadores para identificação do marcador genético 16S rRNA <i>Bacteroidales</i> específico–humano em água bruta superficial da Bacia Hidrográfica Ribeirão João Leite	41
5.3.3. Aplicação de oligonucleotídeos iniciadores para identificação do marcador genético 16S rRNA <i>Bacteroidales</i> específico–bovino em água bruta superficial	42
6. DISCUSSÃO	44
7. CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO I: Artigo	56
ANEXO II: Comissão de Ética no Uso de Animais e humano	71
ANEXO III: Sequenciamento do clone plasmidial humano	76

Figuras

- Figura 1:** Mapa representando a localização da Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite em relação ao Estado de Goiás e ao Brasil. Localização dos 12 pontos de coleta de água bruta superficial ao longo da Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite e 1 ponto localizado na Captação Jaime Câmara (ponto 1) 17
- Figura 2:** Crescimento de colônias de *E. coli* termotolerantes crescidas em meio de cultura HiCrome M-Tec Agra após a realização da técnica de MF da água bruta superficial da Bacia Hidrográfica Ribeirão João Leite 32
- Figura 3:** Ausência de crescimento bacteriano no meio de cultura HiCrome M-Tec Agra apresentado pelo controle negativo pela técnica da MF 32
- Figura 4:** Variação da média da *E. coli* CFU/100mL de água bruta superficial em relação aos Municípios localizados ao longo da Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite e ponto de captação 34
- Figura 5:** Meses com maior concentração de *E. coli* termotolerante ao longo de período de estudo 35
- Figura 6:** Resultado de duas amostras positivas para a presença de marcador específico bovino em amostras de DNA bovino nos pontos de alta influência agropecuária (Córregos Jurubatuba e Bandeira), quando aplicado os oligonucleotídeos iniciadores CF128f - Bac708r 42

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1: Principais doenças de veiculação hídrica e seus agentes patogênicos	3
Tabela 2: Concentração de espécies bacterianas viáveis nas fezes de humanos saudáveis (crianças, adultos e idosos)	11
Tabela 3: Dado relativos as espécies de produção pecuária localizados nos municípios que cobrem a extensão da Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite	16
Tabela 4: Localização geográfica dos pontos de coleta de água bruta superficial na Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite e no ponto de Captação Jaime Câmara	18
Tabela 5: Oligonucleotídeos aplicados a técnica de PCR Convencional, PCR SybrGreen e PCR TaqMan	25
Tabela 6: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas do marcador genético 16S rRNA <i>Bacteroidales</i> indicador de poluição fecal utilizado neste estudo	28
Tabela 7: Valores mínimos, máximos e médios de <i>E. coli</i> termotolerantes (CFU/100mL de água bruta superficial) obtidos pela técnica da MF por ponto de coleta no período de setembro de 2015 a março de 2016	33
Tabela 8: Resultado físico-químico das amostras dos pontos de coleta localizados na Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite durante o período de setembro de 2015 a março de 2016	37
Tabela 9: Números de amostras positivas para PCR convencional apresentados na avaliação dos oligonucleotídeos iniciadores para a presença do hospedeiro específico bovino (CF128f – Bac708r) e específico – humano (HF183 f – Bac708r) em DNA amostral fecal humanas e de diferentes animais	39
Tabela 10: resultados da reação de amplificação dos oligonucleotídeos iniciador hospedeiro – específicos aplicados em DNA de amostras fecais humanas e animais pela PCR em tempo real	40

Tabela 11: Intervalo de *Ct* apresentados em DNA amostral não alvo amplificados pela técnica de PCR em tempo real para o marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* 41

Tabela 12: Resultados das análises dos oligonucleotídeos iniciadores para identificação do marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* específico ruminante em água bruta superficial em pontos com influência agropecuária localizados na Bacia Hidrográfica Ribeirão Leite 43

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURA

BacUni	<i>Bacteroidales</i> Universal
BacHum	<i>Bacteroidales</i> humano
CEP-UFG	Comitê de ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás
CEAU	Comissão de Ética no Uso de Animais
CERH	Conselho Estadual de Recursos Hídricos de Goiás
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CF	coliformes fecais
CFU	Unidade formadora de colônias do inglês “ <i>colony forming units</i> ”
<i>Ct</i>	<i>Cycle threshold</i>
CT	Coliformes totais
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
ETA	Estação de tratamento de água
EPA	Agência de proteção Ambiental
FN	Falso negativo
FP	Falso positivo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas
MF	Membrana filtrante
MST	<i>Search Microbe Tracking</i>
PCR	Reação de cadeia polimerase
Se	Sensibilidade
Sp	Especificidade
OMS	Organização Mundial da Saúde
SANEAGO	Saneamento de Goiás
SDS	Dodecilsulfato de sódio
μS/cm	Microsiemens por centímetro
VN	Verdadeiro negativo
VP	Verdadeiro positivo

RESUMO

Cursos de água que atravessam áreas de produção, sejam elas agrícolas, de pastagens ou habitacional, podem ser direcionadas a bacias hidrográficas e redistribuídas a redes de estação de tratamento de água e abastecimento público. Normalmente, águas de mananciais apresentam elevados níveis de concentrações de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *E. coli*. Entretanto, o indicador microbiológico de poluição fecal *E. coli*, não apresenta especificidade, limitando, portanto, a identificação do hospedeiro causador em determinada corrente de água. Consequentemente, as bactérias do gênero *Bacteroides* vêm sendo sugeridas como potenciais indicadores alternativos de poluição fecal. *Bacteroides* são estritamente anaeróbicas, exclusivas e específicas ao trato gastrointestinal humano, apresentando especificidade a animais homeotérmicos. Por serem capazes de resistir em ambientes aeróbios, são consideradas como promissores indicadores de poluição fecal recente. A sua identificação em corpos de água é geralmente realizada pela presença do marcador genético 16S rRNA da ordem *Bacteroidales*. Este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica e físico-química da água bruta superficial da Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite, responsável por 50% de abastecimento da cidade de Goiânia, e também, a avaliação do marcador 16S rRNA *Bacteroidales* como indicador da fonte de poluição fecal humana e/ou animal em águas desta bacia. Para tal, foram coletadas 91 amostras de água bruta superficial de 13 pontos localizados ao longo da Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite, assim como, amostra fecal humana e animal de modo a testar a sensibilidade e especificidade de oligonucleotídeos iniciadores para o rastreamento do marcador 16S rRNA *Bacteroidales*. Baseado na Resolução CONAMA 357/2005 Classe II para águas doces, 5,5% (5/91) das amostras apresentaram nível de turbidez acima de >100 NTU (119-180 NTU), enquanto que 33% apresentaram valores inferiores a $<10^3$ CFU/100 mL para *E. coli* termotolerante, sendo os valores médios encontrados entre $1,44 \times 10^3$ – $5,5 \times 10^4$ CFU/100 mL. O marcador 16S rRNA *Bacteroidales* hospedeiro bovino (ruminante) foi identificado em água bruta superficial dos pontos coletados com alta influência agropecuária, em contrapartida, dos 5 pontos analisados não foi detectado a presença do marcador 16S rRNA *Bacteroidales* como indicador de poluição fecal humana. Os resultados obtidos poderão colaborar com medidas sanitárias que visam a redução do nível da turbidez e na identificação da origem da contaminação microbiológica fecal nesses corpos d'água minimizando, desta forma, o risco de disseminação das doenças de veiculação hídrica.

Palavras chave: Água bruta superficial, poluição fecal, *Bacteroidales*, marcador genético 16S rRNA.

ABSTRACT

Water courses that pass through areas of production, whether agricultural, pasture or housing, are subject to discharge of municipal and industrial sewage systems. These waters can be directed to river basins and redistributed to networks of water treatment and public supply. Normally, surface raw water has high concentrations of total coliforms, thermotolerant coliforms and *E. coli*. However, the microbiological indicator of fecal contamination, *E. coli*, does not present specificity, limiting, therefore, the host identification causing fecal pollution in water stream. As an alternative, bacteria of the genus *Bacteroides* have been suggested as potential alternative indicators of fecal pollution. *Bacteroides* are strictly anaerobic, exclusive and specific to the human gastrointestinal tract, and are also present in homeothermic animals. Due to its inability to withstand aerobic environments, *Bacteroides* are considered as promising indicators of recent fecal pollution. Their identification in water bodies is usually performed by the presence of the 16S rRNA genetic marker of the order *Bacteroidales*. The objectives of this study were to evaluate the microbiological and physico-chemical quality of the Ribeirão João Leite Basin water, responsible for supplying 50% of water to the city of Goiânia, and the evaluation of the 16S rRNA *Bacteroidales* marker as an indicator of human and / or animal fecal pollution in waters of this basin. For this purpose, 91 samples of surface freshwater were collected from 13 points located along the Ribeirão João Leite Hydrographic Basin. Also, human and animal fecal samples were collected to test the sensitivity and specificity of primers to trace the 16S rRNA *Bacteroidales* marker. Based on the CONAMA Resolution 357/2005 Class II for fresh water, 5.5% (5/91) of the samples had a turbidity level above > 100 NTU (119-180 NTU), while 33% presented values below $<10^3$ CFU / 100 mL for thermotolerant *E. coli*. The mean values were found to be between 1.44×10^3 - 5.5×10^4 CFU / 100 mL. The 16S rRNA *Bacteroidales* ruminant host marker was identified in points with high agricultural and cattle influence, on the other hand, the presence of the 16S rRNA *Bacteroidales* marker as an indicator of human fecal pollution was not detected in the 5 analyzed points. The results obtained will be able to collaborate with sanitary measures to reduce the level of turbidity and also to identify the source of the fecal contamination in these bodies of water, thus minimizing the risk of dissemination of waterborne diseases.

Key words: Surface raw water, fecal pollution, *Bacteroidales*, 16S rRNA genetic marker.

1. REVISÃO DA LITERATURA

Água é a fonte imprescindível para a criação e manutenção de toda a vida no planeta, recurso indispensável para a subsistência e desenvolvimento da agricultura, da indústria e da qualidade de vida no campo e nas cidades (CERH-GO, 2012).

Pode-se verificar que, do total de água existente em nosso planeta, cerca de 97,5% são de águas salgadas e 2,5% são de águas doces. Entretanto, cerca de 68,7% dos recursos de água doce são constituídos por águas armazenadas nas regiões polares e em geleiras diversas, e 30,1% se encontram em reservatórios subterrâneos (CARVALHO, 2012). O Brasil possui a maior disponibilidade hídrica do mundo, correspondendo a 12%, tendo em território nacional a produção hídrica de 182.170 m³/s.

De acordo com o relatório elaborado no ano de 2014 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), para os objetivos do milênio, 9% da população global (setecentos e quarenta e oito milhões de pessoas) continuam a usar fonte de água não tratada para o seu consumo, dos quais, um quarto (cento e setenta e três milhões) ainda dependem do uso direto de água da superfície. Ainda segundo este relatório, muitas pessoas têm acesso a fontes de água que é imprópria para consumo, contaminada com patógenos e impurezas químicas, o que leva a concluir que a água potável não está igualmente distribuída para todos as pessoas e muitas delas não têm acesso.

A qualidade microbiológica da água tem sido uma preocupação aos sistemas de saúde pública, devido a disseminação de doenças de veiculação hídrica como as infecciosas, virais e parasitárias. Desta forma, vários estudos vêm sendo realizados no que cerne a importância da gestão da qualidade de água doméstica no contexto de transmissão de doenças fecal-oral (TREVETT et al, 2005).

1.1. Qualidade de água para o consumo humano

Segundo a Portaria do Ministério da Saúde nº1469 de dezembro de 2000, água potável deve obedecer aos parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos que atendam aos padrões de potabilidade e que não ofereçam riscos à saúde.

De forma análoga, o conceito de poluição deve ser entendido como perda de qualidade da água, ou seja, alterações em suas características que comprometam um

mais usos do manancial. Contaminação é em geral entendida como um fenômeno que apresenta risco à saúde, enquanto que poluição da água indica que um ou mais de seus usos foram prejudicados, podendo atingir o homem de forma direta, pois ela é usada por este para ser bebida, para tomar banho, para lavar roupas e utensílios e, principalmente, para sua alimentação e dos animais domésticos (GREGHI, 2005).

Estimativa realizada em 2012, demonstrou que, mundialmente, cerca de 50.200 mortes foram causadas pelo consumo de água inadequada, assim como 280.000 mortes foram causadas pelo saneamento inapropriado. Ainda, cerca de 361.000 mortes poderiam ser impedidas em crianças menores de cinco anos (USTUN-PRUS et al., 2014).

Doenças de veiculação hídrica são causadas, principalmente, pela ingestão de microrganismos patogênicos entéricos (bactérias, vírus e parasitas) presentes na água poluída com fezes e causando doenças diarreicas responsáveis por grandes surtos e muitas mortes pelo mundo inteiro.

Bactérias patogênicas são responsáveis por numerosos casos de enterites, diarreias infantis e doenças epidêmicas. Os vírus mais comumente encontrados em águas contaminadas por dejetos humanos, entre outros, são os vírus da Hepatite A que causa doença infecciosa que afeta o fígado e os parasitas como *Entamoeba histolytica* que podem ser ingeridos através da água causando doenças como amebíase e com complicações hepáticas (AGUILA et al., 2000; AMARAL et al., 2003).

Os vírus entéricos patogênicos humanos, tais como Adenovírus, Enterovírus e Norovírus, são encontrados em águas residuais humanas e têm sido implicados como importantes agentes causadores de Gastroenterite (GE) em seres humanos devido à exposição a águas residuais e consumo de água contaminada marisco (BEEL et. al., 2016).

Doenças como gastroenterite aguda humana é uma preocupação e gerou estudo por detecção molecular e caracterização do vírus em uma rede hidrográfica impactada por um processo de urbanização desordenada na cidade de Manaus – Brasil (MIAGOSTOVICH et. al, 2007).

No entanto, após a epidemia mundial de cólera, em 1993, o monitoramento ambiental permanente das bacias hidrográficas foi estabelecido em Pernambuco, Brasil, onde a cólera é endêmica (MARQUES et. al, 2013).

A Portaria 2.914 de dezembro de 2011 do Ministério da Saúde dispõe de padrões de controle da qualidade dos mananciais com finalidade para produção e abastecimento de água para o consumo humano e determina que, devem ser analisadas águas dos mananciais de modo a quantificar o número de colônias de *E. coli*. A mesma portaria recomenda a

inclusão do monitoramento de vírus entéricos nos pontos de captação de água provenientes dos mananciais superficiais de abastecimento, com o objetivo de subsidiar estudos de avaliação de risco microbiológico.

Os patógenos mais frequentemente identificados e associados a doenças transmitidas pela água podem ser agrupados em três categorias gerais: bacterianas, protozoárias e virais (BASTOS et. al., 2000), como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1: Principais doenças de veiculação hídrica e seus agentes patogênicos. Adaptado de “Alternative Microbial Indicators of Faecal Pollution: Current Perspective”, 2006; da Inspeção Sanitária em Abastecimento de Água, 2006; e de “Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water”, 2010.

Agente	Doenças
Bacteriano	
<i>Leptospira interrogans</i>	Leptospirose
<i>Escherichia coli</i> particularmente os serotipos O148, O157 e O124	Gastroenterite
<i>Salmonella typhi</i>	Febre tifóide
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera
<i>Shigella spp.</i>	Disenteria bacilar ou shigelose
Viral	
Enterovírus	Gastroenterite, anomalias cardíacas,
	Meningite
	Hepatite infecciosa
Protozoária	
<i>Entamoeba histolytica</i>	Amebíase
<i>Giardia lamblia</i>	Giardíase
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Criptosporidiose

A qualidade da água é avaliada com base em parâmetros físicos, químicos e biológicos, que podem expressar de acordo em concentração ou em forma de valores numéricos (BASTOS, et. al., 2000). Para avaliação da qualidade microbiológica da água é necessário ter em vista o número e diversidade de microrganismos patogênicos, em geral de origem fecal presente na água.

1.1.1. Parâmetro microbiológico

Os padrões microbiológicos usados como indicadores sanitários da qualidade de água são de caráter biológico conhecidos como coliformes totais, coliformes fecais e/ ou

E. coli. Eles são facilmente identificáveis pelas técnicas de controle da qualidade da água ambiental ou potável e, deste modo, a sua presença indicaria uma possível poluição fecal aquática e consequentemente uma possível presença de microrganismos patogênicos.

1.1.2. Parâmetros físico-químico da qualidade da água

Para avaliar a qualidade das águas ambientais assim como tratadas, padrões dos parâmetros físico-químicos tais como turbidez, condutividade, potencial de hidrogênio (pH), a temperatura da água e do ambiente também são decisivos para determinar o nível de potabilidade para o consumo humano.

“A turbidez da água é motivada pela presença de partículas em estado coloidal, em suspensão, matéria orgânica e inorgânica, Apesar de não ser necessariamente causada pela presença de microrganismos, pode indicar a presença dos mesmos” Inspeção sanitária em abastecimento de água, BRASIL (2006).

Com isso, a turbidez da água bruta é um dos principais parâmetros analisados na seleção de tecnologia de tratamento e controle operacional dos processos de tratamento, sendo que, em mananciais superficiais, pode apresentar variações significativas entre períodos de chuva e estiagem. Valores de turbidez em torno de 8,0 NTU (Unidade de Turbidez Nefelométrica) ou menos são imperceptíveis visualmente (Inspeção sanitária em abastecimento de água, 2006).

A Condutividade em ambientes naturais aquáticos é usada como padrão de qualidade sanitária. Para tal, enquanto as águas naturais apresentam teores de condutividade na faixa de 10 a 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$, em ambientes poluídos por esgotos domésticos ou industriais os valores podem chegar até 1.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (LIBÂNIO, et al., 2006).

O pH (potencial hidrogeniônico) é a medida da atividade dos íons hidrogênio e expressa a intensidade de condições ácidas ($\text{pH} < 7,0$) ou alcalinas ($\text{pH} > 7,0$). As próprias características do solo, a presença de ácidos húmicos (cor intensa) ou uma atividade fotossintética intensa podem contribuir para a elevação ou a redução natural do pH (BASTOS, 2007). A alteração do pH provoca em ambientes aquáticos a dissolução de substâncias químicas que irão influenciar na determinação da qualidade da água.

1.1.3. Histórico dos avanços no uso de microrganismos indicadores de poluição fecal na água

No final do século XVIII novas ideias surgiram e foi notado um grande avanço na área microbiológica, o que veio a tornar clara a relação existente entre os microrganismos de veiculação hídrica e as doenças causadas, criando um olhar crítico para a necessidade da melhoria da qualidade e segurança da água potável. Consequentemente, grandes mudanças foram notadas com efeito no que se referia a qualidade e padrões da água para o consumo humano (ASHBOLT et al., 2001).

Estudos sobre bactérias indicadoras de poluição fecal, seus avanços e mudanças sobre a utilização de bactérias como indicadores de qualidade sanitária da água, deu início provavelmente no final do século 19 quando em 1880 Von Fritsch descreveu *Klebsiella pneumoniae* e *K. rhinoscleromatis* como microrganismos pertencentes ao grupo de coliformes indicadores da qualidade da água. Ainda em 1885, em Londres, Percy e Grace Frankland deram início ao primeiro exame de rotina bacteriológico em água, usando meio de gelatina sólido de Robert Koch para contar bactérias. Naquele mesmo ano, Theodor Escherich – descobriu o *Bacillus coli* em amostras fecais humanas e em animais homeotérmicos. Em 1891, Franklands introduziu o termo indicadores bacterianos, reconhecendo que a água pode ser uma fonte de doença e que os microrganismos de esgotos deveriam ser identificados para servirem como potenciais indicadores de poluição perigosa. Em 1892, Schardinger sugeriu a utilização de *E. coli* como um indicador em água e no ano seguinte Blachstein introduziu o termo coliforme. Smith utilizou *E. coli* e outros microrganismos relacionados para indicar uma possível presença de patógenos entéricos em águas nos EUA no ano de 1895, e em 1899, Klein e Houston sugeriram o uso de *Clostridium perfringens* como bactérias indicadoras de poluição fecal.

Já no início do século 20, em 1901, Horrocks sugeriu o uso do termo “coliformes” para as bactérias que se assemelhavam a *B. coli* e em 1902, Winslow e Hunnewell sugeriram a utilização dos *Streptococcus faecalis* como organismos indicadores de poluição. Em 1904, Eijkman sugeriu o uso da *E. coli* como imperativo para ensaios bacterianos devido a sua tolerância ao calor e capacidade fermentativa e em 1907, Winslow e Walker relataram que *E. coli* é em grande parte de origem fecal comparado a outros coliformes.

Com o passar do tempo várias definições e padronizações das bactérias do grupo coliforme foram surgidas. No início da década de 1920 foi usado a correlação que sugeria a produção do indol, fermentação de sacarose, gelatina liquefação e reação de Proskauer como importantes testes para detecção e diferenciação de contaminação fecal (ASHBOLT et al., 2001).

A Diretiva 98/83 da Comunidade Europeia do Conselho da União Europeia (UE) adota a *E. coli* e enterococos como microrganismos padrões para a análise e qualidade de água, por conseguinte, a Organização Mundial de Saúde em 2003 recomendou o uso da *E. coli* como o melhor indicador de poluição fecal em água.

1.1.4. Indicadores microbiológicos de poluição fecal em água ambiental

A Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos recomendou o uso das bactérias indicadoras fecais (FIB) *Escherichia coli* (*E. coli*) e enterococos para determinar o nível de contaminação fecal presente nas águas ambientais e ainda, estabelecer os critérios de qualidade da água para proteger o uso das águas de recreação de contato primário.

Bactérias e vírus são apontados pela EPA como indicadores de poluição fecal (EPA, 2009), nos países desenvolvidos são controlados tanto no monitoramento da água potável quanto em águas ambientais e usados para avaliar o risco à saúde humana.

Vírus humanos como adenovírus, enterovírus, rotavírus, astrovírus e vírus da hepatite E, são responsáveis pela grande maioria de doenças gastrointestinais frequentemente associados com doenças recreativas aquáticas virais (EPA, 2015).

Para ser considerado um bom indicador de poluição fecal, os microrganismos identificados na água devem preencher requisitos tais como: (1) deve existir em grande número no intestino e na matéria fecal humana; (2) deve ser de origem exclusivamente fecal; (3) deve apresentar maior resistência que os organismos patogênicos aos efeitos adversos do meio ambiente e aos processos de tratamento da água para o consumo humano; (4) não ser patogênico para os seres humanos; (5) ser removido e/ou inativado por meio do tratamento da água, pelos mesmos mecanismos e na mesma proporção que os organismos patogênicos; (6) em águas ambientais, o indicador deve apresentar-se em maior número que os organismos patogênicos; (7) deve ser de fácil identificação; (8) e ainda, não se reproduzir no meio ambiente (SCOTT et al., 2002; LIBÂNIO et al., 2006, TYAGI, et al., 2006).

1.2. Bactérias coliformes totais

Bactérias do grupo coliforme totais (CT) estão presentes no intestino humano e de animais homeotérmicos a qual são eliminadas pela matéria fecal em números elevados num intervalo de 10^6 - 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de fezes. CT, quando expostos em meios de identificação microbiológica, apresentam características como sendo bactérias Gram negativas, anaeróbicas facultativas, não formadoras de esporos, apresentam-se sob forma de bastonetes, fermentam a lactose com produção de ácido em temperaturas de 35 °C a 37 °C após um período de 24 a 48 horas e são indol positivas (TALLON et al, 2004; CABRAL, 2010; MESQUITA e NOBLE et al., 2013).

A identificação de CT representa baixa confiabilidade para medir o potencial de contaminação fecal em água potável devido à sua presença como habitante normal em ambientes como o solo, água e plantas. Assim, o uso de CT tem valor sanitário limitado no que se refere a avaliação da qualidade de águas naturais, restringindo a sua utilidade na avaliação da qualidade de fontes individuais do abastecimento de água, onde sua presença pode indicar falhas no tratamento, uma possível contaminação após o tratamento ou, ainda a presença de nutrientes em excesso, por exemplo, nos reservatórios ou nas redes de distribuição (BASTOS et al., 2000; Inspeção sanitária em abastecimento de água-Brasília, 2006).

1.2.1. Bactérias coliformes termotolerantes

Coliformes fecais (CF) ou termotolerantes são bactérias exclusivas de origem fecal, a considerar, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Proteus*. CF são bactérias Gram-negativas, em forma de bacilos, oxidase negativas, que podem fermentar a lactose em 44,5°C, produzem gás quando cultivado no caldo EC e forma colônias quando expostos ao meio de Ágar (BITTON, 2005; CABRAL, 2010).

Dentre os microrganismos pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, *E. coli* é o indicador mais confiável na identificação da contaminação de origem fecal humano e animal porque é o único do grupo coliforme que é exclusivamente de origem fecal. Diferente das espécies pertencentes aos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citobacter* que não são de origem exclusivamente fecal. No entanto, podem ser facilmente isolados no solo, em águas ambientais ricas em nutrientes, nas plantas, em matéria orgânica em decomposição e outras matrizes ambientais (Inspeção sanitária em abastecimento de água-Brasília, 2006; CABRAL, 2010). Deste modo, a presença de coliformes termotolerantes

em águas ambientais não significa categoricamente que tenha sido proveniente de origem fecal.

A *E. coli* é caracterizada pelas técnicas laboratoriais por apresentar uma expressão da enzima β -glucuronidase quando exposta em meios de substratos específicos, produz indol a partir do aminoácido triptofano, sendo a única espécie do grupo coliforme termotolerante cujo habitat exclusivo e primário é o intestino de mamíferos e aves (CERQUEIRA et al., 1999; CABRAL, 2010; COSTA et al., 2011). Assim, *E.coli* termotolerante é a enterobactéria utilizada mundialmente como indicador mais preciso de contaminação fecal em águas ambientes e, portanto, está presente nas normas de análise de qualidade de água.

1.2.2. Indicadores microbiológicos alternativos de poluição fecal

As agências reguladoras exigem o uso de coliformes fecais, *Escherichia coli* ou *Enterococcus* spp., como indicadores microbianos da qualidade das águas recreativas, sendo que estes indicadores de poluição fecal não identificam as fontes específicas de poluição e, por vezes, subestimam os riscos para a saúde associados ao uso recreativo da água (McQUAIQ, et. al, 2006), no entanto um estudo concluiu que bactérias que pertencem aos os gêneros *Escherichia* e *Klebsiella* não são indicadores adequados de contaminação fecal aparente (TORANZONS, 1991). Consequentemente, vários trabalhos propõem além de bactérias indicadoras de poluição fecal como *Bacteroidales*, o uso de poliomavírus humanos (HPyVs), que são comuns entre as populações humanas, como indicadores da poluição fecal humana (QUAING, et. al, 2006).

Neste contexto, os gêneros *Clostridium*, *Bacteroides* e *Bifidobacterium* são anaeróbios obrigatórios que predominam em grande número na microbiota intestinal humana comparado aos anaeróbios facultativos. Estes microrganismos possuem um grande número de espécies e apresentam em maiores quantidades na massa fecal humana.

1.2.2.1. *Clostridium* spp.

O gênero *Clostridium* comporta um numeroso gênero de seres procariotas. São bactérias gram-positivas, anaeróbios obrigatórios, formadores de endósporos resistentes ao calor. A maioria das espécies são móveis com flagelação peritricosos, catalase-negativo e não realizam a redução de sulfato, produzem geralmente misturas de ácidos orgânicos,

álcoois de carboidratos e proteínas. Dentre muitas espécies deste gênero, *Clostridium perfringens* parece ser um componente universal do intestino humano e animal. Nos seres humanos, *C. perfringens* faz parte da microbiota endógena normal e o seu principal local de transporte é o trato gastrointestinal distal (BITTON, 2005; CABRAL, 2010).

Este anaeróbio foi proposto também como sendo um indicador de poluição fecal alternativo devido a associação que apresenta com excretas de animais selvagens não herbívoros e esgoto humano (VIERHEILING et al., 2013). Com isso, a presença de *Clostridium perfringens* em águas ambientais indicaria a possível presença de parasitas protozoários e vírus entéricos (CHOPRA et al., 2006).

Na Europa são tradicionalmente utilizados como indicadores da qualidade da água, sendo que regulamentos da União Europeia consideram especificamente o *C. perfringens* como um indicador de escolha. O fato de espécies do gênero *Clostridium* possuírem a capacidade de formar esporos que resistam à desidratação, ao calor e as condições aeróbias, torna estas bactérias úteis como microrganismos indicadores de poluição fecal antiga em águas ambientais (BITTON, 2005; CABRAL, 2010).

1.2.2.2. *Bifidobacterium*

O gênero *Bifidobacterium* compreende um grupo composto por cerca de 25 espécies bacterianas que vivem normalmente no trato gastrointestinal humano. É a terceira população mais numerosa no intestino humano, após o gêneros *Bacteroides* e *Eubactéria*, sendo que as espécies *B. longum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* e *B. adolescentis* são importantes para o homem.

Bactérias do gênero *Bifidobacterium* são caracterizadas por serem Gram-positivas, não formadoras de esporos, catalase negativo, polimórficas e anaeróbias. Algumas espécies toleram oxigênio na presença de dióxido de carbono, o que lhes tornam anaeróbias facultativas e apresentam uma temperatura ótima de crescimento em torno de 35°C a 39°C. A presença de bifidobactérias no ambiente aquático é, portanto, considerado um indicador de contaminação fecal, por causa da sensibilidade que este grupo de bactérias apresentam diante dos fatores ambientais (BITTON, 2005).

Devido à especificidade das espécies do gênero *Bifidobacterium* a hospedeiros humano e diferentes animais homeotérmicos, a detecção dessas espécies no meio ambiente aquático, em princípio, determina a origem de contaminação fecal (NEBRA e BLANCH,

1999). Por essa razão, são usados como indicadores alternativos que identificariam a fonte de poluição fecal.

1.2.2.3. *Bacteroides* spp.

Bacteroides spp. pertencem ao domínio Bactérias, filo *Bacteroidetes*, ordem *Bacteroidales*, família *Bacteroidaceae* e gênero *Bacteroides*. *Bacteroidales* são comumente encontrados nas fezes de humanos e outros animais homeotérmicos. São caracterizadas por serem bactérias abundantes na matéria fecal humana, em concentrações de ordem de 10^{10} células por grama de matéria fecal, ou seja, representam um terço das bactérias fecais humanas superando as bactérias indicadoras convencionais, tais como os coliformes e enterococos tanto em humanos como em outras espécies animal. São estritamente anaeróbios, Gram-negativo, não formadores de esporos e resistentes a sais biliares (QUAIG et al., 2012).

Bactérias do gênero *Bacteroides* (principalmente *B. thetaiotaomicron* e *B. vulgatus*) são as espécies mais abundantes nas fezes humanas (adultos e crianças saudáveis) e de animais homeotérmicos como demonstra tabela 2, comparado as demais espécies entéricas bacterianas que são liberadas na matéria fecal de seres humanos saudáveis. Por serem anaeróbios estritos, *Bacteroides* spp. não são resistentes quando depositado em meio ambiente pela matéria fecal e conseqüentemente, a sua identificação na água seria um possível indicativo de presença de espécies entéricas patogênicas.

As espécies de *Bacteroidales* são específicas ao hospedeiro e são incapazes de persistirem em ambientes aeróbios, indicando assim uma possível contaminação fecal recente (YOST et. al., 2011), no entanto, *Bacteroidales* apresentam marcadores potenciais que tem mostrado alta especificidade para contaminação fecal humana (LIANG et al., 2015) e, portanto, tem sido considerada como promissores indicadores alternativos de contaminação fecal.

Bacteroidales são mais difíceis de serem identificados em meios de cultura comparado aos coliformes fecais. Os métodos de triagem genética, identificação molecular ou métodos de rastreamento microbiano associado a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizados para identificação do marcador genético 16S rRNA de *Bacteroidales* tem ganhado popularidade e vantagem como uma ferramenta de identificação de fontes difusas de poluição fecal em água ambientais (LEE et. al., 2010) e,

portanto, tornado a identificação deste grupo de bactérias como indicadores de poluição fecal muito promissor (McLELAN et. al., 2014).

Tabela 2: Concentração de espécies bacterianas viáveis nas fezes de humanos saudáveis (crianças, adultos e idosos).

Gêneros entéricos	Log ₁₀ UFC/g em matéria fecal humana
<i>Bacteroides</i> spp.	11,3*
<i>Eubacterium</i> spp	10,7*
<i>Bifidobacterium</i> spp	10,2*
<i>Ruminococcus</i> spp	10,2*
<i>Peptostreptococcus</i> spp	10,1*
<i>Peptococcus</i> spp	10,0*
<i>Clostridium</i> spp	9,8*
<i>Lactobacillus</i> spp	9,6*
<i>Propionobacterium</i> spp	9,4*
<i>Actinomyces</i> spp	9,2*
<i>Methanobrevibacter</i> spp	8,8*
<i>Desulphovibrio</i> spp	8,4*
<i>Fusobacterium</i> spp	8,4*
Enterococci	3,5–7,2**
<i>Enterobacteriaceae</i>	5,9–8,0**
<i>Escherichia coli</i>	7,5–7,7**
<i>Citrobacter</i>	3,3**
<i>Klebsiella</i>	2,4**

Fonte: Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water, 2010. * Valores expressos por peso seco. ** Valores expressos em peso húmido.

1.3. Marcadores moleculares na identificação da fonte de poluição fecal

Técnicas de controle da qualidade de água, usadas mundialmente, ainda se baseiam no reconhecimento da presença ou ausência de CT e CF, incluindo *E. coli*. Entretanto, as técnicas dependentes de meio de cultura não fornecem bases para identificação e distinção da fonte de poluição fecal em águas ambientais.

Neste contexto, o rastreamento de origem microbiológica, do inglês “*Microbial Source Tracking*” (MST), é conhecido e comumente usados como um conjunto de diferentes métodos de investigação para a identificação e determinação das fontes de poluição fecal em águas ambientais que permitem associar microrganismos fecais a hospedeiro (HARWOOD et al., 2014). O MST é considerado uma abordagem emergente para discriminar e quantificar a contaminação fecal animal e humano no meio ambiente,

utilizando marcadores biológicos associados ao hospedeiro específico como o caso de *Bacteroidales* (WERFHORST et al., 2011; MAUFFRET et al., 2012; ODAGIRI et al., 2015).

Dentre as variedades das técnicas de MST, a identificação do marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* permite o rastreamento das fontes poluidoras de contaminação fecal. Oligonucleotídeos iniciadores, desenhados para detectar e amplificar este marcador, foram testados em diferentes áreas geográficas (Estados Unidos, Canadá, França, Irlanda, Portugal e Reino Unido, Austrália, Quênia e Índia) utilizando material fecal humano e de vários animais homeotérmicos tais como bovinos, suínos, ovinos, aves, cães, gatos, aves, urso entre outros (BAE e WUERTZ, 2009; SCHRIEWER et. al., 2010; MAUFFRET, et.al., 2012; REISCHER et. al., 2013; ODAGIRI et. al., 2014).

Vários estudos demonstraram que uso de MST na detecção do marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* fornece informações úteis como sendo capaz de distinguir a poluição fecal humana, animal e poluição de esgoto (GAWLER et al., 2007; GOURMELON et al., 2007; AHMED et al., 2009). Com isso, a detecção de populações bacterianas através de marcadores moleculares específicos ao hospedeiro pela técnica PCR, permite com que facilmente se conheça a origem da poluição seja ele humano e/ou animal em ambientes aquáticos.

Estudos feitos em diferentes partes pelo mundo relataram que os marcadores genéticos 16S rRNA *Bacteroidales* universal, *Bacteroidales* específico-humano e específico-ruminantes são geograficamente conservados, devido a sua identificação em amostras fecais humanas e de diferentes animais homeotérmicos de estudos (REISCHER, et al., 2013; ODAGIRI et al., 2015).

Procedimentos da reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) permite a detecção do marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* em DNA extraído de amostras de águas ambientais, com base na detecção e amplificação de uma região específica ribossômica 16S destes organismos (*United Environmental Protection Agency*, 2010).

1.4. Manancial do Ribeirão João Leite

De acordo com o ciclo da água na natureza, os mananciais podem ser divididos em três categorias: superficiais, subterrâneos e água de chuvas (Ministério da Saúde-Brasil, 2006). O manancial está sujeito a poluição por diversas fontes e por ação provocada principalmente pelo homem, o que degrada a qualidade do seu ecossistema.

A Bacia Hidrográfica pertencente ao manancial Ribeirão João Leite é de importância estratégica, atualmente responsável por mais de 50% de suprimento de água para a capital do estado, a cidade de Goiânia. Apresenta como características físicas, áreas amplamente utilizadas para agricultura, pecuária e ainda, possui um processo de urbanização intenso (RABELO et. al., 2009). Ao longo dos anos de 1979 a 2005 foram verificadas intensas modificações no uso do solo e disponibilidade de água, além de suprirem demandas de irrigação, piscicultura e de outras atividades ao longo da bacia (SANTOS et. al., 2010).

As condições apresentadas na extensão da Bacia Hidrográfica Ribeirão João Leite tais como degradação de áreas ao longo da Bacia Hidrográfica, erosões, uso de agrotóxicos e fertilizantes nas áreas de agricultura, põem em risco as condições de qualidade e quantidade de água para o consumo humano.

2. JUSTIFICATIVA

A poluição em cursos de água é um problema que acarreta maior risco a saúde pública, principalmente em crianças com faixa etária menor de 10 anos e adultos imunocomprometidos. Investigações relacionadas à poluição fecal em cursos de água relatam a presença de organismos coliformes totais, termotolerantes e principalmente a *Escherichia coli*, assim como altos níveis de turbidez como sendo indicadores de possível associação à presença de patógenos nesses ambientes aquáticos.

Poluição dos mananciais superficiais é um problema importante à saúde pública devido à utilização dessas águas para o abastecimento populacional, agricultura e atividades recreativas. Lançamento de esgotos domésticos, água de chuva que escoar por áreas agrícolas e sobre solos sujeitos a erosão, efluentes industriais e acidentes ambientais são fatores que contribuem para a contaminação de cursos d'água (córregos, ribeirões, rios), lagos e represas (SCHRIEWER et al., 2010; WHO, 2012).

A Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite é responsável por 50% do abastecimento da Região Metropolitana de Goiânia. Esta Bacia Hidrográfica apresenta uma crescente expansão a urbanização proporcionando alta densidade populacional além de diversificadas atividades humanas como a pecuária, agricultura, mineração e industriais.

O presente estudo foi desenvolvido visando avaliar e conhecer o estado microbiológico, físico-químico e ainda identificar as fontes difusas da poluição fecal através do método de rastreamento molecular 16S rRNA *Bacteroidales* pela Reação de Cadeia Polimerase em água bruta superficial deste manancial.

Considerando a densidade populacional da cidade de Goiânia, influências antropogênicas no manancial Ribeirão João Leite em conjunto ao déficit de informação da literatura científica regional sobre o tema proposto, ainda, dados deste trabalho de dissertação conjugados a outros trabalhos publicados, poderão subsidiar a implantação de estratégias específicas visando a prevenção e controle da contaminação de cursos de água com matéria fecal.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a qualidade microbiológica e o marcador genético 16S rRNA da ordem *Bacteroidales* como indicador da fonte de poluição fecal humana e/ou animal na Bacia Hidrográfica Ribeirão João Leite.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar a qualidade microbiológica e parâmetros físico-químicos da água bruta superficial em pontos localizados na Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite;

Determinar a sensibilidade de oligonucleotídeos iniciadores desenhados para detectar e amplificar segmento do gene 16S rRNA *Bacteroidales* universal a várias espécies;

Determinar a sensibilidade e especificidade de oligonucleotídeos iniciadores desenhados para detectar e amplificar segmento do gene 16S rRNA *Bacteroidales* específico-humano;

Determinar a sensibilidade e especificidade de oligonucleotídeos iniciadores desenhados para detectar e amplificar segmento do gene 16S rRNA *Bacteroidales* específico- bovino;

Distinguir contaminação fecal humana e bovina em amostras de água bruta superficial.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de estudo e localização geográfica dos pontos de coleta de água bruta superficial

A área de estudo compreende uma extensão da Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite que está localizada entre as latitudes 16° 13' e 16° 39' Sul e longitudes 48° 57' e 49° 11' Oeste. Esta Bacia drena uma área de 766,8 km² e percorre as áreas dos municípios de Ouro Verde de Goiás, Campo Limpo de Goiás, Anápolis, Terezópolis de Goiás, Nerópolis, Goianápolis e Goiânia (RABELO et al., 2009; SANTOS et al., 2010).

Atualmente, a Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite é responsável pelo suprimento de aproximadamente 50% de água para a região metropolitana de Goiânia. Ao longo desta Bacia Hidrográfica, é notável uma vasta utilização e ocupação do solo por áreas de expansão de atividades agrícolas, agropecuárias e, também, área urbana. Dados relativos as espécies de produção pecuária por municípios estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Dados relativos as espécies de produção pecuária localizados nos municípios que cobrem a extensão da Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite. Fonte extraído do “Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Produção da Pecuária Municipal 2014”.

Municípios								Total das espécies
Agropecuária	Goiânia	Campo Limpo	Anápolis	Nerópolis	Terezópolis	Goianápolis	Ouro Verde de Goiás	
Bovino	30.711	16.000	78.130	35.150	10.350	14.650	35.700	220.691
Ovino	750	210	600	230	240	55	140	2.225
Suíno	3.600	2.300	9.000	1.400	3.270	750	690	21.010
Caprino	90	40	20	15	30	15	65	275
Equino	650	2.500	5.000	610	180	200	700	9.840
Galináceos	26.800	12.500	81.700	58.000	23.500	38.000	12.400	252.900

O estudo incluiu 13 pontos de coleta de água bruta superficial, sendo 4 destes localizados ao longo do Ribeirão João Leite, abrangendo o ponto de Captação situado próximo à Estação de Tratamento de Água Jaime Câmara, e os outros 9 pontos estão localizados em tributários deste Ribeirão. A seleção dos pontos estudados foi determinada pela Companhia de Saneamento de Goiás (SANEAGO) em cumprimento à Resolução CONAMA 357/05 águas Doces Tipo II e à Portaria do Ministério da Saúde N° 2914 de dezembro de 2011. Os 13 pontos de coleta estudados estão apresentados na Figura 1 e as respectivas coordenadas geográficas descritas na Tabela 4.

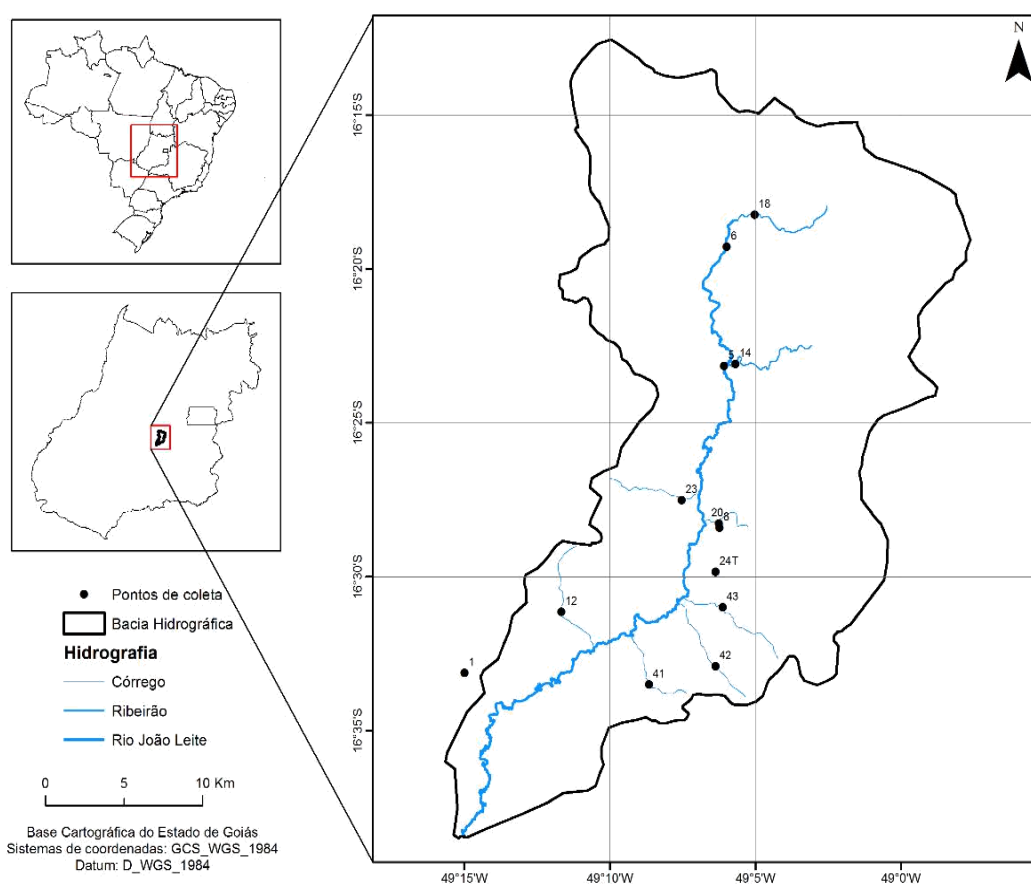


Figura 1: Mapa representando a localização da Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite em relação ao Estado de Goiás e ao Brasil. Localização dos 12 pontos de coleta de água bruta superficial ao longo da Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite e o ponto Captação localizado próximo à Estação de Tratamento Jaime Câmara (ponto 1).

Tabela 4. Localização geográfica dos pontos de coleta de água bruta superficial na Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite e do ponto de Captação.

Local	Município de coleta (Pontos no mapa)	Latitude	Longitude
Ribeirão João Leite	Goiânia (1)	23S 33' 07"	49W 14' 59"
	Anápolis (5)	16S 23' 09"	49W 06' 04"
	Campo Limpo (6)	16S 19' 16"	49W 05' 59"
	Terezópolis (8)	16S 28' 24"	49W 06' 44"
Córrego Bandeira	Nerópolis (12)	16S 31' 08"	49W 11' 40"
Córrego Jenipapo	Anápolis (14)	16S 23' 05"	49W 05' 41"
Córrego Jurubatuba	Campo Limpo (18)	16S 18' 14"	49W 05' 01"
Córrego Maria Paula	Terezópolis (20)	16S 28' 16"	49W 06' 15"
Córrego Descoberto	Nerópolis (23)	16S 27' 30"	49W 07' 32"
Córrego Rosa	Terezópolis (24T)	16S 29' 50"	49W 06' 22"
Córrego Macaúba	Terezópolis (41)	16S 33' 30"	49W 08' 39"
Córrego Carapina	Goianápolis (42)	16S 32' 54"	49W 06' "22
Córrego Grama	Terezópolis (43)	16S 30' 59"	49W 06' 07"

4.1.1. Amostragem de água bruta superficial

Foram realizadas análises microbiológicas, físico-químicos em amostras de água bruta superficial coletadas nos 13 pontos supracitados. Já as análises moleculares, para distinção das fontes difusas de poluição fecal, foram realizadas em 5 pontos selecionados dentre os 13.

O critério utilizado para inclusão destes pontos teve como característica o uso do solo, sendo: 2 pontos caracterizados por alta atividade pecuária/baixa atividade residencial (Córrego Bandeira e Córrego Jurubatuba), 2 pontos com características de alta atividade residencial/baixa atividade pecuária (Captação e Córrego Descoberto) e 1 ponto caracterizado por baixa atividade humana e animal (Ribeirão João Leite – Anápolis).

A coleta de água bruta superficial foi realizada mensalmente no período de setembro de 2015 a março de 2016, com a inclusão de uma duplicata por dia de coleta, tendo no final do estudo obtido duas amostras para cada ponto de coleta.

Para as análises microbiológica e molecular, as amostras foram coletadas em frascos de 1L de polipropileno, esterilizado em autoclave à temperatura de 121°C e à pressão de 0,1 MPa (1atm) durante 30 minutos. Após esterilização, os frascos coletores foram devidamente etiquetados e identificadas por ponto e data de coleta. A localização geográfica (latitude e longitude) dos 13 pontos amostrados foi realizada utilizando um GPS modelo Gramin Montana 650.

Foram realizadas em campo medidas da temperatura ambiente, temperatura da água e também do pH utilizando um pHmetro microprocessador portátil Gehaka PG1400. Após coleta, os frascos de 1L de polipropileno com amostras de água bruta superficial foram acondicionados em caixas de isopor com gelo e encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia Molecular do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás.

As análises de turbidez e condutividade foram efetuadas no Laboratório de Água da SANEAGO e para tais, amostras de água bruta superficial foram coletadas em garrafas de vidro âmbar de 500 mL previamente esterilizadas. Todas amostras de água bruta superficial foram coletadas de acordo com o Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras da Companhia do Estado de São Paulo, 2011.

4.2. Estudo microbiológico

4.2.1. Indicador microbiológico de poluição fecal

A identificação do indicador de poluição fecal, *E. coli*, foi realizada pela técnica da membrana filtrante. 5 mL de amostra de água bruta superficial foi adicionado a 45 mL de PBS 1X estéril (fosfato de sódio 0,1 M – cloreto de sódio 0,5% 1,5 M) em tubo cônico esterilizado e subsequentemente diluídas a 1:10, 1:100 e 1:1000. Os tubos foram homogeneizados a mão e, a seguir, cada amostra diluída foi filtrada à vácuo (Vacuubrand GMBH, Brasil) em membrana de nitrocelulose estéril de porosidade 0.45 µm e 47 mm de diâmetro (Millipore, Brasil).

Após filtração, cada membrana foi assepticamente retirada utilizando uma pinça de inox estéril, colocada sobre o meio de cultura seletivo HiCrome M-TEC Agar (Sigma-Aldrich Inc., Brasil) e incubada por $0,5 \pm 2$ horas a $35 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo que, posteriormente a temperatura de incubação foi elevada a $44,5 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 22 ± 2 horas, tal como descrito e recomendado no *Method 1603: Escherichia coli (E. coli) in Water by Membrane Filtration Using Modified membrane-Thermotolerant Escherichia coli Agar (Modified mTEC) da United States Environmental Protection Agency (EPA,*

2009). O controle negativo utilizado em cada seção de análise de amostras ambientais era o método em branco, aonde filtrava-se 45 mL de PBS 1X estéril e plaqueava-se no meio de cultura HiCrome M-TEC Agar (Sigma-Aldrich Inc, Brasil) e incubadas nas mesmas condições de temperatura das amostras ambientais.

Todas as amostras foram catalogadas de acordo com a hora de coleta e hora de processamento como determinado pelo Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras de água, Sedimento, Comunidades Aquáticas e Efluentes Líquidos, aprovado pela Resolução nº 724 de 03/10/2011.

4.2.2. Número de colônias de *E. coli* termotolerante por 100 mL de água bruta superficial

A regra utilizada para determinação do número de colônias de *E. coli* termotolerante por 100 mL foi a descrita pela EPA–Method 1603 (2009). Devendo haver, no mínimo, três diluições por amostra em PBS 1X de modo a garantir resultados confiáveis de acordo com o nível de poluição fecal. Sendo que, a diluição utilizada para cálculo de *E.coli*/100 mL de água foi a que apresentava o maior número de colônias isoladas visíveis e menos difusas. As concentrações em UFC de *E. coli*/100 mL foram calculadas utilizando a fórmula:

$$E.coli/100\text{ mL} = [N/ (D + V_{mL}) \times 100]$$

Onde: N= número de colônias de *E. coli* termotolerante observados na placa, D = diluição, V= volume filtrado

4.3. Estudo Molecular

4.3.1. Amostras fecais

Para determinação da sensibilidade e especificidade dos oligonucleotídeos utilizados neste estudo, 23 amostras fecais humanas, estratificadas de acordo com a faixa etária (maiores e menores de 18 anos), foram adquiridas de indivíduos saudáveis. As amostras foram coletadas conforme o protocolo número (CAAE 36927614.4.0000.5083) do Conselho de Ética em Pesquisa Humana, Universidade Federal de Goiás (UFG). Foram excluídas deste estudo amostras fecais de indivíduos com diarreia, com doença intestinal crônica e indivíduos em tratamento com antibióticos e/ou quimioterápico.

Amostras fecais de diferentes espécies animais (n=48) foram coletadas de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA, Protocolo N° 036/14) da UFG.

Amostras fecais de *Capra hircus* (cabra doméstica, n=3) e *Bos taurus* (bovino, n=18) foram obtidas na Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG; amostras fecais de *Ovis aries* (ovelha, n=4), *Sus scrofa domesticus* (suíno, n=4), *Gallus gallus domesticus* (galinha, n=4) foram coletadas em uma fazenda localizada na grande área de Goiânia. Já as amostras de *Oryctolagus cuniculus* (coelho, n=1), *Canis lupus familiaris* (cão, n=6) e *Felis silvestris catus* (gato, n=3) foram coletadas pelos proprietários particulares de cada espécie citada; amostras fecais de *Dendrocyna outumnali* (marreca-cabocla, n=1), *Tigrisoma lincatum* (socó-boi, n=1), *Nycticorax nycticos* (socó-dorminhoco, n=1), *Cebus libidinosus* (macaco-prego, n=1), *Alouatta caraya* (guariba, n=1) foram obtidas no Parque Zoológico de Goiânia de acordo com o Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade Número 53443-1.

4.3.2. Extração do Ácido Desoxirribonucleico (DNA) total das amostras fecais

DNA total foi extraído utilizando o kit QIAamp DNA Stool kit (QIAGEN, Biotecnologia Brasil Ltda., Brasil). Brevemente, 200 mg de cada amostra fecal foi pesada em tubos de poliestireno de 2.0 mL e adicionado 1,4 mL do tampão de Lise (ASL). A amostra foi então agitada e homogeneizada por 15 minutos utilizando um agitador vórtex e seguidamente conservada a temperatura de -20 °C. No momento da extração, o tubo de poliestireno contendo a amostra fecal e o tampão de lise ASL foi agitado por 1 minuto e o DNA total foi extraído de acordo com as instruções do fabricante.

4.3.3. Produção do controle positivo humano e bovino

4.3.3.1. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Controles positivos (humano e bovino) para as reações de PCRs a serem incluídos nos experimentos foram produzidos a partir da extração de DNA de amostras fecais. Os oligonucleotídeos iniciadores Bac32f (5'-AACGCTAGCTACAGGCTT-3') e Bac708r (5'-CAATCGGAGTTCTTCGTG-3'), desenhados por BERNHARD e FIELD (2000), foram utilizados para amplificar uma região específica do marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* do DNA amostral de fezes humana e do DNA amostral de fezes bovina. A reação da PCR foi inicialmente testada utilizando 3 diferentes concentrações de cada

oligonucleotídeo iniciador (0,3 μ M, 0,4 μ M e 0,5 μ M) assim como concentrações diferentes (1,5 mM, 2,0 mM e 2,5 mM) da solução de cloreto de magnésio (MgCl_2) em gradientes de temperatura de anelamento (50°C, 53°C e 55°C).

A PCR otimizada constou de um volume final de 30 μ L contendo: concentração final de tampão de PCR a 1X, 2,0 milimolar (mM) de cloreto de magnésio [MgCl_2], 0,25 milimolar (mM) de cada desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP), 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador (Bac32f e Bac708r), 0,3 unidades (U) de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), água livre de DNA (Nuclease-Free Water, Ambion, USA) e 10 nanogramas (ng) de DNA amostral bovino ou humano. DNA de *E. coli* (ATCC 25922) e água livre de DNA (Nuclease-Free Water, Ambion, USA) foram utilizados como controles negativos. As condições de ciclagem foram: 3 minutos a 95 °C para o primeiro ciclo, seguidos de 30 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 45 segundos a 53 °C, 1 minuto a 72 °C, e uma extensão final de 72 °C durante 7 minutos. Todas reações da PCR foram realizadas no termociclador MULTIGENE Gradiente (Labnet International, Inc.)

Os produtos da PCR foram corridos por 2 horas a 100 Amp/120 Volts em gel de agarose a 1% em tampão 1X TBE (0,89 M de tris base, 0,89 M de ácido bórico e 0,01 M de ácido etileno diamino tetra acético [EDTA]) contendo 0.5 μ g/mL de brometo de etídio. O padrão de massa molecular 1 Kb Plus (Invitrogen®) foi adicionado a um dos poços.

A visualização foi realizada por incidência de luz ultravioleta (UV) através do Fotodocumentador Gel Doc System (Bio-Rad Laboratories Inc.) e as imagens foram documentadas com o programa Quantity One (BioRad®).

4.3.3.2. Purificação do produto amplificado por PCR

Após o processo de amplificação e observação da presença de amplicon de 690 pares de bases (pb) correspondente à amplificação de rDNA 16S de *Bacteroidales* do DNA amostral humano e do DNA amostral bovino, os produtos da PCR foram purificados utilizando o Kit GFX (GE Healthcare Life Sciences, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante.

4.3.3.3. Clonagem do produto da PCR

Os produtos das PCRs purificados foram clonados no sistema pGEM-T easy (Promega), conforme o protocolo do fabricante. A reação de ligação teve como volume final 15 μ L sendo: T4 DNA ligase 3U (Promega®); tampão DNA Ligase 1X; plasmídeo pGEM-T easy (Promega®) 50 ng; produto purificado do DNA (16 ng - 25 ng) e água livre

de DNA (Nuclease-Free Water, Ambion). A reação de ligação foi incubada por 16 horas a 16 °C. Em seguida, foi realizada a transformação utilizando 3 µL do produto de reação em 50 µL de célula competente *E.coli* XL10 Gold. O plasmídeo foi inserido na célula bacteriana *E. coli* através de um choque térmico utilizando o *Electroporador* Micro Pulser (Bio-Rad®) ajustado ao programa Ec2 para bactérias utilizando cubeta de 0,2 cm.

Após a transformação, as células foram transferidas para 1000 µL do meio SOC (0,5% de extrato de levedura, 2% de triptona, 10mM de cloreto de sódio [NaCl], 2,5 mM de cloreto de potássio [KCl] e 10 mM de MgCl₂, 20 mM de sulfato de magnésio [MgSO₄] e 20 mM de glicose) foram então incubadas por 1 hora a 37 °C sob agitação 1200 x *g* no *shaker* (Infors HT Miniton). Terminado o tempo de incubação, foi semeado 100µL em meio Luria-Bertani (LB) ágar sólido contendo 100µg/mL de ampicilina e incubado durante 24 horas a 35 °C.

4.3.3.4. Extração de DNA Plasmidial por lise alcalina com dodecil sulfato de sódio (SDS)

Colônias de *E. coli* crescida na placa de transformação, foram selecionadas e transferidas para 5 mL caldo de LB enriquecido com 100 µg/mL de ampicilina e em seguida, incubadas por 16 horas a 37 °C.

Logo após o crescimento das culturas, 1,5 mL das células foram coletadas por centrifugação a 10000 x *g* a 30 segundos por 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 100 µL de solução I (150 mM Tris HCL, 10 mM EDTA pH 8,0), em seguida foi homogeneizada em vórtex (VISION SCIENTIFIC CO., LTD) e incubado por 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 200 µL da solução de lise alcalina II (200 mM de hidróxido de sódio [NaOH], 1% de dodecil sulfato de sódio [SDS]), seguido de homogeneização por inversão cuidadosa e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida adicionou-se 150 µL da solução III (acetato de potássio 3 M, ácido acético 2M; pH 4,8-5,0), misturou-se por inversão e incubou-se no gelo por 3 minutos. Logo a seguir, foi centrifugado por 5 minutos por 10000 x *g*, a 4 °C e transferido todo o sobrenadante para um tubo de poliestireno de 1,5 mL. Foi então adicionado 1 mL isopropanol a 70% e misturado por inversão. Após incubação a temperatura ambiente por 2 minutos, o tubo foi centrifugado a 10000 x *g* por 5 minutos a 4 °C. Todo o sobrenadante foi descartado e adicionado ao sedimento 1 mL de etanol a 70% gelado. O sobrenadante foi descartado e material centrifugado por 5 minutos a 10000 x *g* a 4 °C. O sobrenadante foi novamente descartado e o tubo foi invertido sobre o papel toalha

para deixar a amostra secar em temperatura ambiente por uma hora e o produto final foi então ressuspensionado em 40µL de água Mili-Q (Millipore) e conservadas a -20 °C.

4.3.3.5. Digestão e Purificação do DNA Plasmidial

Realizou-se a digestão com a enzima de restrição *Eco* RI para verificação da presença do inserto de interesse nos plasmídeos extraídos. Para tal, foi necessário um volume final de 10 µL da reação contendo 7 µL do plasmídeo, Tampão (10X REACT3, Invitrogen®) e 10 U da enzima de restrição *Eco* RI. O sistema foi incubado por 24 horas a 37 °C e aplicado em gel de agarose a 1% para separação eletroforéticas.

Após a digestão, os plasmídeos recombinantes com as inserções correspondentes foram purificados utilizando um Kit de purificação de DNA (Qiagen®) conforme as recomendações do fabricante e, no final, o plasmídeo purificado foi ressuspensionado em água Mili-Q (Millipore).

4.3.6. Sequenciamento do produto clonado

O sequenciamento do plasmídeo recombinante foi realizado conforme indicado pelo protocolo do fabricante (BigDye® Terminator V3.1 cycle Sequencing Kit).

A reação de um volume final de 10 µL constou de: primer M13F (1,5 pmol/µL), primer M13R (1,5 pmol/µL), Tampão de Sequenciamento *BigDye* (*DyeNamic*) 5 X, DNA plasmidial purificado e água livre de DNase (Nuclease – Free Water, Ambion).

Depois de preparada as reações em placa de poliestireno de 96 poços, deu-se o início de amplificação utilizando o programa de sequenciamento com a seguinte ciclagem: primeiro ciclo 3 minutos a 94 °C, 25 ciclos de 20 segundos a 95 °C, seguido de 15 segundos a 50 °C e finalizando com 60 segundos a 60 °C e um ciclo constante de 4 °C. No final as reações foram colocadas no sequenciador automático ABI 3130 Applied Biosystems e sequenciamento foi realizado seguindo as orientações do fabricante.

Foi realizado sequenciamento dos plasmídeos humano e bovino e as sequências nucleotídicas foram analisadas e editadas utilizando o software *BioEdit* (Ibis Biosciences, USA) e confirmadas como *Bacteroidales* hospedeiro-específico humano utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, National Center for Biotechnology Information).

4.3.3.7. Quantificação do DNA plasmidial e do DNA de amostras fecais

Os DNAs plasmidiais foram quantificados pelo Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, EUA). Já as concentrações de DNA de amostras fecais foram determinadas a partir de leituras em triplicatas utilizando um espectrofotômetro NanoDrop (NANODROP 2000, Life Technologies, EUA). As concentrações foram posteriormente ajustadas para um valor de no máximo 30 ng/μL.

4.4. Identificação do marcador 16S rRNA *Bacteroidales* em DNA de amostras fecais

Foi utilizado 1 tipo de oligonucleotídeos iniciador para detecção e amplificação dos marcadores 16S rRNA *Bacteroidales* universal, 4 pares de oligonucleotídeos iniciadores para *Bacteroidales* específico-humano e 2 para *Bacteroidales* específico-bovino, sendo aplicado a eles a técnicas da PCR convencional e PCR em tempo real (Tabela5).

Tabela 5: Oligonucleotídeos aplicados a técnica de PCR Convencional, PCR SybrGreen e PCR TaqMan

Oligonucleotídeos iniciadores aplicados as técnicas PCR Convencional		
Marcador Alvo	Oligonucleotídeos iniciadores	Referências
<i>Bacteroidales</i> humano	HF183f - Bac708r	Bernhard e Field, 2000
<i>Bacteroidales</i> Bovino	CF128f - Bac708r	
Oligonucleotídeos aplicados a PCR SybrGreen		
Marcador Alvo	Oligonucleotídeos iniciadores	Referências
<i>Bacteroidales</i> humano	HF183f – Sybr_Bac708r	Bernhard e Field, 2000 Seurink <i>et al.</i> , 2005
Oligonucleotídeos iniciadores aplicados as técnicas PCR TaqMan		
Marcador Alvo	Oligonucleotídeos iniciadores	Referências
<i>Bacteroidales</i> Universal	BacUni-520f-BacUni-690r1-BacUni-656p	Kildare <i>et al.</i> , 2007
<i>Bacteroidales</i> humano	BacHum-160f-BacHum-241r-BacHum-193p	
<i>Bacteroidales</i> Bovino	BacCow-CF128f	Bernhard e Field, 2000 Kildare <i>et al.</i> , 2007
	BacCow-305r	
	BacCow257p	

4.4.1. PCR

Os oligonucleotídeos iniciadores HF183f-Bac708r e CF128f-Bac708r desenhados para amplificar *Bacteroidales* específico-humano e *Bacteroidales* específico-bovino, respectivamente (BERNHARD e FIELD, 2000), foram testados utilizando DNA extraídos de amostras fecais humana e animal (n=71) coletadas para este estudo e descritas anteriormente. Estes oligonucleotídeos iniciadores foram previamente testados para obtenção de concentração ótima (0.3 µM, 0.4µM e 0.5 µM) em gradiente de temperatura de anelamento (56 °C, 59 °C e 62 °C).

A PCR otimizada continha uma concentração final de 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e temperatura de anelamento 59 °C. Todas reações da PCR foram realizadas no termociclador MULTIGENE Gradiente (Labnet International, Inc.). Os produtos da PCR foram corridos em gel de agarose a 1% em tampão 1X TBE contendo 0.5 µg/mL de brometo de etídio e bandas de 520 pb de DNA fecal humano e 580 pb de DNA fecal bovino foram visualizados através do Fotodocumentador Gel Doc System (Bio-Rad Laboratories Inc.).

4.4.2. PCR em tempo real

Os oligonucleotídeos iniciadores e sondas desenhados (KILDARE *et al.*, 2007) foram testados para detecção e amplificação do marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* universal (BacUni-520f, BacUni-690r1 e BacUni-656p), do marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* hospedeiro específico-humano (BacHum-160f, BacHum-241r e BacHum-193p) e do marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* hospedeiro específico-bovino (BacCow-CF128f, BacCow-CF305r e BacCow-257p).

Os oligonucleotídeos iniciadores HF183f e Sybr_Bac708r (SEURINK *et al.*, 2005) foram também testados para detecção e amplificação do marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* hospedeiro específico-humano. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas utilizados para determinação da sensibilidade e especificidade do marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* estão apresentados na Tabela 6.

De forma a constatar a ausência de inibidores de reação da PCR em tempo real no DNA das amostras fecais, foi realizada uma diluição de 1:4 e 1:16 de cada DNA amostral e ambas diluições foram testadas para detecção e amplificação do marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* universal (BacUni-520f, BacUni-690r1 e BacUni-656p). Para detecção e amplificação dos marcadores genéticos 16S rRNA *Bacteroidales* hospedeiro

específico-humano e hospedeiro-específico bovino foi utilizado a diluição 1:4 de DNA amostral.

A Reação de amplificação da PCR em tempo real TaqMan foi realizada utilizando o Kit Rotor-Gene Probe PCR (QIAGEN Biotecnologia Brasil Ltda) para um volume total de 12 µL por reação, contendo Máster Mix 1X, concentrações adequadas de 0,4 µM para cada oligonucleotídeo iniciador e 0,08 µM de sonda, 2,5 µL da diluição 1:4 de DNA amostral e completando o volume final com água (Nuclease-Free Water, Ambion). DNA de *E. coli* e água livre de DNA (Nuclease-Free Water, Ambion) foram utilizados como controle negativo e *no template control*, respectivamente.

Para reação PCR em tempo real SYBR Green foi utilizado o Kit Rotor-Gene SYBR Green (QIAGEN Biotecnologia Brasil Ltda) para um volume total de 12 µL por reação contendo concentrações adequadas para cada oligonucleotídeos (0,1 µM).

As amplificações da reação PCR em tempo real TaqMan e PCR SybGreen foi realizada no equipamento Rotor Gene Q de acordo com as recomendações do fabricante. Os valores de *Cycle Treshhold* (*Ct*) foram analisados utilizando o programa Rotor-Gene Q Software (QIAGEN Biotecnologia Brasil Ltda).

Utilizando uma diluição seriada dos DNAs plasmidiais, foi realizada uma curva padrão para a determinação da eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados com finalidade de amplificar o marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* universal, *Bacteroidales* específico-humano e *Bacteroidales* específico-bovino.

As eficiências de amplificação dos oligonucleotídeos iniciador hospedeiro específico foi determinada realizando-se reações de RT-PCR de diluições seriada dos DNAs bovino e humano clonados. A partir dos *Ct* obtidos uma curva contendo os valores de *Ct* para cada diluição foi feita no Software Excel e a partir desta o coeficiente de regressão linear (R^2) foi determinado.

Tabela 6: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e sondas do marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* utilizados neste estudo.

Alvo	Iniciadores	Sequências (5'-3')	Referências
<i>Bacteroidales</i> Universal ^a	BacUni-520f	CGTTATCCGGATTTATTGGGTTTA	Kildare <i>et al.</i> , 2007
	BacUni-690r1	CAATCGGAGTTCTTCGTGATATCTA	
	BacUni-656p	6-FAM-TGGTGTAGCGGTGAAA-MGB	
<i>Bacteroidales</i> Humano ^b	HF183f	ATCATGAGTTCACATGTCCG	Bernhard e
	Bac708r	CAATCGGAGTTCTTCGTG	Field, 2000
	HF183f	ATCATGAGTTCACATGTCCG	Bernhard e Field, 2000
	Sybr_Bac708r	TACCCCGCCTACTATCTAATG	
	BacHum-160f	TGAGTTCACATGTCCGCATGA	Kildare <i>et al.</i> , 2007
	BacHum-241r	CGTTACCCCGCCTACTATCTAATG	
	BacHum-193p	6-FAM-TCCGGTAGACGATGGGGATGCGTT	
<i>Bacteroidales</i> Bovino ^c	CF128f	CCAACYTTCCCGWTAATC	Bernhard e
	Bac708r	CAATCGGAGTTCTTCGTG	Field, 2000
	BacCow-CF128f	CCAACYTTCCCGWTAATC	Bernhard e Field, 2000
	BacCow-305r	GGACCGTGTCTCAGTTCCAGTG	
	BacCow-257p	6-FAM-TAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCC	
			Kildare <i>et al.</i> , 2007

^aMarcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* universal (origem humano e animais)

^bMarcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* específico de hospedeiros humanos

^cMarcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* específico de hospedeiros bovinos

4.5. Sensibilidade e especificidade dos oligonucleotídeos 16S rRNA *Bacteroidales* em DNA de amostras fecais

A sensibilidade dos oligonucleotídeos iniciadores foi avaliado em DNA de amostras fecais humana e de diferentes animais selecionados para o estudo. A especificidade dos iniciadores para identificar o marcador genético 16S rRNA hospedeiro-específico humano e hospedeiro-específico bovino foram também avaliados. As curvas de eficiência foram aplicadas para obtenção dos valores de *Ct* de todas amostras ambientais.

Estatisticamente, a sensibilidade e especificidade foram calculadas pelas seguintes fórmulas:

Sensibilidade é igual ao número total de amostras verdadeiro positivo para o alvo pretendido dividido pelo número total de amostras positivas por método padrão ouro:

$$Se = [VP / (VP + FN)]$$

Onde, VP corresponde ao número de amostras verdadeiramente positivas e FN correspondem ao número de amostras negativas pelo teste, porém que eram positivas (amostras falso negativas).

Especificidade corresponde ao número total de amostras verdadeiramente negativas obtidos pelo teste dividido pelo número total de amostras negativas obtidas pela fórmula:

$$Sp = [VN/(VN+FP)]$$

Onde, VN corresponde ao número total de amostras verdadeiramente negativas e FP corresponde ao número de amostras que testaram positivas pelo teste, mas são verdadeiramente negativas por teste padrão ouro (amostras falso positivas).

4.6. Água bruta superficial

4.6.1. Extração do DNA total em amostras de água bruta superficial

DNA de água bruta superficial foi extraído utilizando o kit QIAamp DNA Stool kit (QIAGEN, Biotecnologia Brasil Ltda. Brasil) conforme as instruções do fabricante. Brevemente, 1L de água bruta superficial de cada coleta dos pontos selecionados foi filtrada à vácuo utilizando membrana de nitrocelulose estéril de porosidade 0.45 µm. As membranas de nitrocelulose foram então transferidas para tubos *falcon* de 50 mL contendo 1,4 mL da solução de lise ASL (Qiagen).

4.6.2. Detecção e amplificação do marcador 16S rRNA *Bacteroidales* em água bruta Superficial

Para detecção e amplificação do marcador 16S rRNA *Bacteroidales* do segmento de DNA em amostras de água superficiais foram utilizados os iniciadores PCR (HF183f-Bac708r e CF128f-Bac708r) e iniciadores e sondas PCR em tempo real sistema TaqMan.

A condições de amplificação dos iniciadores HF183f-Bac708r e CF128f-Bac708r foram as mesmas descritas anteriormente, exceto pela adição de 10 µL do DNA de amostras de água bruta superficial e um total de 35 ciclos.

A PCR em tempo real sistema TaqMan foi utilizada para identificação do marcador 16S rRNA *Bacteroidales* universal, *Bacteroidales* específico-humano e

Bacteroidales específico-bovino. As condições da reação foram descritas anteriormente, exceto pela adição de 5 µL de DNA extraído das amostras de água. Também foi utilizado os oligonucleotídeos iniciadores e sonda PanBakt para detectar o marcador genético 16S rRNA de Eubactéria (WINDSOR et al., 2006) com o objetivo de identificar presença de inibidores presentes nas amostras de água bruta superficial em amostras negativas para 16S rRNA *Bacteroidales* universal.

5. RESULTADOS

5.1. Análise microbiológica dos pontos de estudo localizados na Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite

Foram processadas 91 amostras de água bruta superficial sendo que as coletas foram catalogadas de acordo com a hora de coleta e hora de processamento. 95,3% apresentaram um intervalo mínimo de 3 horas e 39 minutos e máximo de 9 horas e 55 minutos entre as horas de coleta e processamento. Apenas 1 amostra foi processada acima de 24 horas com intervalo de 26 horas e 18 minutos entre coleta e processamento. Houve repetição no processamento desta amostra devido à ausência de colônias em filtração por diluição seriada e, portanto, para contagem de *E. coli* termotolerante volumes de 1 e 10 mL foram novamente filtrados.

A coloração purpura-magenta apresentada pelas colônias crescidas no meio de cultura HiCrome M-TEC Agar (Figura 2) significa que ocorreu a produção da enzima β -glucuronidase pelas bactérias da colônia que agiu sobre o composto cromógeno (5-bromo-6-cloro-3-indolil- β -D-glucuronido) contido no meio modificado e corresponde ao crescimento de *E. coli* termotolerante. A quantificação de CFUs obtido pela técnica de MF a partir 100mL de água bruta superficial foi usada para determinação do número total de *E. coli* termotolerante. Desta forma, placa com crescimento intenso (Figura 2) está representado em A, e em B, placa com crescimento passível de ser quantificado para determinar a concentração em CFU/100mL de água bruta.

O controle de qualidade dos ensaios foi sempre comprovado pela ausência de colônias, representado pelos controles negativos que eram feitos em todas amostras de água bruta superficial analisada por coleta (Figura 3).

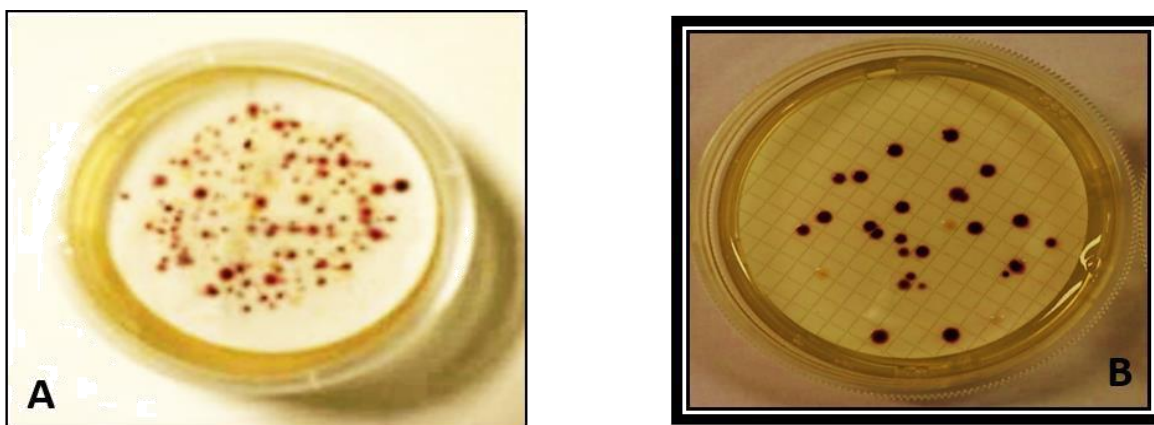


Figura 2: Crescimento de colônias de *E. coli* termotolerante em meio de cultura HiCrome M-TEC Agar (coloração magenta roxo) após realização da técnica de MF da água bruta superficial da Bacia Hidrográfica Ribeirão João Leite.

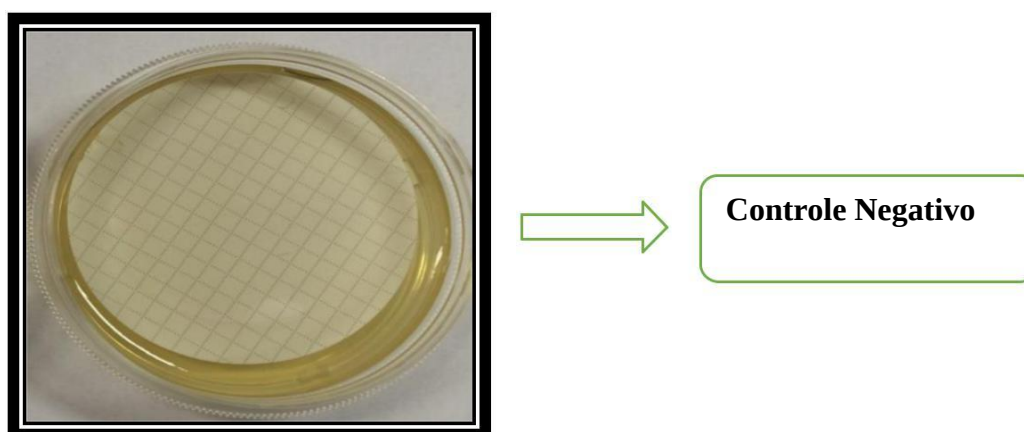


Figura 3: Ausência de crescimento bacteriano no meio de cultura HiCrome M-TEC Agar apresentado pelo controle negativo obtido pela técnica da membrana filtrante.

Os resultados da contagem de *E. coli* termotolerante (CFU/100 mL) obtidos nas análises de cada ponto estudado, representados em valores mínimos, máximos e médias estão apresentados na Tabela 7. O menor valor encontrado ($8,89 \times 10^1$) foi observado para o Córrego Carapina (Goianápolis) e o máximo ($3,11 \times 10^5$) para o Ribeirão João Leite (Campo Limpo). Entretanto em relação à média de CFU de *E. coli*/100 mL de água, ambos, respectivamente, continuaram apresentando o menor ($1,44 \times 10^3$) e o maior valor ($5,5 \times 10^4$) em comparação aos demais pontos amostrados.

Tabela 7: Valores mínimo, máximo e média de *E. coli* termotolerante (CFU/100 mL de água bruta superficial) obtidos pela técnica da MF por ponto de coleta no período de setembro de 2015 a março de 2016.

Pontos de coleta	Min	Max	Média
Captação (Goiânia) – 1	6,89E+02	6,89E+04	2,10E+04
Rib. João Leite (Anápolis) – 5	2,44E+02	1,38E+04	5,28E+03
Rib. João Leite (Campo Limpo) – 6	4,00E+02	3,11E+05	5,50E+04
Rib. João Leite (Terezópolis) – 8	5,78E+02	2,02E+04	8,76E+03
Córrego Bandeira (Nerópolis) – 12	1,78E+02	3,33E+03	5,75E+03
Córrego Jenipapo (Anápolis) – 14	1,11E+02	1,69E+05	2,59E+04
Córrego Jurubatuba (Campo Limpo) – 18	3,11E+02	2,84E+05	5,07E+04
Córrego Maria Paula (Terezópolis) – 20	4,89E+02	1,84E+04	5,70E+03
Córrego Descoberto (Nerópolis) – 23	2,67E+02	8,00E+03	2,83E+03
Córrego Rosa (Terezópolis) – 24T	5,11E+02	1,78E+04	6,99E+03
Córrego Macaúba (Terezópolis) – 41	9,33E+02	6,22E+04	1,38E+04
Córrego Carapina (Goianápolis) – 42	8,89E+01	7,56E+03	1,44E+03
Córrego Grama (Terezópolis) – 43	1,07E+03	8,67E+03	4,05E+03

5.1.1. Média de *E. coli* por município de coleta no período de setembro de 2015 a março de 2016

Os resultados demonstraram que, ao longo do período de estudo, as 91 amostras analisadas apresentaram resultados positivos para a presença de *E. coli* termotolerante, no entanto variação da quantidade foi ampla nos meses de estudo. Como está demonstrado na figura 4, média de *E. coli* (CFU/100mL) pelos 6 municípios durante os 7 meses de estudo (setembro de 2015 a março de 2016), a maior média de *E. coli* ocorreu no município de Campo Limpo no ponto Ribeirão João Leite ($5,5 \times 10^4$ CFU/100mL) seguido do Córrego Jurubatuba ($5,07 \times 10^4$ CFU/100 mL), sendo que a menor média ($1,44 \times 10^3$ CFU/100mL) ocorreu no município de Goianápolis no ponto localizado no Córrego Carapina.

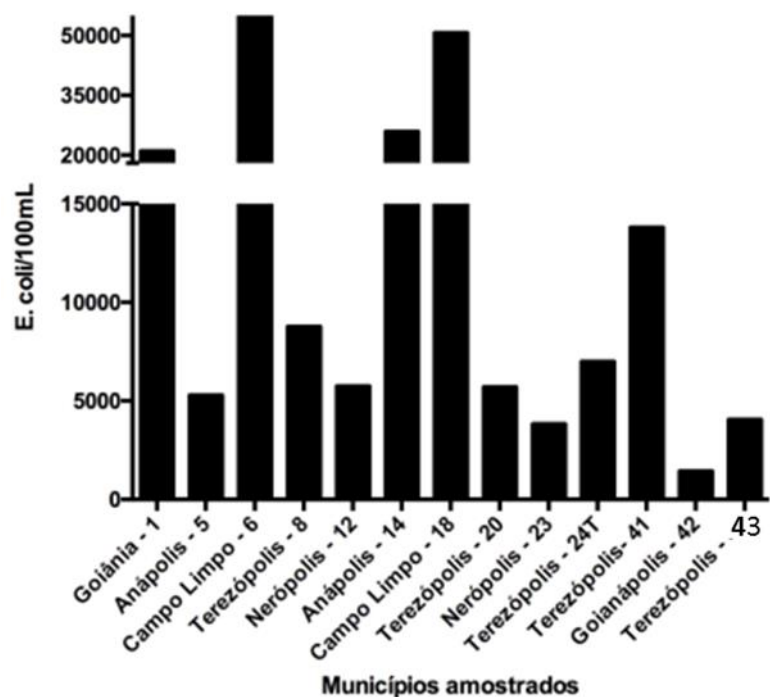


Figura 4: Média da *E. coli* termotolerante (CFU/100mL) de água bruta superficial em relação aos municípios localizados ao longo da Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite e Ponto de Captação.

A figura 5 mostra a porcentagem mensal com níveis máximo de *E. coli* termotolerante CFU/100mL de água dos pontos amostrais durante o período de estudo. O mês de dezembro de 2015 foi o que apresentou cerca de 53,85% dos pontos coletados com o valor de *E. coli* termotolerante máximo representados pelos municípios: Campo Limpo (Ribeirão João Leite e Córrego Jurubatuba), Anápolis (Córrego Jenipapo), Terezópolis (Ribeirão João Leite e Córrego Maria Paula) e Nerópolis (Córrego Bandeira e Córrego Descoberto). Após dezembro, o mês de março de 2016 foi o que apresentou um percentual elevado de pontos coletados com nível máximo, 23,8 % das amostras analisadas, representado pelo município de Terezópolis (Córrego Macaúba, Córrego Rosa e Córrego Grama).

Os pontos localizados nos municípios de Goiânia (Captação) e Anápolis (Ribeirão João Leite), apresentaram concentrações máximas de *E. coli* durante o mês de janeiro de 2016 (15,38%) e o ponto localizado no município de Goianópolis (Córrego Carapina) apresentou o nível máximo de *E. coli* no mês de fevereiro de 2016 (7,78%).

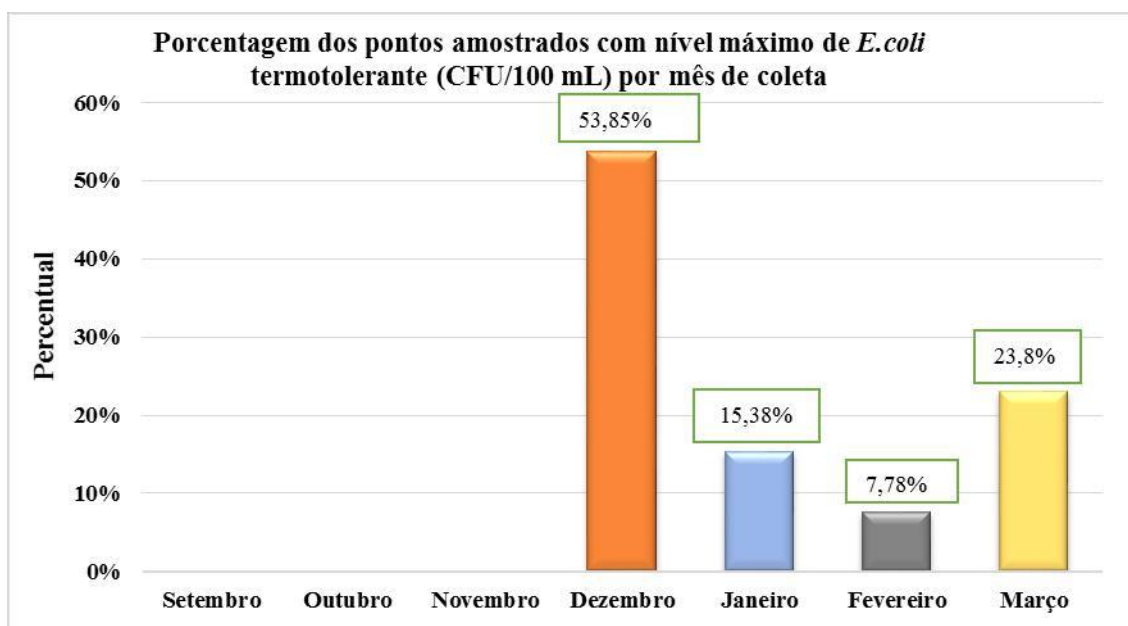


Figura 5: Meses com maior concentração de *E. coli* termotolerante ao longo de período de estudo, setembro de 2015 – março de 2016

5.1.2. Análises físico-químicas da qualidade da água superficial dos pontos estudados na Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite

Além do parâmetro microbiológico, as análises físico-químicas deste estudo visaram avaliar a qualidade da água dos pontos localizados na Bacia Hidrográfica. A Tabela 7, representada abaixo, demonstra que se encontrou 5,5% (5/91) de amostras com pH abaixo de 6,0.

Dentre os valores máximos e mínimos do pH, o menor valor foi 5,19 obtido da amostra do Ribeirão João Leite (Terezópolis) coletada em janeiro de 2016 e o maior (7,79) das amostras do Córrego Grama (Terezópolis) de dezembro de 2015 e do Ribeirão João Leite (Campo Limpo) de janeiro de 2016. O valor médio do pH encontrado neste estudo foi de 7,32.

A temperatura da água também é um dos parâmetros importantes no ecossistema aquático. De acordo com os dados apresentados na tabela 8, o Córrego Carapina, localizado no município de Goianápolis, apresentou a temperatura mínima de 22 °C enquanto que a máxima de 28 °C pode ser observada para o Córrego Rosa e ponto Captação. A temperatura média obtida no decorrer do período de coleta foi de 24,6 °C. Pode-se notar também, uma variação na temperatura ambiental, sendo que a mínima

registrada foi de 19 °C no Córrego Macaúba, localizado no município de Terezópolis, e a máxima registrada foi de 36 °C no Ribeirão João Leite no ponto localizado no município de Anápolis.

De acordo com os dados da (Tabela 8), os valores de condutividade variaram de 70,4 µS/cm, resultado obtido do Córrego Descoberto, a 239 µS/cm, resultado correspondente ao Córrego Grama. Sendo que o valor médio de condutividade apresentado durante o período estudado foi de 148,06 µS/cm. A turbidez da água variou de 2,7 UTN (Córrego Bandeira) a 180 UTN (Ribeirão João Leite, Campo Limpo).

Análise de Regressão apresentou baixa linearidade entre *E. coli*/CFU 100 mL e turbidez das amostras analisadas neste estudo ($R^2 = 0,20131$).

Tabela 8: Resultados físico-químico das amostras de água bruta superficial dos 13 pontos estudados localizados na Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite durante período setembro de 2015 a março de 2016.

Pontos de coleta de amostras	Ph		Temperatura da água (°C)		Temperatura ambiente (°C)		Turbidez (uT)		Condutividade (µs/cm)	
	Media	Intervalo	Media	Intervalo	Media	Intervalo	Media	Intervalo	Media	Intervalo
Captação (Goiânia) – 1	7,54	6,87 - 7,8	5,20*	23 – 28	29	26 - 33	26,53	13,7 - 69	128,83	109,6 - 145
Rib. João Leite – 5	7,57	6,72 - 7,85	24,82*	24 – 26	29,66	25 - 36	47,54	6,85- 125	123,3	112,6- 143,8
Rib. João Leite– 6	7,36	6,33 - 7,89	24,53*	23,5 – 26	31,1	26 - 35,2	64,61	9,3 - 180	140,56	128,3- 160,4
Rib. João Leite– 8	7,43	5,19 - 7,88	24,94	24 - 25,6	28,29	25 - 30	43,46	7,2- 150	134,17	108,6- 159,8
Córrego Bandeira – 12	7,27	6,54- 7,72	24,73*	23 - 26,4	27,04	22 - 31,3	13,07	2,7- 34	133,89	99,2 - 152,6
Córrego Jenipapo – 14	7,58*	6,85 - 7,85	24, 43*	23,7 – 25	30,04	24 - 35	34,6	4,4- 75	109,53	95 - 130,4
Córrego Jurubatiba – 18	7,46	6,28 - 7,76	24,53*	22,5 - 25,7	30,16	28 - 35,1	49,79	6,25- 136	174,23	163,4 - 192
Córrego Maria Paula – 20	7,37	5,44- - 7,82	24,47	23,5 - 25,1	27,43	24 - 30	19,36	4,5- 44	177,74	152- 203
Córrego Descoberto – 23	6,88	5,38 - 7,5	24,99	24 – 27	28,64	24 - 30	19,51	4,1- 40	121,23	70,4 - 147,9
Córrego Rosa – 24T	7,27	5,93 - 7,88	26,37	24,9 – 28	29,5	26 - 30,5	33,81	14 - 75	98,61	83 - 109,8
Córrego Macaúba – 41	7,09	6,03 - 7,83	23,47	23 - 25,3	24,49	19 - 26,4	12,53	3,7- 33	196,33	162,4 - 222
Córrego Carapina – 42	6,97	6,28 - 7,47	23,07	22 – 25	25,21	20 - 27	33,41	10,7 - 80,5	172,81	130- 235
Córrego Grama – 43	7,43	5,78 - 7,89	23,83	23 - 25,8	26,57	23 - 28	27,06	6,5 - 84,2	213,56	171,9 - 239

*Pontos calculados sem a duplicata na primeira coleta

5.2. Análises moleculares para amostras fecais

5.2.1. Sensibilidade dos oligonucleotídeos iniciadores para detecção e amplificação do marcador 16S rRNA *Bacteroidales* universal

Todos DNA de amostras fecais coletadas para este estudo foram amplificados para o marcador 16S rRNA *Bacteroidales* utilizando os oligonucleotídeos BacUni-520f, BacUni-690r1 e BacUni-656p (KILDARE et al. 2007). Uma diferença de 2 unidades do Ct foi observada entre as diluições de DNA fecal 1:4 e 1:16 indicando ausência de inibidores de reação da PCR.

A curva padrão obtida com diluições plasmidiais de DNA fecal hospedeiro humano apresentou uma eficiência > 90 e $R^2 = 0,99$ para esses oligonucleotídeos iniciadores. Essa curva foi então utilizada para obtenção do Ct. A sequência de clone plasmidial humano está demonstrado no apêndice 1.

5.2.2. Sensibilidade e especificidade do oligonucleotídeos utilizados na técnica da PCR convencional

Os resultados obtidos pela técnica da PCR para os oligonucleotídeos iniciadores CF128f-Bac708r, desenhados para amplificar o marcador 16S rRNA *Bacteroidales* hospedeiro específico bovino, em DNA de 25 amostras de ruminantes (18 bovinos, 3 cabras domésticas e 4 ovelhas) e em DNA das demais amostras não ruminantes (n=46), apresentaram banda de 580 pb somente para as amostras consideradas alvos, ruminantes. Portanto, esses oligonucleotídeos iniciadores apresentaram sensibilidade e especificidade de 100% em DNA de amostras de fecais coletados nesta área geográfica.

Os oligonucleotídeos iniciadores HF183f-Bac708r, que identificam o marcador genético 16S rRNA de *Bacteroidales* específico–humano, amplificou 14 de um total de 23 amostras de DNA fecal humano. Portanto, a sensibilidade atingida em nossas amostras fecais foi de 60,9%. Entretanto, não foi observado amplificação do DNA de 48 amostras não alvos (outras espécies) correspondendo a uma especificidade de 100%. Os resultados das amplificações com os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR que foram usados para calcular a especificidade e sensibilidade estão apresentados na (Tabela 9).

Tabela 9: Números de amostras positivas para PCR convencional apresentados na avaliação dos oligonucleotídeos iniciadores para a presença do hospedeiro-específico bovino (CF128f-Bac708r) e humano (HF183f-Bac708r) em DNA amostral fecal humanas e de diferentes animais.

Fonte	Nº de amostras	CF128f-Bac708r (Nº de amostras positivas)	HF183f-Bac708r (Nº de amostras positivas)
Humano	23	0	14
Primata	2	0	0
Bovino	18	18	0
Canino	6	0	0
Suíno	4	0	0
Coelho	1	0	0
Gato	3	0	0
Aves silvestres	3	0	0
Galinha	4	0	0
Caprino	4	4	0
Ovino	3	3	0
Total	71	25	14

5.2.3. Sensibilidade e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores hospedeiros utilizados na PCR em tempo real

De acordo com os resultados obtidos com a amplificação do marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* hospedeiro-específico humano por PCR em tempo real (Tabela 9), a sensibilidade obtida aplicando oligonucleotídeos iniciadores HF183f Sybr-Bac708r (SEURINK et al. 2005) e aplicando oligonucleotídeos iniciadores BacHum (KILDARE et al. 2007) foi de 60,9% e 95,7%, respectivamente. No entanto, esses oligonucleotídeos iniciadores, quando aplicados em amostras de DNA fecal não alvo, apresentaram especificidade de 83% (SYBR Green) e 79,1% (TaqMan).

Apesar dos oligonucleotídeos HF183-Syb_708r apresentarem especificidade superior (83%) quando comparados ao sistema TaqMan (79%), esses oligonucleotídeos não foram considerados para aplicação em água bruta superficial. Isto foi devido a superior sensibilidade apresentada pelo oligonucleotídeos iniciadores do sistema TaqMan (95,7%) e a especificidade encontrada para os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR convencional (100%).

A sensibilidade encontrada para os oligonucleotídeos hospedeiro específico-bovino BacCow (reclassificados como ruminantes) foi de 100% enquanto que a especificidade encontrada foi de 54,35%.

Tabela 10: Avaliação de oligonucleotídeos iniciadores hospedeiro-específicos aplicados em DNA de amostras fecais humanas e animais pela PCR TaqMan e PCR Sybr Green

Origem da amostra	Nº de amostras analisadas	BacHum	HF183f Sybr_Bac708r	BacCow
		Nº de amostras positivas	Nº de amostras positivas	Nº de amostras positivas
Humano	23	22	14	14
Primata	2	1	1	1
Bovino	18	2	2	18
Canino	6	2	1	4
Suíno	4	0	0	4
Coelho	1	0	0	0
Gato	3	3	1	1
Aves silvestre	3	1	0	1
Galinha	4	1	0	0
Caprino	4	0	1	4
Ovino	3	0	2	3

Apesar de ter havido amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores BacCow a partir do DNA de amostras fecais humanas, os valores de *Ct* foram altos, variando entre 32 a 39 com média de aproximadamente 35 (Tabela 11). Os oligonucleotídeos iniciadores BacHum apresentaram valores de *Ct* de 34 e 37 para 2 amostras bovinas, respectivamente (Tabela 10). As espécies domésticas com maior número de reação cruzadas foram os suínos e caninos para os oligonucleotídeos iniciadores BacCow. Sendo o gato e os caninos, este em menor proporção, para os oligonucleotídeos iniciadores BacHum. Dos animais silvestres, DNA fecal de primata (guariba) e de ave silvestre (marreca-cabocla) apresentaram reação cruzada considerável para os oligonucleotídeos iniciadores BacHum e BacCow, respectivamente.

Os resultados da curva padrão utilizando diluição plasmidial seriada para os oligos hospedeiro-específico apresentaram $R^2 = 0.99$ e eficiência entre 92 e 96.

Tabela 11: Intervalo de *Ct* apresentados em DNA amostral não alvo amplificada pela técnica de PCR em tempo real para o marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales*.

DNA não alvo	BacUni (<i>Ct</i>)	BacHum (<i>Ct</i>)	BacCow (<i>Ct</i>)
Primata (n=1)	19, 16	21,47	31,56
Ave silvestre (n=2)	27,0-32,98	0-37,07	0-27,49
Gato (n=3)	20,51-22,92	29,01-31,87	0-31,37
Canino (n=4)	21,07-28,35	0-32,39	0-30,05
Suíno (n=4)	23,69-26,55	0	28,15-33,52
Galinha (n=1)	29,94	36,20	0
Humano (n=14)	12,73-26,97	18,54-33,72	31,47-38,45
Bovino (n=2)	12,3-19,35	33,42-37,23	14,32-23,40

5.3. Identificação do marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* em água bruta superficial da Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite.

5.3.1. Aplicação do oligonucleotídeos iniciadores BacUni em água bruta superficial

Ao analisarmos 33 amostras extraídas de água bruta superficial de cinco pontos de escolha ao longo da Bacia Hidrográfica com as seguintes características: 2 de influência humana, 2 de influência animal e 1 considerado neutro, foi possível confirmar a presença do marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* universal utilizando os oligonucleotídeos iniciadores BacUni 520f, BacUni620r e BacUni656p. Os valores do *Ct* para o marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* universal apresentaram intervalo entre 23 a 32 e média de 27 *Ct*.

5.3.2. Aplicação de oligonucleotídeos iniciadores para identificação do marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* específico–humano em água bruta superficial da Bacia Hidrográfica Ribeirão João Leite

Não foi observado amplificação em DNA extraído das 33 amostras coletadas de água bruta superficial quando utilizado os oligonucleotídeos HF183f-Bac708r, inclusive para os pontos com alta influência urbana (Ribeirão João Leite Captação e Córrego Descoberto). Entretanto, quando aplicado os oligonucleotídeos iniciadores BacHum, 4 amostras destes pontos apresentaram *Ct* entre 34-38 com média 37. Os valores de *Ct* não foram considerados representativos para confirmar a presença do marcador alvo. Desta

forma, dos 5 pontos analisados não foi detectado a presença do marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* específico humano como indicador de poluição fecal humana.

5.3.3. Aplicação de oligonucleotídeos iniciadores para identificação do marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* específico-bovino em água bruta superficial

De acordo com os resultados apresentados quando aplicado os oligonucleotídeos iniciadores CF128f - Bac708r pela técnica de PCR convencional em 33 amostras de água bruta superficial, três amostras apresentaram bandas de 580 pb quando analisadas em gel de agarose. Figura 6 demonstra amplificação de uma das amostras positivas. Estas amostras eram oriundas dos pontos estudados com características de influência agropecuária (Córregos Jurubatuba e Bandeira). As demais amostras analisadas não apresentaram amplificação para identificação deste marcador.

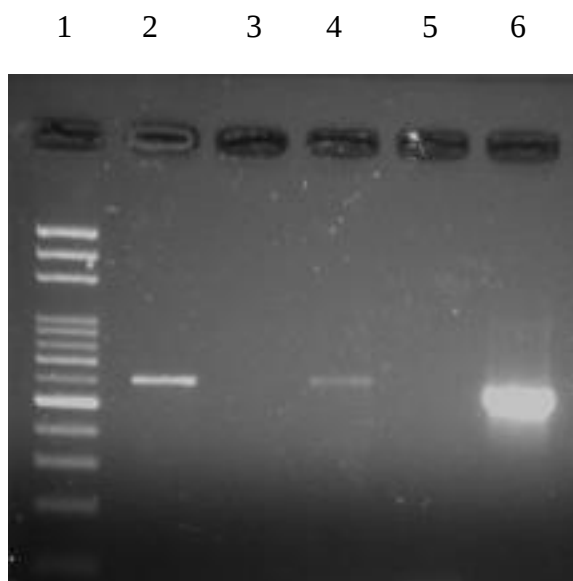


Figura 6: Resultado para a presença de marcador genético *Bacteroidales* específico-bovino em amostras de DNA em ponto de alta influência agropecuária: faixa 1= marcador, faixa 2 = controle positivo bovino, faixa 3 = controle negativo, faixa 4 = Córrego Jurubatuba, faixa 5 = sem amostra quando aplicado os oligonucleotídeos iniciadores CF128f - Bac708r. Faixa 6 = controle positivo humano marcador HF183.

Devido à presença de reações cruzadas apresentada pelos oligonucleotídeos iniciadores BacCow, o limite considerado neste estudo para detecção do marcador hospedeiro-específico ruminantes em amostras de água bruta superficial foi de 32 Ct.

Desta forma, nove amostras oriundas dos pontos considerados com influência agropecuária (Córregos Jurubatuba e Bandeira) apresentaram *Ct* variando entre 26,95-31,93. A Tabela 11 demonstra os resultados obtidos para o marcador 16S rRNA *Bacteroidales* universal e específico bovino (ruminante) para amostras coletadas em pontos com influência agropecuária (*Ct* <32) comparados aos obtidos pela PCR (CF128f-Bac708r).

Tabela 12: Resultados das análises dos oligonucleotídeos iniciadores para identificação do marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* específico-ruminantes em água bruta superficial em pontos com influência agropecuária localizados na Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite.

Pontos de coleta	Data coleta	BacUni (<i>Ct</i>)	BacCow (<i>Ct</i>)	CF128f-Bac708r
Córrego Bandeira	9/2015	27,55	30,26	0
	10/2015	28,48	31,13	0
	11/2015	28,2	29,86	0
	12/2015	28,83	31,2	0
	1/2016	26,25	26,95	1
Córrego Jurubatuba	9/2015	27,39	28,88	1
	10/2015	28,57	29,45	0
	02/2016	NR	30,95	0
	03/2016	30,82	31,93	1

NR – Não realizado

6. DISCUSSÃO

Das 91 amostras de água bruta superficial analisadas da Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite, foi encontrado um valor mínimo de $8,89 \times 10^1$ e valor máximo de $3,11 \times 10^5$ CFU/100 mL de *E. coli* termotolerante. O valor médio máximo geral encontrado foi de $5,5 \times 10^4$ e o mínimo de $1,44 \times 10^3$ *E. coli* CFU/100 mL. Os resultados do presente estudo para o ponto de Captação, apresentou valores de *E. coli* num intervalo de $6,89 \times 10^2$ a $6,89 \times 10^4$ CFU/100 mL, sendo o valor médio de $2,10 \times 10^4$ *E. coli* CFU/100 mL.

A Resolução nº 357 do CONAMA de 17 de março de 2005 estabelece o máximo de 1.000 coliformes termotolerantes por 100 mililitros em 80% ou mais de pelo menos 6 (seis) amostras coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. Neste estudo, a presença de *E. coli* termotolerante foi avaliada em 13 pontos com coletas mensais durante 7 meses, e 68% das amostras apresentaram >1000 CFU/100 mL sendo altos níveis de *E. coli* observado no mês de dezembro, possivelmente devido a alta incidências de chuvas nesta época de ano.

Ecossistemas que apresentam valores baixos de pH têm elevadas concentrações de ácidos orgânicos dissolvidos sendo encontrados; altas concentrações de ácido sulfúrico, nítrico, oxálico, acético, além de ácido carbônico formado (VASCONCELOS e SOUSA, 2011). A maioria das reações bioquímicas em ambientes naturais aquáticos são influenciados pelo seu pH (VANITHA et al., 2014), no entanto, o pH não tem qualquer efeito adverso direto sobre a saúde, mas ao mesmo tempo altera o sabor da água (MOSTAFA, 2013). Os pontos de amostragem analisados apresentaram valor de pH mínimo de 5,19 e máximo de 7,89, conforme demonstrado na tabela 8. Já a distribuição média do pH durante o período de estudo, apresentou uma média mínima 6,88 e máxima 7,57 (Tabela 8).

Analisando os resultados obtidos, foi possível afirmar que 94,5% das amostras analisadas estão dentro dos parâmetros determinados pela resolução da Portaria nº 2914 de dezembro de 2011 que define que as águas doces pertencentes a classe II apresenta o pH ótimo entre 6 a 9. Desta forma conclui – se que o pH destas águas está dentro dos padrões normais para manter a saúde ambiental aquática.

A turbidez da água é importante uma vez que afeta tanto a aceitabilidade pelos consumidores, bem como a seleção e eficiência dos processos de tratamento. Por isso, recomenda-se que, a turvação deve ser consistentemente inferior a 5 uT (*Water sampling and analysis*). Os valores de turbidez variaram entre 2,7 a 180 uT nas amostras de água bruta superficial analisadas. Algumas amostras apresentaram valores de turvação mais elevados do que recomendado pela resolução do CONAMA 357/05 que é de < 100 uT o limite máximo permitido para água doce Classe II. De acordo com Vasconcelos e colaborador (VASCONCELOS e SOUSA, 2011), altos valores de turbidez remetem a uma preocupação em relação à sustentabilidade do manancial e à permanência no enquadramento Classe II de águas para abastecimento.

A medição de condutividade indica a concentração de sais dissolvidos na água, sendo que, a alta condutividade pode constituir um risco para a saúde uma vez que ela protege os microrganismos do tratamento e favorece o seu crescimento (MOSTAFA, et al., 2013). De acordo com a tabela 8, os valores de condutividade das amostras de água superficial do manancial no presente estudo, variaram entre 70,9 a 239 uS /cm. Entretanto, constatou-se que a resolução da Portaria nº 2914 de dezembro de 2011 não preconiza limites aceitáveis de condutividade o mesmo se pode observar na resolução 357/05 do CONAMA.

A temperatura superficial é influenciada por fatores tais como latitude, altitude, estação do ano, período do dia, taxa de fluxo e profundidade (PINTO et. al., 2010), desempenha ainda, um papel crucial no meio aquático, condicionando as influências de uma série de variáveis físico-químicas (CETESB, 2009). Entretanto, geralmente na prática não tem importância como parâmetro da qualidade da água para o consumo.

A temperatura da água, avaliada no momento da coleta das amostras, não apresentou uma variação significativa no período de estudo sendo, a mínima registrada de 22 °C e 28 °C para máxima, com média 24,6 °C.

Adicionalmente, não houve variação significativa da temperatura ambiental sendo mínima registrada 19 °C e máxima 36 °C, apresentando em média 28,23 °C.

De acordo com os resultados obtidos para a identificação do marcador *Bacteroidales* universal, quando aplicado os oligonucleotídeos iniciadores BacUni-520f-690r1-656P, em DNA extraídos de amostras fecais humanas e de diferentes animais, o teste apresentou 100% sensibilidade. Os resultados obtidos em nosso estudo se assemelham aos realizados em vários países como Estados Unidos (KILDARE et al., 2007), Quênia (JENKINS et al., 2009), Canadá (LEE et al., 2010), Índia (ODAGIRI, et al.,

2015) o que significa que este marcador não apresenta variação ao longo das diferentes regiões geográficas de estudo.

No estudo de Layton e colaboradores (LAYTON et al., 2013), utilizando o ensaio HF183 *EndPoint* foi aplicado para avaliar o marcador genético específico – humano em amostras fecais, observou-se uma sensibilidade de 88% e uma especificidade de 100%. No estudo realizado por Boehm e colaboradores (BOEHM et al., 2013) com o mesmo objetivo, obteve-se 80% de sensibilidade e 80% de especificidade em cinco dos sete laboratórios em que foram realizados os ensaios. Entretanto, dois laboratórios apresentaram sensibilidade reduzida de 50%.

Comparativamente aos resultados reportados no presente estudo, o porcentual para a sensibilidade foi um pouco abaixo dos estudos mencionados acima (60,8%), mas a especificidade (100%) das amostras locais demonstrando que está dentro ou acima dos padrões encontrados em outros estudos e podem ser aplicados em amostras de água bruta superficial na região estudada.

Em nosso estudo, quando avaliado o potencial de identificação do marcador genético específico – humano utilizando os oligonucleotídeos iniciadores BacHum (BacHum-160f, BacHum-241r e BacHum-193p) em DNA de amostras fecais humanas e de diferentes animais, pode-se observar que este apresentou 95,7% de sensibilidade e 79,1% de especificidade. No estudo realizado por Kildare e colaboradores (2007), amplificação foi observada em 12 de 18 amostras de DNA fecal humano (66,7% sensibilidade) mas, em contrapartida, algumas amostras não alvo (1 de 8 caninos) também tiveram amplificação para este marcador

Entretanto, no estudo realizado por Layton e colaboradores (LAYTON et al., 2013), a sensibilidade encontrada para os mesmos oligonucleotídeos iniciadores para em amostras alvo foi de 100% enquanto a especificidade reportada foi de 87%. Comparando esses resultados com o estudo realizado em Quênia (JENKINS et al., 2009), que objetivou testar a validade de cinco ensaios de PCR, os resultados foram muito abaixo quanto a sensibilidade (25%) em relação aos demais estudos.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, houve reação cruzada quando aplicado oligonucleotídeos iniciadores BacHum (BacHum-160f, BacHum-241r e BacHum-193p) em DNA fecal de cães (2/6), gatos (3/3), aves silvestres (1/3), primata (1/2), galinha (1/4) e bovino (2/18). Entretanto, os valores de *Ct* obtidos para este marcador em DNA fecal de primata e gato foram bem menores (<30) aos encontrado para as outras espécies (>32).

Resultados apresentados no presente estudo para identificação do marcador genético 16S rRNA *Bacteroidales* específico – bovino (atualmente designados ruminantes) pela técnica PCR (CF128f-Bac708r) em DNA de amostras fecais de ruminantes (bovino, caprino e ovino) e de diferentes animais, incluindo humana, teve como resultado 100% sensibilidade assim como 100% especificidade. Estudos realizados em 4 países do continente europeu (Portugal, França, Reino Unido e Irlanda) também reportaram 100% sensibilidade para o marcador CF128, entretanto a especificidade encontrada foi de 72% (REISCHER et al., 2013). Estes oligonucleotídeos iniciadores são tão sensíveis quanto específicos que podem ser aplicados em amostras de águas ambientais em nossa área geográfica apresentando resultados confiáveis servindo de referência para estudos futuros.

O marcador CF128, quando aplicado ao nosso estudo pela técnica da PCR em tempo real, apresentou similar sensibilidade (100%) ao estudo realizado por (Kildare et al., 2007). Entretanto, o referido marcador amplificou DNA em amostras de humano, primata, canino, suíno, gato e ave silvestre conferindo 54% de especificidade. De acordo com os dados obtidos em nosso estudo, o nível de amplificação desse marcador ($C_t < 32$) foi significativo apenas em DNA de amostras fecais de suínos (4/4) e caninos (6/6).

Estudo realizado em 16 países representando os 6 continentes (REISCHER et al., 2013) aponta para a presença de reação cruzada para estes oligonucleotídeos iniciadores com especificidade de 57%. No entanto, devido a apresentação de reações cruzadas como apresentado no estudo, deve-se ter cuidado em utilização de somente um tipo de marcador para esta técnica o que corre o risco de apresentar resultados não confiáveis. Deste modo, o uso de dois ou mais marcadores proporcionaria resultados confiáveis.

Quando aplicados em DNA de amostras de água bruta superficial coletadas na Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite, não houve amplificação para o marcador humano HF183 tanto da PCR *Endpoint* quanto em tempo real ($C_t > 32$ para as amostras amplificadas e não foram considerados significantes). Interessante notar que o marcador ruminante CF128 *Endpoint* e tempo real, amplificou DNA de amostras de água bruta provenientes de locais considerados alta influência agropecuária ($C_t < 32$).

A diferença encontrada quanto a sensibilidade dos marcadores HF183 e CF128 confirma os resultados de estudos realizados em diferentes regiões geográficas (Europa, América do Norte, Índia e África) para ambos marcadores; ou seja, a instabilidade da presença do marcador HF183 em humanos comparado ao marcador CF128 que apresentou maior estabilidade (presença) entre as populações ruminantes.

CONCLUSÕES

A qualidade microbiológica da água bruta superficial da Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite apresentou uma concentração de *E. coli* termotolerante acima dos padrões vigentes atuais (1000 CFU/100 mL) para água doce Classe II.

Testes com o marcador genético *Bacteroidales* Universal (BacUni) obtiveram 100% de sensibilidade nas amostras fecais coletados de diferentes fontes humanas e animais.

Foi possível utilizar o marcador 16S rRNA *Bacteroidales* (BacUni) como indicador alternativo de poluição fecal em nosso meio geográfico.

A avaliação do marcador genético humano HF183 pela PCR apresentou eficácia um pouco mais baixa para a sensibilidade (60,9%) comparativamente ao resultado obtido pela PCR em tempo real (95,7%). Todavia, a especificidade deste marcador diferiu entre as duas técnicas (100% e 79,1%), sugerindo utilização simultânea como forma de garantir resultados confiáveis em estudos de rastreamento de poluição fecal humana.

O marcador genético ruminante CF128 apresentou ser eficaz em identificar DNA de amostras fecais de ruminantes para ambas as técnicas da PCR

Resultados confirmatórios da presença do marcador 16S rRNA *Bacteroidales* universal e hospedeiros específicos (humano e ruminante) em DNA de amostras fecais de nossa região geográfica, conclui-se que é possível incluir a aplicação deste marcador em estudos de rastreamento microbiológico por metodologias moleculares no controle da qualidade de águas ambientais para a identificação e diferenciação das fontes de poluição fecal.

REFERÊNCIAS

- AGUILA, d`P, Suares. et al. Avaliação da qualidade de água para abastecimento público do Município de Nova Iguaçu. v. 16, n. 3, p. 791-798, 2000.
- AHMED, W. et al. Evaluation of multiple sewage associated *Bacteroides* PCR markers for sewage pollution tracking. *Elsevier Ltd.*, n. 49, p. 4872-4877, 2009.
- AMARAL, L. A. et al. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. *Rev Saúde Pública*, v.37, n. 4, 510-524, 2003.
- ASHBOLT, Nicholas J. et al. Indicators of microbial water Quality. p. 290-316, 2001.
- BASTOS, Rafael K.X. et al. II-057-Coliformes como indicadores da qualidade da água: Alcance e limitações, 2000.
- BERNHARD, Anne, E.; FIELD Katharine G. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *American Society for Microbiology*, v. 66, n. 4, p. 1587-1594, 2000.
- BERNHARD, Anne. E.; FIELD, K. G. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.66, n. 10, p. 4571-4574, 2000.
- BITTON, Gabriel. Microbial indicators of fecal contamination: Application to microbial. *Florida Stormwater Association*, p. 7. 2005.
- BOEHM, A. B. et al. Performance of forty-one microbial source tracking methods a twenty-seven lab evaluation study. *Water Res*, v. 4, n. 18, p. 6812-28, 2013.
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Resolução nº 1469, de 29 de dezembro de 2000.** Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências.
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005.** Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

- BRASIL, Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. **nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011.** Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Inspeção sanitária em abastecimento de água / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006
- BYAMUKAMA, D. et al. Performance Characteristics of qPCR Assays Targeting Human- and Ruminant-Associated *Bacteroidetes* for Microbial Source Tracking across Sixteen Countries on Six Continents. *Environ. Sci. Technol.*, v.47, p. 8548–8556, 2013.
- CABRAL, João P. S. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *Environ. Res. Public Health*, v. 7, p. 3657-3703, 2010.
- CARVALHO, R.S.; Água, um bem que precisa ser cuidado. Coordenador Nacional do Projeto de Estruturação Institucional de Consolidação da Política Nacional de Recursos Hídricos - BRA/OEA/01/002 - SRH/MMA, 2012.
- CERQUEIRA, D.A. et al. Perfis de ocorrência de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* em diferentes amostras de água. 1999.
- CHOPRA, A.K.; et al. Alternative microbial indicators of faecal pollution: Current perspective. *Iran. J. Environ. Health. Sci. Eng.*, v. 3, n. 3, p. 205-216, 2006.
- Conselho Estadual de Recursos Hídricos (GO). Legislação de Recursos Hídricos do Estado de Goiás/Conselho Estadual de Recursos Hídricos, Secretaria Estadual do Meio Ambiente e dos Recursos Hídricos. *Superintendência de Recursos Hídricos*. 1ª. edição, p. 314, 2012.
- COSTA, R. Coagulase-positive Staphylococcus and enterobacteria in fresh shrimp Litopenaeus vannamei, p. 566-571, 2011.
- USEPA Office of Water. Review of Coliphages as Possible Indicators of Fecal Contamination for Ambient **Water Quality**. EPA 820-R-15-098; USEPA Office of Water Washington, DC, USA, 2015.
- GAWLER, A.H. et al. Validation of host-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genes as markers to determine the origin of faecal pollution in Atlantic Rim countries of the European Union. *Water Res.*, v. 41, n. 16, p. 3780-4, 2007.

- GRECHI, S. de Q. Avaliação da eficiência de métodos rápidos usados para detecção de coliformes totais e coliformes fecais em amostras de água, em comparação com a técnica de fermentação em tubos múltiplos. Dissertação. Araraquara, 2005.
- GOURMELON, M. et al. Evaluation of two library-independent microbial source-tracking methods to identify sources of fecal contamination in French estuaries. **American Society for Microbiology**, v. 73, n. 15, p. 4857-4866, 2007.
- HARWOOD V. J. et al. A. Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes. **FEMS Microbiol**, v. 38 (1), n. 1-40. p. 1574-6976, 2014.
- Inspeção sanitária em abastecimento de água/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 1ª edição, p. 84, 2006.
- JENKINS, M.W. et al. Identifying human and livestock sources of fecal contamination in Kenya with host-specific *Bacteroidales* assays. **Water Res**, v. 43, n. 19, p. 4956-66, 2009.
- JEONG, Ju-Yong. Et al.. Molecular Identification of Fecal Pollution Sources in Water Supplies by Host-Specific Fecal DNA Markers and Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Profiles of 16S rRNA Gene. **The Microbiological Society of Korea**, v. 46, n. 6, p. 599-607, 2008.
- KILDARE, B. J. et al. 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal *Bacteroidales*: A Bayesian approach. **Water Res**, v. 41, p. 3701-3715, 2007.
- LAYTON, B. A. et al. Performance of human fecal anaerobe-associated PCR-based assays in a multi-laboratory method evaluation study. **Water research**, v.47 p.6897 - 6908, 2013.
- LEE, Dae-Young. Et al. Quantitative Identification of fecal water Pollution Sources by TaqMan real time PCR assays Using *Bacteroidales* 16S rRNA genetic markers. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 88, p. 1373-1383, 2010.
- LIANG, L. et al. Alternative fecal indicators and their empirical relationships with enteric viruses, *salmonella enterica*, and *pseudomonas aeruginosa* in surface waters of a tropical urban catchment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.8 n.3, 2014.

- MAUFFRET A.; CAPRAIS, MP. GOURMELON M. Relevance of *Bacteroidales* and F-specific RNA bacteriophag for efficient fecal contamination tracking at the level of a catchment in France. ***Appl Environ Microbiol***, v. 78, n. 15, p. 5143-52, 2012.
- McCLELLAN S. L. Discovering new indicators of fecal pollution. ***Trends in Microbiology***, v.22, n. 12, p. 697-706, 2014.
- McQUAIQ, S. et. al. Detection of Human-Derived Fecal Pollution in Environmental Waters by Use of a PCR-Based Human Polyomavirus Assay. ***Applied and environmental microbiology***, v. 72, n.2, 2006.
- McQUAIQ, S.; GRIFFITH J, HARWOOD VJ. Association of fecal indicator bacteria with human viruses and microbial source tracking markers at coastal beaches impacted by nonpoint source pollution. ***Applied Environmental Microbiology***, v. 78, n. 18, p. 6423-6432, 2012.
- MELLO, Ker de Syomara. Caracterização de fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* isoladas das lagoas do parque Estadual do Rio Doce. Dissertação. Universidade Federal do Rio Preto. Minas Gerais. 2006.
- MESQUITA, S., NOBLE, R.T. Recent developments in monitoring of microbiological indicators of water quality across a range of water types, water resources planning, development and management. 2013, INTECH <http://dx.doi.org/10.5772/52312>.
- MIAGOSTOVICH, M. P. et al. Molecular Detection and Characterization of Gastroenteritis Viruses Occurring Naturally in the Stream Waters of Manaus, Central Amazonia, Brazil. ***Applied and environmental Microbiology***, v. 74, n. 2, p. 375-382, 2008.
- MOSTAFA, H. A. et al. Microbiological and physicochemical evaluation of grounda water in Egypt. ***International Journal of Environmental and Sustainability***, v. 2, n. 2, p. 1-10, 2013.
- NEBRA, Y.; BLANCH, A. R. Anew Selective Medium *Bifidobacterium* spp. ***Environ Microbiol***, v. 65, n. 11, p. 5173-5176, 1999.
- NOBLE, R.T. et al. Comparison of total coliform, fecal coliform, and Enterococcus bacterial indicator response for ocean recreational water quality testing. ***Water Research***, v.37, p.1637-1643, 2003.
- ODAGIRI, M. Validation of *Bacteroidales* quantitative PCR assays targeting human and animal fecal contamination in the public and domestic domains in India. ***Science of the Total Environment***. 502 p. 462–470, 2015.

- PINTO, A. L., OLIVEIRA; G. H. de; PEREIRA G. A. avaliação da eficiência da utilização do oxigênio dissolvido como principal indicador da qualidade das águas superficiais da bacia do córrego bom jardim, Brasilândia/MS. **GEOMAE**, v.1n.1 p.69 – 82, 2010.
- RABELO, C. G et al. Influência do uso do solo na qualidade da água no bioma Cerrado: um estudo comparativo entre bacias hidrográficas no Estado de Goiás, Brasil. **Ambi-Agua**, v. 4, n. 2, p. 172-187, 2009.
- REISCHER, G. H.; Performance Characteristics of qPCR Assays Targeting Human- and Ruminant-Associated Bacteroidetes for Microbial Source Tracking across Sixteen Countries on Six Continents. **Environ. Sci. Technol.**, v.47, p. 8548-8556, 2013.
- SANTOS, E. H. M. dos; GRIEBELER, N. P.; OLIVEIRA, Luiz F. C. de. Relação entre uso do solo e comportamento hidrológico na Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite. **Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.8, p.826–834, 2010.
- SCHRIEWER, A. et al. Presence of *Bacteroidales* as a predictor of pathogens in surface waters of the central California coast. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 76, n. 17, 5802-5814, 2010.
- SCOTT, T. M. et al. Microbial source tracking: Current methodology and future directions. **American Society for Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 5796-5803, 2002.
- SHANKS O. C. et al. Performance assessment PCR-based assays targeting *Bacteroidales* genetic markers of bovine fecal pollution. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, n. 5, p. 1359-66, 2010.
- STEVENS, Melita; ASHBOLT, Nicholas; CUNLIFFE, David. Review of Coliforms as Microbial Indicators of Drinking Water Quality. p. 43, 2003.
- SUSSUNA, João. A má distribuição da água no Brasil. **Tropical Medicine and International Health**, p. 19, n. 8, p. 894-905, 2004.
- STWART, J. R.; The coastal environment and human health: Microbial indicators, pathogens, sentinels and reservoirs. **Environmental Health**, v. 7.n. 2.p. 1-14, 2008.
- TALLON, P. et al. Microbial indicators of fecal contamination in water: **A Current Perspective, Water, Air, and Soil Pollution**, v. 166, p. 139-166, 2004.
- TORANZOS, G. A. Current and possible alternate indicators of fecal contamination in tropical waters: A short review. **Environmental Toxicology**, v.6, n.2, p. 121-130, 1991.

- TREVETT, A.F.; CARTER, R. C.; TYRREL, S. F. The importance of domestic water quality management in the context of faecal–oral disease transmission. *Journal of Water and Health*, v.3, n.3, 2005.
- TYAGI.V. K. et al. Alternative microbial indicators of faecal pollution: Current perspective, Iran. J. Environ. Health. *Sci. Eng.*, v. 3, n. 3, p. 205-216, 2006.
- United States Environmental Protection Agency (EPA). Method 1603: *Escherichia coli* (*E. coli*) in Water by Membrane Filtration Using Modified membrane-Thermotolerant *Escherichia coli* Agar (Modified mTEC), 2009.
- USTUN- Pruss Annette, et al. Burden of disease from inadequate water, sanitation and hygiene in low-and middle-income settings: a retrospective analysis of data from 145 countries. *Tropical Medicine and International Health*, v. 19, n. 8, p. 894-905, 2014.
- VANITHA, B., RAO Nirmala B. Analysis of water quality using physico-chemical parameters of Kargil Lake in Karimnagar district Telangana States during the season of winter 2013. v. 4, n. 2, p. 758-762, 2015.
- VAGARALI, Manjula A.; KARADESAI, Shankar G.; PREETI; MEGAUD, Sharada. Bacteriological analysis of drinking water samples. *Journal of Bioscience and Technology*, v. 2, p. 220-222, 2011.
- VASCONCELOS, V. de M. M.; SOUZA, C. F. Caracterização dos parâmetros de qualidade da água do manancial Utinga, Belém, PA, Brasil. *Ambi-Agua*, Taubaté, v. 6, n. 2, p. 305-324, 2011.
- VIERHEILIG, j. et al. Clostridium perfringens is not suitable for the indication of fecal pollution from ruminant wildlife but is associated with excreta from nonherbivorous animals and human sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 79, n. 16, 2013.
- Vigilância e Controle da Qualidade da Água Para Consumo Humano/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde. p. 212, 2006.
- WINDSOR, R. C.; Molecular detection of microbes in nasal tissue of dogs with idiopathic Lymphoplasmacytic Rhinitis. *J Vet Intern Med*, v. 20, p. 250-256, 2006.
- WERFHORST, Laurie C. Van De; SERCU Bram; HOLDEN, Patricia A. Comparison of the host specificities of two *Bacteroidales* quantitative PCR assays used for tracking human fecal contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 77, n. 17 p. 6258-626, 2011.

World Health Organization, UNICEF Joint Monitoring Programme (JMP), Progress on Drinking Water and Sanitation, p. 74, 2014.

Anexo 1 – Artigo

Avaliação dos marcadores CF128 e HF183 16S rRNA *Bacteroidales* para distinção de fontes de poluição fecal em água bruta superficial

**Eni Luidmiliza Leite Buma¹, André Kipnis¹, Aline Vieira Peixoto², Maria das
Graças Cabral Pereira^{1*}**

¹Departamento de Microbiologia, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública,
Universidade Federal de Goiás

²Laboratório de Água, Companhia Saneamento de Goiás

Autor para correspondência: mariagraca906@gmail.com

RESUMO

A qualidade das águas para consumo humano tem sido uma das principais preocupações mundiais nos últimos tempos. As contaminações dos mananciais usados para abastecimento e consumo por dejetos humanos e animais tem contribuído enormemente para o agravamento deste problema. Métodos modernos e mais acurados para caracterizar a qualidade da água para consumo tem sido uma preocupação constante. Nos dias atuais faz-se necessário determinar a origem e fonte da contaminação microbiológica das águas usadas para o consumo. Neste contexto a sensibilidade e especificidade dos marcadores CF128 e HF183 de 16S rRNA *Bacteroidales* para distinção de poluição fecal originadas por ruminantes ou humanos, respectivamente, foram avaliados em DNA de 71 amostras fecais coletadas na grande área de Goiânia. A especificidade encontrada para ambos marcadores foi de 100%, enquanto a sensibilidade variou de 100% (CF128) a 60.9% (HF183). Ambos marcadores foram aplicados em DNA de 33 amostras de água bruta superficial coletadas na Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite. O marcador CF128 hospedeiro ruminante foi detectado em 9% destas amostras, sendo todas de pontos considerados com alta influência agrícola. Os resultados sugerem a possível aplicação deste método de rastreamento de poluição fecal.

Palavras-chave: Poluição fecal, *E. coli*, *Bacteroidales*, marcador genético 16S rRNA, água bruta superficial.

Fonte de financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

ABSTRACT

The quality of water for human consumption has been a major concern in recent times. Contamination of the sources used for water supply and consumption by human and animal waste has contributed enormously to aggravate this problem. Modern and more accurate methods to characterize the quality of drinking water have been a constant concern. Nowadays, it is necessary to determine the origin and source of the microbiological contamination of the waters used for consumption. In this context, the sensitivity and specificity of the CF128 and HF183 markers targeting 16S rRNA

Bacteroidales to distinguish fecal pollution originated by ruminants or humans, respectively, were evaluated in DNA from 71 fecal samples collected in the large area of Goiânia, Goiás, Brazil. The specificity found for both markers was 100%, while the sensitivity ranged from 100% (CF128) to 60.9% (HF183). Both markers were applied to DNA from 33 samples of surface raw water collected in the Ribeirão João Leite River Basin. The CF128 ruminant host marker was detected in 9% of these samples, all of them were collected from water sites nearby land use impacted by agricultural activities. The results suggest the possible application of this fecal pollution screening method.

Key words: Fecal pollution, *E. coli*, *Bacteroidales*, genetic marker 16S rRNA, raw water quality.

Source of funding: Foundation for Research Support of the State of Goiás (FAPEG), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)

INTRODUÇÃO

Poluição fecal oriunda de animais e humanos é um dos principais causadores da degradação da qualidade dos mananciais superficiais (WHO, 2012). Devido à utilização dessas águas para o abastecimento público, agricultura e atividades recreativas, organismos indicadores como coliformes fecais (CF) e *Escherichia coli* (*E. coli*) são utilizados como referência da possível presença de patógenos. Entretanto, estudos conduzidos em climas subtropical e tropical demonstraram que *E. coli* são capazes de persistir e/ou multiplicar em corpos secundários, tais como solos e sedimentos, contestando a habilidade desses indicadores em suportar contaminações mais recentes (Solo-Gabriele et al. 2000; Byappanahalli et al. 2004). Além disso, a sua presença não indica a origem da fonte de poluição e também pode apresentar pobre correlação com a presença de patógenos (Schriewer et al. 2010).

A aplicação de medidas efetivas, que visa o monitoramento dos mananciais aquáticos, deve levar em consideração a inclusão de métodos alternativos indicadores da (s) fonte

(s) de contaminação dessas águas. Esses métodos, referidos como *Fecal Source Tracking* (FST) ou *Microbial Source Tracking* (MST), têm sido aplicados na identificação de fontes difusas responsáveis por contaminação fecal (USEPA, 2010). O uso de FST, combinado aos tradicionais métodos indicadores, poderá informar o grau de discriminação necessário para remediação dos mananciais afetados por contaminação fecal.

Bernhard e Field (2000) reportaram a identificação dos marcadores 16S rRNA HF183 humano e CF128 bovino da ordem *Bacteroidales*. Esse método tem sido amplamente difundido e também considerado um promissor MST (Bohen et al., 2013; Layton et al. 2013). *Bacteroidales* são bactérias anaeróbicas e, ao contrário do grupo Coliforme, restritas ao trato gastrointestinal de vários animais endotérmicos, constituindo um dos membros mais numerosos da microbiota intestinal de vários mamíferos (Roslev et al. 2011).

O objetivo primário deste estudo foi avaliar os marcadores HF183 e CF128 para detecção de fontes de poluição fecal em fezes de diferentes espécies da região geográfica de Goiânia, Goiás. O objetivo secundário foi a aplicação desses marcadores em amostras de água bruta superficial responsável pelo abastecimento desta cidade. A avaliação destes marcadores combinado com sua aplicação em amostras de água contribuirão para identificação das fontes difusas de poluição fecal nesta região geográfica.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras fecais e extração do DNA: Um total de 71 amostras fecais foram utilizadas para determinação da sensibilidade e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados neste estudo. Amostras fecais humanas (n=23) foram adquiridas de indivíduos saudáveis de acordo com o protocolo do Conselho de Ética em Pesquisa humana (CAAE 36927614.4.0000.5083). Foram excluídas amostras fecais de indivíduos com diarreia, com doença intestinal crônica e indivíduos em tratamento com antibiótico(s) e/ou quimioterápico.

Amostras fecais de diferentes espécies animais (n=48) foram coletadas de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (CEUA, Protocolo N° 036/14). Amostras fecais de *Capra hircus* (cabra doméstica, n=3) e *Bos taurus* (bovino, n=18) foram obtidas na Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás; amostras fecais de *Ovis aries* (ovelha, n=4), *Sus scrofa domesticus* (suíno, n=4), *Gallus gallus domesticus* (galinha, n=4) foram coletadas em uma fazenda localizada na grande área de Goiânia. Já as amostras de *Oryctolagus cuniculus* (coelho, n=1), *Canis lupus familiaris* (cão, n=6) e *Felis silvestris catus* (gato, n=3) foram coletadas pelos proprietários particulares de cada espécie citada; amostras fecais de *Dendrocynia outumnali* (marrecabocla, n=1), *Tigrisoma lincatum* (socó-boi, n=1), *Nycticorax nycticosa* (socó-dorminhoco, n=1), *Cebus libidinosus* (macaco-prego, n=1), *Alouatta caraya* (guariba, n=1) foram obtidas no Parque

Zoológico de Goiânia de acordo com o Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade Número 53443-1.

O DNA total foi extraído utilizando o kit QIAamp DNA Stool kit (QIAGEN, Biotecnologia Brasil Ltda., Brasil) de acordo com as instruções do fabricante e mantidos a -20 °C.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): Os pares oligonucleotídeos iniciadores

HF183F (5'-ATCATGAGTTCACATGTCCG-3') e Bac708R (5'-CAATCGGAGTTCTTCGTG-3') e CF128F (5'-CCAACYTTCCCGWTACTC-3') e

Bac708R desenhados para amplificar 525 pb de *Bacteroidales* específico-humano e 580 pb de *Bacteroidales* específico-bovino, respectivamente (Bernhard e Field, 2000), foram testados em DNA extraídos de amostras fecais humana e animal (n=71). Estes oligonucleotídeos iniciadores foram previamente testados para obtenção de concentração ótima (0.3 µM, 0.4µM e 0.5 µM) em gradiente de temperatura de anelamento (56 °C, 59 °C e 62 °C). A PCR otimizada continha uma concentração final tampão de PCR 1X, 2,0 mM MgCl₂, 0,25 mM de cada dNTP, 0,5 µM oligonucleotídeo iniciador, 0,3 U de Taq Polimerase (Invitrogen®), água livre de DNA (Nuclease-Free Water, Ambion, USA) e 10 ng de DNA por reação. As condições de ciclagem foram: 3 minutos a 95 °C para o primeiro ciclo, seguidos de 30 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 45 segundos a 59 °C, 1 minuto a 72 °C, e uma extensão final de 72 °C durante 7 minutos. Todas reações da PCR foram realizadas no termociclador MULTIGENE Gradiente (Labnet International, Inc.). Os produtos da PCR foram corridos em gel de agarose a 1% em tampão 1X TBE contendo 0.5 µg/mL de brometo de etídio e bandas de 520 pb de DNA fecal humano e 580 pb de DNA fecal bovino foram visualizados através do Fotodocumentador Gel Doc System (Bio-Rad Laboratories Inc.). Plasmídeos contendo sequências alvos para os marcadores HF183 e CF128 foram utilizados como controles positivos humano e controle positivo

bovino, respectivamente, e água livre de DNA (Nuclease-Free Water, Ambion, USA) foi utilizada como controle negativo em cada reação da PCR.

Características dos pontos de coleta de água bruta superficial: Cinco pontos localizados na Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite (latitudes 16° 13' e 16° 39' Sul e longitudes 48° 57' e 49° 11' Oeste) foram selecionados para distinção das fontes difusas de poluição fecal. Esta bacia drena uma área de 766,8 km e percorre as áreas dos municípios de Ouro Verde de Goiás, Campo Limpo de Goiás, Anápolis, Terezópolis de Goiás, Nerópolis, Goianápolis e Goiânia (Santos et al., 2010). Atualmente, a Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite é responsável pelo suprimento de aproximadamente 50% de água para a região metropolitana de Goiânia. Ao longo desta, é notável uma vasta utilização e ocupação do solo como áreas de expansão de atividades agrícolas, agropecuárias e, também, área urbana. Os pontos caracterizados por alta atividade pecuária/baixa atividade residencial são representados pelos Córregos Bandeira (16S 31' 08", 49W 11' 40") e Jurubatuba (16S 18' 14", 49W 05' 01"). Os pontos Ribeirão João Leite - Captação (23S 33' 07", 49W 14' 59") e Córrego Descoberto (16S 27' 30", 49W 07' 32") apresentam como característica alta atividade residencial/baixa atividade pecuária e o ponto localizado no Ribeirão João Leite (16S 23' 09", 49W 06' 04") caracterizado por baixa atividade humana e animal.

Coleta de água bruta superficial: A coleta de água bruta superficial foi realizada mensalmente no período de setembro de 2015 a março de 2016. As amostras foram coletadas em frascos de 1L de polipropileno esterilizados, acondicionados em caixas de isopor com gelo e encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia Molecular do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás. A localização geográfica (latitude e longitude) dos pontos amostrados foi realizada utilizando um GPS modelo Garmin Montana 650.

Todas amostras de água bruta superficial foram coletadas de acordo com o Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras da Companhia do Estado de São Paulo (Brandão et al., 2011).

Indicador de poluição fecal e rastreamento da fonte difusa de poluição fecal: A identificação do indicador termotolerante de poluição fecal, *E. coli*, foi realizada pela técnica da membrana filtrante em membrana de nitrocelulose estéril de porosidade 0.45 µm e 47 mm de diâmetro (Millipore, Brasil) utilizando o meio de cultura seletivo HiCrome M-TEC Agar (Sigma-Aldrich Inc., Brasil) com temperatura de incubação de $0,5 \pm 2$ horas a $35 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo que, posteriormente a temperatura foi elevada a $44,5 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 22 ± 2 horas.

DNA de água bruta superficial foi extraído utilizando o kit QIAamp DNA Stool kit (QIAGEN, Biotecnologia Brasil Ltda. Brasil) conforme as instruções do fabricante. Brevemente, 1L de água bruta superficial de cada coleta dos pontos selecionados foi á vácuo utilizando membranas de microcelulose 0.45µm. As membranas foram então transferidas para tubos *falcon* de 50 mL contendo 1,4 mL da solução de lise ASL. As condições de amplificação dos iniciadores HF183f-Bac708r e CF128f-Bac708r foram as mesmas descritas anteriormente, exceto pela adição de 10 µL do DNA de amostras de água bruta superficial e um total de 35 ciclos.

Análise estatística: Sensibilidade (*Se*) foi determinada como $a/a+c$, onde: a = número total de DNA fecal positivo para o marcador da sua espécie (verdadeiro positivo), c = número total de DNA fecal negativo para o marcador de sua espécie (falso negativo). Especificidade (*Sp*) foi determinada como $d/b+d$, onde: d = número total de DNA fecal de outras espécies negativos para o marcador humano ou bovino (verdadeiro negativo), b = número total de DNA fecal de outras espécies positivas para o marcador humano ou bovino (falso positivo).

RESULTADOS

Determinação da Sensibilidade e Especificidade dos Testes moleculares

Um total de 71 amostras fecais foram testados para os marcadores 16S rRNA

Bacteroidales HF183 e CF128 (Tabela 1). Das 23 amostras de DNA fecal humano testadas, 14 foram amplificadas pelo marcador específico-humano HF183, apresentando 60.87% de sensibilidade. Este marcador não foi detectado em DNA de amostras fecais de animais (n=48) sendo, portanto, 100% específico. O marcador genético CF128 amplificou DNA de 25 amostras fecais de ruminantes (18 bovinos, 3 cabras domésticas e 4 ovelhas) apresentando 100% de sensibilidade. Quando sua especificidade foi avaliada, não foi observada amplificação em DNA das demais amostras não ruminantes (n=46).

Tabela 1: Resultados da reação de amplificação dos marcadores CF128 e HF183 aplicados em DNA de amostras fecais humanas e animais.

Fonte	Nº de amostras	CF128 (Nº de amostras positivas)	HF183 (Nº de amostras positivas)
Humano	23	0	14
Primata	2	0	0
Bovino	18	18	0
Canino	6	0	0
Suíno	4	0	0
Coelho	1	0	0
Gato	3	0	0
Ave silvestre	3	0	0
Galinha	4	0	0
Caprino	4	4	0
Ovino	3	3	0
Total	71	25	14

Caracterização dos Parâmetros Microbiológicos

Um total de 33 amostras de água bruta superficial foram analisadas para *E. coli* termotolerante pela técnica da MF. O menor valor de *E. coli* (CFU/100 mL) foi encontrado no Córrego Bandeira

($1,78 \times 10^2$) e o valor máximo registrado ocorreu no Córrego Jurubatuba ($2,84 \times 10^5$) conforme representado na Tabela 2.

Tabela 2: Valores mínimos e máximos de *E. coli* (CFU/100 mL) em água bruta superficial por ponto de coleta no período setembro de 2015 a março de 2016.

Pontos de coleta	Min	Max
Ribeirão João Leite (Captação)	6,89E+02	6,89E+04
Ribeirão João Leite (Anápolis)	2,44E+02	1,38E+04
Córrego Bandeira	1,78E+02	3,33E+04
Córrego Jurubatuba	3,11E+02	2,84E+05
Córrego Descoberto	2,67E+02	8,00E+03

Rastreamento dos marcadores CF128 e HF183 16S rRNA *Bacteroidales* em amostras de água bruta superficial

Um total de 33 amostras de água bruta superficial foram testadas para os marcadores genéticos CF128 e HF183. Destas, 9% apresentaram produtos de amplificação de 580 pb indicando a presença do marcador CF128 (**Figura 1**). A presença do marcador CF128 foi detectada apenas nos pontos estudados com características de influência agropecuária (Córregos Jurubatuba e Bandeira). Todas amostras de água bruta superficial apresentaram resultados negativos para presença do marcador genético HF183 *Bacteroidales* específico-humano.

DISCUSSÃO

A sensibilidade e especificidade para o marcador genético HF183 em DNA de amostras fecais de nossa região geográfica foi de 60,87% e 100%, respectivamente. Estudo realizado em 4 países da

Europa (França, Irlanda Portugal e Reino Unido) reportou sensibilidade geral de 86% com variação entre 76-100% e especificidade geral de 97% com variação regional entre 91%-100% (Gawler et al. 2007). Similarmente, a sensibilidade deste marcador variou entre 50%-80% e a especificidade variou entre 92-100% quando amostras fecais foram testadas por 7 laboratórios de diferentes regiões geográficas dos Estados Unidos (Boehm et al. 2013). Adicionalmente, este marcador apresentou 88% de sensibilidade e 100% de especificidade quando avaliado por vários laboratórios (Layton et al. 2013).

A detecção do marcador genético CF128 em DNA de amostras fecais de pequenos ruminantes de nossa região geográfica confirma os resultados reportados por outros investigadores (Bernard e Field, 2000; Boehm et al. 2013). Apesar de ter sido desenvolvido para identificação de poluição fecal bovina (*Bos taurus*), este marcador foi confirmado ser hospedeiro ruminante (Schiewer et al. 2013). Enquanto a sensibilidade reportada foi de 100% para os 5 países europeus (Gawler et al. 2007), este marcador foi identificado em 95%, 40% e 30% em DNA de amostras fecais bovinas, ovelhas e cabras em estudo realizado na Austrália (Asmed et al. 2008). Já a especificidade reportada do marcador para ambas regiões geográficas foi de 72% (Europa) e 93% (Austrália). A reação cruzada para o marcador CF128 mais significativa em relação aos países europeus ocorreu em DNA de amostras fecais suínas oriundas de Portugal.

A presença do indicador *E. coli* termotolerante foi confirmada em todas amostras de água bruta superficial (n=33) coletadas durante os 7 meses de estudo. A Resolução CONAMA nº 357 de 2005 estabelece o máximo de 4000 coliformes termotolerantes por 100 mL em 80% ou mais de pelo menos 6 amostras coletadas durante o período de 1 ano com frequência bimestral. Níveis de *E. coli* termotolerante acima de 4000 CFU/100 mL foram encontrados em aproximadamente 49% das amostras processadas.

Quando os marcadores genéticos CF128 e HF183 foram aplicados ao DNA de 33 amostras de água bruta superficial para distinção de fonte de poluição fecal, 9% dessas amostras foram positivas para o marcador genético CF128 e amplificação não foi observada para o marcador genético HF183. Interessante observar que as amplificações ocorridas foram em amostras oriundas nos 2 pontos localizados na Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite com alta influência de agricultura, Córregos Jurubatuba e Bandeira. Uma possível explicação para ausência de amplificação do marcador HF183 humano seria a sensibilidade encontrada para o marcador em DNA de amostras fecais humanas de nossa região geográfica.

Os resultados encontrados neste estudo para a presença do marcador 16S rRNA *Bacteroidales* tanto em DNA fecal quanto em DNA de água bruta superficial nesta região geográfica, indicam que é possível a aplicação desta técnica de FST para a identificação e diferenciação das fontes de poluição fecal em água bruta superficial.

AGRADECIMENTOS: Os autores agradecem a todas pessoas e instituições que contribuíram diretamente e indiretamente para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS:

- Asmed W, Powell D, Goonetilleke A, Gardner T 2008. Detection and source identification of faecal pollution in non-sewered catchment by means of host-specific molecular markers. *Water Scie Technol*. 58:579-86
- Bernhard AE, Field KG 2000. A PCR assay to discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in *Bacteroides-Prevotella* genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 66: 4571-4574.
- Boehm AB, Van De Werfhorst LC, Griffith JF, Holden PA, Jay JA, Shanks OC, Wang D, Weisberg SB 2013. Performance of forty-one microbial source tracking methods: A twenty-seven lab evaluation study. *Water Res* 47: 6812-6828.
- Brandão CJ, Botelho MJC, Sato MIZ, Lamparelli MC 2011. Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidas. CETESB: São Paulo, ANA, Brasília, DF.
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.
- Byappanahalli M, Fujioka R 2004. Indigenous soil bacteria and low moisture may limit but allow faecal bacteria to multiply and become a minor population in tropical soils. *Water Scie Technol* 50: 27-32.
- Gawler AH, Beecher JE, Brandão J, Carroll NM, Falcão L, Gourmelon M, Masterson B, Nunes B, Porter J, Rincé A, Rodrigues R, Thorp M, Walters JM, Meijer WG 2007. Validation of host-specific *Bacteroidales* 16S rRNA genes as markers to determine the origin of faecal pollution in Atlantic Rim countries of the European Union. *Water Res* 41: 3780-3784

- Layton BA, Cao Y, Ebentier DL, Hanley K, Ballesté E, Brandão J, Byappanahalli M, Converse R, Farnleitner AH, Gentry-Shields J, Gidley ML, Gourmelon M, Lee CS, Lee J, Lozach S, Madi T, Meijer WG, Noble R, Peed L, Reischer GH, Rodrigues R, Rose JB, Schriewer A, Sinigalliano C, Srinivasan S, Stewart J, Van De Werfhorst LC, Wang D, Whitman R, Wuertz S, Jay J, Holden PA, Boehm AB, Shanks O, Griffith JF 2013. Performance of human fecal anaerobe-associated PCR-based assays in a multi-laboratory method evaluation study. *Water Res* 47: 6897-6908.
- Roslev P, Bukh AS 2011. State of the art molecular markers for fecal pollution source tracking in water. *Appl Microbiol Biotech* 89: 1341-1355.
- Santos EHM, Griebeler NP; Oliveira LFC 2010. Relação entre uso do solo e comportamento hidrológico na Bacia Hidrográfica do Ribeirão João Leite. *Engen Agrícola Amb*, 14:826–834.
- Schriewer A, Miller WA, Byrne BA, Miller MA, Oates S, Conrad PA, Hardin D, Yang HH, Chouicha N, Melli A, Jessup D, Dominik C, Wuertz S 2010. Presence of *Bacteroidales* as a predictor of pathogens in surface waters of the central California coast. *Appl Environ Microbiol*. 76: 5802-5814.
- Solo-Gabriele HM, Wolfert MA, Desmarais TR, Palmer CJ 2000. Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. *Appl Environ Microbiol* 66: 230-237. US Environmental Protection Agency 2010. *Method B: Bacteroidales in water by TaqMan quantitativy polymerase chain reaction (qPCR) assay*. USEPA, Washington, DC.
- World Health Organization 2012. *Animal waste, water quality and human health, vol. 9. Indicators, sanitary surveys and source attribution techniques*. WHO, Geneva.

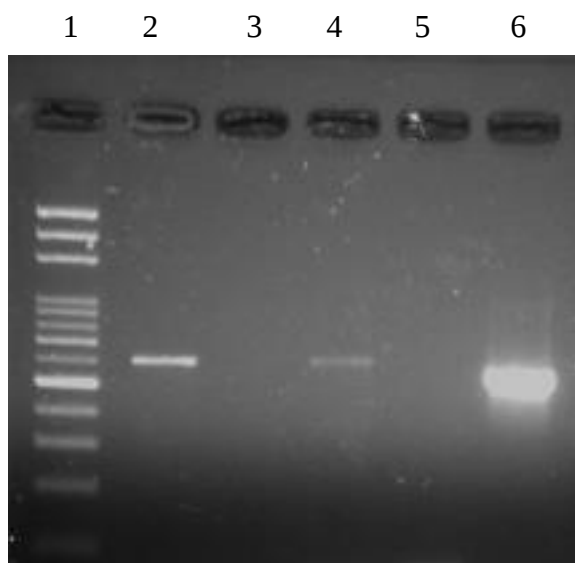


Figura 1: Gel de agarose a 15 com produto das reações com o marcador genético CF128 em DNA extraído de água bruta superficial de ponto de alta influência agropecuária. Faixa 1 = marcador (Amresco), Faixa 2 = controle positivo bovino (580 pb), Faixa 3 = controle negativo, Faixa 4 = DNA água bruta superficial do Córrego Jurubatuba (580 pb), Faixa 5 = sem presença de amostra e Faixa 6 = controle positivo humano (525 pb).



Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética, TCLE

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 05 de agosto de 2014.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 36/14

I - Finalidade do projeto de pesquisa: Pós-Doutorado/Desenvolvimento Científico Regional

II - Identificação:

Título do projeto: Avaliação do marcador 16S rRNA do indicador microbiológico *BACTEROIDALES* para identificação de contaminação fecal humana e bovina na bacia hidrográfica do Ribeirão João Leite.

Pesquisador Responsável/ Unidade: Maria das Graças Cabral Pereira / IPTSP
Pesquisadores Participantes:

Nome/Endereço do Currículo Lattes	Instituição	Formação Básica	Titulação Mais Recente	Função na pesquisa
Maria das Graças Cabral Pereira	IPTSP	Médica Veterinária	Pesquisadora Universidade da Califórnia, Davis.	Pós-Doutoranda
André Kipnis lattes.cnpq.br/443496536 0286741	IPTSP	Médico Veterinário	Coordenador Programa Pós Graduação Biotecnologia e Biodiversidade	Supervisor

Unidade onde será realizado: IPTSP

Data de apresentação a CEUA: 13/06/2014

III - Objetivos e justificativa do projeto:

Avaliar o marcador genético 16S rRNA da ordem Bacteroidales como indicador de contaminação fecal humana e/ou animal na bacia hidrográfica do Ribeirão João Leite.

IV - Sumário do projeto:

Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:

Não existe a necessidade de métodos alternativos pelo fato da coleta do material fecal animal ser não invasiva, com exceção, caso ocorra a necessidade de retirada do material fecal de bovinos por via anal.

Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):

Bovino (n - 18), ovino (n=7), canino (n=7), suíno (n=5), aves (n - 5). Amostras fecais serão coletadas em animais pertencentes à Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG.

Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:

Não se aplica.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II)
- CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.
Email: ceua.ufg@gmail.com



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA**



Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:

Cuidados serão observados para coleta retal em bovinos e segurança física do coletor, caso seja necessário obter amostras diretamente do animal. Risco biológico deverá ser evitado com utilização de luvas durante coleta do material e acondicionamento das amostras em containers com tampas. As amostras serão transportadas em containers secundários (*COOLER*) com etiqueta de identificação nas laterais e na tampa indicando presença de fezes.

Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais:

Não se aplica.

Método de eutanásia:

Não se aplica.

Destino do animal:

Não se aplica.

IV – Comentários do relator frente às orientações da

CEUA: Quanto a documentos:

O pesquisador apresentou toda a documentação necessária para a avaliação. O cronograma e orçamento detalhado estão de acordo com as normas.

Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:

Não serão necessários demais cuidados com os animais, pois as coletas não serão invasivas, sendo recolhido apenas o material fecal. Recomenda-se que a coleta de material por via retal seja feita por pessoa treinada.

V - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**.

VI - Data da reunião: 14/07/2014

RENATA MAZARO:12343522812

Assinado de forma digital por RENATA MAZARO:12343522812
DN: c=BR, o=ICP-Brasil, ou=Autoridade Certificadora Raiz Brasileira v2, ou=AC
SOLUTI, ou=AC SOLUTI Multipla, ou=Certificado PF A3, cn=RENATA
MAZARO:12343522812
Dados: 2014.08.05 11:56:21 -03'00'

Dra. Renata Mazaro e Costa

Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus
Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.
Email: ceua.ufg@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
GOIÁS - UFG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO MARCADOR 16S rRNA DO INDICADOR MICROBIOLÓGICO BACTEROIDALES PARA IDENTIFICAÇÃO DE CONTAMINAÇÃO FECAL HUMANA E BOVINA NA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIBEIRÃO JOÃO LEITE

Pesquisador: Maria das Graças Cabral Pereira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 36927614.4.0000.5083

Instituição Proponente: Universidade Federal de Goiás - UFG

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE GOIAS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.008.789

Data da Relatoria: 23/02/2015

Apresentação do Projeto:

O presente estudo tem como objetivo avaliar o marcador genético 16S rRNA da ordem Bacteroidales como indicador de contaminação fecal humana e/ou animal na bacia hidro-gráfica do Ribeirão João Leite. Para tanto, amostras fecais humana, bovina, ovina, canina, aves e suína serão coletadas e/ou obtidas na cidade de Goiânia, Goiás, para detecção e amplificação do marcador 16S rRNA utilizando a técnica PCR em tempo real, sistema TaqMan. Serão avaliados 2 grupos de primers e sondas para detectar e amplificar o marcador 16S rRNA de Bacteroidales comum ou universal a várias espécies animais (humana, bovina, suína, canina e aves), 3 grupos de primers e sondas para detectar e amplificar 16S rRNA Bacteroidales hospedeiro específico humano e 4 grupos de primers e sondas para detectar e amplificar 16S rRNA Bacteroidales hospedeiro- específico bovino. Adicionalmente, o marcador 16S rRNA será utilizado em água bruta coletada em cinco pontos monitorados pela SANEAGO na bacia hidrográfica do Ribeirão João Leite. Serão incluídos pontos de coleta com alta influencia urbana/baixa pecuária, alta influencia pecuária/baixa urbana e baixa atividade de ambos. Este projeto possibilitara a aplicação de uma nova técnica de “Fecal Source Tracking” para distinção entre contaminação fecal humana e bovina na bacia hidrográfica do Ribeirão João Leite. Os resultados obtidos poderão contribuir para o monitoramento desse manancial.

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.008.789

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: avaliar o marcador genético 16S rRNA da ordem Bacteroidales como indicador de contaminação fecal humana e/ou animal na bacia hidrográfica do Ribeirão João Leite. Objetivos Secundário: avaliar dois grupos de primers e sondas desenhados para amplificar segmento de DNA 16S rRNA Bacteroidales comum ou universal a várias espécies animais (humana, bovina, suína, canina e aves); avaliar três grupos de primers e sondas desenhados para amplificar segmento de DNA 16S rRNA Bacteroidales hospedeiro-específico humano; avaliar quatro grupos de primers e sondas desenhados para amplificar segmento de 16S rRNA Bacteroidales hospedeiro-específico bovino; avaliar o marcador universal, hospedeiro-específico humano e hospedeiro-específico bovino 16S rRNA Bacteroidales em amostras de água bruta da bacia hidrográfica do Ribeirão João Leite; identificar fontes de contaminação fecal de origem humana e animal em amostras de água bruta da bacia hidrográfica do Ribeirão João Leite.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: segundo os pesquisadores a pesquisa não implica em risco biológico, psicológico ou desconforto ao participante, pois o procedimento não é invasivo e amostra será obtida através de doação voluntária. O doador poderá retirar o seu consentimento em qualquer etapa da pesquisa. Benefícios: este projeto possibilitará a aplicação de uma nova técnica de FST para distinção entre contaminação fecal humana e bovina na bacia hidrográfica do Ribeirão João Leite. Os resultados obtidos poderão contribuir para o monitoramento desse manancial.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto utilizará fezes de animais e de humanos. As fezes dos animais, bovino (n=18), ovino (n=7), canino (n=7), suíno (n=5), aves (n=5), serão coletadas em animais pertencentes à Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG. O projeto foi aprovado pelo CEP-Animal da UFG. As amostras de fezes humanas (n=18) serão obtidas de 10 indivíduos com mais de 18 anos e 8 de indivíduos com menos de 18 anos, através de doação voluntária (0,5 – 1,0 g). Foi anexado o TCLE e a redação está de acordo com o recomendado pelo CEP. O cronograma foi reformulado conforme solicitado. Foi informado que não haverá coleta de fezes na Faculdade de Farmácia, o que justifica não ter sido colocado o termo de anuência desse local.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram anexados os seguintes documentos: folha de rosto; Projeto com cronograma reformulado. TCLE. Curriculum dos pesquisadores. Termo de anuência do IPTSP. Termo de compromisso.

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.008.789

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O processo está de acordo com o solicitado pelo CEP/UFG, somos favoráveis à aprovação

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Informamos que a Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UFG considera o presente protocolo APROVADO, o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar ao CEP-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Resolução CNS nº. 466/12. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para 29/09/2017.

GOIANIA, 01 de Abril de 2015

**Assinado por: João
Batista de Souza
(Coordenador)**

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131

Bairro: Campus Samambaia

CEP: 74.001-970

UF: GO

Município: GOIANIA

Telefone: (62)3521-1215

Fax: (62)3521-1163

E-mail: cep.prpi.ufg@gmail.com

Anexo III: Sequencia do clone plasmidial humano 5' – 3'.

AACGCTAGCTACAGGCTT¹AACACATGCAAGTCGAGGGGCAGCATGGTCTTAGC
TTGCTAAGGCTGATGGCGACCGGCGCACGGGTGAGTAACACGTATCCAACCTGCC
GTCTACTCTTGGCCAGCCTTCTGAAAGGAAGATTAATCCAGGATGGC**ATCATGA**
GTTACATGTCCG³**CATGATTAAAGGTATTTTCCGGTAGACGATGGGGATGCGTT**
CCATTAGATAGTAGGCGGGGTAACGGCCACCTAGTCAACGATGGATAGGGGTT
CTGAGAGGAAGGTCCCCCACATTGGAAGTGAACACGGTCCAACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGATGGCCTGAACCAGCCAAGTAG
CGTGAAGGATGACTGCCCTATGGGTTGTAACTTCTTTTATAAAGGAATAAAGTC
GGGTATGCATACCCGTTTGCATGTACTTTATGAATAAGGATCGGCTAACTCCGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTA
AAGGGAGCGTAGATGGATGTTTAAGTCAGTTGTGAAAGTTTGCGGCTCAACCGTA
AAATTGCAGTTGATACTGGATGTCTTGAGTGCAGTTGAGGCAGGCGGAATTCGTG
GTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATAT**CACGAAGAACTCCGATTG²**