



Fl. Proc.: 135-GUANDU/15  
**SEM EFEITO**  
Rubrica: .....

Fl.: ..... Proc.: 132-GUANDU/14  
Rubrica: .....

**UNIVERSIDADE CASTELO BRANCO  
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E MEIO AMBIENTE  
CURSO DE BIOMEDICINA**

**APLICAÇÃO DE BIOMARCADORES DE POLUIÇÃO FECAL  
HOSPEDEIRO-ESPECÍFICO EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS**

**THAÍS DOS SANTOS**

**RIO DE JANEIRO  
2014**

Fl.: ..... Proc.: 135-GUANDU/14  
**SE EFETO**  
Rubrica: .....

Fl.: ..... Proc.: 132-GUANDU/14  
Rubrica: .....



**UNIVERSIDADE CASTELO BRANCO  
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E MEIO AMBIENTE  
CURSO DE BIOMEDICINA**

**APLICAÇÃO DE BIOMARCADORES DE POLUIÇÃO FECAL  
HOSPEDEIRO-ESPECÍFICO EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS**

**THAÍS DOS SANTOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade Castelo Branco como requisito parcial para a obtenção do Grau de Bacharel em Biomedicina, sob a orientação da Dra. Maysa Beatriz Mandetta Clementino e co-orientação de Kayo Cesar Bianco Fernandes.

**RIO DE JANEIRO  
2014**

Sa59a

Santos, Thaís dos.

Aplicação de Biomarcadores de Poluição Fecal Hospedeiro-Específico em Ecossistemas Aquáticos / Thaís dos Santos. - 2014.  
xii, 43f.

Monografia (graduação) – Universidade Castelo Branco – UCB.  
Biomedicina.

1. *rrs* 16S rRNA. 2. Água. 3. Contaminação Fecal. 4. *Bacteroidales*. I.  
Título.

CDD – 616

Fl. Proc.: 132-GUANDU/15  
Rubrica: SEM EFEITO

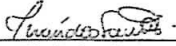
Fl.: Proc.: 132-GUANDU/14  
Rubrica:

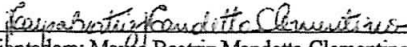
## THAIS DOS SANTOS

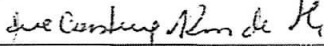
### APLICAÇÃO DE BIOMARCADORES DE POLUIÇÃO FECAL HOSPEDEIRO-ESPECÍFICO EM ECOSSISTEMAS AQUÁTICOS

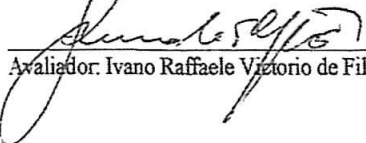
Monografia apresentada no curso de Biomedicina,  
Universidade Castelo Branco, como requisito parcial  
à obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

Aprovada em, 27/ NOVEMBRO /2014, com grau 10 ( Dez )

  
Aluno: Thais dos Santos

  
Orientadora: Maysa Beatriz Mandetta Clementino, Dra.

  
Presidente da Banca: Ana Cristina Rivas da Silva, Dra.

  
Avaliador: Ivano Raffaele Vitorio de Filippis Capasso, Dr.

Rio de Janeiro  
Novembro de 2014



Fl.	Proc. 135-GUANDU/15
Rubrica:	SE FFEITO

Fl.:	Proc. 132-GUANDU/14
Rubrica:	

## DEDICATÓRIA

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

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

## AGRADECIMENTOS

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

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

Ao meu namorado e amigo, Jorge Luiz, por toda ajuda na formatação, montagem dos mapas, deste trabalho e a minha sogra dona Zilda. Pelo amor e carinho. Agradeço;

Aos meus amigos Ana Paula, Juarez, Jorge Renato, Sara e Vagner, por todas conversas e conselhos, que me ajudaram a crescer como ser humano. Agradeço;

Aos meus queridos irmãos da Igreja, em especial ao Grupo Amiguinhos de Cristo pelo qual sou apaixonada e ao meu querido Pastor Anderson Iglesias e Família, pela amizade, palavras de incentivo, atenção e orações em meu favor. Agradeço;

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

Aos meus cunhados Darlen e Luciana, pelo apoio e força concedidos a mim. Agradeço;

Aos meus Primos Maicon, Michael, Cintia, Glaúcia e Thiago pelo carinho e amizade. Agradeço;

A Universidade Castelo Branco, a todos os professores e a turma 2010.2, em especial, à Sabrina, Thais, Alana, Thayane e Priscila, por todo apoio, horas de estudo. Agradeço;

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

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

Ao Dr. Ivano de Filippis por sempre estar disposto a me ajudar quando eu precisava. Agradeço;

Aos amigos do laboratório, Andressa, Aline, Bruna, Camila, Cátia, Carla, Claudia Andrade, Claudia Flores, Dalvim, Mariana, Pâmela, Roberta e Talita obrigada pela ajuda e dedicação. Agradeço;

A equipe de coleta de águas do Rio Guandu formada, por mim, meus pais, meu padrinho, Sobrinho (Hugo Gabriel) e irmã (Tatiana). Obrigada por sempre estarem comigo, mesmo quando o assunto é trabalho;

Fl.: ..... Proc.: 132-GUANDU/14  
Rubrica: .....

Fl.: ..... Proc.: 135-GUANDU/15  
Rubrica: .....  
**SE EFfeito**

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

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

Fl.: ..... Proc. 135 GUANDU/15  
**SEM EFEITO**  
Rubrica: .....

Fl.: ..... Proc. 132 GUANDU/14  
Rubrica: .....

## EPIGRAFE

**Que Darei Eu Ao SENHOR Por Todos Os Benefícios Que Me Tem Feito?**

**Salmos 116.12<sup>a</sup>**

**LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1** - Localização geográfica dos afluentes selecionados para estudo da bacia hidrográfica do rio Guandu e rio Guandu com destino a Baía de Sepetiba. Google Earth..... 6

**Figura 2** - Pontos de Coleta. Google Earth ..... 15

**Figura 3** - Primeira Coleta. Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR das amostras do rio Guandu com destino a baía de Sepetiba para detecção de contaminação fecal e teste de especificidade ..... 23

**Figura 4** – Segunda Coleta. Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR das amostras do rio Guandu com destino a baía de Sepetiba para detecção de contaminação fecal ..... 24

**Figura 5** - Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR das amostras de água do rio guandu com destino a baía de Sepetiba Guandu para detecção de *Methanobrevibacter smithii* (222pb) e teste de especificidade ... 25

**Figura 6** - Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR das amostras da bacia hidrográfica do rio Guandu para detecção de *Bacteroidales* de bovino (690pb) ..... 26

**Figura 7** - Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR das amostras da bacia hidrográfica do rio Guandu para detecção de *Bacteroidales* de equino (242 pb)..... 26

**Figura 8** - Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR das amostras da bacia hidrográfica do rio Guandu para detecção de *Bacteroidales* de Suíno (242pb)..... 27

**Figura 9** - Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR das amostras da bacia hidrográfica do rio Guandu para detecção de *Bacteroidales* de humano (291pb) ..... 27



Fl.: Proc. 135-GUANDU/15  
**SEM EFEITO**  
Rubrica: [assinatura]  
Fl.: Proc. 132-GUANDU/14  
Rubrica: .....

**Figura 10** - Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR das amostras da bacia hidrográfica do rio Guandu para detecção de *Methanobrevibacter smithii* (222pb) ..... 28

**Figura 11** - *Bacteroidales* de Humano apresentou identidade de 99% ..... 28

**Figura 12** - *Bacteroidales* de Equino apresentou identidade de 98% ..... 29

**Figura 13** - *Bacteroidales* de Suíno apresentou identidade de 96%..... 29

**Figura 14** - *Bacteroidales* de Bovino apresentou identidade de 97%..... 29



Fl.: ..... Proc.: 132 - GUANDU/14  
Rubrica: .....

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1</b> - Principais doenças transmitidas pela água, seus agentes patogênicos e suas vias de entrada e saída do corpo humano Modificado de D'aguila e colaboradores (2000).....	4
<b>Tabela 2</b> - Aporte de Água doce à Baía de Sepetiba (WASSERMAN, 2005).....	8
<b>Tabela 3</b> - Iniciadores utilizados no estudo.....	17
<b>Tabela 4</b> - Parâmetros Físico-químicos e microbiológicos do rio Guandu com destino a Baía de Sepetiba .....	20
<b>Tabela 5</b> - Parâmetros Físico-químicos e microbiológicos dos afluentes da bacia hidrográfica do rio Guandu .....	21

## RESUMO

A contaminação de corpos hídricos por material fecal é uma das principais causas de doenças entéricas no mundo. A bacia hidrográfica do rio Guandu, localizada no estado do Rio de Janeiro, possui como destino a ETA Guandu, que responde pelo abastecimento de água local e cerca de 85% da população da região metropolitana do Rio de Janeiro. A baía de Sepetiba, local onde deságua o rio Guandu, é de grande importância para economia da região através da atividade pesqueira. No entanto, as águas dos afluentes da bacia hidrográfica do rio Guandu vêm sendo poluídas por resíduos industriais, esgoto doméstico, entre outros. Atualmente os coliformes totais e termotolerantes são utilizados no monitoramento da qualidade da água, porém estes indicadores não permitem a identificação do organismo-fonte da contaminação, o que vem levantando questionamentos sobre sua eficiência. Organismos da ordem *Bacteroidales* vêm sendo apontados como bioindicadores alternativos ao grupo coliforme, uma vez que possuem a capacidade de indicar a fonte da contaminação fecal. O objetivo principal deste estudo foi a aplicação de biomarcadores hospedeiro-específico na detecção de contaminação fecal de bovinos, suínos, equinos e humanos para a avaliação da qualidade de 10 pontos da bacia hidrográfica do rio Guandu e 3 pontos do rio Guandu destinados à baía de Sepetiba. Foram coletados 5 litros de água de cada ponto de coleta e em seguida foram verificados os parâmetros físico-químicos e microbiológicos. Os resultados obtidos demonstraram que dos 13 pontos analisados 6 apresentaram os valores de oxigênio dissolvido abaixo do preconizado segundo o CONAMA 357, 5 pontos apresentaram a concentração de *E. coli* acima do preconizado, os demais parâmetros ficaram dentro dos valores estabelecidos. As reações de PCR do gene *rrs* 16S rRNA com iniciadores hospedeiro-específicos da ordem *Bacteroidales* demonstraram especificidade frente ao material fecal de ruminantes (690 pb); humanos (291 pb); equinos (242 pb), suínos (694 pb) e gene *nifH* de *M. Smithii* para humano (222pb). Foi detectado contaminação fecal em todos os pontos, pelo menos por um marcador. As sequências do gene *rrs* foram analisadas em banco de dados (GenBank) e apresentaram identidades entre 96-99%, com o gene *rrs* de marcadores da ordem *Bacteroidales*. Estes resultados alertam para a necessidade de maior conscientização dos governantes e da sociedade em relação ao descarte de resíduos domésticos nas águas voltadas ao abastecimento da população do Rio de Janeiro.

**Palavras Chave:** *rrs* 16S rRNA. Água. Contaminação Fecal. *Bacteroidales*.



## ABSTRACT

The water body contamination by faecal matter is a major cause of enteric diseases in the world. Guandu River's watershed, located in the state of Rio de Janeiro, has as destination WTE Guandu, which is responsible for water spot supply and about 85% of the metropolitan region population of Rio de Janeiro. The Sepetiba bay, where the river empties into Guandu, is of great importance to the region's economy through fishing. However, the water of the tributaries of the Guandu river basin has been polluted by industrial waste, sewage and others. Currently the total and thermotolerant coliforms are used to monitor water quality, but these indicators do not allow the identification of the organism source of the contamination, which has been raising questions about its effectiveness. The order *Bacteroidales* organisms have been pointed to as bioindicators coliform group alternative, since they have the ability to indicate the source of fecal contamination. The main objective of this study was the application of host-specific biomarkers in the detection of fecal contamination of bovine, pigs, horses and humans for evaluation of the quality of 10 points from the Guandu river's watershed and 3 points for the Guandu river destined the Sepetiba bay. 5 liters of water were collected from each collection point and then the physical-chemical and microbiological parameters were checked. The results showed that 6 of the 13 points analyzed showed values of dissolved oxygen below the accepted according to CONAMA 357, 5 points showed the concentration of *E. coli* above the recommended levels, the other parameters were within the established values. PCR reactions *rrs* 16S rRNA gene with host-specific primers showed specificity *Bacteroidales* order front the bovine fecal material (690 bp); humans (291 bp); equines (242 bp), pigs (694 bp) and *M. smithii* nifH gene for human (222pb). Faecal contamination was detected in all points, by at least one marker. The sequences of the *rrs* gene were analyzed in the database (GenBank) and showed identities between 96-99%, with the *rrs* gene markers of *Bacteroidales* order. These results warn us for the need for greater awareness of the governments and society concerning the disposal of domestic waste in waters aimed at supplying the population of Rio de Janeiro.

**Keywords:** *rrs* 16S rRNA. Water. Fecal contamination. *Bacteroidales*.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Vigilância Sanitária.....	1
1.2. Vigilância Ambiental em Saúde.....	1
1.3. Água.....	2
1.4. Contaminação dos corpos hídricos.....	3
1.5. Bacia Hidrográfica do Rio Guandu.....	5
1.6. Baía de Sepetiba.....	7
1.7. Bioindicadores de contaminação fecal.....	8
1.8. Rastreamento da Fonte Microbiana em ambientes aquáticos.....	8
1.9. Ordem <i>Bacteroidales</i> e gênero <i>Methanobrevibacter smithii</i> .....	9
2. OBJETIVO.....	12
2.1. Geral.....	12
2.2. Específicos.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1. Coleta de amostras fecais.....	13
3.2. Extração de DNA total de Amostras de origem fecal.....	13
3.3. Coleta de amostras de águas superficiais.....	14
3.4. Parâmetros físico-químicos e microbiológico.....	15
3.5. Extração de DNA total em amostras de águas superficiais.....	16
3.6. Reação em cadeia da polimerase – PCR.....	16
3.7. Sequenciamento.....	18
3.8. Análise do sequenciamento.....	18
4. RESULTADOS.....	19
4.1. Parâmetros físico-químicos e microbiológicos.....	19
4.2. Especificidade dos iniciadores e detecção dos marcadores nas amostras.....	22
4.2.1. Primeira coleta - águas com destino a baía de Sepetiba.....	22
4.2.2. Segunda coleta- águas com destino a baía de Sepetiba.....	23
4.2.3. Afluentes da bacia hidrográfica do rio Guandu.....	25
4.3. Sequenciamento.....	28
5. DISCUSSÃO.....	30
6. CONCLUSÕES.....	34
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Vigilância Sanitária

A Vigilância Sanitária constitui de ações preventivas e sua atuação engloba as práticas médico-sanitária: promoção, proteção, recuperação e reabilitação da saúde. Essas ações são de extrema importância, pois “atua sobre fatores de riscos associados a produtos, insumos e serviços relacionados com a saúde, com o ambiente e o ambiente de trabalho, com a circulação internacional de transportes, cargas e pessoas” (COSTA & ROZENFELD, 2012). Os saberes das práticas de vigilância sanitária são multidisciplinares, que tem como intuito seu melhor desempenho. A Lei Orgânica da Saúde, nº8.080, de 19 de setembro de 1990, definiu a Vigilância Sanitária como “*um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir, ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde*”. Esta lei inclui no campo de atuação do Sistema Único de Saúde (SUS) a “colaboração na proteção do meio ambiente”, assim como o controle da água para consumo humano e de substâncias tóxicas e radioativas (BARCELLOS & QUITÉRIO, 2006; AITH & DALLARI, 2009).

### 1.2. Vigilância Ambiental em Saúde

A Vigilância Ambiental em Saúde é de extrema importância para a saúde pública, uma vez que é formada no conjunto de ações e serviços que têm como finalidade permitir que se tenha o conhecimento e a detecção de fatores de riscos do meio ambiente que interfere na saúde humana, com sua finalidade voltada a recomendação e adoção de medidas de prevenção e controle dos fatores de riscos e doenças ou agravos relacionados à variável ambiental (AUGUSTO, 2003). Com propósito de implementar as ações da Vigilância Ambiental em Saúde, a Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) vem interagindo com outras instituições do setor público e privado que estão inseridos no SUS e demais integrantes das áreas de meio ambiente, saneamento e saúde, adoções de ações integradas tendo como objetivo a

execução da vigilância dos fatores de riscos ambientais que podem de alguma maneira comprometer a saúde da população (FUNASA, 2002).

### 1.3. Água

A superfície do planeta é constituída por aproximadamente 70% de água, 97% composto de água salinas, e 3% de água doce, sendo 2,7% encontradas em geleiras, em forma de vapor d'água e em lençóis freáticos e somente 0,3% da água doce do planeta é acessível para o consumo, em rios e lagos e fontes subterrânea (poços e nascentes) (LIMA, 2009).

Durante séculos, considerou-se que as fontes de água eram inesgotáveis, porém com o grande crescimento da população mundial, o desenvolvimento industrial e tecnológico, a urbanização e a expansão agrícola, a capacidade de autodepuração das águas foi comprometida. Tais fatores contribuem para a poluição e contaminação dos recursos hídricos, o que prejudica a qualidade e quantidade de água disponível ao consumo humano (BOMFIM et al., 2007). Segundo a Lei nº 9.443, de 8 de janeiro de 1997, que alterou o art. 1º da Lei 8.001, de 13 de março de 1990, considera-se a água um bem de domínio público, sendo um recurso natural limitado, dotado de valor econômico, constituindo seu uso prioritário voltado para o consumo humano e a dessedentação de animais em caso de escassez (ANA, 2007). A água é imprescindível para a manutenção da vida, sendo utilizada para consumo, alimentação, higiene pessoal, entre outros, desta forma, deve estar disponível em quantidade e qualidade adequada, a fim de prevenir danos à saúde e favorecer o bem estar das pessoas (SOUSA, 2002; AMARAL, 2007).

Atualmente, uma das preocupações mundiais está vinculada ao uso preponderante da água e à sua manutenção. As autoridades sanitárias têm função de agentes fiscalizadores, e possuem sua atenção voltada para o abastecimento de água, destino de dejetos, tratamento de esgoto, coleta e disposição de resíduos sólidos gerados, principalmente nos grandes centros urbanos, tendo como objetivo prever as consequências que problemas desse contexto possam gerar ao meio ambiente e à Saúde Pública (SÁ et al., 2005).



#### 1.4. Contaminação dos corpos hídricos

Fatos históricos demonstram que algumas das mais generalizadas epidemias que já infligiram as populações humanas, com exceção da peste bubônica, tiveram sua origem em sistemas de distribuição de água (ARRIGO, 2005). Como consequência, a proteção dos sistemas hídricos da contaminação fecal é um dos mais importantes e difíceis desafios para ambientalistas, e o monitoramento dos recursos hídricos é essencial como forma de controle da saúde ambiental destes ecossistemas. O monitoramento da qualidade da água é um componente essencial dos programas de proteção da saúde humana (PONTES & SCHRAMM, 2004).

Os processos de urbanização, de industrialização e de produção agrícola não têm levado em conta a capacidade de suporte dos ecossistemas, afetando drasticamente os potenciais de água doce (REBOUÇAS, 1997).

O despejo de esgotos urbanos e aqueles decorrentes de atividades rurais são as principais fontes de poluição fecal em ambientes aquáticos, contribuindo com um terço da poluição fecal em estuários. Contaminação fecal proveniente de indústrias agrícolas também pode ser escoada para os corpos hídricos durante períodos de chuvas, afetando a saúde das bacias hidrográficas pela introdução de micro-organismos patogênicos para os seres humanos (TUCCI, 1997).

Doenças de veiculação hídrica são causadas por micro-organismos patogênicos ou oportunistas, principalmente, de origem entérica, sendo transmitidos através da rota fecal-oral, isto é, são excretados nas fezes de indivíduos que estão infectados e logo após são ingeridos através da água ou de alimentos contaminados por essas fezes (Tabela 1) (AMARAL, 2007).

Dejetos de suínos é uma fonte significativa de poluição fecal, e podem contaminar águas subterrâneas e superficiais, além do solo. Estudos mostram que os derramamentos de lagoas contendo dejetos suínos elevam os níveis de azoto, fósforo e *Clostridium perfringens*, além da persistência de patógenos como *Salmonella*, *Listeria* e *Campylobacter* spp. na superfície do solo (MALLIN et al., 1997; HUTCHISON et al., 2005).

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

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

Corpos hídricos contaminados com dejetos humanos podem conter cistos de *Giardia intestinalis*, causadora da giardíase. Pacientes infectados podem desenvolver um quadro de diarréia crônica, esteatorréia, cólicas abdominais, sensação de distensão, perda de peso e desidratação (FERREIRA, et al., 2008).

Dejetos equinos e humanos podem conter esporos de *Clostridium tetani*, oriundos do trato intestinal. Estes esporos quando são introduzidos em

ferimentos externos através de lesões pode causar tétano, uma infecção aguda e grave que acomete seres humanos (FIOCRUZ, 2013). Ainda podemos destacar os dejetos bovinos, que podem conter *E. coli* verotoxigênica, principalmente representantes do sorotipo O157:H7 produtoras de toxina *Shiga-like* (STEC) e outros tipos não-verotoxigênicos, comumente relacionadas a doenças entéricas. Estas bactérias podem estar associadas a diversos outros hospedeiros, mas o gado bovino é seu principal reservatório (STELLA, 2009).

### 1.5. Bacia Hidrográfica do Rio Guandu

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

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

O rio Guandu, localizado na região da Baixada Fluminense, Estado do Rio de Janeiro com a extensão de 48 km e largura variável (50 a 90m), nasce na confluência de Ribeirão das Lajes com rio Santana, possuindo como



principais afluentes os rios dos Macacos, Santana, São Pedro, Poços/Queimados e Ipiranga. Grande parte da água do rio Guandu provém do rio Paraíba do sul através da transposição que ocorre no Bairro de Barra de Piraí no reservatório de Santa Cecília, estação da concessionária de energia elétrica do Estado do Rio de Janeiro. O trecho final do rio, que possui 15 km de extensão é denominado Canal de São Francisco (SALAMENE, 2011). Os afluentes selecionados da bacia hidrográfica do Guandu se encontram na Figura 1.



**Figura 1.** Localização geográfica dos afluentes selecionados para estudo da bacia hidrográfica do rio Guandu e rio Guandu com destino a Baía de Sepetiba. Google Earth.

A bacia do Guandu é de grande importância para o Rio de Janeiro, visto que nela é realizada a captação de água para a ETA Guandu, inserida no *Guinness Book* como a maior estação de tratamento de águas em produção contínua, operada pela CEDAE, sendo responsável pelo abastecimento de



água local e de aproximadamente 85% da população da Região Metropolitana do Rio de Janeiro (VIANA, 2009; CEDAE, 2013).

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

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

### **1.6. Baía de Sepetiba**

A baía de Sepetiba (447 km<sup>2</sup>) localizada na região sudeste do Rio de Janeiro, apresenta água salobra e salgada, no entanto recebe aporte de águas doce (tabela 2) (WASSERMAN, 2005). A baía apresenta zonas de mangue e estuarina, onde habitam diversas espécies de peixes, moluscos e crustáceos, sendo de grande importância econômica para a região através da atividade pesqueira, no entanto a baía tem recebido durante anos rejeitos domésticos e industriais (MONTEZUMA, 2012). Esgoto sanitário de 1.400.000 habitantes que residem na região metropolitana do Rio de Janeiro e 12 municípios próximos é lançado na baía de Sepetiba (CUNHA, 2002). Figura 1, pontos A, B, C estão demonstrando águas do rio Guandu que irão deságuas na baía de Sepetiba.

Tabela 2: Aporte de Água doce à Baía de Sepetiba (WASSERMAN, 2005)

Aporte dos Rios	Volume ( $10^6 \text{ m}^3 \text{ ano}^{-1}$ )	Volume ( $\text{m}^3 \text{ s}^{-1}$ )
Engenho Novo	52	1.6
Piração	18	0.6
Piraquê	132	4.2
Porto	21	0.7
Ita	92	2.9
Guandu	221	7.0
São Francisco	6538	207.3
Guarda	445	14.1
Canção	107	3.4
Itingussú	12	0.4
Total:	7638	242.2

### 1.7. Bioindicadores de contaminação fecal

Bioindicadores são organismos ou comunidades utilizadas para monitorar a qualidade das águas ambientais, através da sua presença, quantidade e distribuição (MORENO & CALLISTO, 2005). Um bioindicador ideal precisa estar dentro de alguns critérios, como ser detectado em todos os ambientes, ser mais numeroso que os patógenos, possuir resistência semelhante à dos patógenos (DUARTE, 2011).

Bioindicadores microbiológicos como coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e estreptococos fecais são indicadores utilizados em programas de monitoramento da qualidade microbiológica de águas, segundo as normas do CONAMA 274/2000, 357/2005 e 430/2011.

Entretanto, esses Bioindicadores apresentam limitações na detecção da fonte específica da contaminação, limitando sua utilização como indicador de contaminação fecal (BOEHM et al., 2009).

### 1.8. Rastreamento da Fonte Microbiana em ambientes aquáticos

Com o intuito de saber a fonte de contaminação fecal de águas ambientais, o Rastreamento da Fonte Microbiana (RFM) surgiu no final da



década do século XX (HARWOOD et al., 2014). Esses métodos baseiam-se em moléculas de assinatura (biomarcadores), tais como as sequências de DNA de microrganismos associadas a diferentes espécies animais, permitindo a distinção entre as fontes de contaminações fecais (SCOTT, 2002; MIESZKIN et al., 2009). A utilização de biomarcadores hospedeiro-específicos é de grande relevância em sua aplicação em águas ambientais, principalmente em água de abastecimento. Segundo Bernhard & Field (2000) a persistência da contaminação ocorre pela ausência de métodos que indique o agente causador.

Dentre os biomarcadores pode-se citar os Gêneros *Bifidobacterium*, *Methanobrevibacter* e a ordem *Bacteroidales* que estão presentes naturalmente na microbiota humana e animal, ainda podemos citar os *Enterococcus*, F+ RNA colifagos, vírus que causam lise em bactérias do grupo coliformes. Desta forma, presença desses marcadores na água é indicativo de contaminação fecal específica de humanos, suínos, bovinos e equinos, dentre outros (PEDROSO et al., 2003; GORDON et al., 2013).

Dentre os representantes do gênero *Bifidobacterium*, podemos citar *B. adolescentis* e *B. dentium*, espécies associadas à microbiota humana, *B. ruminantium*, associada a ruminantes, *B. psychraerophilum*, associada a suínos, entre outros (STENICO et al., 2014).

No Domínio Archaea, encontramos o gênero *Methanobrevibacter*, onde podemos citar *M. smithii* e *M. oralis*, associados à microbiota humana, *M. ruminantium*, associado aos ruminantes, *M. thaueri*, associado a suínos e *M. gottschalkii*, associada a equinos (HORZ & CONRADS, 2011; MATHUR et al., 2013).

### **1.9. Ordem *Bacteroidales* e gênero *Methanobrevibacter smithii***

O filo *Bacteroidetes* são representados por bacilos Gram-negativos, e possui 4 classes: *Bacteroidia*, *Cytophagia*, *Flavobacteriia* e *sphingabacteria*. A classe *Bacteroidia* possui uma única ordem: *Bacteroidales*, que por sua vez possui cinco famílias: *Bacteroidaceae*, *Rikenellaceae*, *Porphyromonadaceae*,

*Marinilabiliaceae* e *Prevotellaceae*. Esta classificação foi baseada em análises filogenética do gene *rrs* 16S rRNA (MERINO, 2012).

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

O domínio Archaea compreende os micro-organismos anaeróbios, termófilos e halófilos cujas enzimas são adaptadas a altas concentrações de salinidade. Os metanogênicos, da archaea, possuem a propriedade de consumir o hidrogênio e o dióxido de carbono a fim de produzir metano. Membros do gênero *methanobrevibacter* são anaeróbios estritos, produtores de metano (FERMIANO et al., 2011).

A flora intestinal humana é dominada por duas divisões de bactérias, o Bacteroidetes e o Firmicutes, que em conjunto abrangem mais de 90% de todos os tipos (filogenéticas filotipos). Archaea também estão representados, mais proeminentemente por um Euryarchaeote metanogênica, *Methanobrevibacter smithii*, que compreende até 10% de todos os anaeróbios nos dois pontos de adultos saudáveis (HARWOOD et al., 2014).

Considerando que o método biomolecular, além de indicar a presença de poluição, também indica quem é o agente causador, espera-se que seja um método para auxiliar o método atual, que utiliza a *E. coli*, representando uma análise generalizada, não sendo possível determinar a fonte específica da contaminação, limitando sua utilização como indicador de contaminação. A

ocorrência de micro-organismos anaeróbios em ambientes aquáticos geralmente está ligada à entrada de emissários de esgoto. No entanto, a capacidade limitada de crescimento fora do hospedeiro, devido presença de oxigênio, é superada com utilização de técnicas moleculares, que permitem a detecção e quantificação rápida desses micro-organismos para posteriores estudos (BOEHM et al., 2009).



## 2. OBJETIVO

### 2.1. Geral

Avaliar a presença de contaminação fecal em afluentes da bacia hidrográfica do rio Guandu e em águas do rio Guandu que possuem como destino a baía de Sepetiba por meio da aplicação de biomarcadores hospedeiro-específicos.

### 2.2. Específicos

- Verificar a especificidade dos marcadores frente a fezes de suínos, equinos, bovinos e humanos.
- Coletar amostras de água de 10 pontos da bacia hidrográfica do rio Guandu e de 3 pontos das águas do rio Guandu com destino a baía de Sepetiba.
- Avaliar os parâmetros físico-químicos como: temperatura, Potencial Hidrogeniônico (pH), oxigênio dissolvido (OD), salinidade e condutividade nas amostras.
- Determinar as concentrações de coliformes totais/*E. coli* dos pontos de coleta;
- Detectar a presença de contaminação fecal humana, de animais suínos, bovinos e equinos pela PCR do gene *rrs* (16S rRNA) da ordem *Bacteroidales*.

Fl.:	Proc.: 132-GUANDU/15
Rubrica:	<b>SEMPRE FEITO</b>

Fl.:	Proc.: 132-GUANDU/14
Rubrica:	

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta de amostras fecais

A especificidade dos iniciadores foi realizada através da PCR convencional frente às fezes humanas, suínas, equinas e bovinas coletadas de uma fazenda em Mato Grosso do Sul. Foram coletadas 100 gramas de fezes de cada um dos hospedeiros. As amostras foram refrigeradas e transportadas ao laboratório, em seguida foram conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  e posteriormente foi realizada a extração de DNA, conforme protocolo do item 3.2.

#### 3.2. Extração de DNA total de Amostras de origem fecal

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

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

Para verificação da integridade do DNA genômico foi realizada eletroforese em gel de agarose após a extração e purificação do DNA. O gel foi preparado com 1% de agarose (SIGMA-ALDRICH) em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X , e a corrida foi realizada a 45 volts por 40 min e posteriormente 60 v por 20 min adicionais. A coloração do gel foi realizada com solução de brometo de etídio (0,3 ng/mL) e analisada através do sistema de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE Healthcare).

### 3.3. Coleta de amostras de águas superficiais

Foram realizadas duas coletas no rio Guandu com destino a baía de Sepetiba, na primeira coleta (dezembro/2013) foi realizada coleta em um único ponto, já na segunda foi realizada coleta de 3 pontos (junho/2014). Também foi realizada coleta (julho/2014) de 10 pontos da bacia hidrográfica do rio guandu. Foram coletados 5 litros de amostras de todos os pontos (Figura 2).

As amostras foram refrigeradas e transportadas ao laboratório, em seguida foram filtradas (Filtros Sterivex-GS de 0,22µm). O material retido nos filtros foi conservado a -20°C e posteriormente foi realizada a extração de DNA total, conforme protocolo do item 3.2.



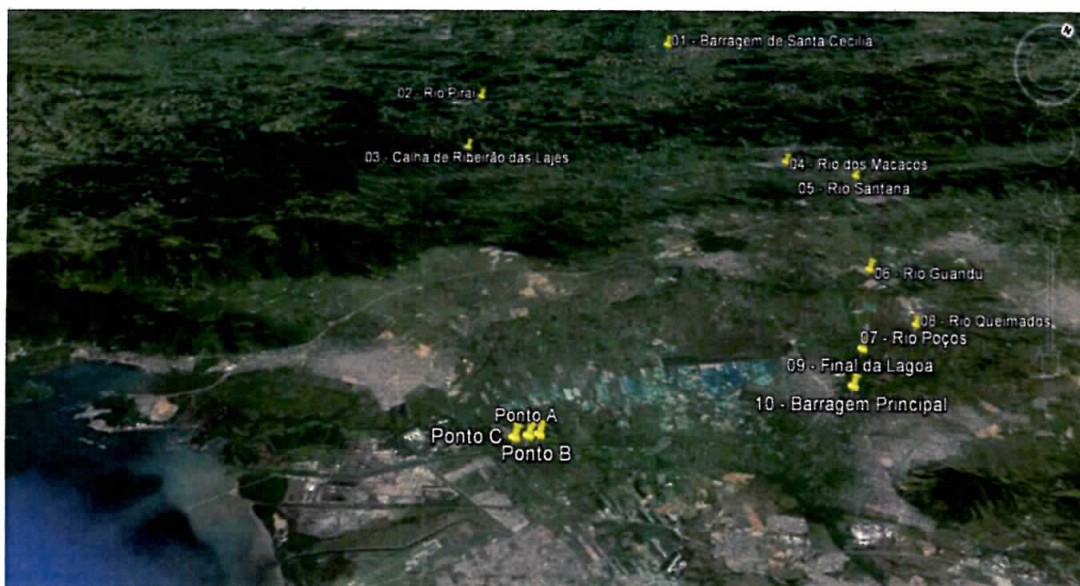


Figura 2: Pontos de coleta. Google Earth

**Ponto 1:** Barragem de Santa Cecília (BSC) (22°28'56.81"S 43°50'20.45"O)

**Ponto 2:** Rio Pirai (RP) (22°37'41.90"S 43°53'49.22"O)

**Ponto 3:** Calha de Ribeirão das Lajes (CRL) (22°41'31.43"S 43°51'44.38"O)

**Ponto 4:** Rio dos Macacos (RM) (22°38'5.99"S 43°42'17.79"O)

**Ponto 5:** Rio Santana (RS) (22°38'13.87"S 43°40'5.58"O)

**Ponto 6:** Rio Guandu (RG) (22°43'40.35"S 43°38'26.18"O)

**Ponto 7:** Rio Poços (RPÇ) (22°45'35.51"S 43°36'57.70"O)

**Ponto 8:** Rio Queimados (RQ) (22°45'35.33"S 43°36'56.53"O)

**Ponto 9:** Final da Lagoa (FL) (22°47'8.43"S 43°37'48.04"O)

**Ponto 10:** Barragem Principal (BP) (22°48'31.69"S 43°37'39.44"O)

**Ponto A:** Rio Guandu, destino a baía de Sepetiba  
(22°52'41.97"S 43°42'41.30"O)

**Ponto B:** Rio Guandu, destino a baía de Sepetiba  
(22°52'34.85"S 43°42'31.73"O)

**Ponto C:** Rio Guandu, destino a baía de Sepetiba  
(22°52'51.44"S 43°42'53.69"O)

### 3.4. Parâmetros físico-químicos e microbiológico

Após a coleta foram analisados os seguintes parâmetros físico-químicos das amostras: temperatura, pH, condutividade, OD, turbidez, cloro e salinidade.

As dosagens foram realizadas através do equipamento *Water Quality Checker U-10* (HORIBA) e por medidor de cloro (HOMIS). A determinação do número mais provável (NMP) para detecção de coliformes totais e de *E. coli* foi realizada através do método do substrato definido (COLILERT, IDEXX), conforme protocolo descrito em *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, AWWA & WEF, 2012).

### 3.5. Extração de DNA total em amostras de águas superficiais

O DNA total das amostras foi extraído, purificado e quantificado de acordo com o protocolo descrito no item 3.2.

### 3.6. Reação em cadeia da polimerase – PCR

A detecção do gene marcador *rrs* (16S rRNA) e gene *nifH* (*Methanobrevibacter Smith*) foi realizada através da PCR, onde foram utilizados iniciadores previamente descritos (Tabela 3). Foram preparados 50 µl da mistura de PCR contendo 1x (20 mM Tris-HCl; 50 mM de cloreto de potássio (KCl)); tampão da reação, 2 U de *Taq* DNA Polimerase *Plantinum*, 50 pmoles de cada iniciador, 0,2 mM de cada desoxiribonucleotídio trifosfato (dNTPs); 5% de dimetilsulfóxido (DMSO); 1,5 a 2,0 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>); aproximadamente 25-50 ng de DNA da amostra e água Gibco® completando o volume. Para controle da reação para verificar possível contaminação com DNA foi realizada a substituição do DNA pela água. Como controle positivo foi utilizado o DNA das amostras de fezes alvos, como controle negativo foi utilizada a cepa *Neisseria gonorrhoeae* INCQS (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde) 00601 (ATCC 49226). Todos os controles foram incluídos em cada experimento. A amplificação foi realizada em termociclador *Mastercycler EP* (EPPENDORF).



Tabela 3 - Iniciadores utilizados no estudo

Oligonucleotídeos - PCR Convencional					
Iniciadores	Sequências	Gene/Microrganismo	Programa	Tamanho do produto	Origem
Bac32F Bac708R	5'-AACGCTAGCTACAGGCTT-3' 5'-CAATCGGAGTTCCTTCGTG-3'	<i>rrs</i> 16S rRNA/ <i>Bacteroidales</i>	95°C-2min 95°C-1min 56°C-1min 72°C-1:30min 72°C-7min	30x 676pb	Bernhard & Field (2000)
PF163F Bac708R	5'-GCGGATTAATACCGTATGA-3' 5'-CAATCGGAGTTCCTTCGTG-3'	<i>rrs</i> 16S rRNA/ <i>Bacteroidales</i> de suíno	95°C-2min 95°C-1min 56°C-1min 72°C-1:30min 72°C-5min	58x 694pb	Dick (2005)
CF128F Bac708R	5'-CCAACYTTCCCGWTACTC-3' 5'-CAATCGGAGTTCCTTCGTG-3'	<i>rrs</i> 16S rRNA/ <i>Bacteroidales</i> de bovino	95°C-5min 95°C-1min 55°C-1min 72°C-1min 72°C-5min	55x 690pb	Bernhard & Field (2000)
PF183F Bac708R	5'-ATCATGAGTTCACATGTCCG-3' 5'-CAATCGGAGTTCCTTCGTG-3'	<i>rrs</i> 16S rRNA/ <i>Bacteroidales</i> de humano	95°C-5min 95°C-30s 57°C-1min 72°C-1min 72°C-5min	40x 695pb	Bernhard & Field (2000)
HoF597F Bac708R	5'-CCAGCCGTAAAAATAGTCGG-3' 5'-CAATCGGAGTTCCTTCGTG-3'	<i>rrs</i> 16S rRNA/ <i>Bacteroidales</i> de equino	95°C-2min 95°C-1min 53°C-45min 72°C-1:30min 72°C-10min	30x 645pb	Dick (2005)
Mnif- 342F Mnif- 363R	5'-AACAGAAAACCCAGTGAAGAG-3' 5'-ACGTAAAGGCACTGAAAAACC-3'	<i>nifH</i> / <i>Methanobrevibacter</i> <i>smithii</i>	95°C-5min 95°C-1min 58°C-30s 72°C-1min 72°C-6min	35x 222pb	Ufnar (2006)

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

Após a PCR, a eletroforese foi realizada para verificar os produtos gerados na amplificação. O gel foi preparado com 2% de agarose (SIGMA-ALDRICH) em tampão TAE 1X, e a corrida foi com 45 volts por 40 min e posteriormente 65 v por 30 min adicionais em tampão TAE 1X. Foi utilizado o padrão de peso molecular de 100 bp (DNA Ladder, INVITROGEN). A coloração do gel foi realizada com solução de brometo de etídio (0,3 ng/mL) e analisada através do sistema de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE Healthcare). Após a confirmação da amplificação, os produtos foram purificados utilizando kit QIAquick® PCR Purification (QIAGEN), de acordo com o manual do fabricante.

Fl.: .....	Proc.: 135-GUANDU/15
Rubrica: .....	<b>SEM EFEITO</b>
Fl.: .....	Proc.: 132-GUANDU/14
Rubrica: .....	.....

### 3.7. Sequenciamento

Os produtos da PCR foram submetidos ao sequenciamento com objetivo de confirmar a identidade dos fragmentos amplificados. Cerca de 200 a 300 ng dos produtos foram distribuídos em placa de 96 poços *MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate* (APPLIED BIOSYSTEMS). Em cada poço foi adicionado solução tampão 5X, *Big Dye*, e  $3,2 \text{ pmol.}\mu\text{L}^{-1}$  dos respectivos iniciadores *forward* (tabela 3). A placa foi submetida a uma reação de amplificação em termociclador *Mastercycler EP* (EPPENDORF), nas seguintes condições: 40 ciclos de 94°C por 10 seg, 50°C por 5 seg e 60°C por 4 min. A reação de sequenciamento foi realizada por eletroforese capilar em aparelho *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer Sequencer* (APPLIED BIOSYSTEMS) usando o kit *Big Dye Terminator* (Plataforma PDTIS/FIOCRUZ). As sequências com mais de 300 bases apresentando "*Phred score*" maior ou igual a 20 foram consideradas boas e incluídas nas análises subsequentes.

### 3.8. Análise do sequenciamento

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

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1. Parâmetros físico-químicos e microbiológicos

Os valores de pH encontrados na 1ª e 2ª coleta no ponto A apresentaram pH igual a 7,57 e 7,56 respectivamente, o valor mais baixo foi apresentado na 2ª coleta no ponto B com pH igual a 6,91, no entanto todos os valores ficaram dentro do preconizado segundo o CONAMA 357/2005. Os valores de condutividade entre 0,224  $\mu\text{S}/\text{cm}$  na 2ª coleta no ponto B e 0,252  $\mu\text{S}/\text{cm}$  na 1ª coleta no ponto A, apresentando assim o valor mais alto no ponto A na primeira. Em relação a turbidez, todos os pontos apresentaram-se dentro dos valores estabelecidos, os maiores valores encontrados foram na 1ª e 2ª coleta do ponto A (90 e 91 UNT respectivamente) e o menor valor foi na 2ª coleta no ponto B com 9 UNT. Os níveis de oxigênio dissolvido apresentaram-se na 1ª coleta no ponto A e 2ª coleta no ponto B com valor de 2,99 mg/L e 3,7 mg/L respectivamente, sendo considerados abaixo do preconizado pela legislação que é superior a 5 mg/L e foi visto que os maiores valores de oxigênio dissolvido foram encontrados na 2ª coleta nos pontos A e C com valores de 6,75 mg/L e 5,27 mg/L respectivamente. As temperaturas variaram entre 20,4 e 25,5 °C, na 2ª coleta no ponto B e na 1ª coleta no ponto A, respectivamente. Os parâmetros microbiológicos foram considerados fora do limite preconizado em todo os pontos de coleta com valores maiores que 24196 NMP/100mL de *E. coli*.



**Tabela 4** – Parâmetros físico-químicos e microbiológicos do rio Guandu com destino a baía de Sepetiba

Parâmetros	V.R Água Doce Classe 2	Rio Guandu			
		1ª coleta Dez. 2013	2ª coleta Jun. 2014		
		Ponto A	Ponto A	Ponto B	Ponto C
Cloro residual total (ppm)	0,01	0	0	0	0
pH	6,0 a 9,0	7,57	7,56	6,91	7,22
Condutividade da Amostra, (µS/cm)	-	0,252	0,242	0,224	0,228
Turbidez (UNT <sup>a</sup> )	Até 100	90	91	9	14
O.D <sup>b</sup> , (mg/L)	>5	2,99	6,75	3,7	5,27
Temperatura (°C)	-	~25,5	~22	~20,4	~21,5
Salinidade (%)	5	0	0	0	0
Coliformes totais (NMP <sup>c</sup> /100 mL)	-	>24196	>24196	>24196	>24196
<i>Escherichia coli</i> (NMP <sup>c</sup> /100 mL)	1000	>24196	>24196	>24196	>24196

Ponto A= ponto principal de coleta, ponto B = 350 m distante do ponto A em direção a nascente, ponto C = 450 m distante do ponto A em direção oposta a nascente.

<sup>a</sup> Unidade Nefelométrica de Turbidez

<sup>b</sup> Oxigênio Dissolvido

<sup>c</sup> Número Mais Provável

Os valores de pH ficou entre 6,4 e 7,8, dentro do preconizado pela legislação em todos os pontos. Os valores de condutividade ficaram entre 33 µS/cm na calha de Ribeirão das Lajes e 586 µS/cm no rio Poços. Em relação a turbidez, todos os pontos ficaram com valores dentro do preconizado, o valor mais elevado foi encontrado no final da Lagoa com valor de 24,8 UNT e o menor valor foi na calha de Ribeirão das Lajes com valor 2,2 UNT. Os níveis de oxigênio dissolvido apresentaram-se na maioria dos pontos dentro do valor preconizado pela legislação, somente o rio Piraí com 4,8 mg/L, rio Macacos com 2,4 mg/L, rio Poços com 2,3 mg/L e rio Queimados com 0 mg/L ficaram

abaixo do preconizado pela legislação. As temperaturas variaram entre 20,2 e 22,8 °C, na barragem de Santa Cecília e rio Macacos, respectivamente. Os parâmetros microbiológicos foram considerados dentro do limite preconizado na maioria dos pontos, com exceção do rio Macacos e rio Queimados com valores acima de 24196 NMP/100mL, em ambos.

**Tabela 5** – Parâmetros físico-químicos e microbiológicos dos afluentes da bacia hidrográfica do rio Guandu

Parâmetros	V.R Água Doce classe 2	Bacia hidrográfica do rio Grandu									
		Jul. de 2014									
		BSC	RP	CRL*	RM	RS	RG	RPÇ	RQ	FL	BP
Cloro residual total (ppm)	0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH	6,0 a 9,0	6,6	6,4	6,4	6,7	6,7	6,6	7	6,8	7,8	7
Condutividade da Amostra, (µS/cm)	-	93	91	33	322	60	89	586	238	335	84
Turbidez (UNT <sup>a</sup> )	Até 100	2,9	2,6	2,2	7,1	5,8	2,8	20,1	13	24,8	3,6
O.D <sup>b</sup> (mg/L)	>5	7,1	4,8	8,7	2,4	9,3	8,8	2,3	0	8,3	8,2
Temperatura (°C)	-	20,2	20,6	21,7	22,8	22,6	21,7	22	22,2	21,3	21,5
Salinidade (%)	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coliformes totais (NMP <sup>c</sup> /100 mL)	-	9804	6131	6488	>24196	>24196	2909	565	>24196	>24196	410
<i>Escherichia coli</i> (NMP <sup>c</sup> /100 mL)	1000	120	97	10	>24196	426	52	41	>24196	173	31

<sup>a</sup> Unidade Nefelométrica de Turbidez

<sup>b</sup> Oxigênio Dissolvido

<sup>c</sup> Número Mais Provável

\* Água de Classe Especial

## 4.2. Especificidade dos iniciadores e detecção dos marcadores nas amostras

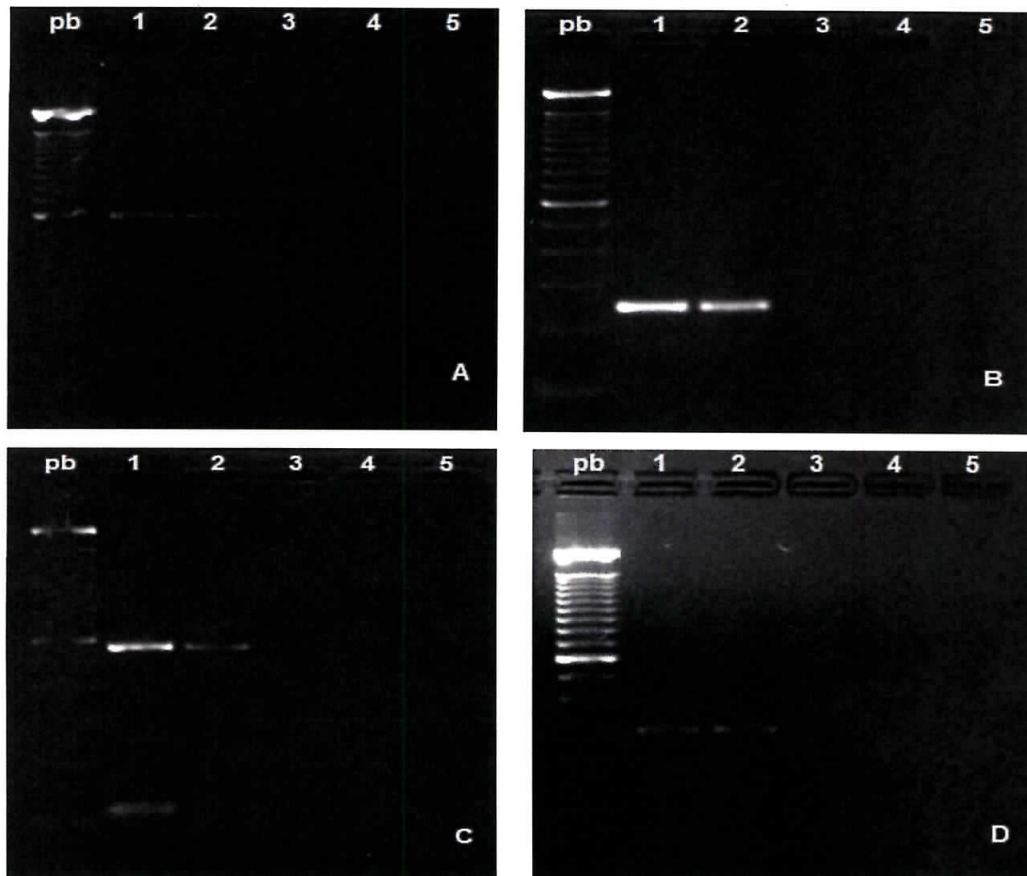
### 4.2.1. Primeira coleta - águas com destino a baía de Sepetiba

Para a realização da especificidade dos iniciadores foi incluído DNA extraído de fezes de suíno na PCR com iniciadores específicos de bovino (Figura 3.A), DNA extraído de fezes de humano com iniciadores específicos de equino (Figura 3.B), DNA extraído de fezes de bovino com iniciadores específicos de suíno (Figura 3.C) e DNA extraído de fezes de equino com iniciadores específicos de humano (Figura 3.D). Os resultados demonstraram a especificidades dos iniciadores específicos frente ao DNA extraído de amostra fecal de outros organismos. A especificidade dos iniciadores deste estudo foi avaliada previamente no laboratório, todos os iniciadores foram específicos frente ao DNA fecal dos hospedeiros alvos, desta forma utilizamos apenas um DNA fecal para demonstrar a especificidade.

Para PCR das amostras, foram utilizados os iniciadores para o gene *rrs* 16S rRNA de *Bacteroidales* de bovinos (CF128F e Bac708R), *Bacteroidales* de suíno (PF163F e Bac708R), *Bacteroidales* de equino (HOF597F e Bac708R) e *Bacteroidales* de humano (HF183F e Bac708R), entretanto os iniciadores de equino e humano descritos na literatura não foram sensíveis neste estudo, por este motivo foram substituídos pelos iniciadores desenhados por Bianco, K (comunicação pessoal, 2014), foram utilizados segundo o protocolo previamente descrito no item 3.6 com DNA total extraído das amostras de água (n=1). A amostra de água analisada apresentou o fragmento esperado para todos os organismos testados. Para bovino aproximadamente 690 pb, compatível com o fragmento detectado no DNA de *Bacteroidales* de bovino (Figura 3.A), para Equino aproximadamente 242 pb, compatível com o fragmento detectado no DNA de *Bacteroidales* de equino (Figura 3.B), para Suíno aproximadamente 694 pb, compatível com o fragmento detectado no DNA de *Bacteroidales* de suíno (Figura 3.C), para humano aproximadamente



291 pb, compatível com o fragmento detectado no DNA de *Bacteroidales* de humano (Figura 3.D).

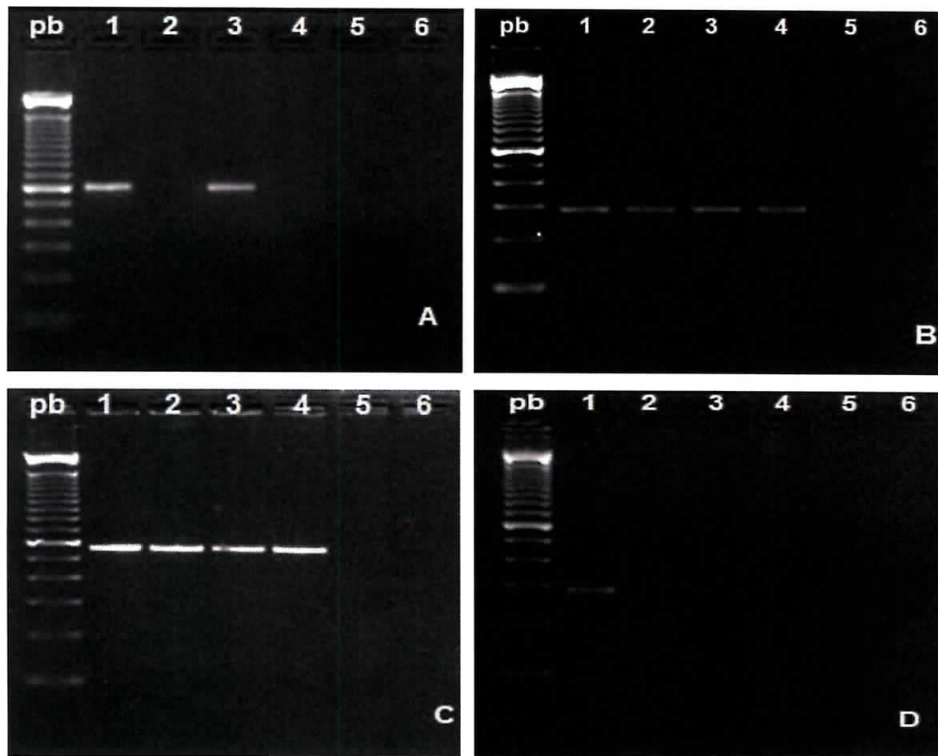


**Figura 3:** Primeira Coleta. Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR das amostras do rio Guandu com destino a baía de Sepetiba para detecção de contaminação fecal e teste de especificidade. **(A)** *Bacteroidales* de bovino (690pb); **(B)** *Bacteroidales* de equino (242pb); **(C)** *Bacteroidales* de suíno (694pb); **(D)** *Bacteroidales* de humano (291 pb). Poços: (pb) 100bp DNA Ladder; (1A) fezes bovina; (1B) fezes equina; (1C) fezes suína; (1D) fezes humana; (2A, B, C, D) Ponto A; (3A) fezes suína; (3B) fezes humana; (3C) fezes bovina; (3D) fezes equina; (4A, B, C, D) *Neisseria gonorrhoeae* INCQS 00601 (ATCC 49226); (5A, B, C, D) H2O Gibco®.

#### 4.2.2. Segunda coleta- águas com destino a baía de Sepetiba

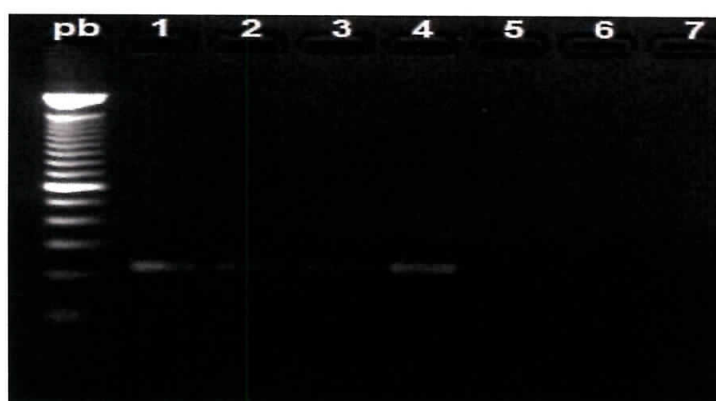
Os iniciadores para o gene *rrs* 16S rRNA de *Bacteroidales* de bovino (CF128F e Bac708R), *Bacteroidales* de suíno (PF163F e Bac708R), *Bacteroidales* de humano (comunicação pessoal) e *Bacteroidales* de equino (comunicação pessoal) foram utilizados segundo o protocolo descrito

previamente no item 3.6 com DNA total extraído das amostras de água (n=3). Para bovino aproximadamente 690 pb, compatível com o fragmento detectado no DNA de *Bacteroidales* de bovino, foi encontrado apenas no ponto B (Figura 4.A), para equino aproximadamente 242 pb, compatível com o fragmento detectado no DNA de *Bacteroidales* de equino foi detectado em todos os pontos (Figura 4.B), para Suíno aproximadamente 694 pb, compatível com o fragmento detectado no DNA de *Bacteroidales* de Suíno foi detectado em todos os pontos (Figura 4.C), para Humano aproximadamente 291 pb, compatível com o fragmento detectado no DNA de *Bacteroidales* de Humano não foi detectado em nenhum dos pontos (Figura 4.D).



**Figura 4:** Segunda Coleta. Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR das amostras do rio Guandu com destino a baía de Sepetiba para detecção de contaminação fecal. **(A)** *Bacteroidales* de bovino (690pb); **(B)** *Bacteroidales* de equino (242pb); **(C)** *Bacteroidales* de suíno (694pb). **(D)** *Bacteroidales* de humano (291pb). Poços: (pb) 100bp DNA Ladder; (1A) fezes bovina; (1B) fezes equina; (1C) fezes suína; (1D) fezes humana; (2A, B, C, D) Ponto A; (3A, B, C, D) Ponto B; (4A, B, C, D) Ponto C; (5A, B, C, D) *Neisseria gonorrhoeae* INCQS 00601 (ATCC 49226); (6A, B, C, D) H2O Gibco®.

Iniciadores para o gene *rrs* 16S rRNA de *Bacteroidales* de Humano, não foi encontrado na segunda coleta do rio Guandu com destino a baía de Sepetiba, para se ter a certeza dos resultados foi realizada uma nova PCR com marcador para o gene *nifH* de *Methanobrevibacter smithii* de archaea, segundo o protocolo descrito previamente no item 3.6 com DNA total extraído das amostras de água (n=3), onde todas das amostras apresentaram aproximadamente 222 pb, compatível com o fragmento detectado no DNA de *M. smithii*. Para verificar a especificidade dos iniciadores foi incluído DNA extraído de fezes de equino (Figura 5). A especificidade do marcador foi avaliada previamente no laboratório, e demonstrou-se específico frente ao DNA fecal dos hospedeiros alvos, desta forma utilizamos apenas um DNA fecal para demonstrar a especificidade.



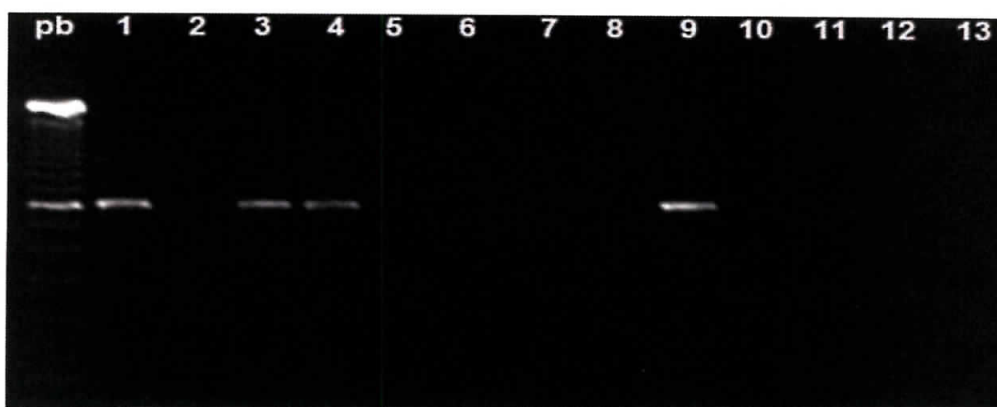
**Figura 5:** Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR das amostras de água do rio guandu com destino a baía de Sepetiba para detecção de *Methanobrevibacter smithii* (222pb). (1) fezes de Humano; (2) Ponto A; (3) Ponto B; (4) Ponto C; (5) Fezes de equino; (6) *Neisseria gonorrhoeae* INCQS 00601 (ATCC 49226); (7) H2O Gibco®.

#### 4.2.3. Afluentes da bacia hidrográfica do rio Guandu

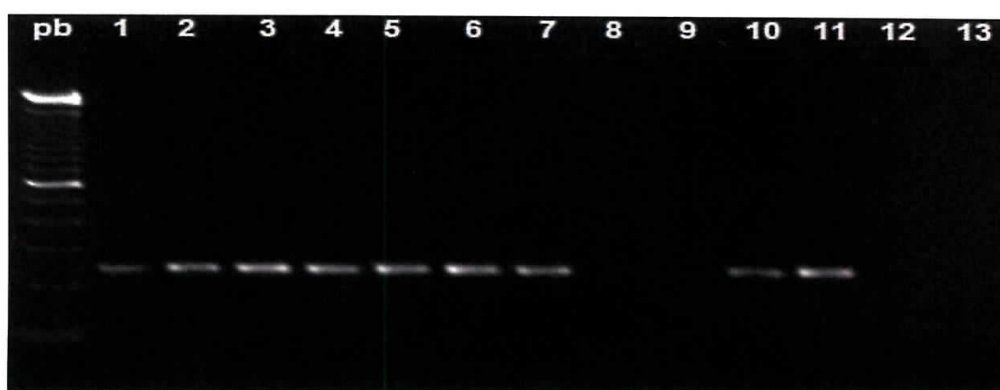
Os iniciadores para o gene *rrs* 16S rRNA de *Bacteroidales* de bovino (CF128F e Bac708R), *Bacteroidales* de equino (comunicação pessoal), *Bacteroidales* de suíno (PF163F e Bac708R) e *Bacteroidales* de humano (comunicação pessoal), foram utilizados segundo o protocolo descrito previamente no item 3.6 com DNA total extraído das amostras de água (n=10). Para bovino aproximadamente 690 pb, compatível com o fragmento detectado no DNA de *Bacteroidales* de bovino, foi encontrado no rio Queimados, rio



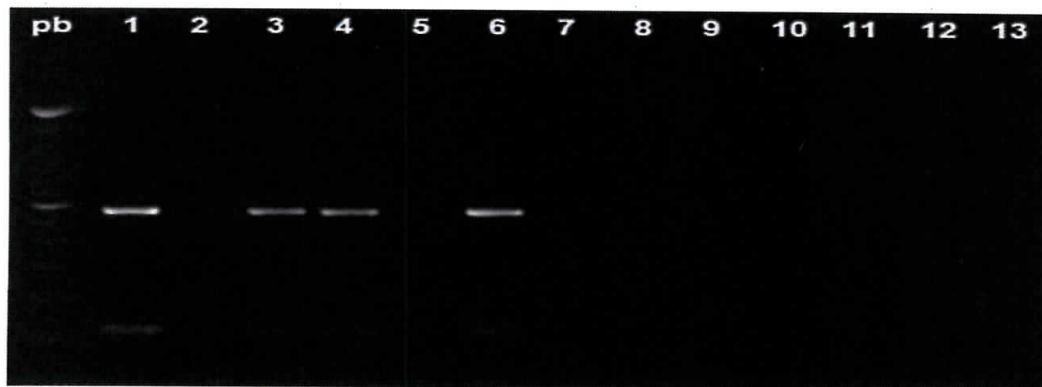
Guandu e rio Macacos (Figura 6), para equino aproximadamente 242 pb, compatível com o fragmento detectado no DNA de *Bacteroidale* de equino foi detectado maioria dos pontos com exceção do rio Guandu e barragem de Santa Cecília (Figura 7), para Suíno aproximadamente 694 pb, compatível com o fragmento detectado no DNA de *Bacteroidales* de suíno foi detectado no rio Queimados, rio Macacos e barragem de Santa Cecília (Figura 8), para humano aproximadamente 291 pb, compatível com o fragmento detectado no DNA de *Bacteroidales* de humano não foi detectado em nenhum dos pontos (Figura 9).



**Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR das amostras da bacia hidrográfica do rio Guandu para detecção de *Bacteroidales* de bovino (690pb). Poços: (bp) 100bp DNA Ladder; (1) fezes de bovino; (2) rio Pirai; (3) rio Queimados; (4) rio Macacos; (5) rio Santana; (6) barragem de Santa Cecília; (7) calha de Ribeirão das Lajes; (8) barragem Principal; (9) rio Guandu; (10) rio Poços; (11) final da Lagoa; (12) *Neisseria gonorrhoeae* INCQS 00601 (ATCC 49226); (13) H2O Gibco®.



**Figura 7:** Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR das amostras da bacia hidrográfica do rio Guandu para detecção de *Bacteroidales* de equino (242pb). Poços: (bp) 100bp DNA Ladder; (1) fezes de equino; (2) rio Pirai; (3) rio Queimados; (4) rio Macacos; (5) rio Santana; (6) barragem Principal; (7) calha de Ribeirão das Lajes; (8) barragem de Santa Cecília; (9) rio Guandu; (10) rio Poços; (11) final da Lagoa; (12) *Neisseria gonorrhoeae* INCQS 00601 (ATCC 49226); (13) H2O Gibco®.

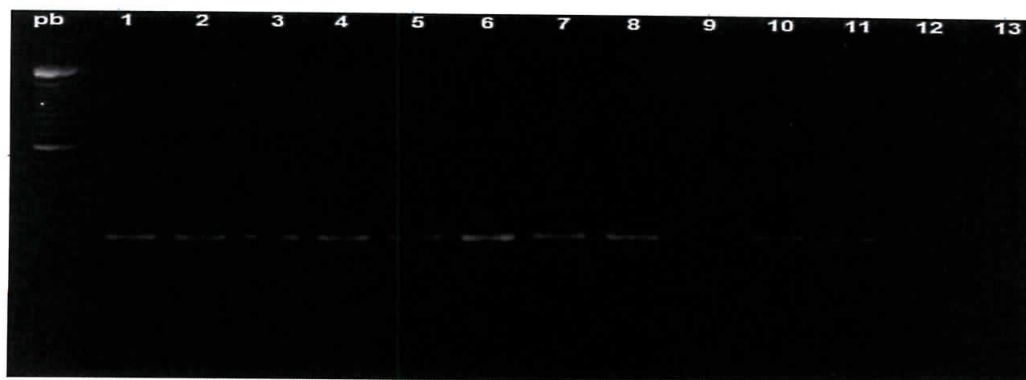


**Figura 8:** Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR das amostras da bacia hidrográfica do rio Guandu para detecção de *Bacteroidales* de Suíno (690pb). Poços: (bp) 100bp DNA Ladder; (1) fezes de suíno; (2) rio Pirai; (3) rio Queimados; (4) rio Macacos; (5) rio Santana; (6) barragem de Santa Cecília; (7) calha de Ribeirão das Lajes; (8) barragem Principal; (9) rio Guandu; (10) rio Poços; (11) final da Lagoa; (12) *Neisseria gonorrhoeae* INCQS 00601 (ATCC 49226); (13) H2O Gibco®.



**Figura 9:** Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR das amostras da bacia hidrográfica do rio Guandu para detecção de *Bacteroidales* de humano (291pb). Poços: (bp) 100bp DNA Ladder; (1) fezes de humano; (2) rio Pirai; (3) rio Queimados; (4) rio Macacos; (5) rio Santana; (6) barragem de Santa Cecília; (7) calha de Ribeirão das Lajes; (8) barragem Principal; (9) rio Guandu; (10) rio Poços; (11) final da Lagoa; (12) *Neisseria gonorrhoeae* INCQS 00601 (ATCC 49226); (13) H2O Gibco®.

Iniciadores para o gene *rrs* 16S rRNA de *Bacteroidales* de Humano, não foi encontrado na Bacia hidrográfica do rio Guandu, então foi realizada uma nova PCR com marcador para o gene *nifH* de *Methanobrevibacter smithii* de archaea, onde a maioria das amostras, com exceção do rio Guandu, apresentaram aproximadamente 222 pb, compatível com o fragmento detectado no DNA de *M. Smith* (Figura 10).



**Figura 10:** Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos de PCR das amostras da bacia hidrográfica do rio Guandu para detecção de *Methanobrevibacter smithii* (222pb). Poços: (bp) 100bp DNA Ladder; (1) fezes de humano; (2) rio Pirai; (3) rio Queimados; (4) rio Macacos; (5) rio Santana; (6) barragem de Santa Cecília; (7) calha de Ribeirão da Lajes; (8) barragem Principal; (9) rio Guandu; (10) rio Poços; (11) final da Lagoa; (12) *Neisseria gonorrhoeae* INCQS 00601(ATCC 49226); (13) H2O Gibco®.

### 4.3. Sequenciamento

A análise das sequências através do BLASTn resultou na confirmação da identidade dos fragmentos. Os fragmentos amplificados do gene *rrs* 16S rRNA de *Bacteroidales* de humano, equino, suíno e bovino apresentaram alta similaridade (96-99%) com os respectivos alvos (figuras 11, 12, 13 e 14 respectivamente).

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Uncultured organism clone ELU0109-T269-S-NI_000152 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	239	239	25%	3e-59	99%	<a href="#">HQ787005.1</a>
Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone AP09K.5	239	239	25%	3e-59	99%	<a href="#">AM404910.1</a>
Uncultured bacterium clone 05FVH24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	237	237	25%	1e-58	99%	<a href="#">KJ422724.1</a>
Uncultured bacterium clone 05DWH24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	237	237	25%	1e-58	99%	<a href="#">KJ422715.1</a>
Uncultured bacterium clone 03EWH24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	237	237	25%	1e-58	99%	<a href="#">KJ422701.1</a>

**Figura 11:** *Bacteroidales* de Humano apresentou identidade de 99%



Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured bacterium clone horse1_aai89d06_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence</a>	348	348	37%	4e-92	98%	<a href="#">EU463590.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured rumen bacterium 16S rRNA, partial sequence, clone: R-B-122</a>	303	303	34%	1e-78	97%	<a href="#">AB614859.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured rumen bacterium 16S rRNA, partial sequence, clone: R-B-105</a>	303	303	34%	1e-78	97%	<a href="#">AB614842.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured rumen bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: D-C-43</a>	303	303	34%	1e-78	97%	<a href="#">AB612742.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured rumen bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence, clone: D-C-26</a>	303	303	34%	1e-78	97%	<a href="#">AB612725.1</a>

Figura 12: *Bacteroides* de Equino apresentou identidade de 98%

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured bacterium clone T1WK15D53_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence</a>	839	839	93%	0.0	97%	<a href="#">HQ716258.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured Bacteroidales bacterium clone 163MPOH001_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence</a>	833	833	93%	0.0	97%	<a href="#">FJ596710.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured bacterium clone PWO087_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence</a>	828	828	93%	0.0	96%	<a href="#">KC300891.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured bacterium clone MF057_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence</a>	828	828	94%	0.0	96%	<a href="#">KC300545.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured Bacteroidales bacterium clone PigC1_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence</a>	817	817	94%	0.0	96%	<a href="#">AY695691.1</a>

Figura 13: *Bacteroidales* de Suíno apresentou identidade de 96%

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured Bacteroidales bacterium clone CB5_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence</a>	941	941	97%	0.0	97%	<a href="#">EU573797.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured Bacteroidales bacterium clone YHF41_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence</a>	935	935	97%	0.0	97%	<a href="#">GQ921861.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured bacterium clone PWO253_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence</a>	929	929	97%	0.0	97%	<a href="#">KC301039.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured Bacteroidales bacterium clone C21_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence</a>	929	929	97%	0.0	97%	<a href="#">HM100694.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured Bacteroidales bacterium clone Cow143_16S_ribosomal_RNA_gene_partial_sequence</a>	924	924	97%	0.0	97%	<a href="#">AY695667.1</a>

Figura 14: *Bacteroidales* de Bovino apresentou identidade de 97%

Fl.: .....	Proc.: 132-GUANDU/14
Rubrica: .....	<b>SEM EFEITO</b>
Fl.: .....	Proc.: 132-GUANDU/14
Rubrica: .....	.....

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados da análise de água do rio Guandu com destino a baía de Sepetiba demonstraram a presença de contaminação em suas águas, onde a atividade pesqueira é de grande relevância para a economia local. Na primeira coleta, primavera de 2013, foi registrada concentração mais baixa de oxigênio dissolvido, com apenas 2,99 mg/L que aquela obtida no mesmo ponto, na segunda coleta, outono de 2014, com 6,75 mg/L. Ainda em 2014, onde foram realizadas 3 coletas do rio Guandu, no ponto B foi verificada baixo nível de OD que aumentou nos pontos A e C. Esse aumento pode estar relacionado a presença de descarte de efluente doméstico que pode estar sendo diluído ao longo das águas que afluem para baía de Sepetiba. Segundo Pinto e colaboradores (2010) o OD em águas é de extrema importância para manutenção da vida aquática, principalmente para os peixes, onde a maioria das espécies não sobrevivem em quantidade inferiores a 4 mg/L de OD, sendo a quantidade de OD a principal ferramenta utilizada, para verificar o impacto de poluentes em águas.

Durante a primeira coleta, a temperatura mais alta (25,5°C), no ponto A, foi inversamente proporcional ao nível de OD. O processo de decomposição da matéria orgânica provoca o consumo do oxigênio presente no meio, o que é acelerado, sobretudo em temperaturas acima de 20°C (CETESB, 2014). Já na segunda coleta foi observado que o ponto B, apesar de apresentar temperatura mais baixa, foi o único ponto que apresentou níveis de OD abaixo do preconizado pela legislação, sugerindo a presença de contaminação por matéria orgânica. Além disso, este foi o ponto que apresentou o menor índice de turbidez (9 UNT).

A quantidade de *Escherichia coli* revelou níveis elevados nas duas coletas realizadas, em todos os pontos, o que é preocupante, pois demonstra a presença de bactérias entéricas nas águas, que pode provocar danos à saúde da população ao entrar em contato com essas águas, e também é prejudicial as espécies aquáticas, uma vez que essas bactérias utilizam o OD das águas.

A maioria dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados nas duas coletas do ponto A não sofreram grandes variações, com exceção da



temperatura que apresentou  $\sim 3,5^{\circ}\text{C}$  de diferença, sendo superior na primeira coleta, o que era esperado, pois a coleta foi realizada na primavera, diferentemente da segunda coleta que foi realizada no outono e OD, onde na primeira coleta realizada no ponto A o resultado obtido foi menor que o resultado encontrado na segunda coleta do ponto A.

A PCR do gene *rrs* revelou a presença de fezes bovinas, equinas, suínas e humanas na primeira coleta (Ponto A). Para verificar se havia uma contaminação constante por esses organismos, foi realizada uma segunda coleta no outono, onde foram inseridos mais dois pontos de coleta (B e C), um antes e outro após o ponto A, para checar a possível origem e disseminação desses contaminantes fecais detectados. Somente o ponto B apresentou contaminação fecal para a maioria dos organismos testados, com exceção ao marcador de humano. Os pontos A e C não apresentaram contaminação fecal bovina e humana e apresentou um aumento nos níveis de OD, o que sugere que a contaminação está mais próxima da nascente. Para checar a ausência de detecção de contaminação fecal humana, realizamos a amplificação do gene *nifH* de *Methanobrevibacter smithii*, que demonstrou contaminação fecal em todos os pontos analisados, demonstrando maior sensibilidade que o marcador da ordem *Bacteriodales*. Por outro lado, um estudo realizado na Austrália por Ahmed e colaboradores (2012) avaliou a especificidade de hospedeiros e a sensibilidade do marcador gene *nifH*, frente as amostras fecais de 11 espécies de animais, incluindo seres humanos e posteriormente em amostras de águas residuais. A especificidade do hospedeiro relatado neste estudo em particular foi de 96%, enquanto a sensibilidade do marcador de esgoto humano foi de 81%. A prevalência do marcador em amostras de água do ambiente foi relativamente baixa em comparação com outros marcadores testados (esp, HF183, HPyVs e adenovírus).

Os resultados do estudo realizado nos afluentes da bacia hidrográfica do rio Guandu demonstraram valores de OD abaixo do preconizado pela legislação no rio Pirai (4,8 mg/L), rio Macacos (2,4 mg/L), rio Poços (2,3 mg/L) e rio Queimado (0 mg/L). Vale ressaltar a ausência total de oxigênio dissolvido em águas do rio Queimados que recebe o lançamento direto de esgoto



doméstico, sem qualquer tratamento, de toda a área de queimados, segundo o IBGE (2014) a região de queimados possui população estimada de 142.709 habitantes em 2014, gerando um forte impacto negativo. Já o rio Poços recebe a contaminação fecal de outros rios que drenam a região urbana de Queimados.

É interessante notar que a Lagoa do Guandu recebe águas dos poluídos rios Poços/Queimados e Cabuçu/Ipiranga, mas apresentou níveis de OD dentro do preconizado pela legislação. Esse dado pode ser atribuído ao grande volume de água do rio Guandu diminuindo os impactos da poluição (NOVA CEDAE, 2009). A temperatura também variou de 22,8°C (rio macacos) e 20, 2°C (barragem de Santa Cecília), o que propicia a aceleração da decomposição de matéria orgânica presente em água.

A quantidade e *Escherichia coli* (NMP/100 mL) encontrou-se com seus níveis dentro o preconizado pela legislação (<1000) na maioria dos pontos de coleta, com exceção dos rios Queimados e Macacos (>24196), Silva e colaboradores (2009) realizou o monitoramento dos afluentes da bacia do Guandu entre 2003 e 2008 e também demonstrou a presença de contaminação fecal nos rios Queimado e Macacos. Estes dados são preocupantes, pois demonstra a contaminação constante nesses rios que afluem para a ETA Guandu. Além disso, os autores verificaram altas concentrações de *E. coli* no rio Piraí, o que não ocorreu neste desse estudo. As águas da calha de Ribeirão das Lajes demonstraram os menores valores de *E. coli*, com 10 NMP/100mL, o que era o esperado, uma vez que as águas do rio Ribeirão das Lajes são consideradas classe especial segundo o CONAMA.

A contaminação fecal de equinos foi a mais prevalente em 8 dos 10 pontos de coleta analisados, demonstrando a necessidade da intervenção da vigilância sanitária e da conscientização da população em relação ao descarte de resíduos domésticos, nos afluentes da Bacia Hidrográfica do rio Guandu. Os rios mais poluídos foram os rios de Queimados e Macacos que apresentaram contaminação fecal da ordem *Bacteroidales*, de bovinos, equinos e suínos. Curiosamente, não foi detectada contaminação fecal humana em nenhum dos pontos testados com o marcador de bactéria, o que nos chamou atenção, uma

vez que o rio Queimados sofre com o lançamento de esgoto doméstico sem qualquer tratamento, e o rio poços recebe rios que drenam a região urbana de Queimados. Por este motivo, foi realizado a PCR do gene *nifH*, e foi verificada a presença de contaminação fecal na maioria dos pontos, com exceção do rio Guandu. Os resultados demonstraram a presença de fezes equinas e humanas na maioria dos pontos analisados, o que é prejudicial para a Bacia hidrográfica do Guandu, pois suas águas são destinadas ao abastecimento após tratamento na ETA Guandu.

As águas do rio Guandu com destino a estação de tratamento demonstraram menor contaminação que as águas do rio Guandu que fluem para a baía de Sepetiba, sugerindo um possível descarte de material fecal após a captação para ETA Guandu.

A contaminação das águas da Bacia hidrográfica do rio Guandu é preocupante, pois se os níveis de poluição forem muito altos o tratamento se torna bastante oneroso e até mesmo improvável, o que pode acarretar danos à ETA Guandu. Em meados da década de 70, a Companhia Estadual de Águas e Esgotos (CEDAE) foi obrigada a desativar duas estações de tratamento de água. Uma delas ficava em Santa Cruz, na Zona Oeste. A Estação de Santos Malheiros captava água do Rio Guandu-Mirim. Devido ao recebimento de uma quantidade de poluentes, a situação ficou tão grave que não foi possível realizar o tratamento das águas. No caso da ETA Guandu, a falta de tratamento do esgoto é compensada com água de diluição. Durante o processo de transposição, é retirado do Rio Paraíba da Sul quantidade extra de água para diluir a poluição do Guandu (JORNAL DO BRASIL, 2003).

Por fim, concluímos que as investigações a respeito das fontes de poluição fecal em águas de abastecimento público pode contribuir para a implementação das melhores estratégias do programa de monitoramento e remediação, a fim de melhorar a qualidade da saúde humana e do ecossistema.



## 6. CONCLUSÕES

Os biomarcadores de contaminação fecal suína, equina, bovina e humana da ordem *Bacteriodales* apresentaram especificidade frente ao material fecal específico

Os biomarcadores de contaminação fecal suína, equina e bovina da ordem *Bacteriodales* apresentaram especificidade e sensibilidade frente as amostras das águas da baía de Sepetiba e dos afluentes da bacia hidrográfica do rio Guandu direcionadas. O biomarcador de fezes humanas apresentou baixa sensibilidade.

O biomarcador de contaminação fecal humana do domínio Archaea apresentou maior sensibilidade comparado ao marcador do domínio Bacteria.

Nossos resultados expressam a presença de matéria orgânica nos afluentes da bacia do rio Guandu, principalmente nos rios Queimados e Macacos o que compromete a qualidade das águas submetidas a ETA Guandu.

Em relação ao lançamento de esgoto sanitário a situação inspira cuidados, principalmente na região de Queimados, visto que a poluição gerada nessa região está muito próxima da captação de água da ETA Guandu.

A ETA guandu foi incluída no *Guinness Book* por ser a maior Estação de Tratamento em produção contínua, no entanto a contaminação dos seus afluentes é prejudicial a ETA e assim ocasionar futuros problemas na distribuição de suas águas em quantidade e qualidade adequada ao consumo.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, W., SIDHU, J. P. S., TOZE, S. **Evaluation of the *nifH* Gene Marker of *Methanobrevibacter smithii* for the Detection of Sewage Pollution in Environmental Waters in Southeast Queensland, Australia.** Environ. Sci. Technol., 2012, 46 (1), pp 543–550.

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

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

ANA. Agência Nacional de Águas. **Legislação básica.** 2ed. Brasília, 2007.

APHA/AWWA/WEF. **Standard methods for the examination of water and wastewater, 22nd ed.** Washington: American Public Health Association; 2012, 360p.

ARRIGO, K. R. **Marine microorganisms and global nutrient cycles.** Nature. 2005 Sep 15;437(7057):349-55. Review.

AUGUSTO, L. G. S. **Saúde e Vigilância Ambiental: um tema em construção.** Epidemiologia e Serviços de Saúde 2003; 12(4) : 177 – 187.

BARCELLOS. C., QUITÉRIO L. A. D. **Vigilância ambiental em saúde e sua Implantação no Sistema Único de Saúde.** Rev. Saúde Pública. 2006 Feb; 40 (1):170-7.

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

BOEHM, A. B., ASHBOLT, N. J., COLFORD JR, J. M., DUNBAR, L. E., FLEMING, L. E., GOLD, M. A., HANSEL, J. A., HUNTER, P. R., ICHIDA, A. M., MCGEE, C. D., SOLLER J. A., WEISBERG, S. B. **A sea change ahead for recreational water quality criteria.** Journal of Water and Health, n.7, p. 9-20, 2009.

BOMFIM, M. V. J., SOEIRO, G. de O., MADEIRA, M., BARROS, H. D. **Avaliação físico-química e microbiológica da água de abastecimento do laboratório de bromatologia da UERJ.** Revista Higiene Alimentar, São Paulo, v. 21, n. 152, p. 99-103, jun. 2007.

CEDAE. Companhia Estadual de Águas e Esgoto. Apresentação. Disponível em: <<http://www.cedae.com.br/img/guandu/guandu.pdf>>. Acesso em: 8 de dezembro de 2013.

CETESB. Companhia de Tecnologia Ambiental do Estado de São Paulo. **Alterações físico químicas.** Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/mortandade/causasmateria.php>>. Acesso em: 10 de novembro de 2014.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Resolução n. 274, de 2000. **Revisa os critérios de Balneabilidade em Águas Brasileiras.** Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res00/res27400.html>>. Acesso em: 25 de outubro de 2014.

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

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Resolução n. 430, de 2011. **Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, completa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA**. Disponível em: <[http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res11/propresollanceflue\\_30e31mar11.pdf](http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res11/propresollanceflue_30e31mar11.pdf)>. Acesso em 23 de outubro de 2014.

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

CUNHA, C. L. N., ROSMAN, P. C. C., MONTEIRO, T. C. N., **avaliação da poluição por esgoto sanitário na baía de sepetiba usando modelagem ambiental**. XXVIII Congresso interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Cancún, México. Anais eletrônicos. México, out. 2002.

D'AGUILA, P. S.; ROQUE, O. C. C.; MIRANDA, C. A. S.; FERREIRA, A. P. **Avaliação da qualidade de água para abastecimento público do Município de Nova Iguaçu**. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 16(3):791-798, jul-set, 2000.

DICK, L. K., BERNHARD, A. E., BRODEUR, T. J., SANTO DOMINGO, J. W., SIMPSON, J.M., WALTERS S. P., FIELD, K. G. **Host Distributions of Uncultivated Fecal Bacteria Reveal Genetic Bacteroidales Markers for Fecal Source Identification**. Appl. Environ. Microbiol. 3184-3191.2005.



DUARTE, P. B. **Microrganismos indicadores de poluição fecal em recursos hídricos**. 2011. 52p. Monografia – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

FALAGAS, M. E., SIAKAVELLAS, E. ***Bacteroides, Prevotella, and Porphyromonas species: a review of antibiotic resistance and therapeutic options***. International Journal of Antimicrobial Agents. Volume 15, Issue 1, June 2000, Pages 1–9f.

FERMIANO, D., LIRA, E. A. G., SAMPAIO, F. R., FIGUEIREDO, L. C., FERES, M. **Prevalência de *Archaea* em indivíduos com doença periodontal e saúde periodontal**. Braz J Periodontol - December 2011 - volume 21 - issue 04 - 21(4):86-93.

FERREIRA, M. D., ABREU, K. P., FERREIRA, P. C., ALVES, R. I. S., MUÑOZ, S. I. S., **Parasitas e bactérias prevalentes no Córrego Monte Alegre localizado na área de influência do aterro sanitário de Ribeirão Preto**. O Mundo da Saúde São Paulo: 2008: jul/set 32(3):287-293.

FIOCRUZ (Fundação Osvaldo Cruz). **Tétano: sintomas, transmissão e prevenção**. Disponível em: <<http://www.bio.fiocruz.br/index.php/tetano-sintomas-transmissao-e-prevencao>>. Acesso em: 25 de outubro de 2013.

FUNASA (Fundação Nacional de Saúde). **Vigilância ambiental em saúde**. Brasília, 2002.

GORDON, K. V., BROWNELL, M., WANG, S. Y., LEPO, J. E., MOTT, J., NATHANIEL, R., KILGEN, M., HELLEIN, K. N., KENNEDY, E., HARWOOD, V.J. **Relationship of human-associated microbial source tracking markers with *Enterococci* in Gulf of Mexico Waters**. Volume 47, Issue 3, 1 March 2013, Pages 996–1004.

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

HARWOOD, V. J., STALEY, C., BADGLEY, B. D., BORGES, K., KORAJKIC, A. **Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes.** FEMS Microbiol Rev 38 (2014) 1–40.

HORZ, H. P., CONRADS, G. **Methanogenic Archaea and oral infections - ways to unravel the black box.** Journal of Oral Microbiology 2011, 3: 5940.

HUTCHISON, M. L., WALTERS, L.D., MOORE, T., THOMAS, D., AVERY, S. M. **Fate of pathogens present in livestock wastes spread onto fescue plots.** Appl. Environ. Microbiol. 71:691–696, 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e estatística. **Rio de Janeiro – Queimados.** Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=330414>>. Acesso em: 20 de novembro de 2014.

INEA – Instituto Nacional do Meio Ambiente. **Bacia Hidrográfica dos Rios Guandu, da Guarda e Guandu-Mirim: Experiências para a gestão dos recursos hídricos.** Rio de Janeiro, 2012. 340 p.

JORNAL DO BRASIL. **E a água do nosso Rio?.** 14 de abril de 2003.

KOBAYASHI, A., SANO, D., HATORI, J., ISHII, S., OKABE, S. **Chicken- and duck-associated *Bacteroides-Prevotella* genetic markers for detecting fecal contamination in environmental water.** Appl Microbiol Biotechnol (2013) 97:7427–7437.

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

LESER, T. D., AMENUVOR, J. Z., JENSEN, T. K., LINDECORONA, R. H., BOYE. M., MOLLER, K. **Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited.** Appl. Environ. Microbiol. 68:673–690, 2001.

LIMA, B. J. L. A. **Qualidade de água no ambiente escolar-ponto de partida para a educação ambiental.** 2009. 98p. Monografia de conclusão de curso – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

MALLIN, M. A., BURKHOLDER, J. M., MCIVER, M. R., SHANK, G. C., GLASGOW, H. B., TOUCHETTE, B. W., SPRINGER, J. **Comparative effects of poultry and swine waste lagoon spills on the quality of receiving streamwaters.** J. Environ. Qual. 26:1622–163, 1997.

MATHUR, R., KIM. G., MORALES. W., SUNG. J., ROOKS. E., POKKUNURI. V., WEITSMAN, S.; BARLOW, G. M., CHANG, C., PIMENTEL., M. **Intestinal Methanobrevibacter smithii but not total bacteria is related to diet-induced weight gain in rats.** Journal of The Obesity Society 2013 Apr;21(4):748-54.

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

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



MONTEZUMA, P.N. **Análise de prováveis fatores causadores do processo de assoreamento na Baía de Sepetiba-RJ.** In: INEA, 2012. Pág. 20- 41.

MORENO, P., CALLISTO, M. (2005). Bioindicadores de qualidade de água ao longo da bacia do Rio das Velhas (MG). **Bioindicadores de qualidade de água.** 5a ed. Brasília: Embrapa, 95-116.

NOVA CEDAE. **EIA/ Rima das obras de proteção da tomada d'água da CEDAE no Rio de Janeiro.** Relatório Final, 2009. Disponível em: <[http://www.ceivap.org.br/downloads2011/CEDAE\\_ EIA.pdf](http://www.ceivap.org.br/downloads2011/CEDAE_ EIA.pdf)>. Acesso em: 17 de novembro de 2014.

PEDROSO, M. Z. FRANÇA, J. P., RODRIGUES, P. F., SANTOS, A., CAMPOS JÚNIOR, O. **Uma síntese sobre colifagos como indicadores de poluição fecal / Colifags as Indicators of Fecal Pollution - a Summary.** Mundo saúde (Impr.) (1995);27(4):559-563, out.-dez. 2003.

PINTO, A. L., OLIVEIRA, G. H., 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.** Rev. GEOMAE Campo Mourão, PR v.1n.1 p.69 – 82. 2010.

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

REBOUÇAS, A. C. Panorama da água doce no Brasil. In: REBOUÇAS, Aldo da Cunha (Org.). **Panorama da degradação do ar, da água doce e da terra no Brasil.** São Paulo: IEA/USP; Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1997. p. 59-107.

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

SALAMENE, S., FRANCELINO, M. R., VALCARCEL, R., LAN, J. L., MÉDICE, M., SÁ, F. **Estratificação e caracterização ambiental da área de preservação permanente do rio Guandu/ RJ.** Revista *Árvore*, v. 35, n.2, p.221-231, Mar/Apr. 2011.

SÁ, L. L. C., JESUS, I. M.; SANTOS, E. C. O., VALE, E. R., LOUREIRO, E. C. B., SÁ E. V. **Qualidade microbiológica da água para consumo humano em duas áreas contempladas com intervenções de saneamento.** *Epidemiologia e Serviços de Saúde*. Vol. 14 - Nº 3, 2005.

SCOTT, T. M., ROSE, J. B., JENKINS, T. M., FARRAH. S. R., LUKASIK, J. **Microbial Source Tracking: Current Methodology and Future Directions†.** *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68(12):5796.

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

SILVA, A. P., OLIVEIRA, E. F., CONSOLI, M. A. F. **Aspectos críticos da poluição da bacia do rio Guandu: sua influência sobre a ETA Guandu e o abastecimento da população da cidade do Rio de Janeiro.** In: XVIII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos – Mato Grosso do Sul, 2009.

SOUSA, T. G. S. **Aguá potável garantia de qualidade de vida.** 2002. 16p. Especialização em supervisão escolar – Universidade Federal do Piauí.

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

STENICO, V., MICHELINE, S., MODESTO, M., BAFFONI, L., MATTARELLI, P., BIAVATI, B. **Identification of *Bifidobacterium* spp. using *hsp60* PCR-RFLP analysis: An update.** *Anaerobe* 26 (2014). p. 36-40.

TUCCI, C. E. M. (1997). **Água no meio urbano.** In: TUCCI, Carlos E.M *Água Doce*. Cap. 14 do livro *Água Doce*.

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

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

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

WASSERMAN, J. C. **O Impacto da mobilização química de metais durante um serviço de dragagem na baía de Sepetiba para o terminal marítimo da CSA.** Set. 2005. Disponível em: <<http://www.uff.br/remadsuff/BibVirtual/RelatdragagemCSA%20-%20Sepetiba.pdf>>. Acesso em: 22 de setembro 2014.