

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANEAMENTO,**  
**MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS**

**INVESTIGAÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS**  
**POR TÉCNICAS MOLECULARES EM UM SISTEMA**  
**DE TRATAMENTO DE ESGOTOS COMPOSTO POR**  
**REATOR UASB E LAGOAS DE POLIMENTO**

**Valéria Martins Godinho**

**Belo Horizonte**

**2010**

**INVESTIGAÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS  
POR TÉCNICAS MOLECULARES EM UM SISTEMA  
DE TRATAMENTO DE ESGOTOS COMPOSTO POR  
REATOR UASB E LAGOAS DE POLIMENTO**

**Valéria Martins Godinho**

**Valéria Martins Godinho**

**INVESTIGAÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS  
POR TÉCNICAS MOLECULARES EM UM SISTEMA  
DE TRATAMENTO DE ESGOTOS COMPOSTO POR  
REATOR UASB E LAGOAS DE POLIMENTO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de concentração: Saneamento

Linha de pesquisa: Tratamento de Águas Residuárias

Orientador: Prof. Dr. Marcos von Sperling

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Silvana de Queiroz Silva

Belo Horizonte

Escola de Engenharia da UFMG

2010

G585i

Godinho, Valéria Martins

Investigação de bactérias patogênicas por técnicas moleculares em um sistema de tratamento de esgotos composto por reator UASB e lagoas de polimento [manuscrito] / Valéria Martins Godinho. – 2010.  
182 f., enc.

Orientador: Marcos Von Sperling.

Co-orientadora: Silvana de Queiroz Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais,  
Escola de Engenharia.

Bibliografia: f. 129-146

Inclui anexos e apêndices

1. Engenharia Sanitária – Teses. 2. Saneamento – Teses. 3. Águas residuais – Microbiologia - Teses. I. Sperling, Marcos Von. II. Silva, Silvana Queiroz. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia. IV. Título.

CDU: 628(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Engenharia

Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos

Avenida Antônio Carlos, 6627 - 4º andar - 31270-901 - Belo Horizonte - BRASIL

Telefax: 55 (31) 3409-1882 - posgrad@desa.ufmg.br

<http://www.smarh.eng.ufmg.br>

---

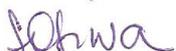
## FOLHA DE APROVAÇÃO

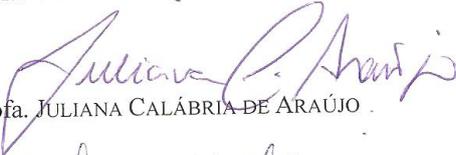
Investigação de Bactérias Patogênicas por Técnicas Moleculares em um Sistema de Tratamento de Esgotos Composto por Reator UASB e Lagoas de Polimento

### VALÉRIA MARTINS GODINHO

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora constituída pelos Senhores:

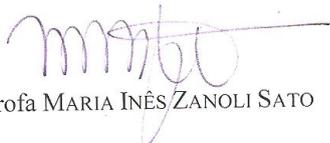
  
Prof. MARCOS VON SPERLING

  
Profª. SILVANA DE QUEIROZ SILVA

  
Profª. JULIANA CALÁBRIA DE ARAÚJO

  
Profª. SÍLVIA MARIA ALVES CORRÊA OLIVEIRA

  
Profª. MARIA HELENA MATTÉ

  
Profª MARIA INÊS ZANOLI SATO

Aprovada pelo Colegiado do PG SMARH

Versão Final aprovada por

\_\_\_\_\_  
Prof. Mauro da Cunha Naghettini  
Coordenador

\_\_\_\_\_  
Prof. Marcos von Sperling  
Orientador

Belo Horizonte, 23 de junho de 2010.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho às pessoas que ainda são carentes de educação, saúde, saneamento e, conseqüentemente, de cidadania. Que ele possa servir também, como uma pequenina gota de conhecimento àqueles que se interessam por estas questões que ainda afetam algumas regiões do nosso país.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter conseguido cumprir mais esta tarefa.

Aos meus pais, por propiciarem as condições para eu estudar, respeitarem e apoiarem as decisões que tomei em minha vida pessoal, profissional e acadêmica e por terem sido tolerantes em meus vastos momentos de ausência e recolhimento.

Ao meu orientador, prof. Marcos von Sperling, por ter aceito orientar este trabalho, pela confiança que depositou em mim, pela educação, paciência, respeito, incentivo e pela inteligência e simplicidade em me ajudar em todos os momentos os quais eu o solicitei, desde as questões mais simples às mais elaboradas.

A prof<sup>a</sup>. Silvana de Queiroz Silva, co-orientadora do trabalho, cuja atuação foi fundamental para a realização deste trabalho, pela paciência com que me ensinou as minúcias da biologia molecular e pela serenidade que sempre transmitia.

Ao prof. Carlos Chernicharo, responsável por todo o início da minha carreira, pelas sugestões para o trabalho, e também pela sabedoria em lidar e se envolver com os alunos em diversas atividades acadêmicas ou não, e em particular pela amizade, desde os tempos de estagiária.

A Fernanda M. S. do Nascimento, pela parceria no trabalho, pelo empenho com que trabalhou nos momentos cruciais de várias etapas do trabalho, principalmente, na PCR, e também pela paciência para aceitar minhas pequenas contribuições e pela convivência no laboratório.

Ao CNPq pela concessão da bolsa, imprescindível para eu me dedicar exclusivamente ao doutorado e a FAPEMIG que financiou toda a pesquisa.

A minha grande amiga Adriana Zerbini, pela presença constante na minha vida pessoal e como companheira de laboratório. Por me aceitar, entender, incentivar, confiar e ter estado ao meu lado em quase 15 anos de amizade.

Aos meus companheiros do laboratório de Microbiologia pela ajuda que me dispensaram no aprendizado da biologia molecular e pela harmoniosa convivência: Grazi, Ana Paula, Érika, Marcos Messias, Edu, Mônica, Renata.

Aos alunos bolsistas e estagiários que trabalharam nas análises físico-químicas e na ETE, Valéria, Francine, Catiane, Renan, Cristiane.

A prof<sup>a</sup> Juliana Calábria pela ajuda com o FISH, prof<sup>a</sup> Sílvia Corrêa Oliveira pela ajuda com a estatística, prof<sup>a</sup>. Maria Helena Matté da USP, Mabel Caldeira da FUNED, prof. Andrey Pereira Lage da Faculdade de Veterinária e prof<sup>a</sup> Dulciene Queiroz da Faculdade de Medicina que doaram algumas culturas puras.

Aos colegas do programa de pós- graduação que colaborarm comigo em algum momento, principalmente André Cordeiro, Eliane Prado, Paulo e Raquel.

Ao Sr. Raimundo pela manutenção de todas as atividades da ETE, particularmente na preservação das lagoas e pelo respeito e amizade cultivados desde o início do CePTS.

Aos funcionários do DESA, pela colaboração em diversas atividades acadêmicas, laboratoriais e burocráticas particularmente a Iara, a Cláudia e Olívia.

Aos amigos que estiveram presentes, me incentivando e torcendo por mim, tanto nos meus momentos pessoais quanto no trabalho, vocês foram especiais: Lenora, Sílvia Oliveira, Lívia, Fernandinha, Jackson Lauffer, Thaís, Luciane, Flávia Reis, Sílvia Gouveia, Denise, Gaby e os amigos da biodança, Thales, Cristina Barros, Danusa e o pessoal da Yoga.

A toda a minha família, irmãos, sobrinhos, tios, tias, e cunhados, e a presença dos meus avós (*in memorian* eu sei que eles estavam presentes) além de todos que em algum momento me desejaram felicidades e sucesso.

A D<sup>a</sup> Chica pelos cafés e pelos sábios conselhos nos dias nebulosos, e a Alaíde por manter a limpeza do laboratório.

A todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho e/ou da minha vida, nestes quatro anos ou que simplesmente se interessaram em saber “e o doutorado?”

*Você não sabe o quanto eu caminhei, pra chegar até aqui!  
Percorri milhas e milhas antes de dormir, eu não cochilei,  
Os mais belos montes escalei,  
Nas noites escuras de frio chorei .  
A vida ensina e o tempo traz o tom, pra nascer uma canção  
E com a fé do dia a dia eu encontro a solução, eu encontro a solução.  
(....) Meu caminho só meu Deus pode mudar  
Meu caminho!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!*

**Trecho da música “A Estrada”  
Toni Garrido e banda “Cidade Negra”.**

## RESUMO

O presente trabalho tem por objetivo investigar a ocorrência de bactérias patogênicas em um sistema de tratamento de esgotos composto por reator UASB e três lagoas de polimento em série (L1, L2 e L3), utilizando-se a técnica da PCR e quantificá-las utilizando-se a técnica de FISH. Foi feita ainda a comparação das técnicas Colilert® e FISH, na quantificação de *E. coli*. Adicionalmente avaliaram-se as condições ambientais nas lagoas, por meio do monitoramento de parâmetros físicos e químicos, para verificar a sua possível influência na ocorrência e decaimento de bactérias patogênicas. A pesquisa foi realizada nas unidades de tratamento de esgotos em escala de demonstração localizadas no CePTS/COPASA/UFMG, na região metropolitana de Belo Horizonte/MG. Foram feitas quatro coletas para a investigação das bactérias por PCR e sua posterior quantificação pela técnica de FISH. Para a comparação das técnicas Colilert® e FISH na quantificação de *E. coli* foram feitas seis coletas. O monitoramento dos parâmetros físicos e químicos foi feito de dez/2006 a mar/2009. Quanto à investigação das bactérias patogênicas pela PCR, verificaram-se reações positivas para *E. coli*, *Salmonella* spp. (apenas nas lagoas 1 e/ou 3), *Enterococcus* spp. e *Campylobacter jejuni*. *Salmonella* Typhimurium, *Shigella* spp. e *Shigella dysenteriae* foram detectadas nos estágios iniciais do sistema (esgoto bruto e/ou UASB e/ou lagoa 1) e não mais foram detectadas nas últimas unidades do tratamento. Quanto às espécies *H. pylori*, *S. aureus* e *Y. enterocolitica*, estas não foram detectadas em nenhuma das unidades nas quatro coletas. Quanto à quantificação das bactérias por FISH encontrou-se valores médios para *E. coli* de  $2,3 \times 10^7$ ,  $4,8 \times 10^6$  e  $4,5 \times 10^6$ . Para *Salmonella* valores de  $8,6 \times 10^6$ ,  $3,4 \times 10^6$  e  $5,4 \times 10^6$ . Para *Campylobacter* spp., média de  $4,5 \times 10^6$ ,  $6,1 \times 10^5$  e  $7,3 \times 10^5$  e para *Enterococcus*, valores médios de  $1,6 \times 10^6$ ,  $2,6 \times 10^5$  e  $1,3 \times 10^5$  respectivamente no EB, L1 e L3. Quanto à comparação do Colilert® e FISH na quantificação de *E. coli* verificaram-se valores de  $1,1 \times 10^8$ ,  $5,5 \times 10^5$  e  $5,2 \times 10^3$  NMP/100mL para o EB, L1 e L3 com o Colilert®. Com o FISH os valores foram da ordem de  $4 \times 10^7$ ,  $3,8 \times 10^6$  e  $3,1 \times 10^6$  células/100 mL para o EB, L1 e L3 respectivamente. Quanto à avaliação das condições ambientais nas lagoas, por meio do monitoramento de parâmetros físicos e químicos, possivelmente tais parâmetros só podem ser atribuídos às variações encontradas quando associados entre si e a outros fatores externos. Observou-se que, de maneira geral, excetuando-se o pH, O.D, temperatura e possivelmente a vazão, os demais não interferiram, expressivamente, na presença ou ausência de determinados gêneros bacterianos.

## ABSTRACT

The present work aimed to investigate pathogenic bacteria in a wastewater treatment system composed by one UASB reactor and three polishing ponds in series using PCR technique and FISH techniques. A comparison between the Colilert® and FISH techniques to quantify *E. coli* was also done. Environmental conditions on the ponds were evaluated through monitoring of physical and chemical parameters, in order to verify their possible influence on the occurrence and decay of the pathogenic bacteria. The research was developed in a pilot treatment plant (200 population equivalents) treating urban wastewater from the city of Belo Horizonte/Brazil. Four sampling campaigns were undertaken to investigate bacteria by PCR and subsequent quantification using FISH technique. To compare Colilert® and FISH techniques for the quantification of *E. coli*, six sampling campaigns were done. Monitoring of physical and chemical parameters was carried out from December/2006 until March/2009. Regarding the investigation of the occurrence of pathogenic bacteria using PCR, there were positive results for *E. coli*, *Salmonella* spp. (only in ponds 1 and/or 3), *Enterococcus* spp. and *Campylobacter jejuni*. *Salmonella* Typhimurium, *Shigella* spp. and *Shigella dysenteriae* were detected only at the initial stages of the system (raw wastewater and/or UASB and/or pond 1). The species *H. pylori*, *S. aureus* and *Y. enterocolitica* were not detected in any of the four samples collected. Regarding quantification of bacteria by FISH the following mean values were found in the raw wastewater, pond 1 effluent and pond 3 effluent, respectively (values in cells per 100 ml): *E. coli*  $2.3 \times 10^7$ ,  $4.8 \times 10^6$  and  $4.5 \times 10^6$ ; *Salmonella*  $8.6 \times 10^6$ ,  $3.4 \times 10^6$  and  $5.4 \times 10^6$ ; *Campylobacter* spp.  $4.5 \times 10^6$ ,  $6.1 \times 10^5$  and  $7.3 \times 10^5$ ; *Enterococcus*  $1.6 \times 10^6$ ,  $2.6 \times 10^5$  and  $1.3 \times 10^5$ . When comparing Colilert® and FISH for *E. coli* quantification, the results obtained were, respectively: raw wastewater  $1.1 \times 10^8$  MPN/100ml and  $4.0 \times 10^7$  cells/100ml; pond 1 effluent  $5.5 \times 10^5$  MPN/100ml and  $3.8 \times 10^6$  cells/100ml; pond 3 effluent  $5.2 \times 10^3$  MPN/100ml and  $3.1 \times 10^6$  cells/100ml. Regarding the influence of environmental conditions in the ponds, no single factor alone showed to be responsible for the decay of the pathogenic organisms in the ponds, and it is likely that their simultaneous interaction was the dominant factor. However, temperature, dissolved oxygen and pH seemed to be the most influential factors.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xv</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	5
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>6</b>
3.1 LAGOAS DE POLIMENTO.....	6
3.2 BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DE IMPORTÂNCIA EM MICROBIOLOGIA SANITÁRIA.....	6
3.2.1 <i>Conceitos gerais</i> .....	6
3.2.2 <i>Principais bactérias potencialmente patogênicas associadas aos esgotos</i> .....	11
3.2.3 <i>Escherichia coli e linhagens patogênicas</i> .....	12
3.2.4 <i>Shigella spp.</i> .....	15
3.2.5 <i>Salmonella spp.</i> .....	16
3.2.6 <i>Helicobacter pylori</i> .....	17
3.2.7 <i>Enterococcus spp.</i> .....	18
3.2.8 <i>Staphylococcus spp.</i> .....	19
3.2.9 <i>Campylobacter spp.</i> .....	21
3.2.10 <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	23
3.2.11 <i>Vibrio cholerae</i> .....	24
3.2.12 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	25
3.3 PRINCIPAIS TÉCNICAS UTILIZADAS EM BIOLOGIA MOLECULAR.....	26
3.3.1 <i>Princípio das técnicas moleculares aplicadas à microbiologia</i> .....	27
3.3.2 <i>Técnica da PCR</i> .....	28
3.3.3 <i>Técnica de FISH</i> .....	31
3.4 TÉCNICA DO SUBSTRATO CROMOGÊNICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE E. COLI.....	36
3.5 DISTRIBUIÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM ESGOTOS BRUTOS E EM SISTEMAS DE TRATAMENTO DE ESGOTOS.....	37
3.5.1 <i>Utilização dos gêneros de bactérias entéricas patogênicas na avaliação dos esgotos</i> .....	37
3.5.2 <i>Levantamento de bactérias patogênicas em esgotos brutos</i> .....	39
3.5.3 <i>Levantamento de bactérias patogênicas em esgotos tratados</i> .....	41
3.5.4 <i>Aplicação das técnicas moleculares para detecção e quantificação de microrganismos patogênicos</i> .....	44
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>46</b>
4.1 ÁREA DE ESTUDO E APARATO EXPERIMENTAL.....	46
4.2 COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS PARA AS ETAPAS A SEREM DESENVOLVIDAS.....	48
4.2.1 <i>Objetivo específico 1 - Identificação das bactérias pela técnica da PCR</i> .....	48
4.2.2 <i>Objetivo específico 2 - Quantificação pela técnica de FISH das bactérias detectadas a partir da PCR</i> .....	50
4.2.3 <i>Objetivo específico 3 - Comparação das técnicas FISH e substrato cromogênico – Colilert® na quantificação de E. coli</i> .....	50
4.3 PROCEDIMENTOS PARA IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS PELA TÉCNICA PCR.....	51
4.3.1 <i>Extração do DNA para as análises da PCR</i> .....	51
4.3.2 <i>Condições de amplificação do DNA</i> .....	54
4.4 HIBRIDAÇÃO DE CÉLULAS POR FISH.....	59
4.4.1 <i>Quantificação das bactérias</i> .....	63
4.4.2 <i>Quantificação de E. coli pelo método do substrato cromogênico/Colilert®</i> .....	64

4.5	PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS .....	64
4.6	TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS .....	65
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
5.1	OBJETIVO ESPECÍFICO 1 – INVESTIGAÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS POR PCR.....	67
5.1.1	<i>Extração do DNA .....</i>	67
5.1.2	<i>Deteção das bactérias patogênicas pela PCR.....</i>	67
5.1.3	<i>Considerações sobre o monitoramento das bactérias investigadas pela PCR.....</i>	85
5.2	OBJETIVO ESPECÍFICO 2 - QUANTIFICAÇÃO POR FISH DAS BACTÉRIAS IDENTIFICADAS A PARTIR DA PCR.....	88
5.2.1	<i>Avaliação dos percentuais de formamida aplicados e do sinal de hibridação emitido pelas células hibridadas.....</i>	89
5.2.2	<i>Resultados obtidos das quantificações das bactérias hibridadas com as respectivas sondas e quantificação de células totais coradas com DAPI .....</i>	90
5.2.3	<i>Avaliação conjunta das concentrações das bactérias quantificadas e dos parâmetros físico-químicos medidos in loco.....</i>	102
5.2.4	<i>Considerações sobre o objetivo específico 2 - Quantificação por FISH das bactérias detectadas a partir da PCR.....</i>	105
5.3	OBJETIVO ESPECÍFICO 3 – QUANTIFICAÇÃO DE E. COLI PELOS MÉTODOS FISH E SUBSTRATO CROMOGÊNICO-COLILERT® E COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS .....	106
5.3.1	<i>Comparação das técnicas Colilert® e FISH na quantificação de E. coli.....</i>	109
5.3.2	<i>Considerações sobre o objetivo específico 3 - Comparação das técnicas Colilert® e FISH na quantificação de E. coli.....</i>	114
5.4	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICOS, QUÍMICOS E E. COLI OBTIDOS NO MONITORAMENTO ROTINEIRO .....	118
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>124</b>
<b>7</b>	<b>RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>128</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>129</b>
<b>9</b>	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>147</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection - Coleção de Culturas Americana
ETE	Estação de Tratamento de Esgotos
BP	“Base pairs” - Pares de bases
BSA	Albumina de Soro Bovina
COPASA	Companhia de Saneamento de Minas Gerais
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DESA	Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EB	Esgoto Bruto
ETEC	<i>E. coli</i> Enterotoxigênica
EHEC	<i>E. coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> Enteroinvasora
EPEC	<i>E. coli</i> Enteropatogênica
EAEC	<i>E. coli</i> Enteroagregativa
DAEC	<i>E. coli</i> Difusamente Aderente
STEC	<i>E. coli</i> produtora de Toxina Shiga
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
FISH	<i>Fluorescent in situ Hybridization</i>
Kb	Kilobase
LP	Lagoa de Polimento
NMP	Número Mais Provável
OD	Oxigênio Dissolvido
Org/100 mL	Organismos por 100 mL
PBS	Phosphate Buffered Saline (Tampão Salina Fosfato)
PCR	Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotação por Minuto
SST	Sólidos Suspensos Totais
TAH	Taxa de Aplicação Hidráulica
<i>Taq</i>	<i>Thermoaquaticus</i>
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica

UASB	“Upflow Anaerobic Sludge Blanket” (Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo).
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VBNC	Viable but Nonculturable (viável, mas não cultivável)
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1</b> – Esquema dos ciclos da PCR e geração de <i>amplicons</i> . .....	29
<b>Figura 3.2</b> – Esquema da estrutura secundária da molécula RNAr 16S.....	32
<b>Figura 3.3</b> - Esquema da técnica de FISH.....	34
<b>Figura 4.1</b> – Fluxograma e vista parcial do aparato experimental: UASB, Lagoas 1, 2, 3 e Filtro .....	47
<b>Figura 4.2</b> - Fluxograma da estratégia de PCR. ....	58
<b>Figura 4.3</b> – Padrão do <i>ladder GeneRuler</i> 1Kb. ....	59
<b>Figura 4.4</b> – Padrão do <i>ladder O'GeneRuler</i> 100 bp. ....	59
<b>Figura 4.5</b> – Padrão do <i>ladder O'GeneRuler</i> 50 bp. ....	59
<b>Figura 4.6</b> – Representação esquemática do preparo de uma lâmina de FISH em laboratório. (Fonte: Araújo, J. C. <i>et al.</i> , 2009).....	62
<b>Figura 4.7</b> – Fluxograma para a aplicação do teste de Kruskal-Wallis .....	66
<b>Figura 5.1</b> – Variação das quantificações das bactérias nas amostras e do valor de células totais.....	92
<b>Figura 5.2</b> - Quantificação de bactérias patogênicas por FISH, considerando as quatro coletas efetuadas nos três pontos de monitoramento. ....	96
<b>Figura 5.3</b> – Quantificações de <i>E. coli</i> – apresentação por coletas e amostras. ....	110
<b>Figura 5.4</b> – Variação das quantificações de <i>E. coli</i> – segundo as metodologias Colilert® (NMP/100mL) e FISH (cel/100mL) .....	112
<b>Figura 5.5</b> – Relação entre as contagens de <i>E. coli</i> – segundo as metodologias Colilert® (NMP/100mL) e FISH (cel/100mL) .....	114
<b>Figura 5.6</b> - Box-plot das concentrações de <i>E. coli</i> , OD, pH, Temperatura, Turbidez, SST, DBO total e DQO total. ....	121
<b>Figura 5.7</b> – Box-plot da variação da vazão afluyente ao sistema (m <sup>3</sup> /dia).....	122

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> - Bactérias patogênicas de veiculação hídrica, doenças e dose infectante. ....	8
<b>Tabela 3.2</b> – Vantagens e limitações da técnica de FISH.....	35
<b>Tabela 3.3</b> – Microrganismos patogênicos detectados e/ou quantificados em esgotos domésticos brutos. ....	40
<b>Tabela 3.4</b> - Microrganismos detectados em esgotos domésticos tratados.....	42
<b>Tabela 3.5</b> – Métodos para detecção e quantificação de diversos microrganismos patogênicos e não patogênicos em amostras ambientais. ....	44
<b>Tabela 4.1</b> - Características do reator UASB e das lagoas de polimento .....	48
<b>Tabela 4.2</b> - Características do filtro de pedra (brita 3)* .....	48
<b>Tabela 4.3</b> - Descrição dos pontos e tipo de amostragem .....	48
<b>Tabela 4.4</b> - Descrição das coletas.....	49
<b>Tabela 4.5</b> - Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de PCR .....	54
<b>Tabela 4.6</b> - <i>Primers</i> específicos utilizados na detecção de bactérias patogênicas por PCR.....	56
<b>Tabela 4.7</b> - Culturas puras de bactérias, gradiente de temperatura e fonte das culturas.....	57
<b>Tabela 4.8</b> - Descrição das sondas.....	60
<b>Tabela 4.9</b> – Relação dos parâmetros físicos e químicos monitorados e periodicidade .....	65
<b>Tabela 5.1</b> - Resultados da PCR para as bactérias investigadas com <i>primer</i> específico .....	70
<b>Tabela 5.2</b> – Percentual de reações da PCR positivas e negativas para <i>E. coli</i> em quatro coletas.....	71
<b>Tabela 5.3</b> – Percentual de reações da PCR positivas e negativas para <i>Salmonella</i> spp. em quatro coletas .....	71
<b>Tabela 5.4</b> – Percentual de reações da PCR positivas e negativas para <i>Enterococcus</i> spp. em quatro coletas .....	71
<b>Tabela 5.5</b> – Percentual de reações da PCR positivas e negativas para <i>Campylobacter jejuni</i> em quatro coletas.....	71
<b>Tabela 5.6</b> - Estatística descritiva da quantificação das bactérias pela técnica de FISH* e resultado da PCR.....	91
<b>Tabela 5.7</b> – Percentual de células hibridadas com as sondas específicas para cada bactéria em relação a células totais coradas com DAPI.....	93
<b>Tabela 5.8</b> – Diferenças significativas entre as quantificações das quatro bactérias detectadas para o Teste de Kruskal-Wallis e Comparações Múltiplas ( $\alpha= 5\%$ de significância).....	95

<b>Tabela 5.9</b> – Diferenças significativas, detectadas pelo Teste de Kruskal-Wallis .....	95
<b>Tabela 5.10</b> – Diferenças significativas entre as quantificações das bactérias nos quatro pontos de monitoramento, detectadas a partir do teste de Kruskal-Wallis e Comparações múltiplas ( $\alpha=5\%$ ). .....	97
<b>Tabela 5.11</b> – Concentração das bactérias quantificadas e parâmetros físicos e químicos, em cada coleta.....	103
<b>Tabela 5.12</b> – Quantificação de <i>E. coli</i> pelas técnicas Colilert® e FISH em cada uma das coletas. ....	109
<b>Tabela 5.13</b> – Estatística descritiva da quantificação de <i>E. coli</i> (NMP/100mL) pela técnica de Colilert®. ....	110
<b>Tabela 5.14</b> – Estatística descritiva da quantificação de <i>E. coli</i> (cel/100mL) pela técnica de FISH.....	111
<b>Tabela 5.15</b> – Estatística descritiva das concentrações de <i>E. coli</i> , referente ao período de novembro/2007 a julho/2009 utilizando a técnica do Colilert®.....	119
<b>Tabela 5.16</b> – Estatística descritiva da concentração dos parâmetros físicos e químicos monitorados em cada ponto de amostragem. ....	120

# 1 INTRODUÇÃO

Os excretas presentes nos esgotos sanitários são responsáveis pela propagação de diversos contaminantes, podendo ocasionar problemas associados à saúde e à poluição das águas, o que implica na necessidade de se fazer o tratamento dos esgotos antes que estes sejam encaminhados ao seu destino final. Existem vários sistemas de tratamento de esgotos disponíveis e que propiciam a remoção de matéria orgânica, sólidos, nutrientes e microrganismos.

No Brasil, nas últimas décadas, tem-se verificado uma considerável expansão na utilização de sistemas anaeróbios no tratamento de efluentes domésticos, principalmente os reatores anaeróbios tipo UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*). Dentre as diversas características que favorecem a utilização da tecnologia anaeróbia, destacam-se (i) o baixo custo de implantação do sistema; (ii) o baixo ou nulo consumo de energia; (iii) baixa demanda de área; (iv) simplicidade operacional; (v) aplicabilidade em pequena e grande escala; (vi) produção de metano, um gás combustível de alto teor calorífico; (vii) tolerância a elevadas cargas orgânicas e (viii) baixa produção de sólidos (CHERNICHARO, 2007).

Os sistemas anaeróbios atingem boa eficiência na remoção da DBO (demanda bioquímica de oxigênio), da ordem de aproximadamente 60 a 80%, porém, na maioria das vezes esta eficiência é insuficiente, ocasionando a necessidade de pós-tratamento do efluente. Dentre as tecnologias de pós-tratamento que atualmente se encontram mais consolidadas no Brasil, estão as lagoas de polimento (LP). A combinação do tratamento dos esgotos utilizando-se o processo anaeróbio, seguido por lagoas de polimento, confere grande vantagem econômica ao sistema, uma vez que é possível que sua implementação seja feita em etapas, além de exigir menores requisitos de área, se comparado às lagoas de estabilização convencionais (von SPERLING, 2005).

Os resíduos líquidos e sólidos gerados pelas populações e despejados nos corpos de água são a principal causa da poluição destas, afetando seus diversos usos, sobretudo aquele que requer maior índice de qualidade, que é o abastecimento doméstico. Um corpo de água que recebe esgotos pode incorporar uma enorme quantidade dos mais variados gêneros de organismos, muitos deles patogênicos e causadores de doenças. A gênese destes agentes patogênicos é essencialmente humana em grandes centros urbanos, refletindo diretamente o nível de saúde

da população e as condições de saneamento básico presentes em cada região. Além disso, também existe a procedência animal, cujos dejetos são eliminados através do esgoto (fezes e urina de cães, gatos, suínos, bovinos, aves e outros animais de criação) e também pela presença de animais silvestres no entorno das estações de tratamento de esgotos (ETE), sobretudo roedores e aves (von SPERLING, 2005; SILVA *et al.*, 2001).

Do ponto de vista de saúde pública, os principais grupos de organismos associados com água e fezes, e de interesse clínico são bactérias, vírus, protozoários e helmintos. Apesar do grupo dos coliformes (totais, termotolerantes/*Escherichia coli*) ser o parâmetro mais utilizado para a avaliação da remoção de patógenos, sabe-se que outros microrganismos, patogênicos ou oportunistas, tais como bactérias dos gêneros, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter* e outros, podem estar presentes e com isso deveriam ser investigados, de modo a avaliar se os sistemas de tratamento também são eficientes na remoção destes (ASHBOLT *et al.*, 2001). Porém, a presença de bactérias patogênicas, em lagoas de polimento, tem sido pouco estudada e a maioria dos trabalhos tem seu foco na avaliação dos coliformes.

Com o desenvolvimento das pesquisas em microbiologia ambiental, tem-se observado uma tendência de adoção de novas técnicas para se avaliar a presença de microrganismos em diversos ambientes. Particularmente a adoção de técnicas de biologia molecular tem contribuído para o aperfeiçoamento das análises, frente à necessidade de se conhecer melhor os mecanismos de remoção dos microrganismos patogênicos, visto serem estes agentes de enfermidades. Dessa forma, entende-se como altamente relevante o desenvolvimento de pesquisas que busquem maior conhecimento sobre outros microrganismos além dos indicadores, que sejam de interesse em saneamento, utilizando-se de tecnologias mais avançadas e que possibilitem melhor entendimento dos aspectos do tratamento dos esgotos no que se refere à presença de microrganismos patogênicos, particularmente, as bactérias.

Há algumas décadas a biologia molecular tem tido grande aplicabilidade na detecção de microrganismos quando se trata de temas relacionados a especialidades médicas. Sua utilização no conhecimento da ecologia de organismos ambientais tem se revelado nas três últimas décadas, e no Brasil, atualmente, essa tecnologia tem sido utilizada na avaliação dos microrganismos envolvidos nos sistemas de tratamento de esgotos com maior frequência. É assim, uma ferramenta bastante promissora, pois permite conhecer com maior precisão os organismos envolvidos no tratamento de esgotos. Alguns autores também têm utilizado a PCR

e sondas de hibridação específicas, no estudo de linhagens patogênicas de *Escherichia coli* no entendimento da sua origem e distribuição no meio ambiente (YAN *et al.*, 2007; ISHI *et al.*, 2007b; AHMED, *et al.*, 2007).

Neste contexto, a atual pesquisa foi proposta na tentativa de se avançar no conhecimento acerca da presença de bactérias potencialmente patogênicas nos esgotos brutos e tratados. A investigação de microrganismos patogênicos, por ferramentas moleculares, proposta neste trabalho, acoplada a técnicas convencionais de cultivos para detecção de *E. coli* e as análises microscópicas, oferecerá maiores informações sobre a presença de bactérias patogênicas em amostras de esgotos brutos e tratados, sobretudo nos sistemas constituídos por reatores anaeróbio tipo UASB, seguidos de pós-tratamento por lagoas de polimento.

Serão descritas as bactérias *E. coli* e suas linhagens patogênicas, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni* e *Yersinia enterocolitica*, investigadas no presente trabalho.

Fez-se opção por investigar tais bactérias, por elas serem importantes patógenos, responsáveis por enfermidades associadas a baixas condições de saneamento básico, veiculadas através da água e alimentos contaminados, além de fortemente relacionadas à rota feco-oral (intimamente vinculada aos esgotos domésticos) e responsáveis por quadros de diarreia aguda, gastroenterites e outras sintomatologias em humanos.

Optou-se pela avaliação de *Helicobacter pylori* por ser um microrganismo considerado emergente (FORD, 2004), e que até recentemente não estava associado à veiculação hídrica, fato que tem sido demonstrado através da utilização de técnicas como a PCR (HUFFMAN *et al.*, 2003). Além disso, a rota feco-oral também tem sido discutida e reportada por vários autores (LECLERC *et al.*, 2004; HULTÉN *et al.*, 1998; MORENO *et al.*, 2003; LU *et al.*, 2002; MOURAD-BAARS e CHONG, 2006; LEE *et al.*, 1991; LEHOURS e YILMAZ, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2005) na transmissão desta espécie, incidindo sobre os esgotos sanitários, papel preponderante.

A seleção das bactérias utilizadas para se desenvolver a presente pesquisa foi baseada em publicações de referência da área de microbiologia humana e ambiental, tais como MADIGAN *et al.* (2004), FEACHEM *et al.* (1983), BITTON (2005), MARA (2003),

CLOETE *et al.* (2004), DEVRIESE *et al.* (2006), TORTORA *et al.* (2008), além de periódicos específicos.

O CePTS (Centro de Pesquisas e Treinamento em Saneamento), onde está situado o sistema de tratamento utilizado neste trabalho, foi idealizado em 2000 como parte do PROSAB (Programa de Pesquisa em Saneamento Básico/2000), sendo inicialmente denominado de ETE/Experimental UFMG/COPASA. Desde então diversas pesquisas vêm sendo conduzidas, em escala piloto e de demonstração, elevando-o a centro de pesquisas, sempre com o intuito de gerar dados e conhecimentos sobre a melhoria da qualidade dos efluentes, quanto aos parâmetros físicos, químicos e biológicos, além da aplicabilidade de inovações tecnológicas, culminando com o objetivo maior de proteger o ambiente e melhorar a qualidade de vida das populações.

Uma vez que a presente pesquisa, avaliando bactérias potencialmente patogênicas no esgoto bruto e efluente das lagoas de polimento por técnicas moleculares, foi feita pela primeira vez no laboratório de Microbiologia do DESA/UFMG, as etapas metodológicas da pesquisa são descritas por tópicos, objetivando torná-las mais didáticas e elucidativas.

Além do caráter inovador, esta pesquisa, financiada pela FAPEMIG, pode ser considerada também como um trabalho de cunho metodológico, uma vez que foram necessárias diversas adaptações nas metodologias disponíveis e possíveis de serem aplicadas a efluentes de estações de tratamento de esgotos.

Este tipo de amostra ambiental pode variar bastante, não só em função das alterações climáticas a que estão sujeitas (como por exemplo, a intensidade de chuva), mas também pela presença de sólidos suspensos que podem interferir nas análises, além de outras variantes, não perceptíveis pelo pesquisador e por isso muitas vezes impossíveis de serem controladas, mas que podem interferir, mesmo que de maneira subjetiva, nos resultados. Assim, foram necessários vários testes, até que se conseguisse alcançar uma metodologia de trabalho que se considerou como mais apropriada às amostras investigadas, tanto na preparação das amostras quanto para a aplicação das técnicas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivo Geral*

O objetivo geral desta pesquisa é investigar e quantificar bactérias potencialmente patogênicas presentes em um sistema de tratamento de esgotos composto por reator UASB e lagoas de polimento em série (UASB-LP).

### 2.2 *Objetivos específicos*

- Investigar a ocorrência das bactérias *Escherichia coli*, *Escherichia coli* enterohemorrágica, *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* (ser) Typhimurium, *Shigella dysenteriae*, *Shigella* spp., *Helicobacter pylori*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter jejuni*, ao longo do sistema UASB-LP utilizando-se a técnica da PCR (*polimerase chain reaction* – reação em cadeia da polimerase).
- Quantificar as bactérias detectadas por PCR no sistema UASB-LP utilizando-se a técnica da hibridação *in situ* com sondas fluorescentes- FISH (*Fluorescent in situ Hybridization*).
- Quantificar *Escherichia coli* no esgoto bruto, e no efluente das lagoas de polimento 1 e 3 pelo método FISH e pelo método do Substrato Cromogênico – Colilert® e comparar os resultados.
- Avaliar, por meio do monitoramento de parâmetros físicos e químicos, as condições ambientais nas lagoas e sua possível influência na ocorrência e decaimento das bactérias patogênicas.

## **3 REVISÃO DA LITERATURA**

### **3.1 Lagoas de polimento**

As lagoas de polimento são assim denominadas por objetivar uma melhoria ou polimento na qualidade do efluente de sistemas anaeróbios, particularmente na remoção da DBO residual, matéria nitrogenada e organismos patogênicos. Distinguem-se, portanto das lagoas de estabilização, cujo objetivo é reduzir substancialmente a carga orgânica de esgotos brutos (CAVALCANTI, *et al.* 2001; von SPERLING, 2005).

As lagoas de polimento recebem um efluente que passou por um tratamento prévio, fazendo com que a matéria orgânica e os sólidos em suspensão tenham sido bastante reduzidos no pré-tratamento e, portanto, a DBO esteja em grande parte estabilizada. Von Sperling (2005) relata que devido aos baixos tempos de detenção nos reatores anaeróbios, a remoção de organismos patogênicos é baixa. As lagoas de polimento são então dimensionadas de forma que se aproveite, ao máximo, a interação de diversos fatores ambientais, tais como temperatura, pH, insolação e alta concentração de oxigênio dissolvido, na remoção de microrganismos patogênicos. Esta é sua função primordial, mas o sistema também alcança uma remoção adicional da matéria orgânica.

Vários destes mecanismos de decaimento tornam-se mais eficazes quando se adotam profundidades menores, o que justifica o fato destas lagoas serem mais rasas, quando comparadas aos demais tipos. Ainda conforme von Sperling (2005), as lagoas de polimento devem atingir elevadas eficiências na remoção de coliformes ( $E > 99,9$  ou  $99,99\%$ ), para que possam ser cumpridos os requisitos para utilização do efluente final para irrigação, ou os padrões para corpo d'água em função da classe a que pertençam.

### **3.2 Bactérias patogênicas de importância em microbiologia sanitária**

#### **3.2.1 Conceitos gerais**

As bactérias patogênicas de interesse em microbiologia sanitária são basicamente as de origem entérica. Alguns gêneros destes grupos são comensais, enquanto que outros são patogênicos e/ou oportunistas, colonizando principalmente o trato gastrointestinal. A maioria pertence às famílias *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae* e *Streptococcaceae*. Dentro do grupo das enterobactérias, destacam-se os gêneros: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Salmonella*,

*Shigella*, *Yersinia*, *Klebsiella*, *Vibrio* (MADIGAN *et al.*, 2004). Leclerc *et al.* (2004) comentam que gêneros de bactérias como *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Legionella* e outros, embora não pertençam à família das enterobactérias, estão fortemente associados à transmissão pela rota feco-oral, de maneira que sua avaliação nos esgotos domésticos também pode ser importante.

A contaminação da água por bactérias de origem intestinal humana pode também ser um indicativo da presença de microrganismos patogênicos pertencentes a outros grupos, tais como vírus (hepatovírus - hepatite A, E; rotavírus; adenovírus entéricos etc.), protozoários (*Giardia* spp., *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica* etc.) e helmintos (*Ascaris* spp., *Trichuris trichiura*, *Enterobius vermicularis* etc.) (DOMBEK *et al.*, 2000; BASTOS *et al.*, 2003).

Grande parte destes microrganismos são potencialmente patogênicos para os humanos, podendo induzir sintomatologia clínica. Além disso, alguns autores relatam que animais como aves, domésticas e selvagens, e várias espécies de mamíferos, também são hospedeiros de patógenos de origem humana, como por exemplo, o sorotipo O157:H7 de *E. coli* EHEC, patogênica para humanos e causadora de graves quadros de gastroenterites, o que pode ocasionar o aumento da concentração de patógenos nos esgotos e o risco de transmissão através do contato com o hospedeiro contaminado e pela ingestão de água ou alimentos contaminados (KRUMPERMAN, 1983; LECLERC *et al.*, 2004; ISHI e SADOWSKY, 2008).

Normalmente a infecção seguida de sintomatologia clínica só ocorre quando uma quantidade suficiente de determinado microrganismo (dose infectante) é ingerida. A Tabela 3.1 apresenta algumas bactérias patogênicas de maior importância sanitária e a sua respectiva dose infectante (menor fração do agente que desencadeia infecção e/ou morbidade e/ou morte) para humanos imunologicamente competentes.

**Tabela 3.1** - Bactérias patogênicas de veiculação hídrica, doenças e dose infectante.

Bactéria	Doença	Dose infectante (nº de organismos)
<i>Vibrio cholerae</i>	Cólera	$10^3 - 10^6$
<i>Salmonella</i> spp.	Salmonelose	$10^5 - 10^9$
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenterite ou campilobacteriose	< 500
<i>Shigella</i> spp.	Disenteria bacilar ou shigelose	$10 - 10^2$
<i>Salmonella</i> Typhi	Febre tifóide	$10^3 - 10^5$
<i>E. coli</i>	Diarréia	$10^6 - 10^8$
<i>E. coli</i> O157:H7 (EHEC)	Colite hemorrágica e ITU*	10 a 100
<i>Leptospira</i> spp	Leptospirose	Desconhecida
<i>Legionella pneumophila</i>	Legionelose	Desconhecida
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Diarréias	$10^9$
<i>Helicobacter pylori</i>	Úlcera péptica e câncer gástrico	$\approx 10^4$

Adaptado de Schroeder e Wuertz (2003), Bitton (2005), Ibekwe *et al.* (2002), Feachem *et al.* (1983).  
\*Infecção do trato urinário

Doenças relacionadas com a água são a maior causa de morbidade e mortalidade ao redor do mundo. Dentre estas doenças, as diarréias são estimadas como a causa de 1,8 milhões de mortes por ano, principalmente nos países em desenvolvimento (WHO, 2004).

A diarréia, mesmo sendo reconhecida como importante causa de morbi-mortalidade no Brasil, ainda não teve sua inclusão estabelecida no MDDA (Monitorização das Doenças Diarréicas Agudas). As dificuldades em vigiar as doenças diarréicas decorrem, principalmente, de sua elevada incidência, da não obrigatoriedade de notificação de surtos e da aceitação, tanto de parte da população leiga, quanto dos técnicos, de que o problema da diarréia é "normal" no Brasil. A análise de casos isolados, no geral, não requer o diagnóstico clínico conclusivo do agente causal da diarréia. Levando-se em conta que o agente etiológico de vários casos de diarréia é de origem bacteriana, e considerando-se que o isolamento do agente nem sempre é fácil, na maioria das ocorrências não se sabe com certeza absoluta qual o agente causador da diarréia. Em casos de surtos, faz-se a definição da fonte, da via de transmissão e o diagnóstico por meio do critério clínico - epidemiológico (LINCX Sistema de Saúde/FNS/1999-2000).

A determinação da presença de patógenos bacterianos ou indicadores de contaminação fecal em águas é necessária para se fazer a avaliação da saúde pública e garantir sua segurança em termos de saneamento, de modo que se possa adotar estratégias que sejam de controle realmente eficaz. Ao se avaliar esta potencial contaminação das águas, usualmente se busca a detecção de organismos indicadores de contaminação fecal.

Bactérias do grupo dos coliformes têm sido sistematicamente adotadas como organismo indicador de contaminação fecal, devido a algumas características, dentre as quais se destacam: i) o fato de serem encontradas em elevadas quantidades nas fezes humanas, tornando a sua detecção mais fácil em amostras ambientais com presença de matéria fecal; ii) serem detectadas somente em animais de sangue quente; iii) terem taxas de decaimento similares a organismos patogênicos de interesse; iv) não se reproduzirem no meio ambiente; v) serem de detecção relativamente rápida e econômica (MOTA, 2006; von SPERLING, 2005).

Bastos *et al.* (2003) mencionam que, complementarmente, tem-se utilizado os enterococos fecais, pertencentes a uma variedade de espécies associadas aos dejetos humanos, como indicadores de contaminação, porém estes podem ser detectados também nas fezes de outros animais e, similarmente aos coliformes, apresentam espécies de vida livre. Além disso, em geral, os enterococos são mais resistentes que os coliformes.

Embora as bactérias do grupo dos coliformes sejam os principais indicadores de contaminação fecal em amostras ambientais, potencialmente, todos os habitantes da flora intestinal humana e animal poderiam ter o papel de indicadores de contaminação. Não obstante, ainda não se encontraram substitutos equivalentes aos coliformes, seja porque suas características ambientais são menos conhecidas, ou devido às técnicas de isolamento serem demoradas e imprecisas.

Por este motivo é que a maioria dos estudos disponíveis na literatura e grande parte do monitoramento praticado em estações de tratamento de esgotos, a fim de se verificar a eficiência do tratamento, atêm-se ao grupo dos coliformes, focados principalmente em *E. coli*, pela confiabilidade de sua origem realmente fecal (diferentemente dos coliformes totais e termotolerantes, que incorporam bactérias de vida livre, por exemplo, dos gêneros *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*). Desta forma, poucos estudos apresentam uma ampla caracterização de bactérias patogênicas em sistemas de tratamento de esgotos.

Com o desenvolvimento das pesquisas em microbiologia aplicada ao saneamento, tem-se observado a adoção de novas técnicas laboratoriais como, por exemplo, as técnicas de biologia molecular, na avaliação da presença e da remoção de microrganismos no tratamento dos esgotos. Este aprimoramento nas análises pode contribuir ainda, para um melhor

entendimento dos mecanismos de remoção de organismos patogênicos no tratamento de esgotos.

A avaliação da qualidade microbiológica dos esgotos tratados adquire cada vez mais um papel de fundamental importância, devido às suas implicações quando despejados nos corpos de água receptores, bem como ao uso controlado de efluentes tratados e do lodo para diversos fins, como por exemplo, o reúso agrícola. Conforme mencionado anteriormente, ainda que sejam conhecidos diferentes grupos de microrganismos patogênicos nos esgotos, os protozoários, as bactérias patogênicas e os vírus não são analisados rotineiramente nas pesquisas que investigam a qualidade do tratamento dos esgotos, e a verificação de sua presença ou ausência fica vinculada aos organismos indicadores de contaminação fecal, no caso, o grupo dos coliformes.

Na avaliação da remoção de bactérias patogênicas em sistemas de tratamento de esgotos, são utilizados os organismos indicadores de contaminação fecal do grupo coliforme, do qual *E. coli* é pertencente. No entanto, um fato recente foi observado na revisão de Ishii e Sadowski, (2008) sobre o uso de *E. coli* como indicador de contaminação fecal. Os autores demonstraram a capacidade desta espécie em crescer e sobreviver em uma variedade de ambientes naturais (por ex., solo, areia, sedimentos), devido à sua versatilidade em adquirir energia, requerendo, simplesmente, fontes de carbono, nitrogênio, além de fósforo, enxofre e pequenas quantidades de outros elementos. Este microrganismo pode ainda crescer, tanto em condições aeróbias como anaeróbias, e em uma variedade de flutuações ambientais, tais como, temperatura e umidade, suscitando assim, dúvidas sobre o caráter de melhor indicador e da exclusividade fecal, que até então tem sido atribuído a *E. coli*.

Assim, avaliar somente os organismos indicadores pode incorrer em uma insuficiência na qualidade do tratamento, no sentido de que o decaimento de determinados patógenos, às vezes pertencentes ao mesmo grupo, não pode ser avaliado por meio do decaimento dos indicadores, por apresentarem mecanismos de remoção ou sobrevivência diferentes, ou devido à interação com outros grupos.

Murphy *et al.* (2006), por exemplo, mencionam a pouca informação acerca dos mecanismos que permitem a sobrevivência de *Campylobacter* spp., no ambiente, quando comparado a outras bactérias, tais como, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. Estudos desenvolvidos por St-

Pierre *et al.* (2009) indicaram que coliformes termotolerantes não são bons indicadores para se avaliar *Campylobacter* spp. em amostras de águas superficiais, demonstrando uma fraca correlação entre a presença de coliformes termotolerantes e *Campylobacter* spp.

Mezriouri *et al.* (1994) estudaram o efeito do crescimento de microalgas e a presença de *E. coli* e *Vibrio cholerae* em amostras de esgoto tratado em um sistema composto por reator UASB e lagoa de estabilização em Marrakesh/Marrocos. Os autores observaram que a presença de microalgas pode afetar diferentemente o comportamento, a sobrevivência e a evolução temporal de *E. coli* e *V. cholerae*. Os autores observaram que no verão, onde ocorre floração de Cianobactérias e a abundância de algas verdes pertencentes ao gênero *Chlorella* é fraca, foram observados altos índices de *V. cholerae* e baixas concentrações de *E. coli*. Ao contrário, quando ocorre maior concentração de algas verdes, *E. coli* mostra-se mais abundante do que *V. cholerae*. Isso mostra como o decaimento de duas espécies de microrganismos pertencentes ao mesmo grupo (bactérias) pode não estar correlacionado e neste caso, como a abundância da bactéria indicadora (*E. coli*) não foi um bom parâmetro para avaliar a presença da bactéria patogênica *Vibrio cholerae*.

Além disso, ainda que a carga dos indicadores existente no esgoto seja reduzida, existe a possibilidade desse efluente conter bactérias que causem doenças devido à sua baixa dose infectante, como é o caso da espécie *Campylobacter jejuni* mencionada na Tabela 3.1.

### **3.2.2 Principais bactérias potencialmente patogênicas associadas aos esgotos**

As bactérias, como a maioria dos organismos patogênicos, utilizam-se de diversos fatores de virulência para provocar doenças. Quando um hospedeiro se encontra comprometido, a probabilidade de um organismo que não causaria doenças em hospedeiros imunocompetentes induzir virulência aumenta. Dentre alguns fatores que afetam o sistema imunológico e diminuem a resistência dos hospedeiros humanos, pode-se citar a frequência de internações hospitalares, o uso indiscriminado de antimicrobianos que destroem a microbiota normal, além de fumo, ingestão de álcool, má nutrição, ausência de sono, dentre outras, que predisõem o paciente a uma diversidade de infecções por microrganismos não patogênicos.

Apresenta-se a seguir uma breve descrição de algumas bactérias potencialmente patogênicas de interesse em saneamento. Adicionalmente, também são descritos *Vibrio* spp. e *Listeria monocytogenes*, embora não tenham sido investigadas na presente pesquisa.

### 3.2.3 *Escherichia coli* e linhagens patogênicas

*Escherichia coli* é a espécie bacteriana mais comum do trato intestinal de humanos e animais, sendo verificada em elevadas quantidades nas fezes (maior que  $10^6$  células em 1 grama de material fecal). É o microrganismo mais conhecido da microbiologia. *E. coli* é bastante conhecida, bioquímica e geneticamente, e continua a ser um organismo importante para a pesquisa biológica. São bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos, medindo de 1,5 a 2,0  $\mu\text{m}$  de comprimento.

São conhecidas várias linhagens de *E. coli* comensal que habitam o trato intestinal de humanos e animais de sangue quente. Essas linhagens pertencem a vários sorotipos que podem ser detectados nas fezes de indivíduos saudáveis, sendo eliminadas maciçamente no ambiente. Somente algumas linhagens são patogênicas, tanto aos humanos quanto a outros animais, tais como bovinos, suínos e ovinos (MADIGAN *et al.*, 2004).

Uma determinada linhagem de *E. coli* pode possuir milhares de genes que estão ausentes em outra linhagem, e somente duas dessas linhagens pode ter no mínimo 50% de genes em comum. Em termos moleculares, sabe-se muito mais sobre *E. coli* que sobre qualquer outro organismo vivo (ALBERTS *et al.*, 2010). *E. coli* comensal da microbiota intestinal é considerada inofensiva para o hospedeiro, sendo, porém um patógeno oportunista. A maioria das linhagens patogênicas atua, inicialmente, no intestino, existindo também àquelas que atuam no trato urinário. Determinadas linhagens são caracterizadas por sua capacidade de produzir potentes toxinas.

Dentre as linhagens de *E. coli* que induzem diarreia e/ou gastroenterite, seis categorias são conhecidas e classificadas de acordo com as características de patogenicidade, sendo elas, *E. coli* enterotoxigênica, enterohemorrágica, enteroinvasora, enteropatogênica, enteroagregativa e *E. coli* que se adere difusamente, conhecidas pelas siglas: ETEC, EHEC, EIEC, EPEC, EAEC e DAEC respectivamente (NATARO e KAPER, 1998; KAPER, *et al.*, 2004; FIALHO, 2008). A utilização da sigla STEC em substituição a EHEC vem sendo adotada pelo fato do reconhecimento de que a patogenicidade atribuída a esta linhagem, em parte, é responsável pela produção uma toxina citotóxica relacionada àquela produzida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 e denominada toxina Shiga, porém durante todo o texto ainda será utilizada a sigla EHEC para indicar a linhagem enterohemorrágica, devido à sua utilização mais tradicional.

EPEC foi o primeiro patótipo a ser descrito e é uma das maiores causas de diarreia aquosa em crianças, no primeiro ano de vida. Um dos primeiros surtos foi registrado no Reino Unido em 1945, acometendo um grande número de crianças que apresentaram diarreia (KAPER *et al.*, 2004). Alguns estudos têm demonstrado que determinados sorotipos pertencentes a esta linhagem, são mais frequentemente detectados no ambiente do que aqueles produtores de toxinas (ETEC, EHEC) (ISHII *et al.*, 2007a; LAUBER *et al.*, 2003). Estudos no Brasil, México e África do Sul têm demonstrado que de 30 a 40% das diarreias em crianças no primeiro ano de vida são devidos a EPEC (NATARO e KAPER, 1998). O conhecimento sobre EPEC tem avançado, e muito já tem sido descoberto sobre a virulência, toxina, patogenicidade, manifestações clínicas e tratamento desta linhagem de *E. coli*.

A linhagem ETEC é uma causa comum de diarreia infecciosa. Em humanos adultos, é uma das causas mais comuns da doença conhecida como “diarreia dos viajantes”, pois acomete principalmente pessoas que viajam de regiões desenvolvidas para regiões subdesenvolvidas do mundo (WOLF, 1997).

A linhagem EHEC pode causar diarreia sanguinolenta, síndrome urêmica hemolítica e colite hemorrágica, devido à presença da toxina Shiga, seu principal fator de virulência, estas manifestações clínicas podem ser potencialmente fatal para humanos (NATARO e KAPER, 1998). A colite hemorrágica provoca forte dor abdominal no paciente e a ocorrência ou não de febre. *E. coli* O157:H7 é o sorotipo mais reconhecido dentro da linhagem EHEC nos Estados Unidos, Reino Unido, Canadá e Japão e tem sido identificado como um dos principais causadores de surtos de doenças veiculadas por água e alimentos (KAPER *et al.*, 2004; INA *et al.*, 2003; ISHII e SADOWSKY, 2008). Em outros países, outros sorogrupos, principalmente dentro dos sorotipos O26 e O111, podem causar doenças mais graves do que aquelas provocadas pelo sorotipo O157:H7. Ibekwe *et al.* (2002) apontaram a dose infectante de *E. coli* O157:H7 como sendo de somente 10 a 100 células.

Números muito baixos de células (< 100 organismos) têm sido implicados na dose infectante de *E. coli* EHEC quando ocorrem surtos de doenças associados com águas de abastecimento, águas recreacionais, na transmissão entre pessoas e também a partir de animais domésticos ou criações (bovinos principalmente) (KAPER, 2004). Nos Estados Unidos, hambúrgueres preparados em restaurantes *fast foods* ou em casa têm sido relatados como importantes causas de surtos. Um surto ocorrido em dezembro de 1992 e janeiro de 1993 em Washington, Idaho,

Nevada e Califórnia atingiu 732 pessoas, das quais, 195 foram hospitalizadas e 4 foram a óbito (NATARO e KAPER, 1998).

Craun *et al.* (2006) fizeram um extenso levantamento sobre surtos de doenças de veiculação hídrica ocorridos nos Estados Unidos entre 1991 e 2002. Dentre as etiologias que foram investigadas, *E. coli* O157:H7 foi responsável por 11 surtos e 288 casos de doença. *E. coli* O157:H7 associada a *Campylobacter* foi responsável por 1 surto com 781 casos de doença.

Quanto a EIEC, estudos sugerem que sua patogênese seja praticamente idêntica a *Shigella* spp. Tem sido verificado que ambos os microrganismos são invasores do epitélio intestinal produzindo uma ou mais toxinas que têm importante papel na diarreia. A infecção por EIEC, tanto como por *Shigella* spp. caracteriza-se por uma diarreia aquosa que antecede a um período de fezes diarreicas, que podem conter sangue, muco e leucócitos, e alguns pacientes podem apresentar quadro de febre e tenesmo.

A maior parte dos estudos sobre EIEC descreve a ocorrência de surtos, usualmente vinculados a água e/ou alimentos, embora a transmissão pessoa a pessoa possa ocorrer. Infecções assintomáticas devido a EIEC não são usuais. O uso da PCR utilizando *primers* específicos pode aumentar a capacidade de detecção desta linhagem mesmo quando presentes em quantidades pequenas.

Ao contrário das demais, a infecção por EAEC não é bem entendida, e sabe-se apenas que EAEC é produtora de um biofilme mucilaginoso e que esta característica está associada à sua virulência. A destruição da mucosa intestinal foi verificada em pacientes que foram a óbito, devido a uma diarreia persistente causada por infecção por EAEC em um hospital da cidade do México (ESLAVA *et al.*, 1993 *apud* NATARO e KAPER, 1998). Nataro *et al.* (2006) fizeram um estudo sobre casos de infecção por *E. coli* diarreio gênicas em Baltimore, Maryland e New Haven, Connecticut e verificaram que dentre os principais patótipos de *E. coli* investigados, EAEC foi detectada em uma proporção considerada importante, ou seja, dentre 823 pacientes avaliados, 37 ou 4,5% foram diagnosticados com EAEC. EHEC e EPEC foram detectadas em 35 pacientes constituindo 4,3% dos casos.

Trabalhando em Fortaleza/Ceará, Guerrant e equipe demonstraram uma associação consistente entre EAEC e a síndrome da diarreia persistente (FANG *et al.*, 1995). Nesta região do Brasil, EAEC tem sido envolvida em mais de 68% dos casos de diarreia persistente

Pouco ainda é conhecido sobre a patogênese de DAEC na indução de diarreia. Alguns estudos têm demonstrado o envolvimento de DAEC como agente de diarreia, enquanto outros não encontram maior quantidade de DAEC em fezes de pacientes com diarreia do que em pacientes - controle que não apresentam diarreia. O quadro epidemiológico da aquisição da doença ainda não é bem determinado. O estudo de Poitrineau *et al.* (1995) sugere que a maioria dos pacientes infectados por DAEC apresenta diarreia aquosa, no entanto, sem sangue ou leucócitos nas fezes.

Embora a transmissão das linhagens patogênicas de *E. coli* através da água seja atenuada pela sua diluição, ainda assim são capazes de causar doença quando ingeridas, devido à baixa dose infectante necessária para que essas linhagens ocasionem doença (a dose infectante varia entre as linhagens) (SCHROEDER e WUERTZ, 2003; FEACHEM *et al.*, 1983).

### **3.2.4 *Shigella* spp.**

O gênero *Shigella* é representado por bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos, imóveis, e muito próximos, filogeneticamente, da *Escherichia coli*. Dentre as espécies conhecidas de *Shigella*, quatro são capazes de causar doenças em humanos: i) *S. dysenteriae*, ii) *S. flexneri*, iii) *S. boydii*, iv) *S. sonnei*. A primeira espécie é a mais patogênica, sendo que as quatro espécies variam sua distribuição ao redor do mundo. Até nos dias atuais, mais de 100 anos após a descoberta da toxina Shiga, a shigelose continua sendo um importante problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento em que predominam baixos padrões de saneamento básico (NYOGY, 2005).

A dose infectante da doença é baixa em relação à salmonelose, variando de 10 a 10<sup>2</sup> células, com elevada taxa de letalidade. A shigelose ou disenteria bacilar atinge principalmente crianças de um a quatro anos de idade e idosos, porém em surtos epidêmicos, todas as faixas etárias podem ser acometidas. Em um estudo de revisão feito por Kotloff *et al.* (1999), foi verificado que dos 165 milhões de casos de diarreia por *Shigella* que incidem em todo o mundo anualmente, 99% ocorrem em países em desenvolvimento e com precárias condições de higiene e saneamento, sendo que 69% dos eventos atingem crianças com idade inferior a cinco anos.

Conforme relatam Gupta *et al.* (2004), durante o período de 1989 a 2002 foram reportados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos 208.368 casos de

infecção por *Shigella* confirmados em laboratório. *Shigella sonnei* foi a espécie responsável por 71,7% dos casos, *Shigella flexneri*, 18,4%, *Shigella boydii* 1,6% e *Shigella dysenteriae* contava 0,7% das infecções. A doença, quando causada por *S. sonnei*, geralmente confere sintomas mais leves aos pacientes do que *S. dysenteriae* e *S. flexneri*.

A principal via de transmissão é a feco-oral, sendo sua disseminação verificada através de alimentos e água contaminados, além da transmissão vetorial (moscas domésticas), que podem carrear o bacilo em suas patas e asas, contaminando alimentos que estejam expostos (SANSONETTI, 2001). *Shigella* e *E. coli* EIEC estão fortemente associadas em termos de genética, bioquímica e patogenicidade. Alguns pesquisadores consideram o gênero *Shigella* como um subgrupo da linhagem EIEC de *E.coli* (ISHI e SADOWSKY, 2008).

Em amostras ambientais, *Shigella* é isolada em números inferiores a *Salmonella*, assim como sua resistência e sobrevivência também são inferiores, sendo que neste tipo de amostras, sobretudo aquelas provenientes de estações de tratamento de efluentes a ausência de *Salmonella* spp. deve ser acompanhada da ausência de *Shigella* spp. (BASTOS *et al.*, 2003).

### **3.2.5 *Salmonella* spp.**

Assim como outros membros da família Enterobacteriaceae, o gênero *Salmonella* constitui-se de bastonetes retos, Gram-negativos e anaeróbios facultativos. Possuem necessidades nutricionais simples, sendo fermentadores ativos de glicose e carboidratos. Taxonomicamente o gênero *Salmonella* está subdividido em duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*. A espécie *S. enterica* está subdividida em seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *hutnae* e *indica*) sendo que a subespécie *enterica* apresenta mais de 2.400 sorotipos (KIM *et al.*, 2006, TORTORA *et al.*, 2005) e é responsável por 99% de todas as infecções humanas. *S. bongori* é a espécie que atinge animais de sangue frio (CHAN, *et al.*, 2003).

Quase todos os membros da espécie *Salmonella enterica* são potencialmente patogênicos. As salmonelas são comensais do trato intestinal de vários animais, sobretudo aves domésticas, bovinos e até morcegos. Quando se verificam condições sanitárias precárias, as salmonelas podem contaminar os alimentos.

A febre tifóide, causada por *Salmonella Typhi*, é a doença mais grave ocasionada pelo gênero. Os sorovares da espécie *Salmonella enterica*, envolvidas com a contaminação alimentar e

causadoras de uma doença gastrointestinal menos grave (salmonelose), são a *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium. Estes sorovares podem crescer rapidamente em alimentos contaminados e causar intoxicação alimentar, ocasionando diarreia e cólica abdominal. *Salmonella* Enteritidis é adquirida através do consumo de aves e ovos contaminados, tendo surgido como um problema de saúde pública na Europa e nos Estados Unidos na década de 1980 (PATRICK *et al.*, 2004).

Ao contrário das shigelas, as salmonelas podem se disseminar por outros órgãos, causando choque séptico, sintoma que constitui a principal causa das mortes, sobretudo em crianças. A dose infectante pode variar, ficando em torno de  $10^5 - 10^9$  para as salmonelas não Typhi e  $10^3 - 10^5$  para *Salmonella* Typhi (ver Tabela 3.1). Nos Estados Unidos, dados estatísticos registram cerca de 40 mil casos ao ano, valores estes provavelmente subestimados, sendo que são registrados aproximadamente 1000 óbitos/ano. Em 1996 foi verificado um surto nos Estados Unidos com uma estimativa de mais de 200 mil infecções, resultante da utilização de ovos não pasteurizados usados na fabricação de sorvete (SCHROEDER e WUERTZ, 2003).

### 3.2.6 *Helicobacter pylori*

*Helicobacter pylori* é uma bactéria que tem se tornado muito comum em humanos, desde a sua descoberta em 1981. É uma bactéria Gram-negativa, com forma espiral, medindo de 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro, microaerofílica, requerendo oxigênio em baixas quantidades. É o principal agente causador de gastrite crônica e úlcera péptica, estando também associada ao desenvolvimento de carcinoma gástrico. A infecção pode ser sintomática ou assintomática, sendo que na maioria dos casos a infecção não resulta em sintomas clínicos (MORENO *et al.*, 2003).

Pessoas que vivem em baixas condições sócio-econômicas têm sido associadas à alta prevalência da infecção. A bactéria também tem sido detectada nas fezes de crianças que vivem em áreas endêmicas, sobretudo em países em desenvolvimento, e também já foi identificada por Lu *et al.* (2002) em amostras de esgotos não tratados, coletadas em um canal de esgoto aberto em Ciudad Juárez/México.

Um estudo conduzido por Shmueli *et al.* (2004), sobre associação entre infecção por *H. pylori* e por *Shigella* spp., em crianças, na região central de Israel, demonstrou a existência de uma forte associação entre as duas infecções em crianças com idade entre 6 meses e 4 anos.

Oliveira *et al.* (1999) investigaram a prevalência de *H. pylori* em uma população residente na área rural de Araçuaí, Minas Gerais, Brasil, uma das regiões mais carentes do país e observaram que, tanto adultos, quanto adolescentes e crianças, apresentaram altas taxas de *H. pylori*. Os autores relataram que a população estudada vivia em casas com índice de saneamento ambiental muito baixo, condição esta considerada determinante para a prevalência desse microrganismo.

Em consonância com outros autores, Lehours e Yilmaz (2007) também relatam que dentre os fatores de risco mais observados encontram-se: o tipo de água para ingestão, a falta de utilização de instalações sanitárias e hábitos de higiene insuficientes, sobretudo, na infância.

Quanto às diferenças de prevalência existentes entre *H. pylori*, *Shigella* e *Salmonella*, Shmueli *et al.*, (2004) comentam que estas não podem ser explicadas somente pelo baixo nível sócio-econômico da população, mas também por outros fatores, tais como i) a rota de transmissão (*H. pylori* não é considerada de transmissão por alimentos) ii) a baixa dose resposta de *Shigella* e *H. pylori* (a dose resposta para *Salmonella* é bem mais elevada) iii) a tolerância de *H. pylori* e *Shigella* de sobreviverem em ambientes altamente ácidos, iv) a infecção por *Salmonella* spp. ocorrer quase sempre em crianças na faixa etária entre 0 e 1 ano de idade, enquanto que *Shigella* spp é mais prevalente entre 1 e 4 anos e *H. pylori* entre 1 e 3 anos de idade.

### **3.2.7 *Enterococcus* spp.**

Os enterococcus fecais, até recentemente, eram todos descritos como pertencentes ao grupo dos estreptococos fecais. Revisões recentes da taxonomia do grupo revelaram que alguns membros deste grupo estão situados dentro de um novo gênero, os *Enterococcus*. Esta reclassificação foi devido à verificação da existência de condições químicas diferentes entre membros pertencentes ao grupo. Atualmente entende-se que a classificação *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium* para designar organismos do trato intestinal não é mais aceita. O gênero *Streptococcus* atualmente está associado a bactérias presentes no trato intestinal de animais (*Streptococcus bovis* e *Streptococcus equinum*, por exemplo). *Streptococcus* que atingem seres humanos não estão associados ao trato intestinal, e sim ao trato oral, sendo agentes de placa dentária e cáries e também associadas ao trato respiratório (MADIGAN *et al.*, 2004).

Dentro do gênero *Enterococcus*, pelo menos 29 espécies têm sido relatadas, no entanto, em humanos, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* são os mais frequentemente encontrados (GARRITY *et al.*, 2003). Vancanneyt *et al.* (2002) reportam que *E. faecalis* parece induzir maior virulência do que *E. faecium*, e, além disso, as infecções devido a *E. faecalis* em relação a todas as demais espécies de enterococos são de aproximadamente 10:1. Outros autores (MURRAY, 1990; WAAR *et al.*, 2005) relatam ainda que, *Enterococcus faecalis* é responsável por 80 a 90% das infecções em relação a *Enterococcus faecium*, que ocupa a segunda posição em incidência de infecções (5 a 10%).

O habitat mais conhecido destes microrganismos é o trato intestinal de mamíferos e aves, embora não seja o único. Podendo ocorrer também, na garganta e no aparelho genital feminino.

Como cita Murray (1990), os *Enterococcus* têm se tornando importantes, não só por serem umas das principais causas de infecções nosocomiais, mas pelo seu expressivo papel na resistência a antibióticos. Devido a este fato, a incidência de *Enterococcus* tem aumentado ultimamente, sobretudo, em pacientes imunossuprimidos, que necessitam do uso de catéter por períodos prolongados e aqueles que tiveram seu sistema imunológico comprometido pelo vírus da imunodeficiência (HIV). Nos EUA, *Enterococcus* constitui a segunda causa de todas as infecções nosocomiais verificadas no país (CDC, 1993).

Ainda que o grupo coliforme seja o indicador mais apropriado para se avaliar contaminação fecal, a presença do gênero *Enterococcus* também pode indicar contaminação de origem fecal e, complementarmente, podem ser utilizados como indicadores, com maior resistência aos tratamentos de esgotos (FEACHEM *et al.*, 1983). Godfree *et al.* (1997) reportam que os *Enterococcus* não se multiplicam no meio ambiente, porém sobrevivem neles por longos períodos, ocorrendo em números elevados no esgoto sem tratamento, em aproximadamente  $10^6$  org/100 mL, e são duas vezes mais resistentes que os coliformes termotolerantes.

### **3.2.8 *Staphylococcus spp.***

O gênero *Staphylococcus* é formado por cocos com diâmetro variando de 0,5 - 1,5µm. São Gram-positivos e anaeróbios facultativos. Para quase todos os fins clínicos este gênero pode ser dividido entre as linhagens que produzem coagulase (uma enzima que coagula a fibrina no sangue) e as que não produzem coagulase. Atualmente 36 espécies e várias subespécies são

reconhecidas, incluindo *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. cohnii*, *S. warneri*, *S. hominis*, *S. saprophyticus* e outros (GARRITY *et al.*, 2003).

As linhagens coagulase negativas (*S. epidermidis*, *S. cohnii*), são muito comuns na pele, onde podem representar 90% da microbiota normal. Elas são patogênicas somente quando a barreira cutânea é rompida ou invadida por procedimentos médicos, tais como, a inserção e remoção de catéteres (TORTORA *et al.*, 2005).

*S. aureus* é a espécie mais patogênica e tem sido confirmada como causa de grave contaminação alimentar. Quase todas as linhagens patogênicas de *S. aureus* são coagulase positiva. Algumas toxinas estafilocócicas, como as enterotoxinas, presentes no alimento afetam o trato gastrointestinal. Quando a sua toxina é detectada em alimentos, Götz *et al.* (2006) comentam que precárias condições sanitárias de preparo e armazenamento são usualmente notadas. Raramente a toxina é detectada nos esgotos, uma vez que ocorre em baixa frequência nas fezes, restringindo-se aos alimentos.

São importantes organismos saprófitas da pele de humanos e animais, assim como são consistentes indicadores para prognóstico das taxas de morbidade entre praticantes de natação (AHTIAINEN *et al.*, 1991). São bactérias que habitam, além da pele, o nariz e a boca, a partir dos quais, contaminam as mãos e destas fontes podem penetrar nos alimentos. *S. aureus* também são agentes etiológicos de folículos (espinhas, terçol ou hordéolo), furúnculos, e infecções profundas, como osteomielites.

Estafilococos potencialmente patogênicos também podem ser detectados em águas recreacionais e águas que são adicionadas aos alimentos industrializados. Evans (1977) *apud* Ahtiainen *et al.* (1991) propôs a espécie *S. aureus* como indicadora de qualidade da água, porém, devido à falta de confiabilidade nos métodos de quantificação, seu uso foi limitado.

A maior atenção é, portanto, focada em *S. aureus*, ainda que outras espécies patogênicas oportunistas possam estar presentes. D'Azevedo *et al.* (2008) relataram o caso de um paciente que apresentava infecção por *S. cohnii*, adquirido por uso de catéter, no estado de São Paulo, com óbito no 25º dia de internação.

A espécie é relativamente resistente a desinfetantes halógenos e quantidades expressivas deste microrganismo podem permanecer viáveis por prolongados períodos em piscinas e banheiras

de hidromassagem usadas em SPAs, e inadequadamente tratadas. São ainda resistentes a alguns antibióticos além de se comportarem como oportunistas do trato urinário em infecções nosocomiais (GÖTZ *et al.*, 2006). Com isso, frequentemente, é um grande problema em ambientes hospitalares, uma vez que pode ser transportado por pacientes, corpo clínico e por visitantes. No passado, esse organismo era extremamente susceptível a penicilina, mas atualmente, cerca de apenas 10% são susceptíveis a esta linha de antibióticos (TORTORA *et al.*, 2005).

### **3.2.9 *Campylobacter* spp.**

O gênero *Campylobacter* é representado por bacilos Gram-negativos, microaerófilos, com 0,2 a 0,8 µm de diâmetro e móveis. *Campylobacter jejuni* é a principal espécie que acomete os humanos. Ainda que sejam frequentemente isolados de fezes de indivíduos assintomáticos, normalmente ocasionam uma infecção autolimitada e que não necessita de tratamento.

Os principais sintomas da doença são diarreia, que pode conter muco, sangue e leucócitos, além de febre, dor abdominal, náuseas, vômitos, dores musculares e dores de cabeça. Tais sintomas se manifestam de 2 a 5 dias após a ingestão do alimento ou água contaminados, e duram aproximadamente de 7 a 10 dias, ocorrendo reincidência em aproximadamente 25% dos casos.

As complicações decorrentes dos casos de campilobacteriose são raras, podendo estar relacionadas à artrite reativa, síndrome hemolítico-urêmica, septicemia, infecções em outros órgãos e síndrome de Guillain-Barré. Aproximadamente 1 em cada 1.000 casos diagnosticados evolui para esta manifestação, o que leva o paciente a uma paralisia que persiste por várias semanas e que necessita de internação.

Casos fatais ocorrem na proporção de 1 para cada 10.000 doentes, sendo a maioria destes indivíduos portadores de outras doenças que comprometem o sistema imunológico (carcinomas, AIDS) ou outras doenças debilitantes. Todas as pessoas são susceptíveis ao microrganismo, porém, crianças menores de cinco anos e adultos jovens (15 - 29 anos) são os mais afetados.

A quantidade de microrganismos viáveis necessária para ocasionar a doença é de menos de 500 células bacterianas (ACMSF, 2005).

O isolamento de *Campylobacter* requer um meio de cultura especial, contendo antibiótico e uma atmosfera microaerófila (contendo 5% de oxigênio), o que faz com que o diagnóstico laboratorial por meio de técnicas de cultivo não seja muito utilizado. No Brasil, isto tem sido identificado como responsável por subdiagnóstico e subnotificação da enfermidade e uma carência de dados. A fonte de infecção para humanos é principalmente o contato direto com animais portadores, além do consumo de água e alimentos de origem animal, contaminados (leite não pasteurizado e carne de frango mal cozida, por exemplo) (PINHEIRO, 2008).

Estima-se que *C. jejuni* ocasione entre 1 a 7 milhões de casos de enterites por ano, resultando de 100 a 500 mortes, nos Estados Unidos. Além disso, em 1996, a incidência de campylobacteriose relatada neste mesmo país superou as infecções por *Salmonella* spp., *S. aureus*, *E. coli* e *Clostridium perfringens* (SOLOMON E HOOVE, 1999).

Nos Estados Unidos, Craun *et al.* (2006) investigaram os agentes etiológicos envolvidos em surtos de doenças de veiculação hídrica entre 1991 e 2002 e detectaram que *Campylobacter jejuni* foi responsável por 7 surtos ocorridos no período investigado, com 360 casos da doença.

Nataro *et al.*, 2006, em seu estudo sobre casos de infecção por *E. coli* diarreiogênicas em Baltimore/ Maryland e New Haven/ Connecticut também verificaram a frequência com que outros patógenos entéricos eram isolados. Dentre 1190 pacientes investigados, *Campylobacter jejuni* foi detectado em 34 pacientes, correspondendo a 2,9% dos isolados, seguido por *Salmonella enterica*, detectada em 24 pacientes, correspondendo a 2% dos isolados.

As aves constituem um importante reservatório desse microrganismo, além disso, cães, gatos, roedores e humanos também podem constituir-se reservatório (OLIVEIRA, 2006a).

Em sua pesquisa na Universidade Federal de Viçosa/Minas Gerais, Oliveira (2006a) fez um levantamento da presença de *Campylobacter* spp. em amostras oriundas de granjas de criação de frango. A autora coletou amostras da cloaca dos animais, bebedouro, “cama” usada e limpa, ração e água e verificou que, exceto na água, em todos os outros componentes avaliados, foi detectada a presença do gênero *Campylobacter*. Além disso, a pesquisadora verificou que na primeira fase da criação dos frangos, todas as aves avaliadas estavam contaminadas. Na fase final da criação, a taxa de contaminação das aves variou de 40 a 100% conforme o local e o sistema de criação. Tais informações ressaltam a importância das aves de

granja como fonte de infecção e o perigo sanitário que precárias condições de higiene na criação, além do destino inadequado dos resíduos provenientes dos abatedouros, podem se constituir.

### **3.2.10 *Yersinia enterocolitica***

*Yersinia enterocolitica* é uma enterobactéria patogênica em forma de bacilo, Gram-negativa, invasora de células dos tecidos humanos e de distribuição mundial, tendo sido isolada em diversos países, incluindo o Brasil. A incidência é alta em países de clima temperado e frio. Na Noruega tem sido implicada como a quarta causa de enterite aguda, superada apenas pelos gêneros *Salmonella*, *Campylobacter* e *Shigella*. Na Bélgica constitui-se a terceira enterobactéria mais comum, após *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. (CARNIEL *et al.*, 2006).

Uma ampla variedade de amostras pode abrigar o microrganismo (solo, água, alimentos), assim como uma variedade de animais pode ser o reservatório da bactéria (porco, coelho, vaca, e outros). A transmissão ocorre pela rota feco-oral, onde os microrganismos são ingeridos juntamente com os alimentos contaminados. A transmissão interpessoal também tem sido verificada através das mãos sujas e ocasionalmente em bolsas de sangue para transfusão, armazenadas sob refrigeração. Crianças abaixo de cinco anos estão mais propensas à contaminação devido ao estado imunológico ainda em desenvolvimento.

Apesar da temperatura ótima de crescimento situar-se em torno de 37°C, estes microrganismos apresentam capacidade de se multiplicarem também em temperaturas baixas, em torno de 4°C, característica importante na disseminação da bactéria. Quanto ao pH, a bactéria é capaz de crescer em uma faixa entre 4 e 10, sendo o pH ótimo ao redor de 7,6 (FALCÃO e FALCÃO, 2006).

Devido à capacidade de crescer e se multiplicar em temperaturas baixas, Carniel *et al.* (2006) comentam que alimentos de origem animal estocados em geladeira foram as maiores causas de surtos por *Yersinia enterocolitica* verificados nos Estados Unidos na década de 1950. A bactéria, no entanto, é sensível ao calor, sendo destruída por pasteurização a 71,8 °C por 30 segundos.

As manifestações clínicas associadas à yersiniose são parecidas com a maioria das infecções intestinais, com quadros de diarreia, febre (entérica), dor abdominal e vômito, podendo estar associadas a casos de septicemia. A duração da doença varia de poucos dias a três semanas, embora alguns pacientes possam desenvolver enterocolite crônica que pode persistir por vários meses.

Ainda que *Yersinia enterocolitica* raramente seja isolada de locais extra-intestinais, pode desenvolver-se em qualquer tecido. Doenças focais podem se apresentar, como celulite, abscessos subcutâneos, piomiosites, linfadenite supurativa, artrite séptica, osteomielite, infecção do trato urinário, abscessos renais, sinusites, pneumonia, abscessos pulmonares ou empiema, além de outras sequelas imunológicas. No Brasil, a maioria das infecções apresenta-se na forma diarreica, embora outras manifestações como anemia falciforme, pneumonia e artrite tenham sido descritas, mas em baixa frequência (FALCÃO e FALCÃO, 2006).

No Brasil a doença não é relatada com a mesma frequência com que é feita em outros países, possivelmente devido ao fato da baixa ocorrência ou a não utilização de técnicas ideais para o isolamento e caracterização desta bactéria, o que a torna pouco conhecida e caracterizada nesta região.

### **3.2.11 *Vibrio cholerae***

*Vibrio cholerae* são bastonetes Gram-negativos, levemente curvos, aeróbios, ou anaeróbios facultativos e fermentadores. Os dois biótipos existentes são o Clássico e o El Tor Biótipo O1, sendo que este último foi a forma responsável pela exacerbação do cólera na América Latina. Este é o biótipo enterotoxigênico, não invasivo, que provoca diarreia profusa e vômito, com perda repentina de grandes quantidades de líquido e eletrólitos, podendo ser letal principalmente para as crianças (BRASIL, 2006).

A mais recente manifestação da sétima pandemia de *V. cholerae*, foi a eclosão ocorrida no Peru, iniciada em janeiro de 1991, causada pelo biótipo El Tor. A doença entrou no Brasil por um município da fronteira com o Peru em abril de 1991. No final de 1991 chegou a São Luís do Maranhão. Em fevereiro de 1992 foi detectada no sertão da Paraíba, logo em seguida em Pernambuco. Até o final de 1992 todos os estados da região Nordeste foram atingidos. Em 1993 observou-se seu recrudescimento em alguns estados do Nordeste e o seu avanço para o

Sudeste com registros em Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Rio de Janeiro (BRASIL, 1991).

O reservatório comprovado são os humanos, porém vários estudos têm sugerido a existência de reservatórios ambientais como fitoplâncton, zooplâncton e frutos do mar. A sobrevivência do vibrião depende de vários fatores. Em princípio, como relatado por Singh *et al.* (2001), a água é um meio mais favorável para sua sobrevivência que os alimentos, assim como temperaturas entre 5 e 10 °C e pH entre 8,5 e 9,0. Salinidade, presença de substâncias orgânicas e ausência de competidores favorecem a manutenção da bactéria. *V. cholerae*, assim como outras espécies de vibriões, não cólera, associados a doenças em humanos (MATTÉ *et al.*, 2007) têm sido relacionados à contaminação de peixes crus ou mal cozidos.

A experiência acumulada ao longo dos anos, na prevenção e controle do cólera, mostra que a doença não se instala em áreas que dispõem de adequada infra-estrutura de saneamento nas quais prevalecem boas práticas de higiene pessoal, o que decorre de constituir o cólera em uma doença eminentemente de veiculação hídrica.

Atualmente a doença está sob controle no Brasil. O caso mais recente de notificação de cólera no país se deu em Pernambuco em 2005, onde foram notificados cinco casos. Excetuando-se alguns estados da Região Nordeste do Brasil, os demais não apresentam casos de cólera, notificados, desde o ano de 2000 (Disponível em: <http://portal.saude.gov.br>) (Acesso em 23/08/2008).

### **3.2.12 *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* são bacilos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos. Esta bactéria é responsável por uma infecção essencialmente alimentar que é a listeriose. O bacilo é amplamente disseminado no solo, vegetação, água, esgoto, além de inúmeras espécies de animais que contaminam os alimentos e disseminam a doença. Embora seja uma doença com baixa prevalência, sua importância na saúde pública se justifica pela severidade das sequelas e pelos altos índices de mortalidade.

No Brasil a doença é subdiagnosticada e subnotificada, devido a dificuldades no controle e no estudo da listeriose, como por exemplo, a demora na realização de análises clínicas para confirmação dos casos e a recuperação de organismos que estejam envolvidos nos surtos, não

se exigindo, com isso, a notificação dos casos de listéria nem em hospitais, nem em fábricas de alimentos (com exceção de fabricantes de queijos úmidos), e isto resulta na falta de dados no país. Tais implicações, associadas ao fato de que a bactéria apresenta alta virulência a partir de baixa dose infectante, dificultam o controle e prevenção da listeriose.

O agente resiste a altas concentrações de sal e nitratos (quando utilizados para conservar alimentos) e multiplica-se em ampla faixa de temperatura, especialmente as de refrigeração, o que significa que ela pode também se disseminar em geladeiras de uso caseiro. O quadro clínico da doença, no início da infecção, assemelha-se a um resfriado comum, com febre, dores musculares e distúrbios gastrointestinais. Em pessoas saudáveis a recuperação é rápida, sem evolução. Contudo, em idosos, crianças e pessoas imunocomprometidas a listeriose pode resultar em septicemia, meningite, meningoencefalite e endocardite, levando a óbito de 20% a 40% dos casos (McLAUHLIN, 1996).

Gestantes possuem doze vezes mais chances de serem acometidas pela listeriose em relação à população em geral. Embora a gestante não manifeste sintomas preocupantes, as probabilidades de aborto e parto prematuro são grandes, em função da invasão da placenta pela bactéria, atingindo o feto, que ainda não dispõe de sistema imunológico capaz de se defender do agente. A *Listeria monocytogenes* é considerada a terceira causa de meningite em recém-nascidos e é responsável por índices entre 30% a 50% de partos prematuros, abortamentos e morte neonatal. Gestantes devem incluir a pesquisa da bactéria no pré-natal, especialmente na ocorrência de sintomas de resfriado. A listeriose pode ser tratada com antibióticos, tanto em adultos quanto em recém nascidos (Grupo de Pesquisa Rio Total. Disponível em: <[http:// www.riototal.com.br/saude](http://www.riototal.com.br/saude)> Acesso em 26/08/2008).

### **3.3 Principais Técnicas Utilizadas em Biologia Molecular**

A diversidade microbiana, além de vasta, é em parte desconhecida. São descritas na literatura, em média, 1700 espécies novas de fungos e 120 espécies de bactérias/ano. Não se sabe ao certo o número total de espécies microbianas existentes na Terra. Estimativas sugerem um provável total, próximo a 1,8 milhões de espécies (HAWKSWORTH, 1992 *apud* ROSADO, 2002).

Durante longos anos os estudos dos microrganismos nos diversos ambientes foram limitados exclusivamente a técnicas microscópicas, de enriquecimento e cultivo. Essas técnicas,

isoladamente, muitas vezes não fornecem maiores informações quanto à composição microbiana, devido às dificuldades inerentes às condições ideais para o cultivo e isolamento dos microrganismos, uma vez que alguns deles são bastante “seletivos” quanto aos meios e outros podem estar em estado VBNC (viáveis, mas não cultiváveis) no meio ambiente (ROSADO *et al.*, 1997; ROSADO e DUARTE, 2002).

Com o advento das técnicas em biologia molecular, estas têm se tornado importantes ferramentas que podem responder questões sobre a real diversidade dos microrganismos para análise da comunidade microbiana em diversas amostras, tais como amostras clínicas, de alimentos, de solos, sedimentos e biorreatores (SINGH *et al.*, 2001; SILVA, 2007; PADILHA *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 1997; OLIVEIRA e BERNARDO, 2002; MAKINO *et al.*, 2000; OLSEN *et al.*, 1986; AMANN *et al.*, 1995). Tais técnicas já vêm sendo utilizadas na área médica há algum tempo e, como comenta Head *et al.* (1998), vêm sendo utilizadas para se conhecer e avaliar a ecologia de microrganismos em amostras naturais desde meados da década de 1980.

### **3.3.1 Princípio das técnicas moleculares aplicadas à microbiologia**

O uso das técnicas moleculares se baseia na aplicação de biomarcadores, que são moléculas que possuem regiões altamente conservadas entre os diferentes organismos e outras regiões variáveis, específicas para grupos ou indivíduos. Um biomarcador comumente utilizado é a molécula de RNA ribossomal, (RNAr). Esta molécula é parte integrante do ribossomo, uma estrutura celular responsável pela síntese de proteínas que está presente em todas as células e, por isso, é considerada um biomarcador ideal.

Por ser uma molécula altamente conservada em termos evolutivos e ainda, com regiões variáveis, a sequência de RNAr 16S é considerada a “impressão digital” de um organismo (PACE *et al.*, 1986; WOESE, 1987).

Por questões de manipulação laboratorial, trabalha-se mais frequentemente com a sequência do DNA que codifica a região 16S do RNAr (DNAr 16S). Isto porque o DNA é uma molécula mais estável e mais fácil de manipular do que o RNA. No entanto, há a opção de se trabalhar com outros genes além do RNAr 16S, como por exemplo, genes que codificam enzimas específicas. Estes genes são fragmentos de DNA típicos de um grupo de microrganismo, e que não devem ser encontrados nos demais. Por exemplo, o gene *nuc*, que é o gene que

codifica a enzima nuclease extracelular termoestável de *Staphylococcus aureus*, é específico da mesma, e está ausente nas outras bactérias (BURTSCHER e WUERTZ, 2003).

Existem várias técnicas baseadas em biologia molecular que podem ser utilizadas na investigação microbiana de amostras ambientais. A seguir serão descritas as técnicas que foram empregadas neste estudo.

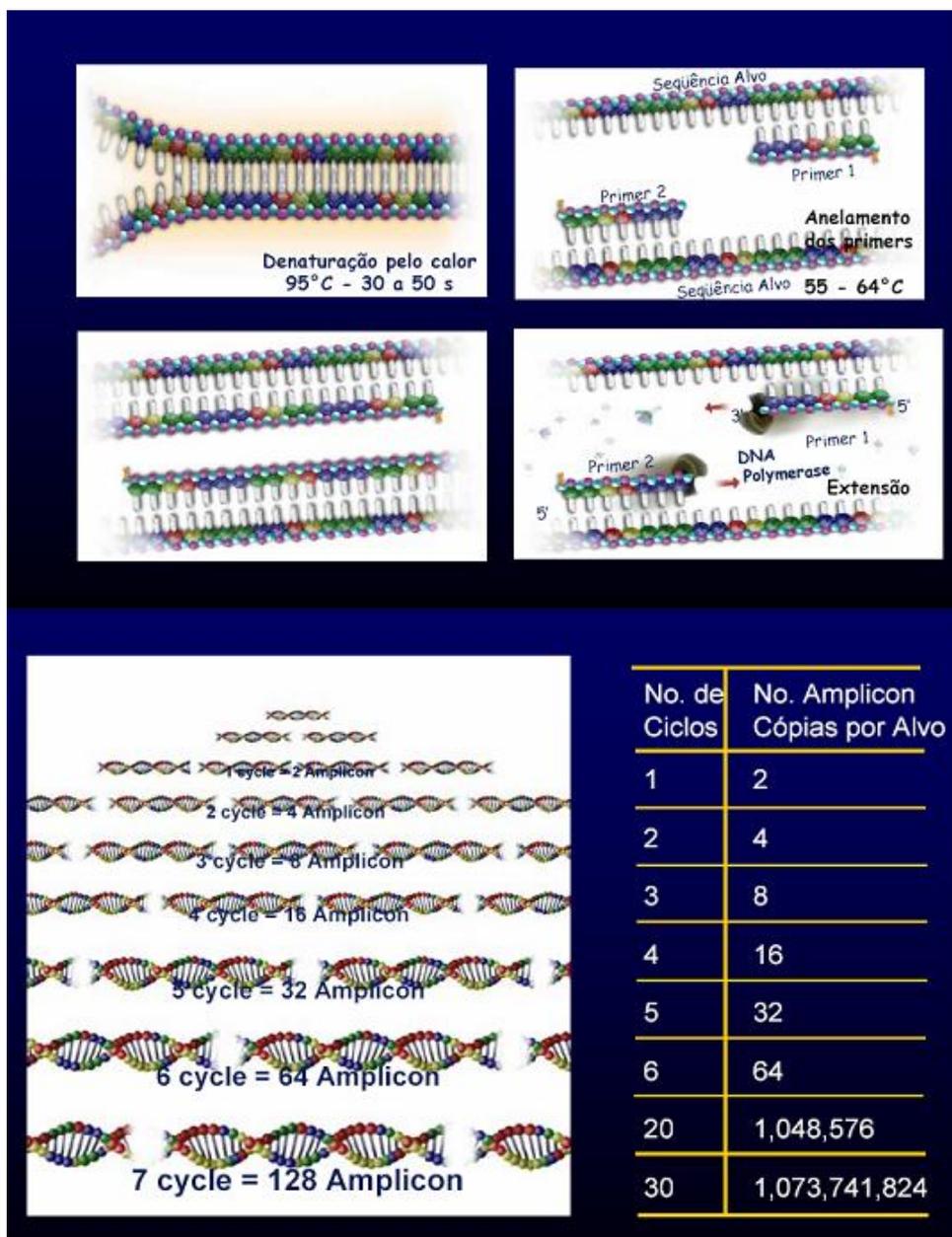
### 3.3.2 Técnica da PCR

A técnica da PCR foi desenvolvida por Mullis em 1983, tendo sido utilizada primeiramente para o diagnóstico de anemia falciforme. Desde então seu uso vem se expandindo e tem sido usada para analisar a diversidade microbiana em diversas amostras, incluindo as ambientais. A PCR é uma técnica que visa à identificação de microrganismos em diversas amostras.

O método inicia-se com a extração do DNA total da comunidade, seguido da amplificação *in vitro* dos fragmentos de tamanhos similares, mas de diferentes composições de nucleotídeos. Neste processo, o fragmento de DNA de interesse é replicado várias vezes através da enzima DNA polimerase que copia o DNA. Para que isso ocorra, a DNA polimerase necessita de uma fita molde e de um *primer*, um pequeno segmento de DNA cujas bases pareiam com as da fita molde, funcionando como um “iniciador” para as cópias de DNA a serem formadas.

A descoberta que levou a consolidação da técnica de PCR foi a adoção da enzima *Taq* DNA polimerase, uma enzima termoestável capaz de tolerar temperaturas elevadas por um determinado período de tempo. Isto permitiu que a reação da PCR ocorresse com múltiplos ciclos de síntese de DNA sem precisar da intervenção de um operador (BROW, 1998; Apostila da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto disponível em [http://morpheus.fmrp.uso.br/td/download\\_apostila.php](http://morpheus.fmrp.uso.br/td/download_apostila.php) Acesso em 09/05/2007).

A PCR baseia-se em ciclos de reação em três etapas que são a desnaturação do DNA, o anelamento dos *primers* e a extensão da fita. A amplificação ocorre durante repetidos ciclos termais de temperatura que variam de baixa a elevada em cada uma das etapas. Os *primers* variam desde universais, como por exemplo, para todo o domínio *Bacteria* (968F-1401R) (MATSUKI *et al.*, 2002), até para grupos-específicos, a exemplo de Ent. 1017F e Ent. 1263R para *Enterococcus*, (VANHOUTTE *et al.*, 2004) e L-uid739 e R-uid1578 para *E. coli* (BEJ, 2004). A Figura 3.1 apresenta um esquema dos ciclos da PCR.



**Figura 3.1** – Esquema dos ciclos da PCR e geração de *amplicons*.

Fonte: <http://www.dbbm.fiocruz.br/helpdesk/mbiology/PCRcurso.pdf>

Devido à rapidez, especificidade e baixo custo, a técnica da PCR é uma das ferramentas moleculares mais utilizadas no estudo dos diversos grupos de microrganismos patogênicos. No entanto, como qualquer outra técnica, pode apresentar alguns problemas, como a inibição da amplificação do fragmento de DNA de interesse ou a amplificação de fragmentos incorretos, entre outros. Diante disso, existem guias disponíveis na literatura com o intuito de

esclarecer sobre as possíveis causas de tais erros e com a indicação de medidas para que tais problemas sejam remediados (BROWN, 1998). Existe ainda um limite de detecção da técnica da PCR que permite inferir que um microrganismo, às vezes, não está ausente na amostra analisada e sim, abaixo do limite de detecção do método, o que torna conveniente conhecer este limite.

Porém, alguns fatores podem afetar o limite de detecção da PCR e conseqüentemente, a interpretação e comparação de resultados, até mesmo entre laboratórios, como por exemplo, a concentração de  $MgCl_2$ , o fornecedor e a concentração da *Taq* DNA polimerase, temperatura de anelamento dos *primers*, variação no lote de iniciadores, métodos de extração de DNA, modelo do termociclador e tipo de amostra (TYLER *et al.*, 1997).

Burtscher e Wuertz (2003) em seu trabalho de avaliação da PCR para a detecção de bactérias patogênicas em lodos, mostraram que o limite de detecção para *Staphylococcus aureus* foi de  $10^6$  UFC/g de lodo, já para *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* o limite verificado foi de  $10^7$  UFC/g de lodo.

Santos *et al.* (2001), em sua investigação de *Salmonella enteritidis*, demonstraram um limite de detecção de 10 UFC/mL em um ensaio de sensibilidade com cultura pura. Tamanai-Shacoori *et al.* (1994) obtiveram um limite de detecção para *Escherichia coli*-ETEC de apenas 1 UFC/mL em amostras de água não tratada.

Embora a reação da PCR seja capaz de amplificar a sequência de DNA alvo a partir de um único microrganismo, um volume extremamente pequeno (1 $\mu$ l) de amostra de DNA utilizado na reação restringe o limite de detecção da PCR em, aproximadamente,  $10^2$  ou  $10^3$  cel/mL, apesar da alta sensibilidade da PCR. Com isso, às vezes torna-se mais efetivo o próprio pesquisador verificar o limite de detecção dos microrganismos que deseja estudar, a partir das culturas puras (HORÁKOVÁ *et al.*, 2008).

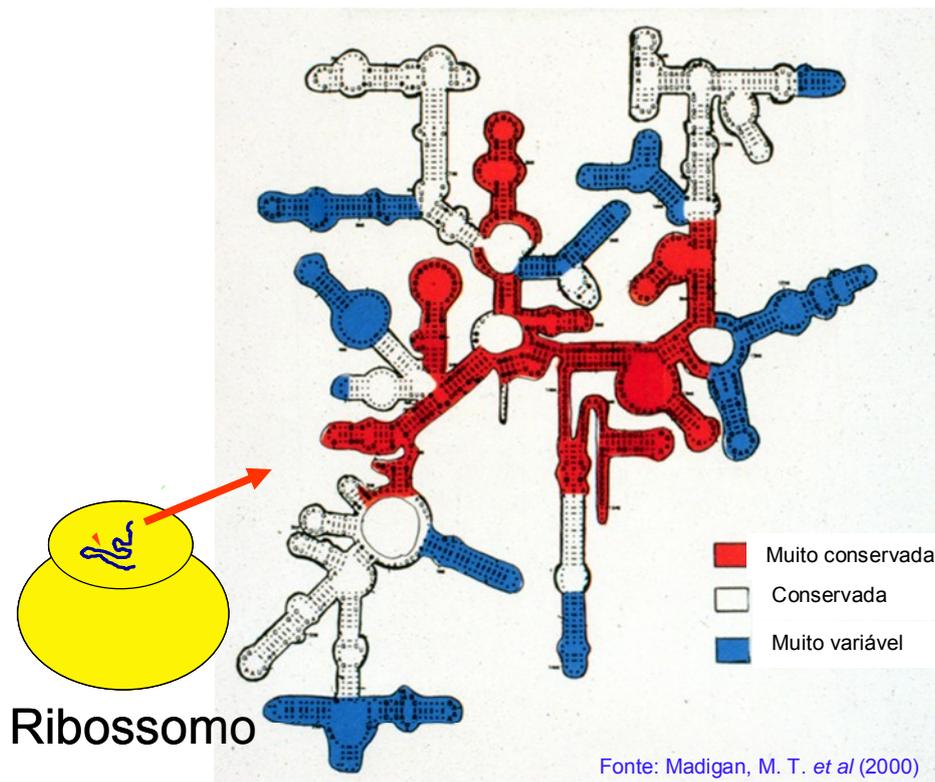
Horáková *et al.* (2008) também apontam que alguns fatores que propiciam o bom resultado da amplificação do DNA pela técnica da PCR, no entanto, são influenciados pela pureza e concentração do DNA e este fato pode ser especialmente decisivo quando o DNA é extraído diretamente de amostras ambientais, sem enriquecimento. Os autores relatam ainda que o isolamento do DNA bacteriano de amostra ambiental é mais difícil de ser feito, devido às

baixas quantidades de moléculas alvo, e pela presença de grandes quantidades de substâncias inibidoras que podem interferir na reação da PCR.

### 3.3.3 Técnica de FISH

Um outro método, que permite a quantificação de microrganismos sem a necessidade de cultivá-los, é o da hibridação *in situ* com sondas fluorescentes, o FISH (*Fluorescent in situ Hybridization*). Trata-se de um método que permite identificar, por microscopia, microrganismos presentes em diversos ambientes, tendo por base o uso de sondas (pequenas sequências complementares ao RNAr 5S, 16S, 23S ou complementares ao RNAm) marcadas com compostos fluorescentes (MOTER e GÖBEL, 2000; AMANN *et al.*, 1995; WOESE, 1987).

Seu uso consiste no mesmo princípio da “impressão digital”, uma vez que os organismos podem ser identificados dentre uma população mista, por apresentarem uma região complementar à sonda a ser utilizada (AMANN *et al.*, 1995). Devido à sua baixa taxa de modificação evolutiva, as sequências que codificam para o RNA ribossômico RNAr 16S (Figura 3.2) ou 18S têm sido usadas mais extensamente para classificar de forma filogenética a diversidade da vida (WOESE, 1987; WOESE *et al.*, 1990). O RNAr 16S apresenta 1.542 bases, sendo 568 posições conservadas e 974 posições variáveis.



**Figura 3.2** – Esquema da estrutura secundária da molécula RNAr 16S

Cada célula “ativa” contém entre  $10^3$  e  $10^5$  ribossomos e parte desses são os RNAs ribossomais (RNAr 5S, 16S e 23S) (van der MEER *et al.*, 1998 *apud* Araújo *et al.* 2002). Algumas regiões dos RNAs ribossomais estão acessíveis para a hibridação, o que significa que é possível ligar a sonda complementar a uma certa região do 16S, nessa porção do RNAr. Dependendo das sondas, o FISH pode ser usado para detectar e quantificar microrganismos de diferentes níveis filogenéticos. Alguns autores têm utilizado técnicas de biologia molecular, dentre elas o FISH, para identificar ou para acompanhar o desenvolvimento de populações microbianas em determinados ambientes (ARAÚJO *et al.*, 2000, 2002, 2004; MONTENEGRO *et al.*, 2003, OLIVEIRA e BERNARDO, 2002; GREISEN *et al.*, 1994; BEJ, *et al.*, 1991).

A técnica de FISH também tem sido utilizada para avaliar organismos patogênicos tais como *Helicobacter pylori* em águas de rio e amostras de esgoto bruto e tratado por lodo ativado (MORENO *et al.*, 2003). A técnica FISH é usualmente utilizada para determinar a abundância relativa de grupos metabolicamente ativos, uma vez que a quantidade de RNAr por célula é, normalmente, proporcional à sua atividade metabólica (WAGNER, 1994). O limite de

detecção da técnica conforme reportado por Amann *et al.* (1995) e Garcia-Armisen e Servais (2004) é de  $10^3$  a  $10^4$  células/mL.

O emprego da técnica FISH geralmente envolve quatro etapas básicas que são: i) a fixação da amostra; ii) a montagem da lâmina; iii) a hibridação com a sonda específica; iv) a coloração com o DAPI e observação sob microscopia de fluorescência.

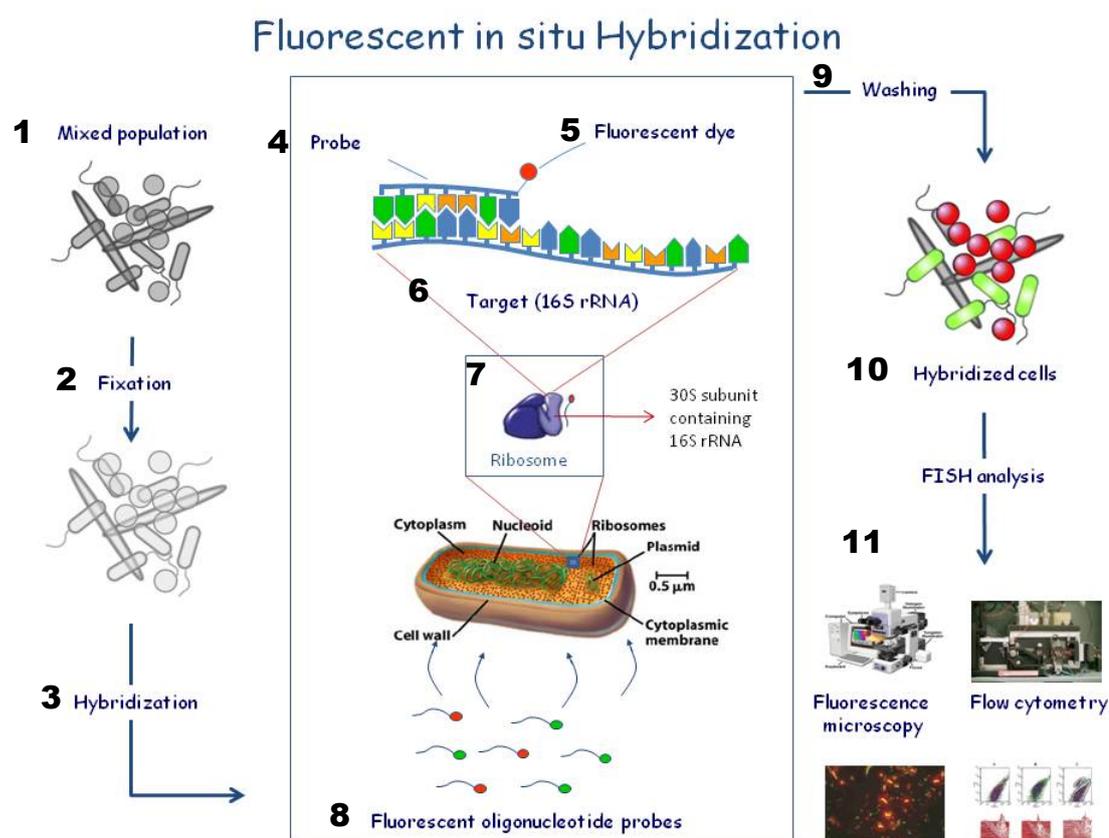
A fixação da amostra consiste em fixar as células no estado em que se encontram no momento que foram coletadas. Uma substância adicionada ao tampão de fixação (paraformaldeído) cria poros na membrana celular, permitindo a entrada na célula, e com isso a fixação mantém a morfologia da célula e possibilita que ela seja armazenada de forma a manter a sua estrutura fisiológica intacta.

Esta etapa é talvez a mais importante da técnica, porque na fase da hibridação, as células são submetidas a altas temperaturas e concentração de reagentes como a formamida, e com isso a integridade das mesmas é mantida. Além do mais, a etapa de fixação ocasiona uma permeabilização na parede da célula para que a sonda possa adentrar a célula e se ligar ao RNAr (ARAÚJO, 2001; ARAÚJO *et al.*, 2009).

A montagem da lâmina consiste em fixar as células na lâmina de vidro e em seguida desidratá-las em etanol, uma vez que já se encontram aderidas. A hibridação é a etapa em que a sonda é aplicada juntamente com o tampão de hibridação e a lâmina é incubada em câmara úmida e escura, já que a sonda é sensível à luz e pode comprometer a fluorescência quando exposta à luz por longo tempo. Molecularmente a hibridação consiste da entrada da sonda na célula e na ligação da mesma a uma porção do RNAr que tenha uma sequência de nucleotídeos complementar à sua.

A próxima etapa é a coloração com o DAPI (4,6-diamidino-2-phenilindol), um corante para DNA, que se entremeia com este e, com isso, cora todas as células, sem especificidade a nenhuma. Na etapa de visualização ao microscópio, é possível observar somente os organismos alvo do ensaio (quando se utiliza um filtro específico para a sonda, fazendo a contagem das células hibridadas) e/ou observar todos os organismos da amostra (utilizando filtro específico para o DAPI para a contagem total das células) (ARAÚJO *et al.*, 2009).

A visualização das células marcadas com o corante DAPI é de fundamental importância para se certificar que as células que hibridaram com a sonda também estavam hibridadas com o corante DAPI. Isto garante que a hibridação de uma célula com a sonda seja realmente uma célula, e não em decorrência de algum resíduo ou partícula inerte. Além disso, como a visualização de células coradas com o DAPI fornece o valor total de células existentes na amostra, é possível obter a abundância relativa de células que hibridaram com a sonda em relação ao total de células existentes na amostra. A Figura 3.3 apresenta um esquema de todas as etapas da técnica de FISH.



**Figura 3.3-** Esquema da técnica de FISH  
Disponível em: <http://www.biovisible.com> - Acesso em 08/09/2009

Legenda:	1 - "Mix" de microrganismos	2 - Fixação	3 - Hibridação	4 - Sonda
	5 - Marcadores fluorescentes	6 - Gene alvo	7 - Ribossomo	8 - Entrada da sonda na célula
	9 - Lavagem			
	10 - Células hibridadas	11 - Observação sob microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo		

Como todas as técnicas, o FISH também apresenta vantagens e limitações (Tabela 3.2). A indicação ao uso ou não da técnica, vai depender de fatores, tais como i) o tipo de amostra a ser avaliada, ii) o total de espécies bacterianas que se pretende pesquisar, iii) a precisão que se

deseja alcançar, iv) o número de pessoas envolvidas na pesquisa, uma vez que a experiência do observador deve ser levada em consideração.

**Tabela 3.2 – Vantagens e limitações da técnica de FISH**

Vantagens do FISH	Limitações do FISH
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Método direto e relativamente rápido para caracterizar e quantificar populações microbianas em diversos tipos de amostras.</li> <li>• Visualiza e quantifica individualmente os microrganismos que estão ativos na amostra.</li> <li>• Permite visualizar a distribuição espacial do microrganismo na amostra.</li> <li>• FISH representa análise complementar àquela de sequências do DNAr, e permite confirmar a importância daquela sequência na amostra ambiental e às vezes, com a filogenia, pode-se inferir a fisiologia e a função do microrganismo no ambiente (ou em um reator).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• O limite de detecção da técnica é elevado – <math>10^3</math> a <math>10^4</math> cél/mL, ou seja, populações que estiverem presentes na amostra, abaixo desta concentração não são detectadas.</li> <li>• Deve-se ter um conhecimento prévio da amostra para definir quais sondas serão utilizadas ou qual grupo se pretende monitorar, o que implica em se ter a sonda disponível.</li> <li>• Um dos problemas mais expressivos do FISH é a questão da inacessibilidade da região alvo à sonda, interferindo na qualidade do sinal fluorescente.</li> <li>• Um fator que também interfere muito no FISH é a questão da autofluorescência de algumas amostras, principalmente pela presença de materiais inorgânicos e também pela presença de outros grupos como, por ex. as algas, que são bastante autofluorescentes. Além da fluorescência de “background”, o que dificulta sobremaneira a quantificação.</li> <li>• A contagem somente sob microscopia de fluorescência (sem o uso do software de captura da imagem) pode se tornar bastante demorada e cansativa e exige experiência do observador.</li> <li>• Existência de falsos positivos ou falsos negativos.</li> <li>• O pré - tratamento para determinados tipos de amostras tanto para desfazer debris quanto para tentar diminuir a presença de organismos autofluorescentes pode não surtir efeito positivo e dificultar a contagem.</li> <li>• O custo das sondas. No Brasil (outubro de 2009) uma sonda marcada com Cy3 e com uma sequência de 18 bases nitrogenadas custava aproximadamente R\$900,00.</li> </ul>

Fonte: De Long *et al.*, (1989); Amann *et al.* (1995); Amann *et al.* (2001); Fuchs *et al.*, (2001); Moter e Göbel, (2000); Araújo, (2002).

### **3.4 Técnica do substrato cromogênico para quantificação de *E. coli***

Por volta da década de 1980 houve um intenso avanço em estudos que buscassem a identificação e quantificação de *Escherichia coli*. A partir de então, surgiram as técnicas cromofluorogênicas, usando meios e substratos definidos, para detecção simultânea de coliformes totais e *E. coli*.

O princípio do método é baseado na lise, pelos coliformes totais, do substrato cromogênico,  $\beta$ -D-galactopiranosido, através da utilização da enzima  $\beta$ -D-galactosidase, normalmente presente nos vários sorotipos de *E. coli*, liberando uma substância que muda a cor do meio (cromógeno onitrofenol amarelo forte). Consecutivamente, *E. coli*, que possui a enzima 4-metil-umbelliferil  $\beta$ -D-glucuronidase, lisa a molécula do substrato, liberando-se assim 4-metil-umbelliferil (MUG), que após 24 horas, sob luz ultravioleta de comprimento de onda 366 nm, produz intensa fluorescência azul (CEBALLOS, 2000).

Têm sido desenvolvidos vários meios de cultura que utilizam MUG, destacando-se o Colilert®, em que o meio de cultura em pó estéril é fornecido em sachês plásticos prontos para o uso, adicionando-se em 100 mL de amostra ou suas diluições. Para quantificação, usa-se a técnica de NMP/100 mL, desenvolvida em cartelas plásticas estéreis e descartáveis, que substitui a tradicional técnica dos tubos múltiplos. A amostra é colocada na cartela, selada e incubada a  $35 \pm 2$  °C durante 24 horas. Após esse período, promove-se a contagem das células que desenvolveram coloração amarelo forte e/ou fluorescência. Com o auxílio de uma tabela que acompanha o *kit* obtém-se o valor do NMP de Coliformes totais e *E. coli* /100mL de amostra (MELO, 2001).

Esta metodologia foi aceita e padronizada, sendo publicada na 19ª edição do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, em 1995. Desde então, tem sido utilizada pelos laboratórios na avaliação da presença de coliformes totais e *E. coli*, simultaneamente, em amostras ambientais, principalmente água e esgotos domésticos. É uma metodologia bastante rápida e fácil de aplicar, necessitando, no entanto da aquisição de uma máquina seladora para as cartelas, e uma leitora com lâmpada UV. Os *kits* de substratos e cartelas são vendidos separadamente em caixas de 20 e 100 substratos e caixas com 100 cartelas a custos aproximados de dez a doze reais, cada sachê de substrato.

### **3.5 Distribuição de bactérias patogênicas em esgotos brutos e em sistemas de tratamento de esgotos**

#### **3.5.1 Utilização dos gêneros de bactérias entéricas patogênicas na avaliação dos esgotos**

Na avaliação do desempenho dos sistemas de tratamento de esgotos, em termos de remoção de microrganismos patogênicos, a maioria dos laboratórios não emprega outros grupos, além das bactérias do grupo dos coliformes no monitoramento. Desta forma, grande parte dos trabalhos utiliza principalmente coliformes totais, *Escherichia coli* e ocasionalmente, os enterococos e os helmintos, no monitoramento de rotina. A avaliação de bactérias patogênicas, tais como os gêneros *Salmonella*, *Shigella*, patótipos de *E. coli* dentre outras, não é feita para a maioria dos sistemas de tratamento de esgotos. Outras bactérias patogênicas e outros grupos de microrganismos, como protozoários e vírus, têm sido avaliados somente em pesquisas mais específicas e não na rotina do monitoramento.

Esta avaliação de bactérias patogênicas muitas vezes não é feita, dada a dificuldade de se fazer tal análise utilizando as metodologias convencionais de cultivo, que demandam tempo e algumas se mostram bastante trabalhosas. A avaliação de patógenos ocasionalmente é feita em outras amostras ambientais, como por exemplo, em bioossólidos, particularmente, devido ao aumento da sua utilização como fertilizante agrícola, a fim de cumprir os padrões prescritos pela OMS, como apresentado por Burtscher e Wuertz, (2003) que utilizaram *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Staphylococcus aureus* como modelo de patógenos.

Alonso *et al.* (2006) investigaram a presença de microrganismos patogênicos, na avaliação de amostras de solo coletadas de campos de golfe da Espanha e Portugal, que são irrigados com efluente de esgotos tratados por lagoa de maturação e outros sistemas, reunindo como modelo *E. coli*, enterococos, vírus entéricos e a bactéria *Legionella pneumophila*. A pesquisa do gênero *Legionella* foi feita por estes autores utilizando-se a técnica da PCR.

Oliveira *et al.* (2006b) avaliaram a eficácia do tratamento de esgotos em um sistema de lagoas através da identificação da população bacteriana, utilizando-se de técnicas convencionais de cultivo. Eles verificaram a presença de vários gêneros de bactérias, podendo-se citar *Enterobacter* spp., *Bacillus* spp., *Acinetobacter* spp., *Alcaligenes*, spp., *Proteus* spp. e outros. Foram detectadas apenas duas UFC do gênero *Escherichia* na amostra afluente e uma UFC/100mL no efluente final, ao passo que, foram detectadas três UFC de *Salmonella* spp.,

no afluente e ausência de UFC de *Salmonella* no efluente final. Dentre as hipóteses que os pesquisadores listaram para a ausência de salmonelas no efluente final está a existência de um baixo percentual do gênero *Salmonella* nas amostras, a presença de células estressadas do gênero *Salmonella*, devido às condições adversas do ambiente do esgoto que impediram a sua recuperação e o seu crescimento nos meios de cultura seletivos, além da microbiota competitiva presente na amostra, uma vez que os meios utilizados também permitem o desenvolvimento de outros microrganismos e o crescimento destes podem ter impedido o crescimento de um número maior de salmonelas, uma vez que estas não toleram competição.

Shannon *et al.* (2007) investigaram a presença de diversas bactérias potencialmente patogênicas, pela técnica da PCR em tempo real, incluindo *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *E. coli* O157:H7, *Helicobacter pylori*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* em amostras obtidas de esgoto bruto e efluentes obtidos do tratamento primário, do tanque de aeração de lodo ativado e do efluente final.

Os resultados verificados pelos pesquisadores mostraram a presença de *E. coli* em todas as etapas do tratamento e uma redução desta espécie de  $1,5 \times 10^7$  para  $1,6 \times 10^3$ , cópias de DNA/100 mL. *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium perfringens*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*, estiveram presentes em pelo menos uma etapa do tratamento, incluindo o efluente final e em quantidades mais elevadas do que *E. coli*. Algumas das espécies pesquisadas, das quais *Bacillus cereus*, *E. coli* O157:H7, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*, não foram detectadas em nenhuma das amostras ou estavam em concentrações abaixo do limite de detecção da técnica utilizada. Os autores concluíram que os processos de tratamento examinados, reduziram a concentração de algumas bactérias, potencialmente patogênicas, em 3 a 4 unidades logarítmicas, e que em comparação aos métodos de cultivo, a PCR em tempo real foi mais rápida, sensível, específica e com grande potencial para investigação de patógenos em esgotos.

Os mecanismos que promovem o decaimento de microrganismos (centrados em *E. coli*) nos sistemas de tratamentos de esgotos, tais como as lagoas de maturação e polimento, têm sido

bastante estudados, no entanto, o modelo de microrganismos utilizados têm sido sistematicamente os indicadores (coliformes totais e *Escherichia coli*).

### **3.5.2 Levantamento de bactérias patogênicas em esgotos brutos**

A Tabela 3.3 apresenta os resultados de alguns trabalhos publicados sobre levantamento da presença de bactérias patogênicas em esgotos brutos. Somente alguns desses trabalhos listados, principalmente aqueles divulgados nos últimos doze anos, mostraram a pesquisa de outros gêneros de bactérias. A Tabela 3.3 enfatiza o fato citado de que, dentre os principais microrganismos presentes nos esgotos brutos, *E. coli* é a mais estudada.

Uma ocorrência que ainda é possível se observar na Tabela 3.3 é a existência de uma variação, entre os autores, dos valores que são detectados no esgoto bruto. Essas variações são possíveis de ocorrer, devido aos métodos utilizados e também pelo fato de que a concentração de microrganismos patogênicos presente nos esgotos depende dos índices de contaminação da população, o que pode variar entre os países e entre as regiões de uma mesma localidade.

Verifica-se também que, em alguns casos, os grupos bacterianos não são quantificados, possivelmente devido às dificuldades de serem isolados por métodos convencionais e pela indisponibilidade de se implementar metodologias mais eficazes para se fazer a contagem, sobretudo nos países em desenvolvimento, cujos laboratórios, muitas vezes, não dispõem de equipamentos mais sofisticados. Outro fator que pode estar associado à não quantificação são as baixas concentrações com que alguns gêneros (*Helicobacter* e *Staphylococcus*, por exemplo) são verificados no esgoto, dificultando a quantificação, mesmo por métodos mais avançados. Outro aspecto a ser observado é quanto à diferença de unidades com que as concentrações são apresentadas. Estas variações ocorrem, sobretudo devido ao tipo de técnica utilizada para se fazer o cultivo e isolamento, ou seja, utilização de NMP para culturas líquidas, UFC para contagem de colônias em placas, além de que, em alguns casos as espécies foram somente detectadas, mas não quantificadas.

Na maioria dos trabalhos citados na Tabela 3.3, foram avaliados também os coliformes totais, mas que não foram apresentados, visto que estes não são indicadores estritos de contaminação fecal. Os dados da Tabela 3.3 também indicam que, mesmo que na rotina, somente o grupo coliforme seja monitorado, a presença de outros microrganismos também deve ser levada em

consideração, mesmo que sejam detectados em números inferiores quando comparado aos coliformes.

**Tabela 3.3 – Microrganismos patogênicos detectados e/ou quantificados em esgotos domésticos brutos.**

Organismo	Deteção/concentração	Localidade (País)	Referência
<i>Escherichia coli</i>	2,2 x 10 <sup>7</sup> UFC/100mL	Estados Unidos	Rose <i>et al.</i> (1996).
	5,2 x 10 <sup>7</sup> NMP/100mL	Brasil	Chernicharo <i>et al.</i> (2001).
	3 x 10 <sup>4</sup> (patogênicas) NMP/100mL	Canadá	Lee <i>et al.</i> (2006).
	1,7x10 <sup>7</sup> (não patogênica) NMP/100mL	Canadá	Lee <i>et al.</i> (2006).
	1,3 x 10 <sup>6</sup> NMP/100mL	Canadá	Payment <i>et al.</i> (2001).
	10 <sup>6</sup> – 10 <sup>8</sup> org/100 mL	Brasil	Bastos <i>et al.</i> (2003).
	2,0 x 10 <sup>7</sup> org/100 mL	Brasil	Ceballos (2000).
	8,3 x 10 <sup>7</sup> UFC/100 mL	Colômbia	Madera <i>et al.</i> (2002).
	1,9 x 10 <sup>8</sup> /NMP100 mL	Brasil	Mascarenhas (2002).
<i>Campylobacter</i>	51,3 org/100mL	-	Stelzer <i>et al.</i> (1991).
	70 - 1,6x10 <sup>3</sup> /100mL	Brasil	Oragui <i>et al.</i> (1987).
	70 org/100 mL	Brasil	Ceballos (2000).
<i>Helicobacter pylori</i>	Detectado	França	Dousse <i>et al.</i> (1993).
	Detectado	México	Lu <i>et al.</i> (2002).
<i>Salmonella spp.</i>	Não detectado	Canadá	Lee <i>et al.</i> (2006).
	1,1 x 10 <sup>3</sup> NMP/100mL	Finlândia	Koivunen <i>et al.</i> (2003).
	2,8 x 10 <sup>3</sup> NMP/100mL	Índia	Pant e Mittal (2007).
	6,0 x 10 <sup>2</sup> NMP/100mL	Canadá	Lee <i>et al.</i> (2006).
	10 <sup>2</sup> - 10 <sup>3</sup> org/100 mL	Brasil	Bastos <i>et al.</i> (2003).
<i>Salmonella enterica</i> (ser) Enteritidis	130 org/100mL	Brasil	Arridge <i>et al.</i> (1995).
	20- >1,8 x 10 <sup>3</sup> NMP/100mL	Canadá	Ceballos (2000).
	3,0x10 <sup>3</sup> org/L	Noruega	Langeland (1982).
<i>Shigella spp.</i>	3,7 x 10 <sup>3</sup> NMP/100mL	Brasil	Oragui <i>et al.</i> (1987).
	1 – 10 <sup>3</sup> org/100 mL	Inglaterra	Yaziz e Lloyd (1979).
<i>Shigella dysenteriae</i>	Detectado	Índia	Pant e Mittal (2007).
<i>Shigella flexneri</i>	Detectado	Brasil	Chernicharo <i>et al.</i> (2006).
<i>Shigella sonnei</i>	Detectado	China	Peng <i>et al.</i> (2002).
<i>Vibrio cholerae</i> O: 1 e O:139	1,0 x 10 <sup>7</sup> NMP/100mL	Inglaterra	Curtis (1996).
<i>Vibrio cholerae</i> O:1	Detectado	Brasil	Martins <i>et al.</i> (1991).
	40 org/L	Brasil	Arridge <i>et al.</i> (1995).
	4,4 x 10 <sup>4</sup> NMP/100mL	Índia	Pant e Mittal (2007).
<i>Staphylococcus aureus</i>	Não detectado	Canadá	Lee <i>et al.</i> (2006).
<i>Enterococcus faecalis</i>	10 <sup>6</sup> NMP/100mL	Estados Unidos	Harwood <i>et al.</i> (2005).
	4,37x 10 <sup>3</sup> NMP/100mL	Canadá	Lee <i>et al.</i> (2006).
	1,98 x 10 <sup>5</sup> NMP/100mL	Canadá	Payment <i>et al.</i> (2001).
	3 x 10 <sup>6</sup> org/100mL	Brasil	Ceballos (2000).
	4,7 x 10 <sup>5</sup> UFC/100 mL	Colômbia	Madera <i>et al.</i> (2002).
	4,1 x 10 <sup>6</sup> org/100mL	Brasil	Arridge <i>et al.</i> (1995).

A escolha do microrganismo patogênico a ser avaliado em esgotos sanitários está fortemente relacionada ao perfil de saúde da população e a peculiaridades inerentes ao microrganismo. *Helicobacter pylori*, por exemplo, apresenta como peculiaridade possuir outras rotas de transmissão mais significativas que a feco-oral (por ex., gastro-oral, oro-oral), assim como *Staphylococcus* spp., que apresenta como peculiaridade, o fato de acometerem principalmente a pele e o trato respiratório, antes que o trato gastrointestinal.

### **3.5.3 Levantamento de bactérias patogênicas em esgotos tratados**

Dados sobre a presença de bactérias patogênicas em efluentes, tratados por diferentes técnicas, estão apresentados na Tabela 3.4. Percebe-se que alguns gêneros bacterianos não são detectados nos efluentes após o tratamento (ex.: *Helicobacter* e *Campylobacter*) ou detectados em níveis muito baixos, conforme o tipo de tratamento utilizado (ex.: *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus*).

As concentrações de *E. coli* nos efluentes de sistemas de tratamento de esgotos apresentaram valores entre  $10^2$  e  $10^3$  organismos/100mL, para a maioria dos processos que utilizaram o sistema de lagoas em alguma etapa do tratamento.

Embora tenha sido reportado na Tabela 3.4 somente um autor avaliando *E. coli* e *Salmonella* spp. por meio do sistema de lodos ativados, o valor verificado está em consonância com a literatura, que mostra que o sistema de lodos ativados convencional apresenta concentrações elevadas ( $10^6 - 10^7$  NMP/100mL) de *E. coli* (von SPERLING, 2005). Já os sistemas que utilizam desinfecção UV na etapa final são um dos mais eficientes na eliminação de patógenos, como verificado no trabalho de Lee *et al.* (2006). Porém, sistemas como lagoas de estabilização, maturação e polimento também se mostram bastantes eficientes, alcançando eficiências de remoção elevadíssimas (99,99% ou mais) em termos de coliformes (von SPERLING, 2005).

**Tabela 3.4 - Microrganismos detectados em esgotos domésticos tratados.**

Sistema de tratamento	Organismo	Valor	Efic. de remoção (%)	Referência
LgE	<i>Campylobacter</i> spp.	0	100	Stelzer <i>et al.</i> (1991).
Sist., com variadas modalidades de lagoas	<i>Salmonella</i> spp.	Não detectável		Chernicharo <i>et al.</i> (2006).
	<i>Escherichia</i>	11,0		Ampofo e Clerk (2003).
	<i>Proteus</i>	9,26		
	<i>Salmonella</i>	9,56		
	<i>Shigella</i>	0,29		
	<i>Staphylococcus</i>	0,88		
	<i>Yersinia</i>	0,44		
	<i>Campylobacter</i>	1,91		
	<i>Pseudomonas</i>	14,71		
	<i>Enterococcus</i>	11,91		
8 LgM em série	<i>Salmonella</i> spp.	0	100	
	<i>E. faecalis</i>	450 org./100mL		
Reator UASB + 2 LgP	<i>E. coli</i>	1,83 x10 <sup>2</sup> NMP/100mL	99,999	Mascarenhas (2002)
	<i>E. coli</i>	7 x10 <sup>3</sup> org./100mL	99,97	
LgA + LgF + 3 LgM	<i>C. perfringens</i>	300 org./100mL	99,4	Ceballos (2000).
	<i>E. faecalis</i>	300 org./100mL	99,99	
	<i>Campylobacter</i> spp.	0	100	
	<i>Salmonella</i> spp.	0	100	
LgA + LgF + 1 LgM	<i>E. faecalis</i>	9,4 x 10 <sup>3</sup> UFC/100mL	<sup>c</sup> 90	Madera <i>et al.</i> (2002).
	<i>E. coli</i>	6,6 x 10 <sup>3</sup> UFC/100mL	<sup>c</sup> 99,99	
UASB+ 1 Lg	<i>Salmonella</i>	10 <sup>2</sup> NMP/100mL		Pant e Mittal (2007).
	<i>Shigella</i>	10 <sup>1</sup> NMP/100mL		
	<i>Vibrio</i>	10 <sup>2</sup> NMP/100mL		
Ld. ATV	<i>E. coli</i>	10 <sup>4</sup> - 10 <sup>7</sup> /L	90 a 99	Ceballos (2000).
	<i>Salmonella</i> spp.	10 - 10 <sup>3</sup> /L	90 a 99	
<sup>a</sup> Ld.ATV. + desinfecção por radiação UV	<i>E. faecalis</i>	1,86 x 10 <sup>1</sup> NMP/100mL		Lee <i>et al.</i> (2006).
	<i>E. coli</i>	6,12 x 10 <sup>2</sup> NMP/100mL		
	<i>H. pylori</i>	Não detectável		
	<i>K. penumoniae</i>	7,47 x 10 <sup>1</sup> NMP/100mL		
	<i>Salmonella</i> spp.	Não detectável		
<sup>b</sup> EfT	<i>E. coli</i>	1,15 x 10 <sup>6</sup> NMP/100mL	12	Payment <i>et al.</i> (2001).
	<i>E. faecalis</i>	1,41 x 10 <sup>5</sup> NMP/100mL	29	
<sup>b</sup> EfT	<i>Salmonella</i> spp.	23 NMP/100mL		Koivunen <i>et al.</i> (2003)
<sup>b</sup> EfT	<i>E. coli</i>	2,14 x 10 <sup>3</sup> NMP/100mL		Fasciolo <i>et al.</i> (2002).
	<i>Salmonella</i> spp.	Positivo/100mL (valor não demonstrado)		

<sup>a</sup> 100 mL de efluente; <sup>b</sup> não especificado o tratamento; <sup>c</sup> percentual de remoção após o tratamento em relação ao EB – Tab. 3.2; <sup>d</sup> valores em frequência percentual presente na última lagoa da série.

LgP –LAGOA DE POLIMENTO; LgA – LAGOA AERADA; LgM – LAGOA DE MATURAÇÃO; Ld ATV. – LODO ATIVADO; LgE- LAGOA DE ESTABILIZAÇÃO; EfT- EFLUENTE TRATADO; LgF – LAGOA FACULTATIVA

O trabalho de Ampofo e Clerk (2003), desenvolvido em Ghana, sobre a diversidade bacteriana presente em lagoas utilizadas para o tratamento de efluentes, com o objetivo de se

avaliar a qualidade do efluente para reutilização, foi bastante amplo. Os autores identificaram qual era a diversidade bacteriana existente após o tratamento, detectando os índices percentuais com que cada um dos 25 gêneros pesquisados aparecia. Eles observaram uma diversidade bacteriana expressiva, sendo que *Pseudomonas* spp. foi o gênero mais frequente (Tabela 3.4), seguido por *Enterococcus* spp., *Escherichia* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Campylobacter* spp., *Shigella* spp. e outros em menores percentuais.

Interessante mencionar que os autores detectaram o aumento de alguns gêneros na quarta lagoa da série em relação à primeira, como por exemplo, *Enterococcus* spp. que não foi detectado na primeira lagoa e na quarta lagoa foi verificada a sua ocorrência com uma frequência de 12%. O trabalho destes autores é de grande importância, uma vez que, não só identificam os possíveis gêneros de bactérias patogênicas que podem estar presentes nos sistemas de tratamento cuja principal característica seja a remoção de patógenos, a exemplo das lagoas, como também avalia os impactos da reutilização desses efluentes.

Já Pant e Mittal (2007) conduziram uma pesquisa em Nova Delhi/Índia, na qual investigaram a presença de bactérias patogênicas, tais como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., e *Vibrio* spp., microrganismos que apresentam alta prevalência em países em desenvolvimento. Os autores avaliaram também indicadores tradicionais, como coliformes e enterococos. O sistema avaliado, constituído por um reator anaeróbio tipo UASB seguido por uma lagoa, não apresentou uma remoção expressiva de microrganismos no efluente final (*Salmonella* –  $10^1$  NMP/100 mL no reator UASB e  $10^2$  NMP/100 mL após a lagoa; *Shigella*  $10^2$  NMP/100mL no reator UASB e  $10^1$  NMP/100mL após a lagoa e *Vibrio*  $10^3$  NMP/100mL no reator UASB e  $10^2$  NMP/100mL após a lagoa). No entanto, o estudo é importante por extrapolar a avaliação para além dos microrganismos indicadores, uma vez que os microrganismos patogênicos, como vem sendo aventado, podem estar presentes em densidades elevadas.

Em outros trabalhos, como os de Payment (2001), Koivunem (2003) e Fasciolo (2002), que apresentaram diferenças importantes na concentração, principalmente, de *E. coli*, não se especificou qual sistema de tratamento foi utilizado. Na Tabela 3.4, excetuando-se os trabalhos de Lee *et al.* (2006), Ampofo e Clerk, (2003) e Ceballos (2000) que incorporaram outras bactérias patogênicas, como por exemplo, os gêneros *Campylobacter*, *Yersinia*, *Helicobacter*, a maioria das pesquisas, tanto aquelas demonstradas na Tabela 3.4, quanto a grande maioria dos trabalhos, avaliando efluentes de lagoas, segue o padrão de avaliação,

restringindo-se praticamente aos organismos indicadores, possivelmente pelos mesmos fatores levantados na avaliação do esgoto bruto.

### 3.5.4 Aplicação das técnicas moleculares para detecção e quantificação de microrganismos patogênicos

Os dados apresentados nas Tabelas 3.3 e 3.4 foram obtidos utilizando-se métodos de detecção e quantificação variados. A Tabela 3.5 apresenta uma lista de alguns dos métodos utilizados, que incluem tanto técnicas convencionais de microbiologia quanto técnicas atuais baseadas em biologia molecular.

**Tabela 3.5** – Métodos para detecção e quantificação de diversos microrganismos patogênicos e não patogênicos em amostras ambientais.

Técnicas		Referência
Convencional	Molecular	
Meio de cultura		Stelzer e Jacob (1991)
Meio de cultura		Martins <i>et al.</i> (1991)
Tubos múltiplos		Pant e Mittal (2007)
Membrana filtrante		Harwood <i>et al.</i> (2005)
	PCR, PCR tempo real, hibridação do DNA genômico,	Lee <i>et al.</i> (2006) Shannon <i>et al.</i> (2007).
	<sup>1</sup> iUPPCR	Peng <i>et al.</i> (2002)
Membrana filtrante		Rose <i>et al.</i> (1996)
Contagem em placa; tubos múltiplos	PCR	Nasser <i>et al.</i> (2007)
Meio de cultura		Payment <i>et al.</i> (2001)
Meio de cultura		Ampofo e Clerk (2003)
Membrana filtrante	PCR	Alonso <i>et al.</i> (2006)
Meio de cultura		Ceballos (2000)
Membrana filtrante e meio de cultura		Dousse <i>et al.</i> (1993)
	<i>FISH</i>	Oliveira e Bernardo (2002)
	PCR	Lu <i>et al.</i> (2002)
	PCR e <i>FISH</i>	Moreno <i>et al.</i> (2003)
	PCR e <sup>2</sup> RT-PCR	Hultén <i>et al.</i> (1998)

<sup>1</sup> *immunocapture Universal Primer* PCR

<sup>2</sup> RT-PCR – PCR transcriptase reversa

Como pode ser observado na Tabela 3.5, diferentes métodos de quantificação são verificados. A utilização de diferentes metodologias para quantificação de microrganismos, ainda que apresente vantagens e desvantagens inerentes a cada uma, geram resultados que não podem ser comparados, o que dificulta a interpretação dos dados dos diferentes trabalhos.

Observa-se pela Tabela 3.5, que há uma tendência atual em se adotar as técnicas moleculares na avaliação de amostras ambientais, devido aos recentes avanços ocorridos nos últimos anos, e que pode se expandir à medida que os laboratórios de pesquisas microbiológicas em amostras ambientais passem a implementá-las e usá-las como uma ferramenta adicional acoplada as técnicas convencionais em uso.

Técnicas moleculares, tais como a PCR e a PCR em tempo real também têm sido utilizadas para avaliar a presença de patógenos em outros tipos de amostras ambientais, como, por exemplo, de biossólidos para utilização na agricultura (BURTSCHER e WUERTZ, 2003).

Dentre os trabalhos citados nas Tabelas 3.3, 3.4 e 3.5, os trabalhos de Lee *et al.* (2006) e Shannon *et al.* (2007) se mostram importantes, por que, além de fazerem extensa avaliação dos organismos patogênicos e não patogênicos em efluentes brutos e tratados por lodo ativado seguido por desinfecção ultravioleta, os autores utilizaram métodos moleculares (hibridação do DNA genômico e a PCR em tempo real).

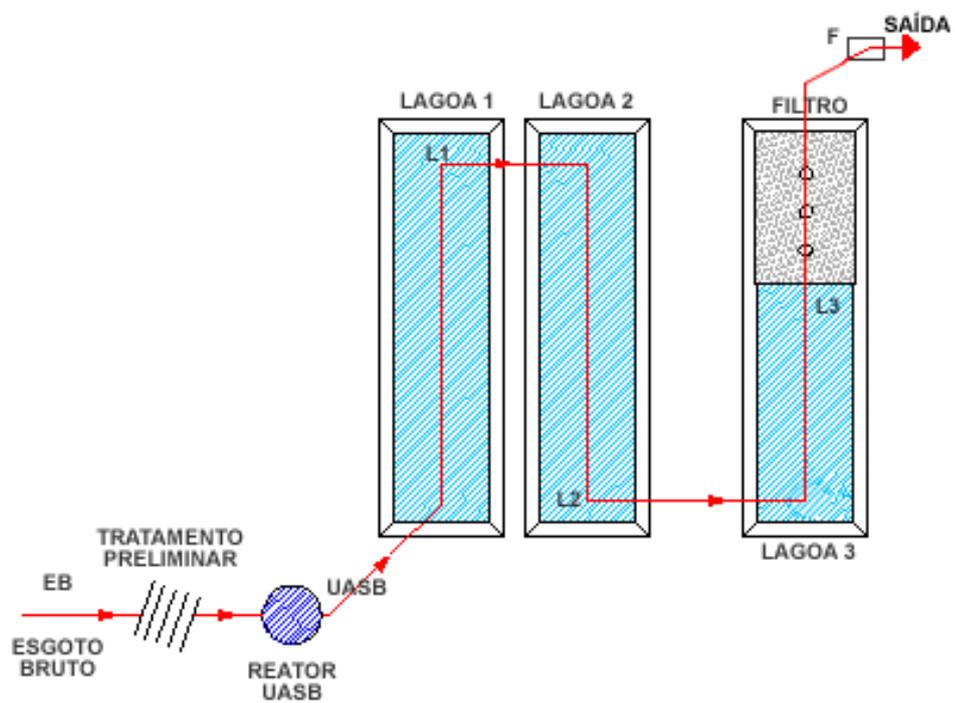
No trabalho de Lee *et al.* (2006), os autores não só utilizaram sondas moleculares já existentes, mas também efetuaram o desenho de novas sondas, fato que é possível que ocorra mais frequentemente no futuro, à medida que novos microrganismos sejam identificados no ambiente e necessitem ser quantificados. Os autores concluíram que as técnicas moleculares propostas foram bem sucedidas, alcançando resultados que permitem seu uso na rotina do monitoramento de patógenos.

## **4 METODOLOGIA**

### ***4.1 Área de estudo e aparato experimental***

A área de estudo faz parte do Centro de Pesquisas e Treinamento em Saneamento CePTS/UFMG/COPASA, e está localizada na ETE Arrudas, na grande Belo Horizonte a 19° 52'42,30"S e 43° 52'43,36" O.

O aparato experimental utilizado para o presente trabalho é composto das seguintes unidades em série: um reator anaeróbio tipo UASB e três lagoas de polimento. O esgoto utilizado é captado após o tratamento preliminar afluente à ETE Arrudas. Ao final da lagoa 3 foi inserido um filtro de pedra com brita 3, utilizado em pesquisas anteriores para avaliar a remoção de algas. O sistema foi utilizado como um todo na fase de identificação das bactérias pela PCR em uma primeira etapa do trabalho e, em uma segunda etapa, foram avaliadas amostras do esgoto bruto, da lagoa 1 e da lagoa 3. As principais características do reator UASB e das lagoas de polimento são apresentadas na Figura 4.1 e nas Tabelas 4.1 e 4.2. Os pontos de coleta estão apresentados na Tabela 4.3.



**Figura 4.1** – Fluxograma e vista parcial do aparato experimental: UASB, Lagoas 1, 2, 3 e Filtro

**Tabela 4.1 - Características do reator UASB e das lagoas de polimento**

Reator UASB	Lagoas de Polimento 1 e 2	Lagoa de Polimento 3
Volume: 14,2 m <sup>3</sup>	Volume: 125 m <sup>3</sup>	Volume: 42 m <sup>3</sup>
Altura: 4,5 m	Comprimento no fundo: 25,00 m	Comprimento no fundo: 16,56 m
Diâmetro: 2,0 m	Largura no fundo: 5,25 m	Largura no fundo: 5,25 m
	Profundidades médias: 0,75 m e 0,70 m respectivamente	Profundidade média: 0,50 m
Vazão Média: 29 m <sup>3</sup> /d	Vazão Média: 29 m <sup>3</sup> /d	Vazão Média: 29 m <sup>3</sup> /d
TDH: 11,7 h	TDH: 4,3 d    TAH: 0,15 m <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> .d	TDH: 1,5 d    TAH: 0,22 m <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> .d

TDH: Tempo de detenção hidráulica; TAH: Taxa de aplicação hidráulica

**Tabela 4.2 - Características do filtro de pedra (brita 3)\***

Comprimento do fundo: 8,44 m	Altura da lâmina d'água: 0,50 m
Largura a 0,40 m de altura: 6,05 m	Altura do filtro: 0,70 m
Comprimento a 0,40 m de altura: 8,44 m	Inclinação dos taludes: 45°
Largura no fundo: 5,25 m	TAH: 0,52 m <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> /dia

\*O filtro de pedra é componente do sistema, no entanto, o efluente do filtro não foi avaliado nesta pesquisa

**Tabela 4.3 - Descrição dos pontos e tipo de amostragem**

Ponto de coleta	Descrição do ponto	Tipo de amostragem
EB	<sup>1</sup> Esgoto Bruto	Composta
UASB	<sup>1</sup> Efluente do reator UASB	Composta
L1	Efluente da Lagoa 1	<sup>2</sup> Composta (por toda a profundidade)
L2	Efluente da Lagoa 2	Composta (idem)
L3	Efluente da Lagoa 3	Composta (idem)

<sup>1</sup>Coleta composta para a análise dos parâmetros físico-químicos e pontual para os microbiológicos.

<sup>2</sup>A coleta composta das lagoas, por toda a profundidade, consiste em coletar a amostra nas três alturas das lagoas (fundo, meio e superfície) utilizando para isto um amostrador em coluna feito em PVC e corresponde a aproximadamente uma coleta composta pelo tempo.

## **4.2 Coleta e preparo das amostras para as etapas a serem desenvolvidas**

### **4.2.1 Objetivo específico 1 - Identificação das bactérias pela técnica da PCR**

Para a identificação das bactérias selecionadas utilizando-se a técnica da PCR, a data das coletas, os pontos de coleta e os volumes coletados estão especificados na Tabela 4.4. As datas das coletas foram selecionadas casualmente, ou seja, não foi considerado nenhum evento específico para se fazer a coleta. As amostras das lagoas foram coletadas sempre dos pontos de saída do efluente.

**Tabela 4.4 - Descrição das coletas**

Data das coletas	Amostras coletadas	Volume coletado
25/04/2007 27/02/2008	EB, UASB, L1, L2, L3	2 Litros
11/02/2009 27/05/2009	EB, L1, L3	

Inicialmente foram determinadas apenas duas coletas, devido ao fato de que seria necessário realizar uma série de testes preliminares, até se adaptar e padronizar a maioria das etapas das técnicas de biologia molecular para as amostras a serem avaliadas, principalmente a PCR, no estabelecimento da rotina. Posteriormente, quando se estabeleceu a rotina a ser adotada, optou-se por fazer mais duas coletas. Ressalta-se que na terceira e quarta coletas os pontos amostrados passaram a ser somente o EB, a L1 e a L3 e não mais o sistema completo, devido às dificuldades verificadas na etapa de filtração das amostras das lagoas e a demanda de tempo para se avaliar cinco pontos de monitoramento. O volume especificado (2 L) foi integralmente utilizado para se fazer a extração do DNA a ser utilizado nas reações da PCR.

As amostras foram coletadas em garrafas plásticas de 2 L, previamente lavadas com uma solução de Extran a 1%, enxaguadas com água de torneira e secas. Após a secagem, foram novamente enxaguadas com água destilada, porém não foram autoclavadas. Após a coleta, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia do DESA/UFMG preservadas em gelo.

As amostras provenientes das lagoas foram pré-tratadas segundo metodologia descrita em Godinho *et al.* (2007) considerando o fato de a amostra ser muito diluída e principalmente devido a elevada concentração de algas existentes nas lagoas que poderia interferir na reação de PCR. O pré-tratamento adotado consistiu basicamente em filtrar as amostras em filtro de 12,5 cm de diâmetro e 8,0 µm de porosidade (Filtros J-Prolab-faixa azul), e em seguida através de membrana éster-celulose, de 47 mm de diâmetro e porosidade 1,2 µm, Milipore, ou equivalente.

Em seguida, as amostras filtradas foram submetidas a uma etapa de concentração por centrifugação a 4.000 rpm, durante 30 minutos, para se obter uma quantidade de biomassa suficiente para se fazer extração do DNA das bactérias a serem pesquisadas. O esgoto bruto e o efluente do UASB foram centrifugados a 4.000 rpm por 20 minutos diretamente, sem passar

por nenhum processo de purificação prévio. O sedimento obtido da centrifugação das amostras foi mantido a -20 °C até se fazer a extração do DNA.

#### **4.2.2 Objetivo específico 2 - Quantificação pela técnica de FISH das bactérias detectadas a partir da PCR**

As amostras para quantificação de bactérias patogênicas pela técnica de FISH, detectadas a partir da PCR, também foram coletadas nas datas mencionadas na Tabela 4.4. O volume coletado foi de 200 mL para cada ponto de amostragem especificado. O mesmo processo de filtração (adotado no presente trabalho para tentar diminuir a interferência das algas) e descrito anteriormente foi aplicado para as amostras oriundas das lagoas, nesta etapa do trabalho.

A centrifugação foi feita a 4.000 rpm por 30 minutos, baseando-se em Falco (2005) e Lemarchand *et al.* (2005). O sedimento foi ressuspensionado em uma solução de PBS 1X. O processo de fixação das amostras foi feito no dia da coleta, para preservar a integridade da célula, utilizando-se uma solução contendo paraformaldeído 4% e NaOH 1N, conforme o protocolo proposto por Hahn (2001). O processo de fixação consiste das seguintes etapas:

1. misturar em um tubo *epENDORF* de 2,0 mL, um volume (375 a 500 µL a depender do volume de sedimento obtido após a centrifugação) da amostra (que estava previamente no PBS 1X) em três volumes da solução de fixação (1:3) e agitar;
2. fixar por 3 a 16 horas (ou “overnight”) a 4 °C; centrifugar a 7.600 rpm por 5 minutos e descartar o sobrenadante; lavar 2 vezes com 1 mL de PBS 1X (centrifugando-se a 7.600 rpm por 5 minutos cada vez); ressuspender em PBS 1X e adicionar etanol 100%, gelado (proporção 1:1);
3. armazenar a - 20 °C (congelador) por tempo indeterminado.

#### **4.2.3 Objetivo específico 3 - Comparação das técnicas FISH e substrato cromogênico – Colilert® na quantificação de *E. coli***

Para a comparação das técnicas de FISH e Colilert® na quantificação de *E. coli* procedeu-se a coleta em seis campanhas amostrais, nas datas 19/09/2007, 22/11/2007, 27/02/2008, 02/04/2008, 11/02/2009 e 27/05/2009. O volume de amostra coletado foi de 200 mL para se aplicar a técnica de FISH e 100 mL para a técnica do Colilert® para os pontos, EB, L1 e L3.

Assim como descrito no item 4.2.1, optou-se por trabalhar com os pontos de coleta mencionados, primeiramente devido ao volume de trabalho que a avaliação do sistema completo geraria, e depois porque tais pontos constituem a amostra afluenta, um ponto intermediário e a amostra efluente, e desta maneira seria possível avaliar a possível ocorrência do decaimento bacteriano no sistema pelas duas técnicas. O processo de filtração e centrifugação das amostras, assim como a fixação destas, para se aplicar a técnica de FISH foi feito como descrito no item 4.2.2. As amostras obtidas das lagoas para aplicação da técnica Colilert® não receberam nenhum pré-tratamento.

### **4.3 Procedimentos para identificação das bactérias pela técnica PCR**

#### **4.3.1 Extração do DNA para as análises da PCR**

Para a extração do DNA foram avaliados dois protocolos, descritos a seguir.

##### **Protocolo 1**

A extração do DNA das amostras foi feita inicialmente pelo método proposto por Yu e Mohn (1999), modificado por Lemarchand *et al.* (2005), e consiste das seguintes etapas:

1. centrifugar 1 mL da amostra a 16.000g por 10 minutos e desprezar o sobrenadante;
2. adicionar 2,0 g de pérola de vidro (1,0 mm) e 1 mL de tampão de extração [50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA, 3% de SDS];
3. levar ao microdesmembrador à velocidade máxima (4.800 rpm) por 2,5 minutos;
4. resfriar por 1 minuto e repetir a agitação no microdesmembrador por mais 2,5 minutos;
5. centrifugar a 16.000g por 3 minutos e coletar o sobrenadante;
6. ressuspender o sedimentado em 1 mL do tampão de extração [50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA, 3% de SDS];
7. repetir a etapa do microdesmembrador para evitar a perda de DNA e juntar os sobrenadantes;
8. precipitar as impurezas para purificar o DNA em 1 volume de acetato de amônia concentração final de [2 M] e levar ao banho de gelo por 5 minutos; centrifugar a 16.000g por 5 minutos e coletar o sobrenadante;
9. repetir a etapa de purificação para eliminar impurezas residuais do sobrenadante;

10. precipitar o DNA com 1 volume de isopropanol a - 20° C, por 50 minutos ou “overnight” e centrifugar a 16.000g por 15 minutos;
11. lavar o DNA com etanol 70%, centrifugar por mais 5 minutos e secar ao ar;
12. dissolver o DNA em 400 µl de tampão TE 1x (Tris [1 M] 10 mM; EDTA [0,5 M], 1 mM);
13. precipitar em 2,5 volumes de etanol 100%, centrifugar por 15 minutos a 16.000g;
14. lavar o DNA com 1 mL de etanol 70%, centrifugar por 15 minutos e ressuspender cada sedimento em 50 µl de TE 1x.

Nas primeiras extrações, que consistiram de testes, o protocolo anterior foi aplicado da maneira como descrita, já para as demais extrações foi necessário se fazer alguns ajustes na metodologia a fim de adequá-la às amostras a serem investigadas, particularmente o efluente das lagoas. As modificações foram basicamente: diminuir o volume de pérola de vidro para 1,5 g e agitar no vórtex após a adição do acetato de amônia para permitir maior contato do reagente com a amostra.

A principal modificação efetuada, no entanto, foi a redução das lavagens do DNA. As etapas 12 a 14 foram excluídas, já que se mostraram desnecessárias e com isso evitou-se a perda de DNA. Desta forma, após a etapa 11, o material obtido foi ressuspendido em 50 µL de tampão TE 1x. As amostras de DNA extraídas foram, então, precipitadas em 0,1 V de Acetato de Sódio 3M, pH 5,5 e em 2-2,5 V de etanol absoluto.

Outro método de extração de DNA também foi utilizado, em princípio, para se comparar as metodologias.

## **Protocolo 2**

Para a nova extração do DNA microbiano, optou-se pelo protocolo descrito por Egli *et al.* (2003). Este protocolo consiste das seguintes etapas:

1. centrifugar 2 mL da amostra a 16.000g por 5 minutos e desprezar o sobrenadante;
2. ressuspender o sedimento em 900 µl de tampão de homogeneização TEN (0,1M NaCl, 10mM Tris HCl e 1mM de EDTA, pH 8,0) e transferir para um tubo de rosca adicionando 0,2 g de pérola de vidro de 1 mm de diâmetro.
3. levar ao microdesmembrador à velocidade máxima de 4.000 rpm por 1 minuto;

4. resfriar em gelo por 1 minuto e repetir a agitação no microdesmembrador;
5. deixar sedimentar por aproximadamente 5 minutos antes de coletar o sobrenadante (o sobrenadante é coletado sem centrifugação);
6. adicionar à amostra 1 volume de Fenol tamponado (Tris-Fenol 1:1) (pH 8,0);
7. homogeneizar em vórtex e acrescentar 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1 vol/vol);
8. agitar no vórtex e centrifugar a 12.000 g ou 13.000 rpm por 10 minutos a 4° C;
9. transferir a fase aquosa para novo tubo *eppendorf*;
10. repetir a etapa 7 caso a amostra não esteja pura (presença de cor na fase líquida);
11. agitar no vórtex e centrifugar novamente a 12.000 g ou 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C;
12. repetir esta etapa enquanto a amostra apresentar contaminantes;
13. precipitar o DNA com 2 volumes de etanol e 0,1 V de acetato de sódio 3M (pH 5,2) por 1 hora e meia a -80° C ou *overnight* a -20° C; o etanol pode ser substituído por 1 volume de isopropanol gelado;
14. centrifugar a 13.000g por 20 minutos e descartar o sobrenadante;
15. adicionar 300 µl de uma solução de etanol 70% para lavar o DNA e para remover os sais e centrifugar a 12.000g ou 13.000 rpm por 10 minutos;
16. retirar o sobrenadante e verter o tubo sobre um papel toalha (para escorrer todo o etanol) e deixar o DNA secar ao ar por mais ou menos 30 minutos;
17. ressuspender o DNA em 50 µl de água ultra-pura estéril previamente aquecida ( $\pm 70^{\circ}$  C) e armazenar a -20° C.

Para ambos os protocolos as extrações de DNA foram feitas em duplicata ou triplicata, a depender da quantidade de amostra gerada na fase de preparo da amostra. Os sedimentos obtidos eram unificados em único tubo. Após a extração, alíquotas de 5,0 µl de cada amostra extraída, adicionadas a 1,0 µl de tampão de corrida, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% a 75 V por 40 minutos. O marcador de DNA (*Ladder*) utilizado para verificar a positividade da extração foi o de 1 Kb/Fermentas (Figura 4.3).

O gel foi, então, corado em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) por aproximadamente 15 minutos e em seguida submerso em água destilada por 5 minutos a fim de remover o excesso de brometo. A visualização e obtenção das imagens foram feitas em um transiluminador de luz UV (de 300 nm) para verificar a presença de bandas fluorescentes e a confirmação positiva da extração do DNA. A composição das principais soluções, utilizadas nas metodologias, está descrita no Apêndice.

#### 4.3.2 Condições de amplificação do DNA

As concentrações e volumes das reações da PCR estão apresentados na Tabela 4.5. As reações ocorreram em presença de tampão de reação (*Phonutria*), *primers* (*Bioneer*), dNTP (*Fermentas*), BSA (*Sigma*), enzima *Taq* polimerase (*Phonutria*). Para todos os pares de *primers* utilizados, as reações da PCR foram feitas, no mínimo, em dois eventos diferentes, sendo que para alguns *primers* as reações foram repetidas por quatro ou mais eventos diferentes, a fim de confirmar os resultados.

**Tabela 4.5** - Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de PCR

Reagentes	Concentração estoque	Concentração por reação	Volume (µL)
Água ultra-pura	-	-	16,875
*Tampão	10X	1X	2,5
dNTP	10 mM Total	0,2 mM Total	0,5
<i>Primer 1</i>	10 pmol/µL	0,3 pmol/µL (300 nM)	0,75
<i>Primer 2</i>	10 pmol/µL	0,3 pmol/µL (300 nM)	0,75
BSA	2,5 mg/mL	0,3 µg/µL	3,0
<i>Taq</i> Polimerase	5 u/µL	0,7 u	0,125
DNA <i>template</i>			0,5
Volume total			25 µL

\* Tampão acrescido de 50mM de MgCl<sub>2</sub> (concentração por reação 1,5 mM)

Foram desenvolvidos programas com uma temperatura de anelamento específica, determinada por meio de reações da PCR com culturas puras das bactérias, para cada par de primer testado. As condições de amplificação do DNA pela técnica da PCR foram feitas seguindo as seguintes condições:

- desnaturação inicial: 3 minutos a 94 °C;
- desnaturação: 30 ciclos de 60 segundos a 94 °C;

- anelamento: 1 minuto a T° específica determinadas a partir das culturas puras (55 °C para a maioria das bactérias, 57 °C para *Enterococcus*, 60 °C para os gêneros *Campylobacter* e *Yersinia*).
- extensão: 1 minuto a 72 °C;
- extensão final: 7 minutos a 72 °C.

As temperaturas, inicial e final, foram de 94 °C e 4 °C, respectivamente. Para a análise das bactérias investigadas foram utilizados pares de *primers* específicos para cada grupo alvo, e estão listados na Tabela 4.6. As culturas puras utilizadas neste trabalho são apresentadas na Tabela 4.7, assim como o gradiente de temperatura testado e a fonte das culturas.

**Tabela 4.6 - Primers específicos utilizados na detecção de bactérias patogênicas por PCR**

Bactéria	Nome dos primers	Sequência (5' → 3')	Gene alvo	Amplicon (pb)	*T. (°C)	Referência
<i>E. coli</i> Total	L-uid739	tggaattaccgacgaa aacggc	<i>uidA</i>	840	65	Bej (2004); Bej <i>et al.</i> (1991).
	R-uid578	gtggcgaaatattcccg tgcact				
<i>E. coli</i> (EHEC)	L-vt2a	ttaaccacacccacggcagt	vt	346	55	Bej <i>et al.</i> (2004); Pollard <i>et al.</i> (1990).
	Lvt2b	gctctggatgcatctctggt				
Salmonella Typhimurium	L-himA	cggtgctctgaaaacgggtgag	<i>himA</i>	123	65	Bej <i>et al.</i> (1994).
	R-himA	cggtgctgtaataggaata tcttca				
<i>Salmonella</i> spp.	Sal-3	tatcgccacgcttcgggcaa	gene <i>invA</i>	275	50	Wang <i>et al.</i> (1997).
	Sal-4	tcgaccgctcaaaggaacc				
<i>Shigella dysenteriae</i>	L-phoBR	attgaagccgcgccc acgcaa	<i>phoB-phoR</i>	152	68	Bej (2004)
	R-phoBR	cggtgcctgacaccttgaggg				
<i>Shigella</i> spp.	Shi-1	cttgaccgcctttccgatac	gene <i>ipah</i>	610	50	Wang <i>et al.</i> , (1997)
	Shi-2	cagccacctctgagagta				
<i>Enterococcus</i> spp.	Ent1	tactgacaaaccattcatgatg	gene <i>tuf</i>	112	55	Ke <i>et al.</i> (1999)
	Ent2	aacttcgtcaccaacgcgaac				
<i>H. pylori</i>	HP1	gcaatcagcgtcagtaatgttc	DNAr 16S	521	55	Lu <i>et al.</i> (2002).
	HP2	gctaagagatcagcct atgtcc				
<i>Y. enterocolitica</i>	Y.16S-86f	gcggcagcgggaagt agtta	DNAr 16S	416	53	Burtscher e Wuertz (2003).
	Y.e.eur.16 S-455r	caatcacaaggtattaacc tttatg				
	YE-1	ctgtcttcatttgagcattc	Gene de enterotoxina	159	-	Wang <i>et al.</i> (1997); Ibrahim <i>et al.</i> (1992).
	YE-2	gcaacatacatcgcaaatc				
<i>S. aureus</i>	<i>nuc1</i>	gcgattgatggtgatacggtt	Gene <i>nuc</i>	270	55	Burtscher e Wuertz (2003).
	<i>nuc2</i>	agccaagccttgacgaactaa gc				
<i>C. jejuni</i>	CL2	tgacgctagtgtttaggag	DdeI	402	48	Ng <i>et al.</i> (1997); Wang <i>et al.</i> (1999); Vargas <i>et al.</i> (2005); Magistrado <i>et al.</i> (2001).
	CR3	ccatcatcgctaagtgaac				

\*Temperatura de anelamento recomendada pelos autores dos artigos de referência

**Tabela 4.7** - Culturas puras de bactérias, gradiente de temperatura e fonte das culturas.

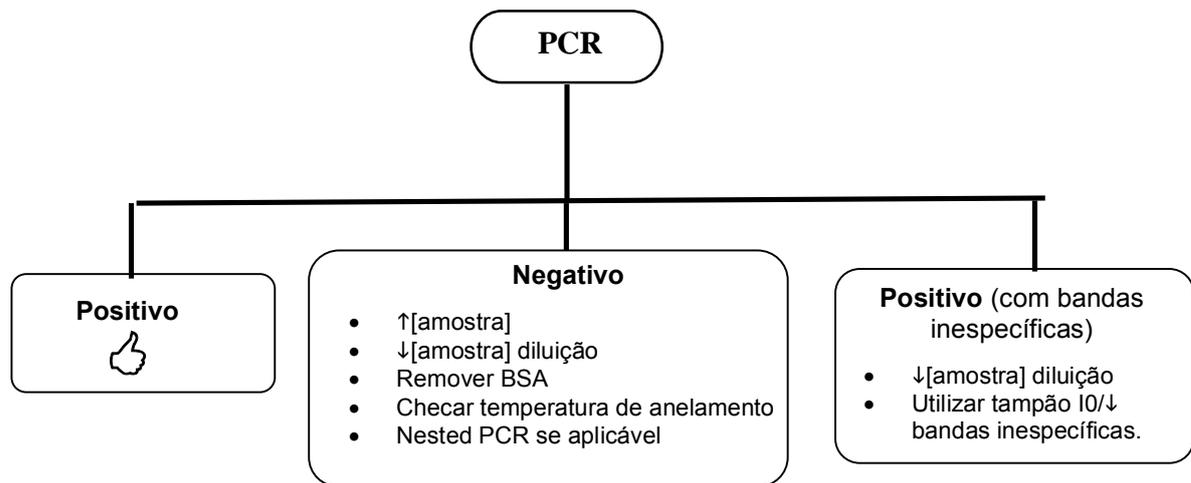
<b>Bactéria</b>	<b>Primers</b>	<b>Gradiente de Temperatura (°C)</b>	<b>Fonte das culturas</b>
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	L-uid73 R-uid578	49,2 a 62,0	Laboratório Micra*
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Ent1 Ent2	49,2 a 62,0	Laboratório Micra *
<i>Helicobacter pylori</i>	HP1 HP2	51,5 a 59,5	Hospital das Clínicas (UFMG)
<i>Salmonella</i> spp.	L-himA R-himA	51,5 a 59,5	Fundação Ezequiel Dias (FUNED)**
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 23175	Shi-1 Shi-2	51,5 a 62,0	Fundação André Tosello***
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	nuc1 nuc2	51,5 a 59,5	Laboratório Micra*
<i>Shigella sonnei</i> ATCC 23175	L-phoBr R-phoBr	51,5 a 62,0	Fundação André Tosello***
<i>Salmonella</i> spp.	Sal-3 Sal-4	51,5 a 59,5	Fundação Ezequiel Dias (FUNED)**
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 25931	Y.e.eur.16S-86f Y.e.eur.16S-455r YE-1 YE-2	49,2 a 62 45,8 a 59,6	Fundação André Tosello***
<i>Campylobacter jejuni</i>	CL2 CR3	45,8 a 59,6	Escola de Veterinária (UFMG)

\*Laboratório Micra (Microbiologia de Anaeróbios), Belo Horizonte, MG

\*\*Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG

\*\*\*Coleção de Culturas Tropicais da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello, Campinas, SP.

Para *E. coli* EHEC, não se conseguiu a amostra de cultura pura. Ainda assim procederam-se testes na tentativa de se estabelecer as condições de temperatura para a reação da PCR. As melhores temperaturas de anelamento para cada par de *primers* foram determinadas por meio de reações da PCR com culturas puras em um termociclador com gradiente de temperatura (*Mastercycler Gradient, Eppendorf*), onde foram testadas simultaneamente várias temperaturas diferentes. Devido à diferença nas características das amostras analisadas, uma estratégia para a PCR foi elaborada a fim de garantir os resultados de amplificação (Figura 4.2).



**Figura 4.2** - Fluxograma da estratégia de PCR.

O fluxograma pode ser interpretado da seguinte maneira:

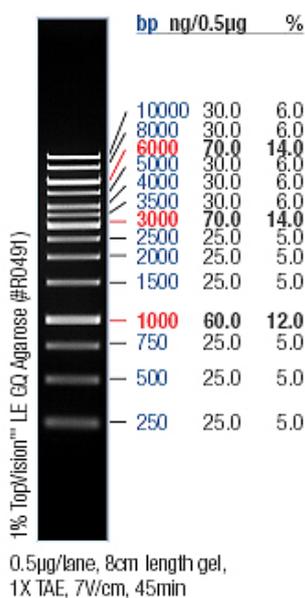
- se o resultado da PCR fosse positivo, as condições foram ideais;
- se o resultado da PCR fosse negativo, primeiramente, aumentar-se-ia a quantidade de amostra. Permanecendo negativo, diminuir-se-ia a quantidade de DNA através de diluições. As diluições também seriam importantes na tentativa de reduzir contaminantes que poderiam inibir a reação da PCR. A terceira opção seria remover o BSA do “mix”. Permanecendo negativo o resultado, a próxima opção seria checar a temperatura de anelamento e por último, a técnica do “Nested PCR” (reamplificação de um fragmento a partir de um produto da PCR previamente amplificado) seria a opção, quando aplicável;
- se o resultado da PCR fosse positivo, porém com bandas inespecíficas, as opções seriam: diminuir a quantidade de amostra através de diluições ou usar um tampão sem magnésio testando-se diferentes concentrações de magnésio a serem acrescidas.

Os resultados da PCR podem ser interpretados da seguinte maneira:

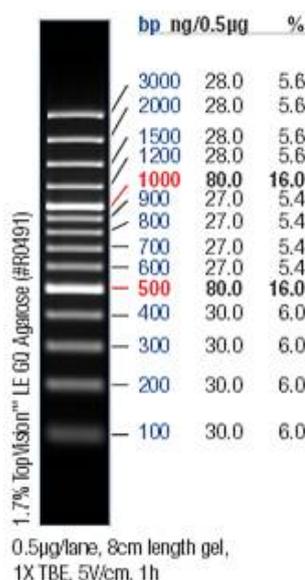
1. Resultado positivo: é verificado pela presença de bandas no gel, do fragmento de interesse, de acordo com o tamanho do fragmento amplificado, no *ladder* (não importando a intensidade da banda).
2. Resultado negativo: é verificado pela ausência de bandas no gel, e implica que o gênero ou a espécie investigada estava ausente na amostra, ou estava abaixo do limite de detecção da técnica.

O limite de detecção da técnica pode variar entre microrganismos, tipo de amostra, concentração de MgCl<sub>2</sub>, concentração da *Taq* DNA polimerase, temperatura de anelamento dos *primers*, método de extração do DNA entre outros fatores. É possível obter amplificação pela PCR a partir de volumes de amostras em que haja desde uma única célula ou até concentrações mínimas de 10<sup>2</sup> cel/mL (WILSON, 1997; TYLER *et al.*, 1997).

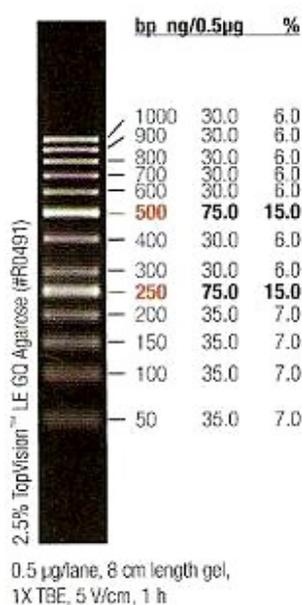
Uma vez estabelecidas às melhores condições de amplificação para cada amostra e para cada conjunto de *primers*, as reações da PCR para as amostras foram repetidas no mínimo, duas vezes, para garantir a confirmação do resultado. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose entre 1 e 2% (a depender do tamanho do fragmento) para verificação dos resultados. Os géis foram corados em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e observados em um transiluminador de luz UV (UVP Products). As imagens dos géis foram registradas por um sistema de captura de imagem. Os *ladders* utilizados foram i) GeneRuler 1Kb, ii) O'GeneRuler 100 bp, iii) O'GeneRuler 50 bp todos da Fermentas. As Figuras 4.3 a 4.5 ilustram os padrões dos *ladders* utilizados.



**Figura 4.3** – Padrão do *ladder* GeneRuler 1Kb.



**Figura 4.4** – Padrão do *ladder* O'GeneRuler 100 bp.



**Figura 4.5** – Padrão do *ladder* O'GeneRuler 50 bp.

#### 4.4 Hibridação de células por FISH

As amostras previamente fixadas foram aplicadas na superfície das lâminas de teflon contendo 10 pocinhos de 8 mm de diâmetro (*MP Biomedicals*). As sondas utilizadas foram

para *E. coli*, *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp., *Campylobacter* spp., e estão descritas na Tabela 4.8. A sonda NON 338 é utilizada como controle negativo, uma vez que ela não é complementar a nenhuma área da região alvo. Nesse caso, ao se aplicar a sonda e na visualização microscópica houver emissão de brilho, considera-se o resultado como falso-positivo.

A especificidade dos microrganismos às sondas foi checada em “bancos de sondas” no qual é possível verificar a existência de similaridade entre o microrganismo e a sequência de nucleotídeos das sondas. A sonda ECO 45a (ECO-1167) foi checada através do programa “Probase” (*an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes* - disponível em <http://www.microbial-ecology.net/probase>). As demais sondas (*uidA*, Sal - 3, CAJECO 1427, Enf-191, Enc 38 foram cheçadas pelo programa NCBI/BLAST (*National Center for Biotechnology Information/Basic Local Alignment Search Tool*) disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Para todas as sondas foram aplicados controles positivos e negativos utilizando-se cultura pura de bactérias a fim de garantir a especificidade das sondas.

**Tabela 4.8** - Descrição das sondas.

Nome da sonda	Especificidade	Sequência (5'→3')	Alvo	(%) FA Referenciado	(%) FA usado	Cromóforo	Referência
ECO 45a (ECO 1167)	<i>E.coli</i>	gcataagcgctcg ctgccg	RNAr 23S	40	30	Cy3	Neef <i>et al.</i> (1995)
<i>uid-A</i> *	<i>E. coli</i>	ccgaacacctg ggtggacgatata	<i>uidA</i>	NE	30	Cy3	Bej (2004)
Sal - 3	<i>Salmonella</i> spp.	aatcacttcacct acgtg	RNAr 23S	NE	20	Cy3	Nordentoft <i>et al.</i> (1997)
CAJECO 1427	<i>Campylobacter</i> spp.	agccctaagcgt ccttc	RNAr 23S	20 a 35	20	Cy3	Schmid <i>et al.</i> (2005a)
ENF 191	<i>Enterococcus faecalis</i>	gaaagcgccttt cactcttatgc	RNAr 16S	20	30	Cy3	Wellinghausen <i>et al.</i> (2007)
ENC 38	<i>Enterococcus</i> spp.	ccctctgatgggt agggt	RNAr 23S	20	15	Cy3	Frahm <i>et al.</i> (2001); Kempf <i>et al.</i> (2000)
NON 338	Controle negativo	actcctacggga ggcagc	Não se liga a nenhum grupo específico				Wallner <i>et al.</i> (1993)

FA - Formamida

NE – não especificado

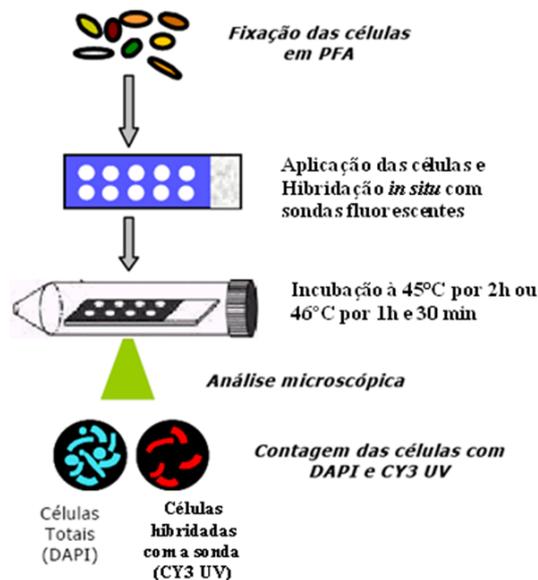
Obs. A sonda CAJECO 1427 foi positiva para cultura pura de *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* e outras em baixa intensidade, conforme o autor referenciado.

\* sonda testada mas não utilizada para geração de resultados

O protocolo de hibridação utilizado foi proposto por Hahn (2001). As etapas do protocolo estão descritas a seguir:

1. aplicar 1  $\mu$ L de amostra no pocinho e espalhar com a ponteira;
2. incubar a lâmina em estufa a 46 °C por 40 minutos para secar;
3. desidratar as células aderidas à lâmina por imersão serial em banhos de etanol 50, 80 e 100% (3 minutos cada) e deixar secar;
4. antes de iniciar a hibridação, aquecer os tampões de hibridação e lavagem a 48 °C e a câmara escura de hibridação (papel embebido em tampão de hibridação);
5. adicionar em cada pocinho 9  $\mu$ l de tampão de hibridação aquecido contendo a quantidade de formamida específica para cada sonda (concentração 50 ng/ $\mu$ l) e 1  $\mu$ l da sonda espalhando com a ponteira;
6. incubar a lâmina em câmara úmida escura em estufa a 45 °C por duas horas ou a 46 °C por 90 minutos;
7. imergir a lâmina em tampão de lavagem a 48° C por 15 a 20 minutos, em banho maria, e em seguida mergulhar a lâmina em água ultra pura por 10 segundos para remover sais e SDS e secar em temperatura ambiente no escuro;
8. adicionar 9  $\mu$ L de água ultra pura e 1 a 2  $\mu$ l do corante DAPI (4,6-diamidino-2-phenilindol, Sigma) a 0,001% e espalhar com a ponteira para corar o DNA de todas as células;
9. deixar o DAPI agir por 10 minutos em temperatura ambiente no escuro;
10. retirar o DAPI mergulhando a lâmina em água destilada rapidamente e deixar secar;
11. aplicar sobre cada pocinho 6  $\mu$ L de uma solução com 80% glicerol e 20% PBS 1X;
12. guardar as lâminas no escuro e sob refrigeração a 4 °C até a observação ao microscópio.

A Figura 4.6 apresenta de forma simplificada o preparo de uma lâmina de FISH, conforme a descrição do protocolo.



**Figura 4.6** – Representação esquemática do preparo de uma lâmina de FISH em laboratório. (Fonte: Araújo, J. C. *et al.*, 2009).

As lâminas foram visualizadas sob microscopia óptica em microscópio Olympus BX-50 em objetiva de imersão, para aumento de 1.000 vezes, sob epifluorescência e contraste de fase. A microscopia de contraste de fase foi utilizada somente para ajustar o foco da imagem, antes da observação sob a luz ultravioleta. Foram utilizados filtros específicos com espectro de absorção entre 510 a 550 nm e de 330 a 385 nm para captação de emissões de fluorescência da sonda e do DAPI, respectivamente (ABREU, 2006).

A formamida é um reagente que fortalece a ligação entre a molécula alvo e a sonda, permitindo a melhoria da hibridação e, conseqüentemente, a intensidade do sinal na emissão de fluorescência. A depender da quantidade de formamida utilizada, as células podem emitir um sinal fluorescente mais ou menos intenso.

A interferência da formamida na qualidade do sinal fluorescente é de extrema importância. Ainda que os autores de referência das sondas indiquem o percentual de formamida a ser acrescentado ao tampão de hibridação, sugere-se que a cada sonda a ser utilizada sejam feitos testes com percentuais de formamida diferentes, a fim de garantir que o sinal emitido pela sonda seja adequado e com isso se distinguir as células com a melhor clareza possível. Para todas as sondas, diferentes concentrações de formamida foram testadas, para se chegar ao percentual adequado que proporcionasse uma boa qualidade da hibridação e emissão de sinal fluorescente (conforme Tabela 4.8).

#### 4.4.1 Quantificação das bactérias

O critério de contagem dos microrganismos pela técnica de FISH varia entre autores, Araújo (2001) relata que 20 campos microscópicos ou 1.000 células coradas com DAPI são suficientes para se ter uma amostra representativa. Biesterfeld e Figueroa (2002) optaram por contar 10 campos microscópicos para amostras de biofilmes. Abreu (2006) contou 20 campos microscópicos para amostras de lodo de UASB. Falco (2005), para amostras de lagoas de estabilização, seguiu o protocolo de Araújo (2001). Oliveira e Bernardo (2002) contaram o número de salmonelas hibridadas com a sonda em cinco campos microscópicos, para amostras de alimentos e amostras ambientais. As variações de contagens verificadas entre autores são devidas, principalmente, ao tipo e à qualidade da amostra.

Procedeu-se à contagem de 10 campos microscópicos, que continham, no máximo, 100 células coradas com o corante DAPI, totalizando-se 1.000 células coradas com DAPI. Cada amostra foi hibridada em três pocinhos distintos aplicando-se 1 µL em cada um. Em uma primeira etapa as células foram contadas *in loco*, por meio da visualização direta das células através da ocular do microscópio. Posteriormente o laboratório do DESA adquiriu um sistema de captura de imagem acoplado ao microscópio, onde as imagens eram capturadas e a contagem das células passou a ser feita pela sua visualização no monitor do computador.

Os resultados são expressos em células hibridadas/mL, utilizando-se a seguinte equação:

$$N^{\circ} \text{ células} = \frac{\text{área do pocinho} \times N^{\circ} \text{ de células por campo}}{\text{Área do campo visual}} \quad (4.1)$$

Onde:

- Área do pocinho = 50,24 mm<sup>2</sup> (para a lâmina especificada anteriormente)
- Número de células por campo = valor médio de células contadas em 10 campos visuais.
- Área do campo visual = 0,038 mm<sup>2</sup> (o fator de redução da câmera acoplada ao microscópio e utilizada para fotografar a área do campo visual corresponde a 2/3 do campo original, o que dá um valor do campo visual de 0,025 mm<sup>2</sup>).
- Correção dos valores de acordo com o tratamento de diluições e concentrações dispensadas para cada amostra.

Como relatado anteriormente a visualização das células marcadas com o corante DAPI é de fundamental importância para se certificar que as células que hibridaram com a sonda também estavam hibridadas com o corante DAPI. Isto garante que a hibridação de uma célula com a sonda não seja em decorrência de resíduos ou partícula inerte. A determinação do número total de células da amostra coradas com o corante DAPI foi feita para as amostras do EB e da L3 devido às dificuldades verificadas em se contar as células coradas com o DAPI, sobretudo nas amostras das lagoas, uma vez que em um único campo havia centenas de células, de tamanho muito reduzido. Os valores de todas as quantificações efetuadas, incluindo o de células totais, foram expressos em 100 mL de amostra.

#### **4.4.2 Quantificação de *E. coli* pelo método do substrato cromogênico/Colilert®**

Para a quantificação de *E. coli* pela técnica do substrato cromogênico/Colilert® foi utilizado o sistema Quanti-Tray 2000, que permite uma leitura na faixa de 1 a 2.419 (NMP/100mL), a partir de uma tabela estatística com limite de confiança de 95% para os valores determinados (CHERNICHARO *et al.*, 2001). As análises foram realizadas de acordo com os procedimentos do *Standard Methods for the examination of water and wastewater AWWA/APHA/WEF 9223B* (APHA, 2005), objetivando-se a avaliação quantitativa da bactéria indicadora de poluição fecal *Escherichia coli*.

Este parâmetro microbiológico começou a ser monitorado mensalmente a partir de novembro de 2007 coletando-se amostras de todas as unidades (EB, UASB, L1, L2, L3) para se acompanhar o perfil de *E. coli* no sistema. No entanto, para se proceder à análise por FISH as amostras foram coletadas em seis campanhas amostrais como descrito no item 4.2.3.

O volume de amostra coletado para esta análise foi de 100 mL. Após alguns testes para se definir as diluições que deveriam ser utilizadas, procedeu-se a aplicação do método. As diluições aplicadas foram de  $10^6$ ,  $10^4$  e  $10^3$  para o EB, L1 e L3 respectivamente. O método do Colilert® não foi feito em triplicata para as quatro primeiras coletas, pois devido à robustez do teste, acreditava-se que não ocorreriam diferenças representativas nos resultados de triplicatas. Adotou-se a triplicata somente nas duas últimas coletas (fevereiro e maio de 2009).

#### **4.5 Parâmetros físicos e químicos**

Para a determinação dos parâmetros físicos e químicos, tanto para a preservação, quanto para o transporte e análise, foram seguidos os métodos propostos pelo *Standard Methods for the*

*Examination of Water and Wastewater* AWWA/ APHA/WEF (APHA, 2005). Na Tabela 4.9 estão listados os parâmetros físico-químicos que foram monitorados, rotineiramente, em todas as unidades do sistema e sua respectiva periodicidade. O monitoramento dos parâmetros físicos e químicos iniciou-se em dezembro/2006 e para a maioria destes finalizou-se em 04/03/2009. Os parâmetros como pH, temperatura e oxigênio dissolvido foram medidos *in loco* por meio de equipamentos portáteis até Julho de 2009.

**Tabela 4.9 – Relação dos parâmetros físicos e químicos monitorados e periodicidade**

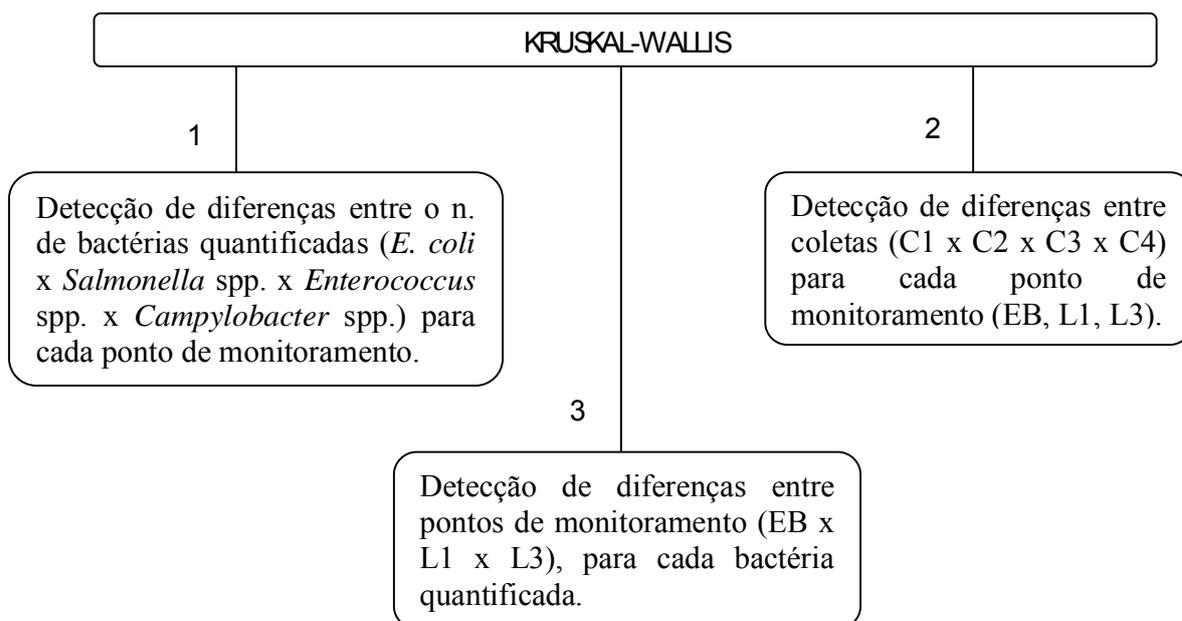
Parâmetro	Periodicidade	Método	Referência
DBO total e filtrada	Quinzenal	Método Iodométrico-DBO 5 dias	APHA 5210 – B
DQO total e filtrada	Quinzenal	Refluxo Fechado - Método Titulométrico.	APHA 5220 – C
Sólidos Suspensos Totais	Quinzenal	Gravimétrico – seco a 103-105°C	APHA 2540 – D
pH	Semanal	Eletrométrico	APHA 4500 H <sup>+</sup> B
Temperatura	Semanal	Termômetro °C (Hg)	APHA 2550 B
Turbidez	Semanal	Nefelométrico	APHA 2130 – B
Oxigênio dissolvido	Semanal	Iodométrico	APHA 4500 B

#### **4.6 Tratamento estatístico dos dados**

Para o primeiro objetivo específico (investigação das bactérias pela PCR), optou-se pela utilização de Tabelas de Contingência com duas ou mais categorias. Os resultados foram avaliados por meio de observações baseadas no total de reações positivas e negativas das bactérias propostas, uma vez que os dados foram qualitativos.

Para o segundo objetivo específico (Quantificação por FISH das bactérias identificadas por meio da PCR) os dados foram avaliados a partir da estatística descritiva para determinar seu comportamento, se simétricos ou assimétricos. Isto foi necessário para seleção dos testes estatísticos mais adequados para os dados em análise. Além do comportamento assimétrico, o tamanho das amostras, exceto para os parâmetros físico-químicos, apresentou um número de dados insuficiente para aplicação de testes de aderência que determinariam a distribuição de frequência que melhor se ajustaria aos dados.

A avaliação estatística utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal - Wallis seguido do teste de Múltiplas Comparações foi realizada nas três situações apresentadas na Figura 4.7.



**Figura 4.7**– Fluxograma para a aplicação do teste de Kruskal-Wallis

Para as quantificações de bactérias, em triplicatas, o Teste Q de Dixon foi utilizado para detectar “outliers” entre triplicatas antes de se aplicar os testes estatísticos. O teste se fundamenta no fato de que se o valor experimental de Q ( $Q_{exp}$ ) for maior que o valor Q crítico ( $Q_{crit}=0,970$  a um nível de significância de 5%) o valor suspeito é considerado um “outlier” e, portanto, deve ser descartado da avaliação ([http://www.chem.uoa.gr/applets/AppletQtest/Text\\_Qtest2.htm](http://www.chem.uoa.gr/applets/AppletQtest/Text_Qtest2.htm) Acesso em 16/03/2010).

Para o terceiro objetivo específico (Comparação das técnicas Colilert® e FISH na quantificação de *E. coli*) foi utilizado o teste “T de Wilcoxon” para amostras pareadas, para verificar a existência de diferenças significativas entre as metodologias Colilert® (NMP/100mL) e FISH (cel/100mL) na quantificação de *E. coli* em cada uma das amostras (EB, L1, L3). Também foram feitas correlações entre os métodos Colilert® e FISH na quantificação de *E. coli*, para verificar a existência de associações entre os métodos, que em princípio utilizam unidades diferentes para expressão dos resultados.

Para o quarto objetivo específico (Monitoramento por meio de parâmetros físico-químicos das condições ambientais e possível influência na ocorrência de bactérias patogênicas) utilizou-se de estatística descritiva para apresentação dos dados, além dos gráficos Box-Plot para se fazer uma avaliação conjunta dos parâmetros físico-químicos e das bactérias quantificadas.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Objetivo específico 1 – Investigação de bactérias patogênicas por PCR**

#### **5.1.1 Extração do DNA**

Foram utilizados dois protocolos, 1 e 2 para a extração do DNA (ver item 4.3.1). As diferenças principais entre os protocolos basearam-se no volume de pérola de vidro a ser acrescido, diferenças no tampão de extração, utilização de fenol tamponado e lavagem do sedimento para retirar impurezas do DNA. Analisando-se as bandas obtidas da extração do DNA, percebeu-se que as amostras cuja extração foi feita com o protocolo 1 foram as que, aparentemente, geraram menos DNA (em função da baixa intensidade das bandas), embora a intensidade de padrão de bandas, por si só, não seja uma forma ideal de se expressar a concentração de DNA. Os resultados obtidos do protocolo 1 estão apresentados em Nascimento (2008).

Já o protocolo 2 mostrou-se mais eficaz para se fazer a extração do DNA das amostras avaliadas, permitindo a obtenção de bandas com padrão de intensidade de melhor qualidade, quando comparado ao protocolo 1. A partir deste resultado, o protocolo 2 de extração de DNA passou a ser adotado para se extrair o DNA genômico de todas as bactérias em todas as amostras, até a finalização do trabalho.

Foram feitas extrações do DNA genômico para as amostras obtidas da coleta 1 (25/04/2007), coleta 2, (27/02/2008), coleta 3 (11/02/2009) e coleta 4 (27/05/2009). Após a extração do DNA de todas as amostras, a confirmação desta foi feita por meio de gel de agarose e visualizada sob luz ultravioleta. Para a terceira e quarta coletas, os pontos avaliados passaram a ser o esgoto bruto, o efluente da lagoa 1 e o efluente da lagoa 3 (EB, L1, L3), representando a amostra afluente, um ponto intermediário e o efluente final.

#### **5.1.2 Detecção das bactérias patogênicas pela PCR**

É possível que sob a interferência de diferentes reagentes, os ciclos de temperatura, sobretudo da temperatura de anelamento, apresentados pelos autores que desenvolveram os *primers*, sejam diferentes. Por isso, há necessidade da realização de testes para otimizar a detecção das bactérias utilizando-se culturas puras.

A PCR gradiente (conforme apresentado na Tabela 4.7) foi realizada e os resultados mostraram-se positivos para as culturas puras, significando que os *primers* se anelaram perfeitamente ao DNA bacteriano, confirmando sua especificidade (NASCIMENTO, 2008). Para a maioria das culturas, houve amplificação em todas as temperaturas testadas, exceto para *Shigella sonnei*, onde não houve amplificação na maior temperatura de anelamento. Com isso utilizou-se a temperatura de anelamento de 55° C para a maioria delas.

Uma concentração não ideal de DNA pode gerar dois aspectos de resultados. Um primeiro aspecto seria considerando que o DNA da bactéria alvo encontra-se em baixa concentração, com isso sugere-se dobrar o volume da amostra para garantir que haja DNA suficiente para gerar *amplicons* (produto de PCR).

Um segundo aspecto seria a elevada concentração de DNA. Uma alta concentração de DNA *template* pode gerar problemas na PCR, tais como bandas inespecíficas (WALKER e RAPLEY, 1999) e inibição da sua expressão pela presença de contaminantes, ocasionando resultados falso-negativos. Por isso, foram feitos testes empíricos utilizando-se 0,5 a 2 µl de amostra do DNA (concentrado ou diluído) para garantir a segurança do resultado obtido. Os resultados dos testes apontaram à impossibilidade de se adotar a mesma diluição para as diferentes amostras, e também de se adotarem diluições específicas para cada par de *primers* testado. Assim, para todas as reações de PCR foi necessário testar qual a melhor quantidade de DNA a ser aplicada e a necessidade ou não de diluição.

Particularmente para a cultura pura de *Shigella sonnei*, foi verificada a formação de bandas inespecíficas, mesmo após a realização de testes para minimização destes efeitos (diluição de DNA *template*, e principalmente alterações nas temperaturas de anelamento dos *primers*). Com isso não foi possível padronizar a reação de PCR.

A PCR para a cultura pura de *Yersinia enterocolitica* utilizando-se o par de *primers* Y.16S-86f e Y.e.eur.16S-455r foi negativa, não sendo possível estabelecer as condições de amplificação do DNA extraído. Testes foram feitos na tentativa de alcançar esta amplificação, tais como mudanças na concentração do DNA *template* e o “Nested PCR” (reamplificação de um fragmento com *primer* específico, a partir de um fragmento previamente amplificado com um *primer* geral), no qual foi utilizado o par de *primer* geral Epsilon (5'-GAGASTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1541r (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3')

(EMBLEY, 1991) para o gene DNAr16S. O resultado foi positivo para o *primer* geral, mas não gerou produtos após aplicação com os *primers* específicos (NASCIMENTO, 2008).

Dessa forma, nenhuma mudança foi satisfatória para se conseguir resultado de PCR positivo para esta bactéria, com isso optou-se pela aquisição de um novo par de *primers* (YE1 e YE2) especificados na Tabela 4. 6. Com a aquisição de um novo *primer* foi necessário refazer os testes com gradiente de temperatura variando entre 45,8 a 59,6 °C. O teste foi positivo para o novo par de *primers*, e a melhor temperatura de anelamento que permitiu a amplificação desta bactéria a partir da cultura pura foi de 57,3 °C, e com isso, a investigação desta bactéria pode ser feita nas amostras especificadas.

*Campylobacter jejuni* foi incluída na avaliação posteriormente, com isso, para assegurar a qualidade do resultado, todos os testes, como mencionado para as demais bactérias (melhor temperatura de anelamento por meio de PCR gradiente, volume de DNA a ser aplicado, necessidade ou não de diluição) também foram realizados.

O limite de detecção dos *primers* utilizados nesta pesquisa (Tabela 4.6) não foi investigado. Os dados referentes a limite de detecção de *primers* são baseados na literatura.

A Tabela 5.1 apresenta um resumo dos resultados das bactérias detectadas pela técnica da PCR, nas coletas 1 a 4. Todas as Figuras resultantes da eletroforese em gel de agarose obtidas das reações de PCR, para as bactérias investigadas, nas quatro coletas encontram-se inseridas no Apêndice 1.

As Tabelas 5.2 a 5.5 mostram os resultados, por meio de Tabela de Contingência para dados qualitativos, e indicam o percentual das bactérias que apresentaram reações positivas e negativas da PCR nas quatro coletas investigadas.

**Tabela 5.1** - Resultados da PCR para as bactérias investigadas com *primer* específico

Bactérias	Primeira Coleta (25/04/07)					Segunda Coleta (27/02/08)					Terceira Coleta (11/02/09)			Quarta Coleta (27/05/09)		
	EB	UASB	L1	L2	L3	EB	UASB	L1	L2	L3	EB	L1	L3	EB	L1	L3
<i>E. coli</i> (total)	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella</i> spp.	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
<i>Salmonella</i> Typhimurium	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>Shigella</i> spp.	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus</i> spp.	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Helicobacter pylori</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i>	+		+		+	-		-		+	+	+	+	-	-	+
<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>primers</i> YE1/YE2	-		-		-	-		-		-	-	-	-	-	-	-

Legenda: Em branco: Não realizada

-: Amplificação do DNA bacteriano negativa

+: Amplificação do DNA bacteriano positiva (resultados oriundos de 3 ou 4 reações de PCR distintas para cada amostra).

**Tabela 5.2** – Percentual de reações da PCR positivas e negativas para *E. coli* em quatro coletas

<i>E. coli</i>	Positiva	Negativa	Total
EB	4 (100%)	0	4 (100%)
L1	4 (100%)	0	4 (100%)
L3	2 (50%)	2 (50%)	4 (100%)
<b>Total</b>	10 (83,3%)	2 (16,7%)	12 (100%)

**Tabela 5.3** – Percentual de reações da PCR positivas e negativas para *Salmonella* spp. em quatro coletas

<i>Salmonella</i> spp.	Positiva	Negativa	Total
EB	0	4 (100%)	4 (100%)
L1	2 (50%)	2 (50%)	4 (100%)
L3	3 (75%)	1 (25%)	4 (100%)
<b>Total</b>	5 (41,7%)	7 (58,3%)	12 (100%)

**Tabela 5.4** – Percentual de reações da PCR positivas e negativas para *Enterococcus* spp. em quatro coletas

<i>Enterococcus</i> spp.	Positiva	Negativa	Total
EB	3 (75%)	1 (25%)	4 (100%)
L1	2 (50%)	2 (50%)	4 (100%)
L3	2 (50%)	2 (50%)	4 (100%)
<b>Total</b>	7 (58,3%)	5 (41,7%)	12 (100%)

**Tabela 5.5** – Percentual de reações da PCR positivas e negativas para *Campylobacter jejuni* em quatro coletas

<i>Campylobacter jejuni</i>	Positiva	Negativa	Total
EB	2 (50%)	2 (50%)	4 (100%)
L1	2 (50%)	2 (50%)	4 (100%)
L3	4 (100%)	0 (100%)	4 (100%)
<b>Total</b>	8 (66,7%)	4 (33,3%)	12 (100%)

#### 5.1.2.1 *Escherichia coli*

O monitoramento de *E. coli* ao longo do sistema foi feito utilizando-se um par de *primer* para o gene *uidA*, que tem por função codificar a enzima betaglicuronidase. Esta mesma enzima, no método do Colilert®, reage com o substrato cromogênico para indicar a presença de *Escherichia coli*. O gene *uidA* tem sido usado para detectar *E. coli* em amostras aquáticas (BEJ *et al.*, 1991; 2004).

Avaliando-se a Tabela 5.1 e 5.2 para *E. coli* (total), observa-se que esta espécie foi detectada no EB e na L1 da primeira e da segunda coleta, e no EB, L1 e L3 da terceira e quarta coletas, totalizando 83,3 % de reações positivas para *E. coli*. Na primeira coleta, em que foram avaliadas todas as unidades que compõem o sistema, verificou-se uma banda também no efluente do UASB e da lagoa 2, esta última, de fraca intensidade.

A intensidade das bandas em um mesmo gel pode ser proporcional à quantidade de DNA marcada pelo brometo de etídio. Assim, a existência de uma banda, de fraca intensidade, na lagoa 2, poderia indicar o decaimento da quantidade de DNA de *E. coli* do esgoto bruto até o efluente da lagoa 2 o que poderia significar a ocorrência de decaimento.

Não se verificou amplificação do DNA de *E. coli* nas amostras oriundas da lagoa 3 nas coletas 1 e 2. A ausência de bandas de DNA de *E. coli* na lagoa 3, nas duas primeiras coletas pode indicar o decaimento de *E. coli* neste ponto, significando que *E. coli* poderia estar presente nesta amostra, no período avaliado, em baixas concentrações. Este resultado está de acordo com o esperado e descrito em várias publicações, tais como Mascarenhas (2002), Madera *et al.* (2002), Ceballos (2002), von Sperling (2005) e outros, apresentados na Tabela 3.4, que mostram que há um decaimento bacteriano de *E. coli* ao longo das unidades, em sistemas de tratamento de esgotos que utilizam lagoas de polimento (ou de maturação) em uma das etapas do tratamento, com base em métodos de cultivo.

Andrada (2005) verificou uma remoção média de cinco ordens de grandeza de *E. coli* nas mesmas lagoas utilizadas neste trabalho, porém em diferentes condições operacionais, pelo método do Colilert® (NMP/100mL), apontando que houve decaimento nos valores de *E. coli* de  $10^8$  no EB para  $10^3$  NMP/100mL na lagoa 3.

Entretanto, foi verificada a amplificação do DNA de *E. coli* no efluente da lagoa 3 nas coletas 3 e 4. Conforme mencionado, a não amplificação de DNA de *E. coli* no efluente da lagoa 3 nas coletas 1 e 2 sugere que, nestas amostras, *E. coli* poderia se encontrar em quantidades reduzidas à época da coleta, ou seja, menores que  $10^3$  NMP/100mL, como verificado por Andrada (2005). A hipótese mais provável, no entanto, é que interferentes da PCR, como relatado por Tyler *et al.* (2007), Wilson (1997) e outros pesquisadores, tenham inibido a reação e com isso o resultado se apresentou como negativo.

Há pouca informação sobre sorotipos patogênicos de *E. coli* em esgotos (brutos e tratados) e também no lodo e em águas poluídas. Orsi *et al.* (2008) avaliaram a distribuição de grupos de *E. coli* em amostras de água dos rios Jaguari e Sorocaba no Estado de São Paulo/Brasil, utilizando a PCR, e encontraram grupos de *E. coli* associados a sorotipos patogênicos em ambos os rios.

Ainda que a presença de sorotipos patogênicos de *E. coli* em amostras ambientais seja pouco estudada, é plausível assumir que a presença destes grupos ocorra em esgotos domésticos, ainda que em baixas concentrações, e com isso, possam ocasionar infecções em animais e humanos. Ressalta-se, assim, a importância de se investigar os sorotipos patogênicos de *E. coli* em esgotos, devido à baixa dose infectante que alguns sorotipos de *E. coli* necessitam para causar doença em humanos, como por exemplo, o sorotipo enterohemorrágica (EHEC), cuja dose necessária para conferir sintomatologia é de apenas 10 a 100 células (Tabela 3.1).

Para investigação do sorotipo patogênico EHEC de *E. coli*, foi utilizado apenas o par de *primers*, L-vt2a e L-vt2b. Não foi possível padronizar as condições da PCR para este sorotipo, devido à ausência de uma cultura pura para a realização dos testes. Mesmo assim, as reações com as amostras, na presença destes *primers*, foram feitas utilizando o programa descrito por Bej *et al.* (2004) e o programa com temperatura de anelamento de 55 °C, desenvolvido em uma das etapas da presente pesquisa. Os resultados foram negativos nas quatro coletas, mesmo após a adoção da estratégia de minimização dos possíveis efeitos inibitórios da PCR (aumento da concentração de DNA *template*, remoção do reagente BSA, aumento na temperatura de anelamento dos *primers*, de 55°C para 58°C).

Mesmo não sendo possível padronizar as condições da PCR para o sorotipo EHEC pelo fato de não se ter conseguido uma cultura pura em nenhuma das instituições listadas na Tabela 4.5, é possível que ainda assim, os resultados permaneceriam negativos uma vez que, conforme visto anteriormente o sorotipo EHEC de *E. coli* está mais associado a surtos de veiculação alimentar ou hídrica, principalmente nos Estados Unidos, Japão, Reino Unido e outros países desenvolvidos (KAPER, 2004; ISHII e SADOWSKY, 2008; CRAUN, *et al.*, 2006; INA *et al.*, 2003).

Em países em desenvolvimento, estudos mostram que os sorotipos mais comumente associados à diarreia, sobretudo em crianças é EPEC (CRAVIOTTO *et al.*, 1996; LEVINE *et al.*, 1996 *apud* KOBAYASHY *et al.*, 2000). No Brasil alguns estudos relatam que crianças que foram hospitalizadas devido a diarreia, os sorotipos EPEC e EAEC de *E. coli* foram detectados nas fezes (KOBAYASHI *et al.*, 2000; VIDOTTO *et al.*, 2000; FANG *et al.*, 1995), com isso pode-se supor que a quantidade de DNA do sorotipo enterohemorrágica no esgoto bruto e no efluente das unidades de tratamento, se existente à época das coletas, devia ser muito baixa.

#### 5.1.2.2 *Salmonella* spp. e *Salmonella* Typhimurium

Quanto a *Salmonella* spp., mesmo tendo sido realizadas várias tentativas de minimização da presença de bandas inespecíficas, a melhor condição de amplificação ainda gerou uma banda adicional. Apesar disso, *amplicons* de 275 pb foram visualizados em determinadas coletas, sendo considerado como resultado positivo da amplificação de *Salmonella* spp. Pela Tabela 5.3 observa-se que, considerando as quatro coletas, *Salmonella* spp. se mostrou positiva em 41,7% das reações.

Visualizando-se a Tabela 5.1, percebe-se que o gênero *Salmonella* foi detectado na primeira coleta (25/04/2007) nas lagoas 1, 2, e uma fraca banda foi visualizada para a lagoa 3, embora não se tenha verificado no gel bandas indicativas da sua presença no esgoto bruto (Anexo 1). Resultados, mesmo que semelhantes, não foram verificados na segunda coleta (27/02/2008), que se mostrou negativa para todas as amostras. Para a terceira coleta (11/02/2009) o mesmo padrão de resultados da coleta 1 foi observado, ou seja, ausência de bandas positivas para o EB e bandas positivas para a L1 e a L3. Já para a quarta coleta (27/05/2009) não se observaram reações positivas para o EB e a L1, enquanto que para a L3 o resultado foi positivo.

Shannon *et al.* (2007) utilizando a técnica PCR em tempo real na investigação de bactérias patogênicas em amostras de esgoto obtidas de uma ETE, no Canadá, não verificaram a presença do gênero *Salmonella* no esgoto bruto e em nenhuma das etapas do tratamento a que o esgoto foi submetido.

Langeland (1982) investigou a presença de *Salmonella* spp. e outros microrganismos em amostras de esgoto, de lodo e outros tipos de amostras, obtidas de três estações de tratamento de esgotos em Oslo/Noruega utilizando métodos de cultivo (baseados em

NMP). O autor identificou a presença de *Salmonella* spp. nas amostras de esgoto, de lodo, e nos ambientes físicos das estações de tratamento investigadas. No esgoto bruto, *Salmonella* spp. foi identificada nas amostras obtidas das três estações avaliadas, enquanto que no esgoto tratado não foi detectada a presença de *Salmonella* spp.

O fato de que *Salmonella* spp. pode se multiplicar no meio ambiente ainda é discutível (GUILLOT e LORET, 2010). No entanto Langeland, 1982, citando o trabalho de Grunnet (não referenciado) relatou que os quatro sorotipos de salmonela comumente encontrados em amostras de lodo, incluindo *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Paratyphi-B, *Salmonella* Senfteberg e *Salmonella* Baidon são capazes de multiplicar em águas residuárias em temperaturas que variam entre 10 e 42 °C. Esta hipótese pode indicar que, possivelmente, algum representante do gênero *Salmonella*, excetuando-se *S.* Typhimurium, cujos resultados deram negativos na L3 em todas as coletas, pode ter se multiplicado na L3 e com isso foram detectados pela PCR quando se utilizou o primer para o gênero *Salmonella*.

Aissa *et al.* (2007) fizeram pela primeira vez, na Tunísia, uma avaliação da presença de *Salmonella* spp. em amostras de origem humana, animal, alimentos e ambiental (água de abastecimento, piscina, e água mineral) em todas as regiões do país. Os autores verificaram que nas amostras ambientais havia uma influência da sazonalidade, onde se observou que nos meses mais frios, as salmonelas aumentavam. Este fato já tinha sido verificado por Yaziz e Lloyd (1979) em amostras de esgotos brutos e tratados pelo sistema de lodos ativados. Os autores verificaram que nos meses frios, as concentrações de salmonelas aumentaram nos sistemas de tratamento de esgotos. Koivunem *et al.* (2003) também fizeram um levantamento da presença de sorotipos de *Salmonella enterica* em estações de tratamento de esgotos de cidades da Finlândia, incluindo Helsinki, e detectaram sorotipos de salmonelas em todas as amostras oriundas do esgoto bruto. Os autores relataram que a baixa temperatura do esgoto bruto no período avaliado (maio a outubro) favoreceu a manutenção do gênero nas amostras.

Uma vez que em grande parte do território brasileiro as estações climáticas não são bem definidas, diferenças de temperaturas marcantes também não são fortemente observadas na região de estudo do presente trabalho. O que se nota, mais marcadamente, é a ocorrência de uma estação quente/ chuvosa e outra fria/seca.

Considerando-se os trabalhos de Yaziz e Lloyd (1979), Koivunem *et al.* (2003) e Aissa *et al.* (2007) com relação à sazonalidade, não foi possível afirmar que diminuições da temperatura possam ter afetado a concentração do gênero *Salmonella* nas amostras investigadas no presente trabalho devido principalmente a dois fatores i) a ausência de reações positivas para o gênero *Salmonella* ter sido verificada somente no esgoto bruto, ii) não ter sido efetuada nenhuma coleta no auge da estação seca que coincide com o inverno, já que as quatro coletas foram feitas praticamente no mesmo período, ou seja, duas coletas na estação chuvosa/quente (27/02/2008 e 11/02/2009) e duas coletas no início da estação seca/fria (25/04/2007 e 27/05/2009).

Quanto a *Salmonella* Typhimurium os resultados mostram a presença de *amplicons* de 123 pb, indicando reação positiva para *Salmonella* Typhimurium no esgoto bruto e no efluente do UASB (nas duas primeiras coletas) e um baixo sinal na lagoa 1 (na primeira coleta). Para as coletas 3 e 4 só foram detectadas bandas positivas para a amostra oriunda do EB, com a ausência de bandas para as lagoas 1 e 3. Estes resultados indicam que o sistema UASB-LP pode ter apresentando decaimento de *Salmonella* Typhimurium no decorrer das unidades. No entanto estes resultados contrastam com aqueles obtidos para *Salmonella* spp. apresentados anteriormente, no qual o gênero não foi detectado no EB, no entanto, o sorotipo S. Typhimurium foi detectado. Esperar-se-ia um comportamento similar entre gênero e espécie/sorotipo, o que, porém não ocorreu.

O limite de detecção dos *primers* utilizados para investigação de S. Typhimurium, conforme relatado por Bej *et al.* (1994) é  $10^2$  células/mL. Desta forma, pode-se considerar que no efluente das lagoas, S. Typhimurium estava presente em quantidade menor ou igual a  $10^2$  cel/mL e possivelmente este seja um dos fatores pelo qual não foi detectada nas lagoas.

#### 5.1.2.3 *Shigella* spp. e *Shigella dysenteriae*

Para *Shigella* spp. foram obtidos resultados positivos da PCR (fragmentos com 610 pb) para os efluentes do reator UASB e da lagoa 1, na primeira coleta. Para as demais amostras e nas coletas 2, 3 e 4, os resultados da PCR foram negativos. De acordo com Wang *et al.* (1997), a detecção para *Shigella* spp. com o par de *primers* utilizado (Shi-1 e Shi-2) pode apresentar baixa sensibilidade ( $5 \times 10^4$  células), ou seja, são necessárias aproximadamente  $5 \times 10^4$  células de *Shigella* em 1 mL para que o resultado da PCR seja positivo.

Com base nisso, pode-se supor que nas amostras em que *Shigella* mostrou-se negativa, a concentração deste gênero era menor que  $10^4$  cel/mL. Assumindo-se que a concentração de bactérias do gênero *Shigella* esteja abaixo do limite de detecção, a utilização de *primers* mais sensíveis para se monitorar o gênero *Shigella* em lagoas de polimento pode ser recomendável. No entanto, ressalta-se mais uma vez, que assim como para *E. coli*, as amostras de esgotos podem conter contaminantes que inibem a reação da PCR, fazendo com que o resultado se mostre negativo, ainda que se utilize *primers* mais sensíveis.

A detecção de *Shigella dysenteriae* com o *primer* específico mostrou resultado similar ao verificado para o gênero, no qual não foi obtida amplificação para as amostras originárias das lagoas 2 e 3 na primeira coleta e negativo para todas as amostras a partir da segunda coleta.

Para *S. dysenteriae* a amplificação só foi positiva para o EB e efluente do reator UASB na primeira coleta, ainda que o resultado para o gênero *Shigella* spp. tenha sido negativo no esgoto bruto, semelhante ao que ocorreu para *Salmonella* spp. Uma hipótese para este fato pode estar relacionada à maior sensibilidade dos *primers* para *S. dysenteriae* do que para *Shigella* spp. e novamente pela maior existência de contaminantes no esgoto bruto. Mesmo com a hipótese de que o *primer* para *S. dysenteriae* seja mais sensível do que o de *Shigella* spp., não se verificou reações positivas para *S. dysenteriae* nas lagoas em nenhuma das coletas.

#### 5.1.2.4 *Enterococcus* spp.

No monitoramento de *Enterococcus* o par de *primers* utilizado foi para o gene *tuf*. Este gene é responsável pela codificação de uma proteína envolvida na formação de cadeias peptídicas durante a síntese protéica (KE *et al.*, 1999) e pode ser detectado na maioria das espécies de enterococos com alta sensibilidade de detecção e boa especificidade (KE *et al.*, 1999; HORÁKOVÁ *et al.*, 2008). As reações da PCR com os *primers* para *Enterococcus* spp. apresentados nas Tabelas 5.1 e 5.4 indicam resultados positivos em 58,3% das amostras e reações positivas nas amostras do esgoto bruto e do reator UASB, na primeira coleta, resultados negativos em todas as amostras da segunda coleta e positivo no EB, L1 e L3 da terceira e quarta coletas.

Foram verificados na literatura vários trabalhos que mostram a presença de *Enterococcus* spp. em esgotos brutos da ordem de  $10^3$  a  $10^6$  cel/100mL (LEE *et al.*, 2006; PAYMENT *et al.*, 2001; CEBALLOS, 2000; MADERA *et al.*, 2002; ARRIDGE *et al.*, 1995). Já em esgoto tratado, na maioria dos trabalhos que utilizaram lagoas em série, os efluentes apresentaram elevada eficiência de remoção (> 99%), sendo o número de células da ordem de 300 org/100mL (CEBALLOS, 2000) a  $9,4 \times 10^3$  UFC/100mL (MADERA *et al.*, 2002). Lee *et al.* (2006) e Shannon *et al.* (2007) observaram remoção da ordem de 3,2 unidades logarítmicas desde o esgoto bruto até o efluente final para *Enterococcus* spp., utilizando-se a PCR e a PCR em tempo real.

Para os resultados da presente pesquisa, a ausência de amplificação para as amostras das lagoas 1, 2, 3 na coleta 1 pode sugerir que possivelmente o sistema apresentou uma boa eficiência em promover o decaimento de *Enterococcus* spp., em níveis abaixo do limite de detecção da técnica da PCR, ou seja, é possível que *Enterococcus* spp., tenha sido removido para limites inferiores a  $10^3$  cel/100mL à época da coleta. Outro fator que pode ser aventado é quanto à concentração de oxigênio dissolvido, especificamente no dia da coleta.

Verificou-se uma elevada concentração de oxigênio dissolvido (aproximadamente 17,6 mg/L) na lagoa 1, na primeira coleta (25/04/2007) (Tabela 5.10). Essa elevada concentração de oxigênio dissolvido também pode ter contribuído para o decaimento do gênero *Enterococcus* devido à sensibilidade apresentada por algumas espécies anaeróbias facultativas a altos teores de oxigênio dissolvido (CURTIS, 2003). Todavia, tal nível de eficiência não permaneceu nas coletas 3 e 4, cuja concentração de O.D estava em torno de 3,2 mg/L uma vez que os resultados da reação de PCR para o gênero *Enterococcus* foram positivos nestas coletas. Assim, não se pode atribuir as variações na concentração de O.D como o único fator a regular o desempenho das lagoas em promover o decaimento bacteriano.

Este resultado pode indicar que para as amostras das coletas 3 e 4, a eficiência do sistema em promover o decaimento de *Enterococcus* spp. diminuiu, confirmando o fato de que algumas espécies do gênero *Enterococcus* podem não tolerar altas concentrações de O<sub>2</sub>, enquanto que podem sobreviver por longos períodos em ambientes naturais, sob

a exposição direta de luz solar (BALE *et al.*, 1993) e em elevadas concentrações de pH (acima de 9,0) (CURTIS, 2003).

Já para a coleta 2 não se pode fazer nenhuma suposição sobre a ocorrência de decaimento, uma vez que nesta coleta, a maioria das bactérias investigadas não apresentou reações de PCR positivas.

#### 5.1.2.5 *Helicobacter pylori*

*H. pylori* não foi detectada em nenhum dos pontos avaliados, nas quatro coletas, mesmo após as mudanças que levariam a uma otimização da reação de PCR (alterações da temperatura de anelamento, diluição das amostras, aumento no volume de DNA *template*). Também foi utilizada a estratégia de “Nested PCR”, onde foi aplicado o par de *primers* 1541 e EpF10 para o gene DNAr16S para o domínio *Bacteria*, e o uso dos *amplicons* para uma nova reação de PCR com os *primers* de uma região do gene DNAr16S, específico de *H. pylori* para as amostras da primeira e segunda coletas. Porém, os resultados da segunda amplificação também foram negativos.

Alguns pesquisadores que investigaram a presença de *H. pylori* em amostras de esgoto bruto e tratado utilizando-se de técnicas moleculares (PCR e PCR-RT) também não detectaram em suas amostras (LEE *et al.*, 2006; SHANNON *et al.*, 2007; JANZON *et al.*, 2009). Ao contrário, Lu *et al.* (2002) identificaram *H. pylori* em amostras de esgotos não tratados, coletadas em um canal de esgoto a “céu aberto” no México.

Importantes observações sobre a detecção de *H. pylori* em diversas amostras de água, incluindo água potável, água residuária, biofilmes oriundos de água doce, água de lagos e de rios, foram feitas no trabalho de pesquisa conduzido por Janzon *et al.* (2009). Os autores fizeram um extenso levantamento de possíveis fatores que poderiam ocasionar falhas na tentativa de se detectar o DNA de *Helicobacter pylori* nas amostras especificadas, em Dhaka/Bangladesh – região de alta endemicidade de *H. pylori*, utilizando a técnica de PCR-RT, com rigoroso controle de resultados falso-positivo e falso-negativo.

Para confirmar que seus resultados negativos não eram falso-negativos os autores monitoraram, por meio de testes, diversos fatores intervenientes na PCR, que poderiam ser elementos a ocasionar resultados falso-negativos e/ou falso-positivos, tais como, o

método de coleta da amostra, a sensibilidade da reação, a especificidade dos ensaios com cultura pura e a possível degradação do DNA *template*. Os autores também sugeriram que a ausência de resultados positivos pudesse estar associada à presença de inibidores da PCR. No entanto, os pesquisadores fizeram ensaios testes em que verificaram que uma diluição do DNA de 10 vezes restringia os inibidores da PCR em aproximadamente 90%. Mesmo após controlar todos estes fatores de interferência, ainda assim não foram verificados resultados positivos e confirmou-se a veracidade do resultado negativo.

Algumas de suas observações estão em consonância com as verificadas nesta pesquisa. Aqui também foram adotadas medidas na tentativa de confirmar os resultados negativos para *H. pylori* nas amostras investigadas, tais como a diluição do DNA, a fim de minimizar inibidores da reação de PCR, “Nested PCR”, PCR com gradiente de temperatura e cultura pura, aumento e diminuição do DNA *template*, sendo que nenhuma dessas medidas foi suficiente para modificar o resultado negativo observado nas amostras investigadas nas quatro coletas.

Janzon *et al.* (2009), concluíram que possivelmente a rota de transmissão predominante na área estudada (Bangladesh) não seria por meio de veiculação hídrica, mas ainda assim eles consideram que esta via de transmissão não pode ser refutada em outras regiões em que haja endemicidade de *H. pylori*. Elitsur e Yahav (2005) mencionam que, a partir de 2004, vários trabalhos restabeleceram a rota feco-oral como um modo efetivo de transmissão desta espécie.

Aqui também se aventa a possibilidade de que os esgotos, brutos e tratados, ainda não sejam rotas expressivas de veiculação da espécie bacteriana na região estudada. Assim, pode-se considerar a não detecção desta bactéria no presente trabalho, principalmente pela possibilidade de que a rota feco-oral ainda não esteja bem estabelecida na transmissão da doença na região estudada. Isto não quer dizer que *H. pylori* não esteja presente no esgoto de Belo Horizonte, mas que talvez esteja presente em concentração tão baixa que não pôde ser detectada pela PCR.

#### 5.1.2.6 *Staphylococcus aureus*

Assim como para *H. pylori*, os resultados também foram negativos para todas as tentativas de detecção de *Staphylococcus aureus* em todas as amostras investigadas.

Este resultado é bastante coerente com aqueles observados por Shannon *et al.* (2007) e Lee *et al.* (2006), utilizando a técnica da PCR em tempo real para quantificação de bactérias patogênicas, nos quais *Staphylococcus aureus* não foi detectada em nenhuma das amostras de esgoto (bruto ou tratado) investigadas.

Ampofo e Clerk (2003) reportaram que, dentre 25 gêneros de bactérias patogênicas investigadas em um sistema de tratamento de esgoto, composto por 4 lagoas de maturação em série, utilizando-se técnicas de cultivo, o gênero *Staphylococcus* foi detectado em menos de 1% das amostras.

Ahtiainen *et al.* (1991), também investigaram a presença do gênero *Staphylococcus* spp. em águas poluídas, no sul da Finlândia, incluindo na avaliação, amostras de esgoto tratado. Os autores verificaram que dentre 48 amostras avaliadas, somente uma amostra (correspondente a 2%) mostrou-se positiva para *Staphylococcus aureus*. A presença de *Staphylococcus aureus* foi identificada em 18% das amostras de águas pristinas investigadas. Nas amostras de esgoto tratado, a espécie mais comum foi *Staphylococcus cohnii*, que é patogênica oportunista. D'Azevedo *et al.* (2008) relataram um caso de *S. cohnii*, ocorrido no estado de São Paulo/Brasil, cujo paciente, foi a óbito no 25º dia de internação.

Considerando-se que o gene *nuc* (que codifica a enzima nuclease extracelular termoestável de *S. aureus*) é um bom marcador para investigação deste organismo (BURTSCHER e WUERTZ, 2003; MARTINEAU *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 1997), a ausência de resultados positivos para *S. aureus* é aceitável. É possível que outras espécies do gênero *Staphylococcus*, que sejam oportunistas quando se instalam em hospedeiros humanos imunosuprimidos, possam estar presentes nos esgotos em concentrações mais elevadas que *Staphylococcus aureus*.

Considerando-se que em ambientes muito competitivos *Staphylococcus* spp. não são boas competidoras (TORTORA *et al.*, 2005) e que sua presença em amostras de esgotos brutos e tratados possa ser detectada quando haja algum aumento de infecções nosocomiais de origem estafilocócica, os resultados negativos verificados nesta pesquisa são razoáveis. Outro fato relevante é que a toxina liberada por esta espécie, que é o grande problema atribuído a elas, está basicamente restrita aos alimentos, sendo raramente detectada nas fezes, uma vez que esta espécie é detectada principalmente em

infecções da pele e da garganta. Porém como tem importante papel em infecções nosocomiais, pode ser detectada, eventualmente, em amostras de esgotos que recebam resíduos de unidades hospitalares sem tratamento prévio.

#### 5.1.2.7 *Campylobacter jejuni*

Os resultados apresentados na Tabela 5.1 e 5.5 mostram reações positivas para *C. jejuni* em 66,73% das amostras. Foram visualizadas bandas no gel de agarose, ainda que fracas, para o EB, L1 e L3 na primeira e terceira coletas, e reação positiva na segunda e quarta coleta, somente para a L3.

Estes resultados permitem considerar que a presença de *Campylobacter jejuni* em amostras de esgoto bruto e tratado pode requerer mais atenção do que a que tem sido dada até o momento. A presença desta espécie em amostras de esgoto pode ter uma importância expressiva em saneamento ambiental, uma vez que foi a segunda espécie mais detectada no presente trabalho, sendo superada somente pela bactéria indicadora de poluição fecal *E. coli*.

Conforme observado nas Tabelas 3.3 e 3.4 foram relatados poucos trabalhos em que *Campylobacter* spp. foi investigada em amostras de esgotos brutos e tratados. É possível que devido ao fato de que *Campylobacter* spp. exija meios e condições especiais de crescimento, sua investigação em amostras ambientais, como é o caso dos esgotos, não seja feita com frequência. No entanto, com o advento das técnicas moleculares, sobretudo a PCR, o gênero tem sido pesquisado em diversos tipos de amostras, a exemplo de alimentos, de fezes, amostras ambientais, amostras obtidas de animais abortados e outras (VARGAS *et al.*, 2005; RINTTILÄ *et al.*, 2004; MORENO *et al.*, 2001; NG *et al.*, 1997; TOSIN e MACHADO, 1995; GIESENDORF *et al.*, 1992).

A presença de *Campylobacter* spp. tem sido relatada com frequência em alimentos, sobretudo aqueles provenientes de aves, ovinos, bovinos e outros animais que constituem importantes reservatórios desta espécie (PINHEIRO, 2008; OLIVEIRA, 2006a; MAGISTRADO *et al.*, 2001; MORENO *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 1999). Diversos fatores que propiciam a presença do gênero *Campylobacter* em amostras ambientais têm sido verificados na literatura.

Uma importante verificação na literatura sobre a presença de *Campylobacter* spp. é proveniente do trabalho de St- Pierre *et al.* (2009). Os autores avaliaram a presença do gênero *Campylobacter* em amostras oriundas de água bruta de regiões de Québec/Canadá e verificaram que, das 53 amostras pesquisadas em uma determinada localidade, 5 amostras ou 10% estavam positivas para *Campylobacter jejuni*, ao passo que somente 2 das amostras se mostraram positivas para Coliformes termotolerantes. Os pesquisadores concluem o trabalho sugerindo que no monitoramento de amostras de água bruta usar unicamente os indicadores de contaminação fecal não seria suficiente para avaliar a carga de *Campylobacter* spp., fato, este, também verificado no presente trabalho para amostras de esgotos.

No presente estudo, todas as coletas avaliadas mostraram resultados da PCR positivos, em no mínimo uma das amostras para o gênero *Campylobacter*. Na segunda e quarta coletas somente a L3 apresentou resultado da PCR positivo.

Stelzer e Jacob (1991) fizeram a avaliação da presença de *Campylobacter* spp. em amostras de esgoto bruto e tratado pelo sistema de lodo ativado e lagoas de oxidação, além da avaliação da presença da bactéria em amostras de lodo de esgoto, utilizando técnicas de cultivo. Os autores encontraram valores de  $10^3$  cel/100mL no esgoto bruto, 58 cel/100mL na amostra do tanque de aeração, ausência de *Campylobacter* spp. nas lagoas e  $2,4 \times 10^6$  cel/mL no lodo digerido (idade do lodo > 90 dias).

Os pesquisadores avaliaram, ainda, amostras de água proveniente de um rio moderadamente poluído e verificaram a presença da bactéria em 82,1% das amostras pesquisadas e concluíram que o conteúdo de *Campylobacter* spp. em águas superficiais mostrou uma forte associação com a presença de chuvas, com a temperatura da água e com a presença de aves aquáticas.

Uma ocorrência que talvez possa explicar a presença de *Campylobacter jejuni* nas amostras de esgoto do presente trabalho, seria a possibilidade de o afluente receber uma carga de resíduos proveniente do abatimento de frangos (abatimentos clandestinos ou caseiros). Conforme verificado por Oliveira (2006a), os criadouros de frangos podem apresentar positividade de *Campylobacter* spp. em vários estágios da criação e nos mais diversos ambientes das áreas de criação, tanto nas fases iniciais quanto na fase do abate das aves. Tal fato, no entanto, não pôde ser comprovado na presente pesquisa, uma vez

que, não se investigou qual seria a carga de resíduos proveniente do abate clandestino de aves que alcançam os esgotos da ETE Arrudas. Além disso, ainda que este fato ocorra, acredita-se que esta influência seja pequena.

Um outro fator observado com frequência quase diária na ETE em estudo, também levantado para o gênero *Salmonella*, e que poderia estar associado a ocorrência de *Campylobacter jejuni*, sobretudo nas amostras das lagoas, é a presença de garças que constantemente, voam e pousam no entorno e nas laterais das lagoas, em busca de alimento, deixando as lagoas mais vulneráveis a fatores externos principalmente a L3, que é a mais rasa. A hipótese levantada é que essas aves poderiam introduzir na lagoa, células de *C. jejuni* por meio dos seus dejetos, já que as aves são importantes hospedeiros dessa espécie. Tal fato, no entanto é exposto com bastante cautela, pois ainda que isso seja possível, acredita-se que a carga seria baixa e não interferiria tão incisivamente nos resultados.

Associado a estes fatores deve se considerar a carga de bactérias que realmente é despejada no esgoto, sobretudo por uma população assintomática (TOSIN e MACHADO, 1995) e que se constitui um reservatório do microrganismo, hipótese mais provável. Outro fator que pode ser um indicativo da presença da bactéria em quantidades maiores do que aquelas que têm sido relatadas é o fato de que em amostras de águas ambientais, *Campylobacter* spp. pode se associar a espécies de protozoários (SNELLING *et al.*, 2005) e com isso não ser detectada quando se encontra internalizada em protozoários, sobretudo se a metodologia utilizada for por meio de cultivo, além de sedimentarem com os protozoários no lodo da lagoa.

De fato, a presença de *Campylobacter jejuni* nas amostras avaliadas e os resultados quantitativos (apresentados no item 5.2.2) mostram a importância de se avaliar esta espécie nas amostras de esgotos brutos e tratados, uma vez que o lançamento destes efluentes nos corpos de água, ou ainda o seu reúso em fertirrigação, principalmente por aspersão, pode se tornar um fator preocupante para a saúde humana e dos animais, principalmente pelo fato desta espécie apresentar baixa dose infectante

#### 5.1.2.8 *Yersinia enterocolitica*

Não houve resultado positivo de PCR para a detecção da espécie *Y. enterocolitica* quando se usou o par de primer Y.e.eur.16S-86f/ Y.e.eur.16S-455r, já que o resultado da

PCR gradiente foi negativo, mesmo após a realização de vários testes com cultura pura sem sucesso.

Com base neste resultado optou-se pela aquisição de um novo par de primers YE-1/YE-2 descrito na Tabela 4.6. Após os testes com a cultura pura por meio da PCR gradiente verificou-se que a melhor temperatura de anelamento foi de 57,3 °C. No entanto, para todas as amostras investigadas e em todas as coletas, não se verificou a presença de bandas de *Y. enterocolitica*, indicando ausência desta no esgoto e nas unidades de tratamento.

No trabalho desenvolvido por Ampofo e Clerk (2003), os autores relatam que dentre as bactérias patogênicas investigadas no sistema avaliado, composto por 4 lagoas de maturação em série, utilizando-se técnica de cultivo, o gênero *Yersinia* foi uma das que foram detectadas em menor quantidade, representando menos de 0,5% das bactérias patogênicas.

Ainda que *Yersinia enterocolitica* ocorra ao redor do mundo, e tenha sido detectada no Brasil por volta de 1969, principalmente em amostras de alimentos contaminados, nas regiões brasileiras a infecção por *Yersinia enterocolitica* não é relatada com a mesma frequência que em outros países (FALCÃO e FALCÃO, 2006). É possível que esta bactéria patogênica esteja em concentrações muito baixas nos esgotos brutos e tratados das ETEs brasileiras, uma vez que a sua ocorrência é mais detectada em países de clima temperado (CARNIEL *et al.*, 2006). Considerando o fato de que o Brasil é um país com temperaturas elevadas na maior parte do ano, com a ocorrência de alta incidência de luz solar, a ausência de reações de PCR positivas para *Yersinia enterocolitica* é bastante aceitável.

### **5.1.3 Considerações sobre o monitoramento das bactérias investigadas pela PCR**

Na investigação de bactérias patogênicas pela PCR, observam-se como principais problemas a ausência, na coleta 2, da maioria das bactérias investigadas e também a ausência do gênero *Salmonella* no EB e sua presença nas lagoas 1 e/ou 3 na primeira, terceira e quarta coletas.

Quanto à coleta 2, a PCR foi positiva apenas para *E. coli*, *Salmonella Typhimurium* e *Campylobacter spp.*, esta, somente na L3. Algumas hipóteses que podem ter ocasionado

a ausência quase total de bactérias na segunda coleta têm sido discutidas. Uma delas seria intensos episódios de chuva ocorridos nos dias anteriores à coleta, que culminaram com uma alta elevação da lâmina de água, principalmente da lagoa 3, por ser a mais rasa. Esse aumento na altura das lagoas pode ter gerado excessiva diluição do efluente, o que pode ter ocasionado uma dispersão dos microrganismos ao longo da lagoa e o volume coletado não apresentou uma concentração de bactérias em níveis detectáveis, já que a coleta do efluente era sempre feita no mesmo ponto da lagoa.

Os parâmetros físico-químicos como OD e temperatura não puderam ser aferidos neste dia, no entanto o valor da DBO estava menor que das semanas anteriores, sugerindo alta concentração de OD. Isso pode ter ocasionado uma mudança brusca no ambiente que afetou o comportamento das bactérias.

A hipótese de ter ocorrido algum problema na coleta, na extração do DNA das mesmas ou na PCR (problemas com reagentes, por exemplo) não pode ser totalmente descartada. Horaková *et al.* (2008) e outros autores também comentam que o isolamento de DNA bacteriano de amostras ambientais é mais difícil de se fazer devido, principalmente, à presença de grandes quantidades de substâncias que interferem na amplificação pela PCR. Porém, de maneira geral, não se verificou nenhuma eventualidade que justificasse a ocorrência de falhas que pudessem ter afetado somente as análises da segunda coleta.

Quanto às demais coletas (1, 3 e 4), como pode ser verificado na Tabela 5.1, dentre todas as bactérias avaliadas pela técnica de PCR, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp. e *Campylobacter jejuni* foram detectadas em pelo menos uma das lagoas (1, 2, 3) investigadas, destacando-se que alguns gêneros, a exemplo de *Campylobacter* (na segunda e quarta coletas) e *Salmonella* spp. (na primeira, terceira e quarta coletas) foram detectados na lagoa 3, mas não o foram nas amostras das unidades precedentes, ou seja, L1 e/ou EB.

Quanto ao fato do gênero *Salmonella* não ter sido detectado na amostra de EB, em nenhuma das quatro coletas e ter sido detectada pela PCR, nas amostras oriundas das lagoas de polimento (L1 e/ou L3), este fato não foi completamente elucidado, visto ser o esgoto bruto que alimenta o reator UASB e este as lagoas. Algumas hipóteses podem ser levantadas na tentativa de compreender a ocorrência deste evento.

Uma possibilidade seria o fato de que a amostra da lagoa que é coletada em um determinado dia não corresponda à amostra de esgoto bruto daquele mesmo dia, uma vez que o TDH é de aproximadamente 11,7 horas no reator UASB, aproximadamente 4,3 dias nas lagoas 1 e 2, e aproximadamente 1,5 dias na lagoa 3. Ainda que este fato seja possível, é questionável a possibilidade de que em quatro coletas realizadas, nenhuma delas apresentasse uma concentração de *Salmonella* spp. que pudesse ser detectada por uma técnica tão sensível quanto a PCR.

Uma segunda hipótese seria a de que a concentração de salmonelas que realmente ocorre no EB esteja abaixo do limite de detecção da técnica. Porém para as lagoas existe a constatação de que o lodo, ocasionalmente, se desprende do fundo da lagoa e flutua na lâmina de água e isto poderia trazer à tona bactérias que porventura estivessem próximas à camada de lodo, no entanto não se pode certificar a ocorrência deste fato, uma vez que, em nenhum momento amostras do lodo foram investigadas.

Uma terceira hipótese, plausível, mas também não conclusiva, é relativa à presença de animais que circulam nas proximidades das lagoas durante o dia e à noite (garças e outros pássaros que sobrevoam as lagoas e ali pousam para buscar alimentos, além de outros animais hospedeiros - morcegos e ratos, de hábitos noturnos) que possam introduzir, por meio de seus dejetos, uma carga maior de salmonelas somente nas lagoas.

Uma quarta hipótese seria o fato de que no esgoto bruto haja mais inibidores da PCR do que nas lagoas, devido à maior quantidade de contaminantes que poderiam interferir na detecção de reações positivas para *Salmonella* spp., diminuindo a sensibilidade dos *primers* utilizados. Wilson (1997) em sua revisão, assim como outros autores já citados, listam uma série de fatores que podem interferir na reação da PCR ocasionando falsos resultados, demonstrando que desde os tubos de centrífuga utilizados, até a contaminação dos reagentes (a *Taq* polimerase, por exemplo, assim como qualquer outro) podem interferir fortemente nos resultados.

Uma quinta hipótese, possível, mas que ainda que não tem total respaldo da literatura e por isso carece de mais investigação, é a possibilidade de que salmonelas possam se multiplicar no ambiente.

Conforme mencionado por Bastos *et al.* (2003), em amostras ambientais, o gênero *Shigella* é isolado em números inferiores ao gênero *Salmonella*, assim como sua resistência e sobrevivência também são inferiores, sendo que em amostras oriundas das estações de tratamento de efluentes, a ausência do gênero *Salmonella* deve ser acompanhada da ausência de *Shigella*. Na primeira coleta este fato pode ser verificado, uma vez que se observou a ausência de reação positiva para os gêneros *Salmonella* e *Shigella* no esgoto bruto. No entanto, a espécie *S. dysenteriae* e o sorotipo *S. Typhimurium* foram detectados no EB, não acompanhando o resultado dos gêneros.

Avaliando-se as bactérias *S. Typhimurium*, *Shigella* spp. e *Shigella dysenteriae*, estas só foram detectadas nos estágios iniciais (EB, UASB e/ou L1, a depender da bactéria e da coleta) e não mais se verificou sua presença nos estágios posteriores do tratamento. A ausência de reações positivas para estas bactérias nos demais estágios do tratamento (lagoas 2 e 3, a depender da coleta) pode ser interpretada pela interação de dois eventos: i) a ocorrência de um decaimento expressivo nas unidades do tratamento e ii) pelos baixos índices com que tais bactérias ocorreram nos esgotos, particularmente, nas amostras e nos períodos estudados.

Quanto às demais bactérias investigadas (*Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica*) sua presença não foi detectada em nenhuma das amostras investigadas em nenhuma das quatro coletas.

## **5.2 Objetivo específico 2 - Quantificação por FISH das bactérias identificadas a partir da PCR**

Após a etapa de detecção das bactérias, a próxima fase consistiu em se fazer a quantificação das bactérias que apresentaram reações de PCR positivas nas amostras do EB, L1, L3, uma vez que tais pontos representam a entrada do esgoto, um ponto intermediário do tratamento e a saída do efluente final e também, como mencionado anteriormente, devido às dificuldades em se monitorar os cinco pontos constituintes do sistema completo. Para esta etapa utilizou-se a técnica FISH.

Na primeira e segunda coleta, ainda que o resultado da PCR fosse positivo no efluente do UASB ou na lagoa 2, não seria feita a quantificação. Para as quatro coletas as quantificações foram feitas nas amostras do esgoto bruto, da lagoa 1 e da lagoa 3 conforme o seguinte padrão: se o resultado da PCR nas lagoas fosse positivo e no

esgoto bruto fosse negativo, ainda assim a amostra do esgoto bruto seria quantificada. Com isso o resultado da PCR nas lagoas é que determinaria quais bactérias seriam quantificadas. Isto porque o efluente das lagoas, principalmente da L3, é que representa o esgoto tratado que será lançado no corpo de água ou reutilizado. As bactérias que atenderam a este padrão foram *E. coli*, *Samonella* spp., *Enterococcus* spp. e *Campylobacter* spp. e portanto foram quantificadas.

A partir disso, escolheram-se as sondas a serem utilizadas, por meio de literatura específica. As sondas efetivamente empregadas na quantificação foram: ECO 1167, Sal-3, ENC 38 e CAJECO 1427, para *E. coli*, *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp. e *Campylobacter* spp., respectivamente. As características de cada sonda e os percentuais de formamida utilizados estão listadas na Tabela 4.8. A sonda NON 338 foi utilizada como controle negativo para todas as bactérias, e o controle positivo utilizado foi a partir de culturas puras das bactérias, listadas na Tabela 4.5 e previamente fixadas.

### **5.2.1 Avaliação dos percentuais de formamida aplicados e do sinal de hibridação emitido pelas células hibridadas**

Quando se utiliza a técnica FISH para se fazer a quantificação de determinado microrganismo em uma amostra que se deseja avaliar, um dos principais fatores a ser considerado é o percentual de formamida que é acrescida ao tampão de hibridação, aumentando a estringência entre célula e sonda, permitindo uma melhoria na especificidade e, conseqüentemente, na qualidade do sinal emitido pela célula.

Este reagente pode interferir decisivamente na qualidade da hibridação e na quantificação das bactérias, uma vez que, volumes de formamida abaixo ou acima do ideal podem ocasionar resultados falso – negativo ou falso-positivo. Isso poderia subestimar ou superestimar a contagem e incorrer em resultados errados, ou ainda na desqualificação de uma sonda, considerando-a como de qualidade ruim, sendo que na realidade, a possível interferência seja devido à falta ou ao excesso de formamida.

Essa influência do percentual de formamida também foi verificada por Konuma *et al.* (2001), estudando bactérias oxidadoras de amônia, e mostra que, a depender da concentração de formamida que é adicionada ao tampão de hibridação, a intensidade do sinal pode variar.

A temperatura de hibridação também pode estar associada à concentração da formamida e interferir na qualidade do sinal de hibridação, no entanto testes associando volume de formamida e temperatura de hibridação para a quantificação de *E. coli* como sugeridos por Tang *et al.* (2005) foram feitos no presente trabalho e verificou-se que variações na temperatura pouco interferiram na qualidade do sinal.

Assim, para todas as sondas utilizadas, vários testes para se encontrar a concentração ideal de formamida foram feitos, partindo-se sempre do percentual indicado pelo autor de referência da sonda (Tabela 4.8).

A sonda ENF 191 foi escolhida como primeira opção para se fazer a detecção e quantificação de *Enterococcus* spp. Antes da utilização, propriamente dita, de cada sonda, procedia-se a preparação de lâminas testes, com o objetivo de se checar qual a melhor concentração de formamida a ser acrescida ao tampão de hibridação e que proporcionaria uma boa intensidade do sinal, este verificado pelo brilho que a célula emitiria sob luz UV de comprimento de onda específico. Após sucessivos testes com percentuais de formamida que variaram de 15 a 40%, percebeu-se que a sonda ENF 191 estava hibridando somente com um número ínfimo de células da cultura pura (controle positivo) nos melhores percentuais de formamida que era entre 20 e 25%.

A hipótese mais plausível levantada para a ocorrência deste episódio foi o fato da sonda ser específica para *Enterococcus faecalis* e a cultura pura ser de *Enterococcus* spp. Em princípio, ao se fazer a escolha desta sonda, considerou-se que era de boa qualidade, uma vez que, como é confirmado pela literatura (MURRAY, 1990), dentre todas as espécies de *Enterococcus* que ocorrem no esgoto, 90% correspondem a *Enterococcus faecalis*. No entanto, como havia uma dúvida quanto ao uso da sonda ENF 191 para a quantificação de *Enterococcus* spp., optou-se pela aquisição de outra sonda (Enc 38).

### **5.2.2 Resultados obtidos das quantificações das bactérias hibridadas com as respectivas sondas e quantificação de células totais coradas com DAPI.**

A Tabela 5.6 apresenta a estatística descritiva das bactérias hibridadas com as respectivas sondas utilizando-se FISH, além do número de células totais coradas com DAPI. A Figura 5.1 mostra a variação das quantificações das bactérias nas amostras do EB, L1 e L3 em quatro coletas (N=4) e os valores obtidos da quantificação de células

totais coradas com DAPI para o EB e a L3. Quanto à aplicação do teste T de Dixon, de um total de 12 resultados (4 coletas em triplicata) obtidos para cada bactéria quantificada, somente três valores foram excluídos, sendo 2 para *Salmonella* spp. (um no EB e um na L3) e um para *Campylobacter* spp. na L1.

**Tabela 5.6** - Estatística descritiva da quantificação das bactérias pela técnica de FISH\* e resultado da PCR

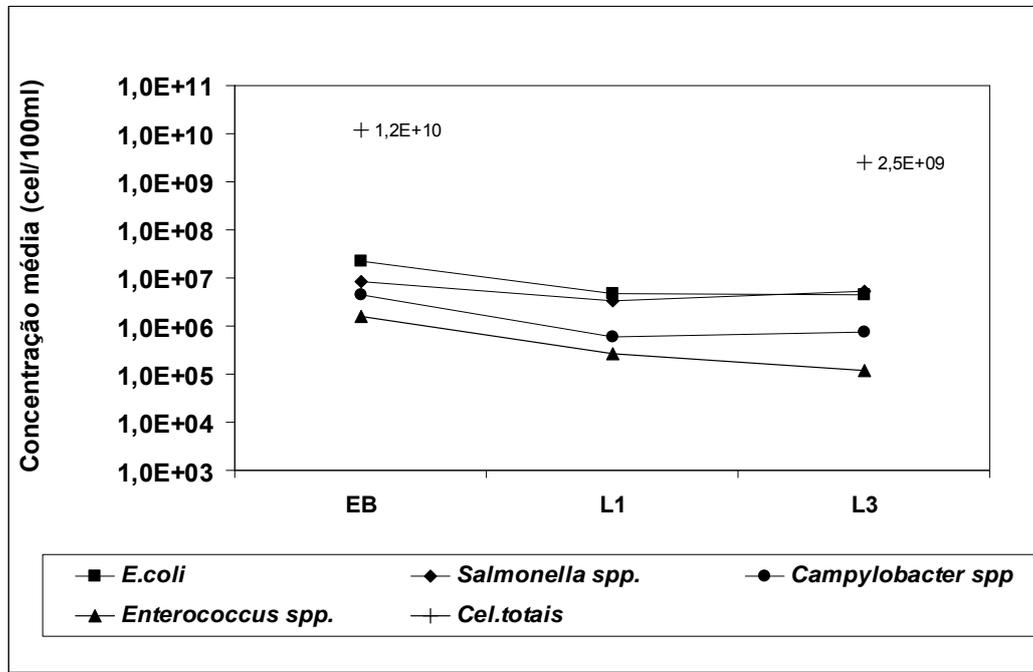
<i>Escherichia coli</i> (cel/100mL) (ECO-1167)						
Parâmetro	EB	PCR	L1	PCR	L3	PCR
Média aritmética	2,3E+07		4,8E+06		4,5E+06	
Média geométrica	1,6E+07		3,4E+06		1,7E+06	
Mediana	1,1E+07		5,3E+06		3,9E+06	
Desvio padrão	2,4E+07	Positivo	3,1E+06	Positivo	4,8E+06	Positivo
CV	1,08		0,64		1,06	
Mínimo	8,3E+06		6,0E+05		1,3E+05	
Máximo	5,9E+07		8,0E+06		1,0E+07	
<i>Salmonella</i> spp. (cel/100mL) (Sal-3)						
Parâmetro	EB	PCR	L1	PCR	L3	PCR
Média aritmética	8,6E+06		3,4E+06		5,4E+06	
Média geométrica	3,6E+06		5,5E+05		6,4E+05	
Mediana	6,7E+06	Negativo	1,9E+06		2,1E+06	
Desvio padrão	9,5E+06		4,6E+06	Positivo	8,2E+06	Positivo
CV	1,10		1,35		1,52	
Mínimo	8,0E+05		4,8E+04		4,8E+04	
Máximo	2,0E+07		9,8E+06		1,7E+07	
<i>Campylobacter</i> spp. (cel/100mL) (CAJECO 1427)						
Parâmetro	EB	PCR	L1	PCR	L3	PCR
Média aritmética	4,5E+06		6,1E+05		7,3E+05	
Média geométrica	4,4E+06		5,4E+05		6,6E+05	
Mediana	3,9E+06		5,6E+05		6,7E+05	
Desvio padrão	1,4E+06	Positivo	3,4E+05	Positivo	3,9E+05	Positivo
CV	0,30		0,55		0,53	
Mínimo	3,6E+06		3,0E+05		3,7E+05	
Máximo	6,6E+06		1,0E+06		1,2E+06	
<i>Enterococcus</i> spp. (cel/100mL) (Enc-38)						
Parâmetro	EB	PCR	L1	PCR	L3	PCR
Média aritmética	1,6E+06		2,6E+05		1,3E+05	
Média geométrica	1,5E+06		-		-	
Mediana	1,4E+06		2,3E+05		4,9E+04	
Desvio padrão	7,5E+05	Positivo	3,0E+05	Positivo	1,9E+05	Positivo
CV	0,46		1,17		1,49	
Mínimo	9,4E+05		0,0E+00		0,0E+00	
Máximo	2,7E+06		5,9E+05		4,0E+05	
Células totais (DAPI)*	1,2E+10		-		2,5E+09	

Valores referentes às médias de triplicatas obtidas de cada uma das quatro coletas, tanto para as células hibridadas, quanto para células totais.

\*A quantificação de células totais, conforme mencionado anteriormente, foi feita somente para o EB e a lagoa 3.

Percebe-se que no EB, *E. coli* foi a única espécie que apresentou valor médio da ordem de  $10^7/100\text{mL}$ , resultado esperado, uma vez que *E. coli* apresenta grande contribuição

para o esgoto bruto, em termos de bactérias entéricas, da ordem de  $10^9$  a  $10^{12}$  org/hab.d (von SPERLING, 2005). De qualquer forma, as concentrações encontradas, das quatro bactérias, são elevadas, principalmente os valores de *Salmonella* spp. verificados na lagoa 3.



**Figura 5.1** – Variação das quantificações das bactérias nas amostras e do valor de células totais.

Visualizando-se conjuntamente a Tabela 5.6 e a Figura 5.1, observa-se, que utilizando a técnica de FISH, ocorreu o decaimento médio de uma ordem de grandeza para *E. coli*, *Enterococcus* e *Campylobacter* desde o EB até a L3, já para *Salmonella* spp. observa-se que não houve variação dos valores em termos de ordem de grandeza, permanecendo da ordem de  $10^6$  células/100mL desde o EB à L3.

Na amostra do EB os gêneros *Salmonella*, *Campylobacter*, e *Enterococcus*, mantiveram valores médios da ordem de  $10^6$  células/100mL. Nas Lagoas 1 e 3, os valores médios de *E. coli*, e *Salmonella* spp. situaram-se da ordem de  $10^6$  células/100mL, seguidos por *Campylobacter* spp. e *Enterococcus* spp., da ordem de  $10^5$  células/100mL, com um ligeiro aumento para *Campylobacter* spp. Observa-se que entre as lagoas 1 e 3, ocorreu uma diminuição dos valores absolutos, mas não se notou uma diminuição dos valores, em termos de ordem de grandeza, para nenhuma das bactérias.

Nota-se, ainda, na Tabela 5.6 que a variabilidade dos dados entre as coletas foi menor para *E. coli* na L1, já no EB e na L3 a variabilidade se mostra elevada. Para *Salmonella* spp. ocorreu uma forte variabilidade nas três amostras, para *Campylobacter* spp. a variabilidade foi baixa nas três amostras, enquanto que *Enterococcus* spp. teve alta variabilidade somente nas amostras das lagoas.

Na Tabela 5.7 são apresentados os percentuais de células hibridadas com as sondas, em relação ao número total de células quantificadas nas amostras. Isto é, dentre todos os microrganismos presentes na amostra, qual percentual corresponde a cada um dos gêneros quantificados.

**Tabela 5.7 – Percentual de células hibridadas com as sondas específicas para cada bactéria em relação a células totais coradas com DAPI**

Gênero ou espécie	% de células hibridadas no EB em relação ao número de células totais	% de células hibridadas na L3 em relação ao número de células totais
<i>E. coli</i>	0,2	0,02
<i>Salmonella</i> spp	0,1	0,2
<i>Campylobacter</i> spp	0,03	0,02
<i>Enterococcus</i> spp	0,01	0,005

Obs.: os valores das células totais são referentes às médias obtidas de triplicatas em cada coleta conforme valores apresentados na Tabela 5.6

Analisando-se a Tabela 5.7 os valores de células hibridadas com as respectivas sondas só podem ser considerados baixos quando se avalia a totalidade da amostra. Ou seja, em relação a todos os microrganismos presentes nas amostras, as quatro bactérias quantificadas, à primeira vista, são pouco representativas. Observa-se que no EB *Salmonella* spp representa 0,1% do número total de células, enquanto que na lagoa 3 o percentual de ocorrência de *Salmonella* spp. foi de 0,2%. Com isso algumas das hipóteses levantadas no item 5.1.2, sobre o resultado negativo para *Salmonella* spp.no EB e positivo na lagoa 3 podem ser reforçadas, principalmente a hipótese de que *Salmonella* possa se multiplicar nas lagoas ou devido a contaminação externa por dejetos de animais.

Apesar da quantidade de células totais coradas com DAPI mostrar que houve um decréscimo na quantidade de células na lagoa 3, a porcentagem relativa de *Salmonella* nesta amostra foi maior que a determinada para o esgoto bruto, sugerindo que este gênero possa ser mais adaptado às condições ambientais presentes na lagoa de

polimento. Conforme mencionado pela prof<sup>a</sup>. M. H. Matté (em comunicação pessoal), bactérias do gênero *Salmonella* apresentam baixa competitividade com os demais microrganismos entéricos presentes no esgoto bruto, e dependendo das condições ambientais a que são expostas, eventualmente podem se multiplicar no meio ambiente, o que poderia explicar o resultado obtido.

Apesar da baixa abundância relativa das bactérias investigadas, há que se ponderar que dentre outros elementos, a ocorrência de microrganismos patogênicos nos esgotos brutos e tratados constitui um importante fator de risco, sobretudo porque esses organismos podem atingir o organismo de humanos e animais, comprometendo-lhes à saúde.

A avaliação estatística, utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando a quantificação das quatro bactérias (conforme descrito no item 1 da Figura 4.7) foi realizada. A aplicação do teste consistiu em se verificar a existência de diferenças significativas entre o número de bactérias quantificado nas amostras investigadas. A hipótese  $H_0$  adotada foi de que não havia diferenças estatísticas significativas de quantificações entre as quatro bactérias, nas amostras investigadas. Assim, se  $p_{calc}$  fosse maior que 0,05 não se rejeitaria  $H_0$ , ao contrário se  $p_{calc}$  fosse menor que 0,05 rejeitar-se-ia  $H_0$ . Para os grupos de dados no qual se rejeitou  $H_0$ , o significado era de que, no mínimo, um deles apresentava diferença estatisticamente significativa em relação aos demais conjuntos analisados, a um nível de significância de 5%. Em seguida, a fim de se avaliar quais conjuntos eram diferentes entre si, utilizou-se o teste de Comparações Múltiplas (software STATISTICA 6.1 - Statsoft, Inc., 2003).

Os resultados estão apresentados na Tabela 5.8, e mostram que, no EB houve diferença estatística significativa de quantificação entre *E. coli* e *Enterococcus* spp. Já na lagoa 3 ocorreram diferenças estatísticas significativas, de quantificação, entre *Enterococcus* spp. e *E. coli*, *Enterococcus* spp. e *Salmonella* spp., e também entre, *Enterococcus* spp. e *Campylobacter* spp. Conforme pode ser observado na Tabela 5.6 a quantificação de *Enterococcus* spp. nas lagoas, apresentou valor mínimo igual a zero.

**Tabela 5.8** – Diferenças significativas entre as quantificações das quatro bactérias detectadas para o Teste de Kruskal-Wallis e Comparações Múltiplas ( $\alpha= 5\%$  de significância)

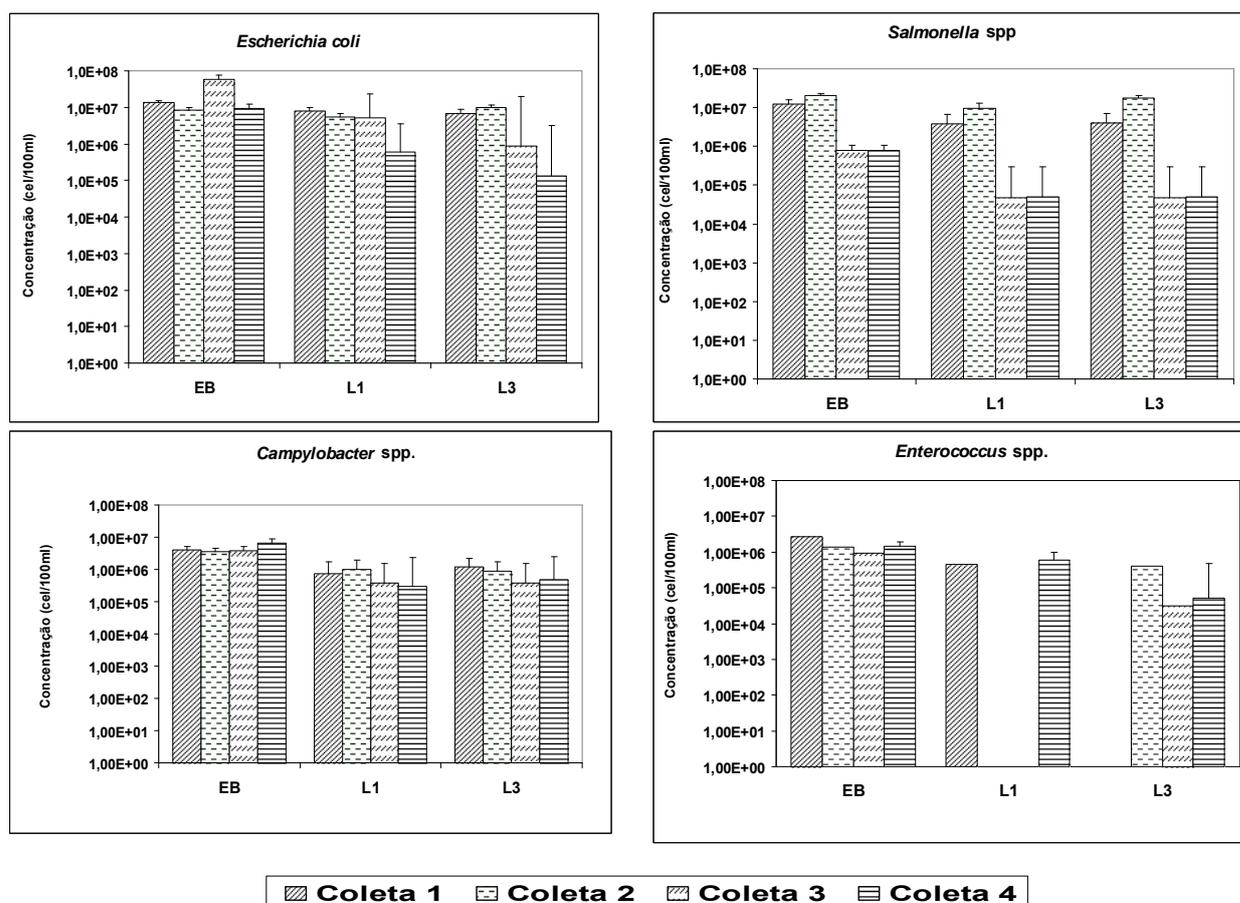
<b>Estatística</b>	<b>EB</b>	<b>L1</b>	<b>L3</b>
P <sub>calc.</sub>	0,0000	0,0005	0,0010
Existem diferenças entre bactérias?	sim	Sim	sim
Entre quais bactérias ocorreu a diferença estatística?	Eco x Ent.	Eco x Ent.	Ent x Eco. Ent x Sal e Ent. x Camp
Legenda: Teste de Kruskal-Wallis com comparações múltiplas.	Eco= <i>E. coli</i> Sal= <i>Salmonella</i> spp.	Ent= <i>Enterococcus</i> spp. Camp= <i>Campylobacter</i> spp.	

A Figura 5.2 mostra os resultados das quantificações das quatro bactérias, por FISH, considerando as quatro coletas. Os resultados da avaliação estatística, utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis, considerando as quatro coletas nos três pontos de monitoramento (EB, L1 e L3 - conforme descrito no item 2 da Figura 4.7) também foram feitos e estão apresentados na Tabela 5.9. A aplicação do teste consistiu em se verificar a existência de diferenças significativas das bactérias, entre as quatro coletas. A hipótese  $H_0$  adotada foi de que, não havia diferença estatisticamente significativa nas quantificações de *E. coli*, *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp., e *Campylobacter* spp. entre as quatro coletas, em cada uma das amostras (EB, L1 e L3). Assim, se  $p_{calc} > 0,05$  não se rejeitaria  $H_0$ , ao contrário se  $p_{calc} < 0,05$  rejeitar-se-ia  $H_0$ . Em seguida, a fim de se avaliar quais conjuntos eram diferentes entre si, também se utilizou o teste de Comparações Múltiplas como descrito anteriormente.

**Tabela 5.9** – Diferenças significativas, detectadas pelo Teste de Kruskal-Wallis ( $\alpha= 5\%$ ), entre as quatro coletas e os pontos de amostragem, considerando a quantificação das bactérias

<b>Bactéria</b>	<b>Observações</b>	<b>EB</b>	<b>L1</b>	<b>L3</b>
<i>E. coli</i>	P <sub>calc.</sub>	0,0221	0,0752	0,0153
	Existe diferença significativa entre coletas?	sim	não	sim
	Entre quais coletas?	2 e 3		2 e 4
<i>Salmonella</i> spp.	P <sub>calc.</sub>	0,0341	0,0220	0,0220
	Existe diferença significativa entre coletas?	sim	sim	sim
	Entre quais coletas?	ND	2 e 3	2 e 3
<i>Campylobacter</i> spp.	P <sub>calc.</sub>	0,0886	0,0349	0,0227
	Existe diferença significativa entre coletas?	não	sim	sim
	Entre quais coletas?		2 e 4	1 e 3
<i>Enterococcus</i> spp.	P <sub>calc.</sub>	0,1118	0,0219	0,0147
	Existe diferença significativa entre coletas?	não	sim	sim
	Entre quais coletas?	-	ND	1 e 2

Obs: ND - não foi possível determinar



**Figura 5.2** - Quantificação de bactérias patogênicas por FISH, considerando as quatro coletas efetuadas nos três pontos de monitoramento.

Fazendo-se uma avaliação conjunta da Tabela 5.9 e da Figura 5.2, nota-se que nas quatro coletas do EB, *E. coli* mostrou valor mais elevado na coleta 3, porém diferenças significativas foram observadas apenas entre as coletas 2 e 3. Na L1, a coleta 1 foi a que apresentou maior valor, no entanto não se verificou a existência de diferença estatística significativa entre as quatro coletas. Na L3 o maior valor de quantificação foi observado na coleta 2, sendo verificada uma diferença significativa apenas entre as coletas 2 e 4.

Para *Salmonella spp.*, observando-se a Figura 5.2, para as três amostras (EB, L1 e L3) maiores valores foram detectados na coleta 2, entretanto, pelo teste das Comparações Múltiplas não foi possível definir entre quais coletas ocorreram diferenças estatisticamente significativas no EB. Já para a L1 e a L3 diferenças significativas foram notadas entre as coletas 2 e 3.

Quanto a *Campylobacter* spp. no EB, a coleta 4 apresentou o maior valor dentre as quatro, entretanto diferenças significativas não foram observadas entre coletas. Na L1 a coleta 2 teve o maior valor dentre as quatro e encontrou-se diferença significativa entre as coletas 2 e 4. Já para a L3 a coleta 1 foi a que teve maior valor quantitativo e diferença significativa foi encontrada entre as coletas 1 e 3.

Para *Enterococcus* spp. o maior valor no EB foi verificado na coleta 1, mas não se observou diferenças significativas entre as quatro coletas. Na L1 o maior valor foi verificado na coleta 4, mas não foi possível definir entre quais coletas houve diferenças estatísticas significativas. Para a L3 a coleta 2 foi a de maior valor quantitativo para o gênero e diferença significativa foi observada entre as coletas 1 e 2.

Seguindo o fluxograma da Figura 4.7 (item 3) também se verificou a existência de diferença estatisticamente significativa entre as quantificações, efetuadas nos pontos de amostragem (EB, L1 e L3) para cada bactéria. A hipótese  $H_0$  adotada era de que não existia diferença estatisticamente significativa das bactérias entre amostras (EB L1, L3), o teste de Comparações Múltiplas, a fim de se avaliar quais conjuntos eram diferentes entre si, também foi aplicado, como descrito anteriormente. Os resultados são apresentados na Tabela 5.10.

**Tabela 5.10** – Diferenças significativas entre as quantificações das bactérias nos quatro pontos de monitoramento, detectadas a partir do teste de Kruskal-Wallis e Comparações múltiplas ( $\alpha=5\%$ ).

<b>Estatística</b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>Salmonella</i> spp.</b>	<b><i>Campylobacter</i> spp.</b>	<b><i>Enterococcus</i> spp.</b>
Pcalc.	0,0002	0,1864	0,0000	0,0000
Entre quais amostras ocorreu a diferença estatística?	L1 e L3	-	L1 e L3	L1 e L3

Observa-se que somente *Salmonella* spp. não apresentou diferenças significativas entre amostras, ou seja, do EB até a L3, os valores não alteraram em termos de ordem de grandeza, confirmando-se estatisticamente os valores apresentados na Tabela 5.6. Para as demais bactérias foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre quantificações, sobretudo nas lagoas 1 e 3, indicando que houve decaimento.

Vários trabalhos têm sido publicados em relação à presença de *E. coli* em esgotos brutos e tratados, uma vez que esta espécie é utilizada como indicadora de microrganismos patogênicos (Tabelas 3.3 e 3.4). A quase totalidade dos trabalhos listados mostra um expressivo decaimento de *E. coli*, desde o EB até a última lagoa da série, sobretudo quando se utiliza lagoas de maturação ou polimento em uma das etapas do tratamento, sendo que também, a maioria dos trabalhos listados utilizaram metodologias que empregam meios de cultura (Colilert®, tubos múltiplos, cultura em placa ou outro), cujos resultados são expressos em termos de NMP ou UFC (Tabela 3.5).

Regnault *et al.* (2000) utilizaram FISH para avaliar a presença de *E. coli* em diversas amostras, com o objetivo principal de verificar a qualidade da sonda Colinsitu, construída pelos próprios pesquisadores. Um método de revivificação, que promove o alongamento da célula (sem divisão celular), tornando-a mais robusta, também foi testado. Em amostras de urina, obtidas de pacientes, os autores encontraram valores que variaram de  $2,8 \cdot 10^8$  a  $3,0 \cdot 10^5$  UFC/mL. Já para amostras ambientais (água do Rio Sena/França e amostras de esgotos obtidas de ETEs da França) os autores mencionaram que as células deveriam apresentar boas condições fisiológicas para serem detectáveis. Além disso, a pesquisa de *E. coli* nas amostras de esgoto bruto e tratado mostrou-se difícil (os números foram bastante baixos), segundo os autores, devido a uma privação de células e pelo fato de que quase sempre elas são muito diminutas, contêm baixa quantidade de ribossomos e, conseqüentemente, de RNAr 16S, mostrando que a etapa de revivificação das células nestas amostras foi essencial.

Como relatado anteriormente, a técnica de FISH vem sendo utilizada na investigação de bactérias patogênicas em diversos tipos de amostra, no entanto o que se observa é que a técnica ainda é pouco utilizada para quantificar bactérias patogênicas em amostras ambientais, sobretudo àquelas oriundas de ETE.

Poulsen *et al.* (1994) investigaram *E. coli* utilizando FISH em amostras de intestino grosso de camundongos, com objetivo principal de testar a qualidade da sonda Ec 1531 para o gene RNAr 23S. Os autores confirmaram a boa qualidade da sonda, mas não mostraram o resultado quantitativo de *E. coli*.

Tang *et al.* (2005) utilizaram *E. coli*, inoculada em água do mar, como modelo de microrganismo, para otimizar um protocolo de FISH (de maneira geral os protocolos

são relativamente semelhantes em várias publicações, com variações nas concentrações dos reagentes e no tempo de hibridação). O objetivo principal da pesquisa com FISH e *E. coli*, era testar baixos tempos de hibridação (aproximadamente trinta minutos), associado à elevação da temperatura e não a quantificação da bactéria na amostra. Os autores relataram que o protocolo avaliado mostrou-se tão bom quanto os protocolos convencionais em que são requeridas até duas horas para a hibridação das células.

Fuchs *et al.* (1998) e Fuchs *et al.* (2001) fizeram um extenso trabalho de avaliação da qualidade de várias sondas para FISH e da intensidade do sinal de hibridação, utilizando *E. coli* como modelo. Estes dois trabalhos são muito importantes porque mostram em quais regiões dos genes alvos RNAr, 16S e 23S, ocorre melhor “anelamento” da sonda e melhor intensidade do sinal em função da sequência da sonda e da estrutura secundária do RNAr. Os autores verificaram que não foram encontradas diferenças de hibridação entre os genes 16S ou 23S, e não foram apresentados resultados quantitativos.

Stender *et al.* (2001) identificaram e quantificaram *E. coli* em amostras de água de abastecimento utilizando uma técnica molecular de hibridação *In Situ* (PNA-CISH-peptide nucleic acid – Chemiluminescent *In Situ* Hybridization) semelhante ao FISH, mas com características diferentes, impossibilitando a comparação.

Neef *et al.* (1995), que utilizaram a sonda ECO 1167, também utilizada no presente trabalho, avaliaram a presença de *E. coli* em uma mistura de bioaerossóis, encontrando valores de *E. coli* que variavam entre, menor que 1 até  $10^9$  cel/m<sup>3</sup> de ar.

Joachimsthal *et al.* (2003) avaliaram a especificidade de uma sonda utilizada para a técnica FISH por citometria de fluxo para verificar a ocorrência de resultado falso-positivo, utilizando uma cultura pura (ATCC 53323) de *E. coli* como modelo e verificaram que a especificidade da sonda avaliada situou-se entre 47-70%, mas também não apresentaram valores de quantificação de *E. coli*.

O que se percebe é que empregando a técnica de FISH, *Escherichia coli* tem sido utilizada mais para testar a qualidade de alguma sonda, ou para otimização de protocolos, do que para se quantificar, realmente, sua presença em amostras ambientais.

Quanto ao gênero *Salmonella*, Pant e Mittal (2007) investigaram este gênero em um sistema UASB-LP, porém utilizaram método de cultivo, e constataram a presença de *Salmonella* spp. da ordem de  $10^2$  NMP/100 mL no esgoto bruto. Houve a remoção de uma unidade log após o reator UASB (da ordem de  $10^1$  NMP/100 mL) e após a lagoa, retornou para a ordem de  $10^2$  NMP/100 mL. Ou seja, a bactéria decaiu entre o esgoto bruto e o UASB, e, no entanto aumentou em uma ordem de grandeza no efluente da lagoa, permanecendo com um valor no efluente final semelhante ao EB, não confirmando um decaimento bacteriano.

Langeland (1982) investigou a presença de *Salmonella* spp. e outros microrganismos em amostras de esgoto obtidas de três estações de tratamento de esgotos em Oslo/Noruega também utilizando métodos de cultivo (NMP). Nas amostras de esgoto bruto os valores médios variaram de 130 a 3 NMP/100mL nas três estações avaliadas. Não obstante, o autor relata que os valores verificados foram possivelmente mais baixos em relação ao esperado, devido a duas condições requeridas para que a técnica do NMP seja apropriada: i) o fato de que algumas células debilitadas possam perecer durante o enriquecimento do meio, ii) a improbabilidade de que as bactérias estejam regularmente distribuídas, em todas as amostras avaliadas. Probabilidade, esta última, que também pode ter ocorrido com o gênero *Salmonella* ou algum dos outros gêneros também na presente pesquisa, utilizando técnicas moleculares.

Dados obtidos do PROSAB 4, em que todos os grupos utilizaram métodos de cultivo, mostraram que o grupo da Universidade Federal de Viçosa/MG, avaliando um sistema de tratamento de esgotos constituído por reator UASB e lagoas em série, em escala piloto, verificaram que salmonelas inoculadas no sistema de lagoas apresentaram um rápido decaimento ( $10^7$  -  $10^1$  org/100mL). O grupo da Universidade Federal do Espírito Santo, trabalhando em um sistema composto por reator UASB e uma lagoa de polimento detectou concentrações de *Salmonella* spp. menores que 3 NMP/100mL. Já o grupo da Universidade de São Paulo, trabalhando em dois sistemas constituídos por lagoas anaeróbias seguidas de lagoas facultativas na cidade de Lins, não detectou a presença do gênero *Salmonella* nas amostras investigadas (CHERNICHARO *et al.*, 2006).

Oliveira *et al.* (2006b), não detectaram a presença de UFC de *Salmonella* spp. na avaliação da eficácia do tratamento de esgotos de um sistema de lagoa de estabilização na cidade de Porto Alegre/Brasil, utilizando-se técnicas de cultivo.

Nordentoft *et al.* (1997) utilizaram a técnica de FISH e a sonda Sal-3 para avaliar a aplicabilidade da sonda na identificação de *Salmonella* em aglomerados bacterianos e em tecido histológico extraído de animais contaminados por esta bactéria. Dentre 55 sorovares da espécie *Salmonella enterica* testados, 49 hibridaram com a sonda Sal-3. Os autores concluíram que a sonda testada para FISH é uma ferramenta promissora para a rápida quantificação de *Salmonella enterica* nas amostras estudadas.

Oliveira e Bernardo (2002) utilizaram um protocolo de FISH introduzindo-se algumas modificações na etapa de fixação e na temperatura de hibridação. A sonda Sal-3 para a detecção de *Salmonella* spp. em amostras de alimentos e do meio ambiente (amostra ambiental não especificada) foi utilizada. Os autores verificaram também o limite de detecção da técnica com a sonda utilizada e compararam os resultados da quantificação por FISH com resultados obtidos por meio de cultivo em placa. Os valores quantificados por FISH ( $\text{Log}_{10}$  cel/mL) foram maiores do que os valores detectados por contagem em placa ( $\text{Log}_{10}$  UFC/mL), 9,5 cel/mL e 8,3 UFC/mL respectivamente. Os autores relataram que uma maior sensibilidade do FISH poderia ser explicada por uma detecção pela sonda, de células que não estejam totalmente viáveis, mas ainda possuam algum conteúdo de rRNA ativos. Quanto ao limite de detecção um resultado bastante interessante mostrou a sensibilidade da técnica em detectar 1 célula/mL, tanto para a espécie *S. enteritidis* quanto para o sorotipo *S. Thyphimurium*.

Quanto ao gênero *Campylobacter*, Stelzer e Jacob (1991) avaliaram a sua presença em amostras de esgoto de duas ETE na Alemanha e encontraram aproximadamente 51,3 cel/100mL no esgoto bruto, 1,5 cel/100mL no efluente da primeira lagoa e ausência de organismos no efluente da quarta lagoa da série. Entretanto tais resultados não são passíveis de comparação com os do presente trabalho, uma vez que as lagoas eram diferentes e o método de quantificação utilizado foi por meio de cultivo. Dousse *et al.* (1993) também pesquisaram a presença de *Campylobacter* spp. em amostras de esgoto bruto. De 116 amostras pesquisadas, 43,9% foram positivas para este gênero, entretanto a metodologia utilizada também foi por meio de cultivo.

Moreno *et al.* (2001) avaliaram a presença de *Campylobacter* spp. em amostras obtidas de frangos, utilizando FISH. O trabalho consistiu da verificação da qualidade da sonda CAM-1, com prévio enriquecimento da amostra e amostras sem enriquecimento. Os autores não apresentaram valores das concentrações das células detectadas por FISH, porque o objetivo principal era avaliar o sinal emitido pela sonda utilizada. Este se mostrou bastante adequado principalmente após 22 horas de enriquecimento das amostras.

Schmid *et al.* (2005) também utilizaram FISH para avaliar a concentração do gênero *Campylobacter* em amostras fecais de frangos, enriquecidas e não enriquecidas, encontrando valores que variaram de  $10^8$  a  $10^3$  cel/g de fezes conforme o tempo de enriquecimento.

Assim como para *E. coli*, a utilização da técnica FISH para quantificação de bactérias entéricas patogênicas, ainda tem se restringido a testes para verificação da qualidade de sondas, para otimização de protocolos ou ainda, na investigação de outras amostras (alimentos, por ex.) e, por enquanto, tem sido pouco usada para pesquisar estes microrganismos em amostras oriundas de efluentes de ETEs.

### **5.2.3 Avaliação conjunta das concentrações das bactérias quantificadas e dos parâmetros físico-químicos medidos *in loco*.**

A Tabela 5.11 apresenta os resultados das quantificações das bactérias em cada coleta, juntamente com os valores dos parâmetros, pH, temperatura, OD, turbidez, e vazão, medidos nos dias das coletas. Uma avaliação mais detalhada da relação dos parâmetros físico-químicos será apresentada no item 5.4.

Fazendo uma avaliação conjunta das quantificações das bactérias nas quatro coletas e dos valores de pH, OD, temperatura, turbidez e vazão no dia das coletas, observou-se que o pH nas quatro coletas variou de neutro a básico, observando-se um maior aumento na L3, nas quatro coletas. Quanto à concentração de OD observaram-se valores bastante baixos (abaixo do valor de supersaturação = 9,4 mg/L) para as lagoas 1 e 3 na coleta três, enquanto que na coleta quatro, verificou-se valor de OD muito baixo na lagoa 1 (3,2 mg/L) e bastante elevado na lagoa 3 (16,6 mg/L), bem acima do valor de supersaturação.

**Tabela 5.11** – Concentração das bactérias quantificadas e parâmetros físicos e químicos, em cada coleta.

Parâmetro	Coleta	EB	L1	L3
<b>**E.coli</b>	1	1,3E+07	8,0E+06	6,8E+06
	2	8,3E+06	5,4E+06	1,0E+07
	3	5,9E+07	5,2E+06	8,8E+05
	4	9,4E+06	6,0E+05	1,3E+05
<b>**Salmonella spp.</b>	1	1,3E+07	3,7E+06	4,1E+06
	2	2,0E+07	9,8E+06	1,7E+07
	3	8,0E+05	4,8E+04	4,8E+04
	4	8,0E+05	5,0E+04	5,0E+04
<b>**Campylobacter spp.</b>	1	4,0E+06	7,4E+05	1,2E+06
	2	3,6E+06	1,0E+06	8,7E+05
	3	3,9E+06	3,8E+05	3,7E+05
	4	6,6E+06	3,0E+05	4,7E+05
<b>**Enterococcus spp.</b>	1	2,7E+06	4,5E+05	0,0E+00
	2	1,3E+06	0,0E+00	4,0E+05
	3	9,4E+05	0,0E+00	4,8E+04
	4	1,5E+06	5,9E+05	5,0E+04
<b>*pH</b>	1	7,4	7,7	9,0
	2	7,1	7,8	8,0
	3	7,1	7,6	8,2
	4	7,3	7,5	9,0
<b>*Oxigênio dissolvido</b>	1	0,3	17,6	8,4
	2	NM	NM	NM
	3	0,5	3,0	3,1
	4	1,5	3,2	16,6
<b>*Temperatura</b>	1	24,2	25,8	24,4
	2	NM	NM	NM
	3	23,5	26,4	25,4
	4	22,4	22,0	21,3
<b>*Turbidez</b>	1	141	39	56
	2	100	18	37
	3	110	23	39
	4	155	18	28
<b>Vazão (m<sup>3</sup>/dia)</b>	1	31	31	31
	2	19	19	19
	3	26	26	26
	4	15	15	15

Legenda: NM- não medido

\*Valores medidos no dia da coleta

\*\*Valores médios de triplicatas Obs.: os dados obtidos dos parâmetros físico- químicos e vazão são referentes aos valores verificados nos dias das quatro coletas (N=4)

Considerando-se os valores médios das quantificações, observados na Tabela 5.6, a eficiência de remoção global (desde o esgoto bruto até a lagoa 3) verificada para cada uma das quatro bactérias foi de 89% para *E. coli*, 82% para *Salmonella spp.*, 85% para *Campylobacter spp.* e 50% para *Enterococcus spp.*

A eficiência das lagoas em promover o decaimento de enterobactérias é atribuída principalmente às alterações de temperatura, do pH e OD, devido à atividade fotossintetizante das algas, sendo que altos valores de pH (acima de 9,4) é letal para a

maioria das bactérias (PEARSON, 2003). É possível que essas variações, principalmente do pH e do OD, quando associados, possam ter contribuído para o aumento ou a diminuição dos valores quantitativos das bactérias, observados entre coletas. Porém, os valores médios de pH e OD observados nos resultados dos parâmetros físicos e químicos (Tabela 5.15) mostram que as variações entre coletas, em geral, foram pequenas e não justificariam as diferenças observadas.

Quanto à temperatura nas quatro coletas, esta se mostrou ligeiramente mais elevada somente na lagoa 1 (valores ínfimos quando comparados ao EB e L3). Entretanto, considerando que a temperatura média nas lagoas foi de 23 °C é pouco provável que este parâmetro tenha interferido diretamente nos valores das quantificações, a não ser quando associado aos diversos outros parâmetros avaliados.

A vazão média verificada foi de 29 m<sup>3</sup>/dia. No entanto os valores das vazões nos dias das coletas variaram. Porém, observando-se a Figura 5.2 e a Tabela 5.11 não se pode dizer que este parâmetro, por si só, tenha sido decisivo nas diferenças observadas, já que a coleta 4 apresentou valores de quantificação maiores para algumas bactérias, em relação às outras três coletas e foi feita em um dia em que a vazão apresentou um dos valores mais críticos (15m<sup>3</sup>/dia) dos três anos e meio de monitoramento.

Uma questão, que associada à vazão e a outros fatores, pode ter contribuído para as diferenças observadas é o TDH (tempo de detenção hidráulica) em cada unidade. O TDH expressa o tempo necessário para que os microrganismos procedam à estabilização da matéria orgânica nas lagoas e, portanto relaciona-se à atividade das bactérias (VON SPERLING, 2002). Com isso, valores de TDH relativamente altos (em termos de dias) permitem que as bactérias estabilizem a matéria orgânica, proporcionando melhor qualidade do tratamento. Uma vez que o TDH, nas lagoas 1 e 2, é em torno de quatro dias e na lagoa 3 é de um dia e meio, isto significa que, na prática, a amostra de EB que entrou no sistema em um determinado dia não corresponderia à amostra de saída das lagoas daquele mesmo dia.

Mediante estas observações poder-se-ia conjecturar que os valores verificados desde o EB até a lagoa 3 não demonstraram um decaimento expressivo, em termos de ordem de grandeza, como era esperado, sendo observado, em média, decaimento menor que uma unidade logarítmica (uma unidade log=90% de remoção) para as quatro bactérias, como

mencionado anteriormente. Isto pode ter ocorrido devido a uma possível multiplicação das bactérias nas lagoas. Tal hipótese, no entanto, como já relatado, ainda é discutível. O que se sugere é que todos os fatores mencionados, quando associados, podem ter interferido nos resultados das reações de PCR, assim como nos valores de quantificação das bactérias detectadas.

#### **5.2.4 Considerações sobre o objetivo específico 2 - Quantificação por FISH das bactérias detectadas a partir da PCR**

Uma observação crucial quando se faz a quantificação de um mesmo microrganismo utilizando-se metodologias e amostras diferentes, é que os valores, quando comparados, por vezes se mostram bastante divergentes e dificulta, em determinadas situações, a comparação dos dados.

Alguns autores têm pesquisado o gênero *Campylobacter* utilizando a técnica FISH (MORENO *et al.* 2001; LEHTOLA *et al.* 2005; SCHMID *et al.* 2005; HALAWEH *et al.* 2005), entretanto, as amostras são, geralmente, clínicas ou de alimentos. Alguns desses autores têm utilizado FISH para testar sondas para quantificação deste gênero, e as amostras, geralmente, são, ou purificadas a partir de amostras clínicas, ou obtidas de culturas puras de coleções, como é o caso da sonda CAJECO 1427, utilizada no presente trabalho.

Observações semelhantes também têm sido verificadas para *E. coli*, para o gênero *Enterococcus* (JANSEN *et al.* 2000; MANERO e BLANCH, 2002; KEMPF *et al.*, 2000; WAAR *et al.* 2005; WELLINGHAUSEN *et al.*, 2007; FRAHM *et al.* 2001) e também para *Salmonella* spp. (NORDENTOFT *et al.* 1997; OLIVEIRA e BERNARDO, 2001; MAYNARD *et al.* 2005) e a grande maioria dos trabalhos que se propõem a quantificar bactérias patogênicas em amostras ambientais (águas de rios, águas poluídas, esgotos brutos e/ou tratados) ainda se utiliza das técnicas de cultivo para quantificação. Nesta pesquisa, excetuando-se *E. coli*, (discussão no item 5.3) não se utilizaram técnicas de cultivo para o enriquecimento de nenhuma das bactérias, pois não era escopo do trabalho.

O que se nota, de maneira geral, em relação à utilização da técnica de FISH para a quantificação de bactérias patogênicas, é que a maioria dos estudos tem utilizado

amostras clínicas (sangue, fezes, tecidos histológicos, urina), amostras de alimentos ou culturas puras (na construção de novas sondas), principalmente para se responder rapidamente a um possível diagnóstico positivo e com isso administrar a medicação correta de maneira rápida.

A quantificação de bactérias patogênicas em amostras ambientais (particularmente esgotos brutos e tratados) utilizando esta técnica ainda parece incipiente, e os métodos de cultivo permanecem sendo os mais utilizados, com isso a comparação dos resultados à luz da literatura torna-se bastante estreita, devendo ser feita com cautela.

De maneira geral a quantificação de bactérias patogênicas no esgoto bruto e em amostras de lagoas de polimento, conforme verificado nesta pesquisa se mostrou efetiva, ou seja, mesmo com algumas dificuldades foi possível utilizar a técnica FISH para quantificar bactérias patogênicas neste tipo de amostra. No caso das lagoas em particular, a quantificação por FISH se mostrou relativamente difícil, sobretudo para *E. coli*, devido principalmente a interferência das algas, que são fortemente autofluorescentes mesmo após passar pelo processo de filtração adotado nesta pesquisa, ressaltando-se ainda que tal etapa de filtração pode reter microrganismos na membrana e estes serem desconsiderados, requerendo mais estudos para melhor validação.

### **5.3 Objetivo específico 3 – Quantificação de *E. coli* pelos métodos FISH e Substrato Cromogênico-Colilert® e comparação dos resultados**

Como especificado no item 4.3.3, a técnica FISH (cel/100mL) também foi utilizada para se quantificar *E. coli* e comparar os resultados com aqueles obtidos pelo método dependente de cultivo, Colilert® (NMP/100mL). Paralelamente ao objetivo específico 1, o objetivo específico 3 foi desenvolvido. Assim, os primeiros ensaios utilizando-se a técnica FISH foram feitos para a quantificação de *E. coli*, a fim de se comparar com os resultados obtidos por meio do Colilert®.

Esta etapa do trabalho foi feita somente com *E. coli*, pelo fato de a técnica do Colilert® ser de execução fácil e rápida. O cultivo, em placas ou em tubos, das outras bactérias a serem investigadas pela PCR não foi feito devido às dificuldades e exigências de algumas bactérias em relação aos meios e também porque não era o escopo principal do trabalho.

Conforme comentado no item 5.2.1 o percentual de formamida adicionado ao tampão de hibridação é bastante importante quando se opta pela técnica FISH para se quantificar determinado grupo de microrganismo.

Ao se iniciarem os testes de hibridação de *E.coli* por FISH utilizando-se a sonda ECO-1167 (descrita na Tabela 4.7) e adicionando o percentual de formamida sugerido pelo autor de referência (40% FA), observou-se uma baixa intensidade do sinal emitido pelas células, gerando dúvidas sobre a real hibridação das células com a sonda ECO-1167 e tampão de hibridação contendo 40% de formamida.

A partir desta verificação, foram utilizados alguns recursos no intuito de se descobrir o porquê da emissão desse sinal fraco. Com isso, aumentou-se o volume de amostra, de sonda, e de tampão de hibridação. Posteriormente, diminuiu-se o tempo de lavagem e excluiu-se EDTA dos tampões, e em seguida, se aumentou e depois se diminuiu a temperatura de hibridação. Como não foram notadas diferenças após tais alterações do procedimento, concluiu-se que o problema deveria ser com a sonda em uso. Optou-se, assim pela aquisição de uma outra sonda para quantificar *E. coli*, escolhendo-se a sonda *uidA*, descrita na Tabela 4.7.

Para a sonda *uidA*, como não foi indicada na literatura a concentração de formamida a ser utilizada, avaliou-se a interferência da concentração desta, testando-se percentuais entre 20 e 50% de formamida, na hibridação de *E. coli* obtida de cultura pura.

A sonda *uidA* apresentou melhor hibridação com 30% de formamida, ou seja, um sinal fluorescente mais intenso, porém não foram todas as células da cultura pura que hibridaram com a sonda. Isto ocorreu possivelmente pelo fato de a sonda estar hibridando a uma região específica do microrganismo, uma vez que a sonda era gene-específica, para o gene *uidA*, presente em quase todas as linhagens de *E. coli* ou que talvez nem todas as células do cultivo estavam ativas.

A sonda ECO 1167, quando utilizada com tampão de hibridação contendo 40% de formamida, apresentou baixa intensidade de brilho fluorescente quando hibridada com células da cultura pura. Ainda assim foi feita a quantificação de *E. coli* nas amostras especificadas (EB, L1 e L3) em três coletas.

Paralelamente, uma lâmina com células de *E. coli* foi preparada utilizando-se tampão de hibridação contendo 30% de formamida e a sonda ECO 1167, somente para fins de teste. A partir deste teste observou-se que praticamente todas as células da cultura pura de *E. coli* (a mesma cultura utilizada anteriormente no teste com a sonda *uid-A*) hibridaram com a sonda, emitindo um brilho fluorescente muito melhor do que quando se utilizava 40% de formamida no tampão, como sugerido por Neef *et al.* (1995).

A partir desta constatação, testaram-se diferentes percentuais de formamida para as sondas ECO1167 e *uidA* na quantificação de *E. coli*, e confirmaram-se os resultados, os quais estão publicados em Godinho *et al.* (2009). Uma vez constatado que a sonda ECO-1167 quando utilizada com tampão de hibridação contendo 30% de formamida emitiu um sinal muito melhor, abandonou-se o uso da sonda *uidA*, além disso todas as contagens que foram feitas utilizando-se a sonda ECO-1167 e tampão de hibridação contendo 40% de formamida (referente a três coletas) foram repetidas e os valores da hibridação com 40% de FA foram descartados.

O teste realizado com uma cultura pura de *Salmonella* spp. para verificar a ocorrência de hibridação cruzada, indicou que o gênero *Salmonella* não hibridava com a sonda ECO 1167, enquanto que algumas células de *Shigella* spp. hibridaram com a sonda utilizada, mostrando que, ainda que branda, a ocorrência de reação cruzada com este gênero de bactéria não podia ser totalmente descartada.

Embora a sonda ECO-1167 utilizada, tenha sido demonstrada pelos autores de referência como específica para *E. coli*, a proximidade filogenética entre *Shigella* e *Escherichia coli* já é bem conhecida (como mencionado na revisão da literatura, alguns autores consideram *Shigella* uma linhagem de *E. coli*). Assim, hibridações cruzadas são possíveis de ocorrerem entre estes dois gêneros. Para outros controles negativos (culturas puras de *Enterococcus* spp., *Aeromonas hydrophila* e *Yersinia enterocolitica*) não se verificou hibridação quando se utilizou o mesmo tampão de hibridação contendo 30% de formamida, eliminando a possibilidade de resultados falsos positivos com estas bactérias.

### 5.3.1 Comparação das técnicas Colilert® e FISH na quantificação de *E. coli*

Foram feitas quantificações de *E. coli* através das técnicas Colilert® e FISH para amostras oriundas do esgoto bruto, da lagoa 1 e lagoa 3, conforme especificado no item 4.2.3, com o objetivo de se comparar as duas metodologias e possivelmente estabelecer uma correlação entre elas. Assim como para o objetivo específico 2, o sinal da célula hibridada com a sonda ECO 1167 era considerado na quantificação quando a mesma era também corada por DAPI. Para este objetivo também se quantificaram as células totais coradas pelo corante DAPI, obtendo-se o total de células existentes nas amostras de cada uma das coletas, para o EB e a lagoa 3.

#### 5.3.1.1 Quantificação de *E. coli* utilizando-se a sonda ECO 1167 e 30% de formamida

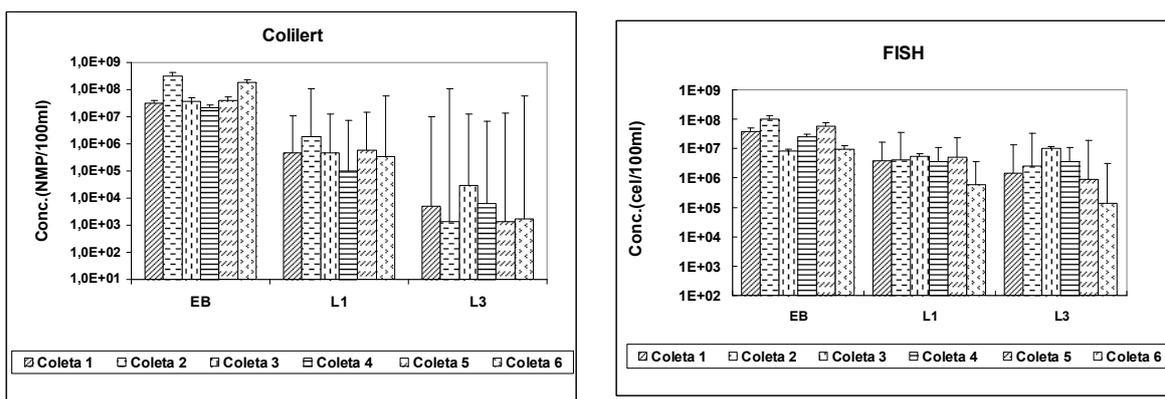
Para a comparação das técnicas Colilert® e FISH na quantificação de *E. coli*, utilizando-se 30% de formamida no tampão de hibridação, procederam-se seis campanhas de coleta, nas datas 19/09/2007, 22/11/2007, 27/02/2008, 02/04/2008, 11/02/2009 e 27/05/2009. A contagem de células por FISH foi feita em triplicata nas seis coletas, já a quantificação pela técnica do Colilert® foi feita uma única vez nas coletas 1 a 4 e em triplicata nas coletas 5 e 6. A Tabela 5.12 e a Figura 5.3 mostram os resultados da concentração de *E. coli* obtidos, utilizando-se as técnicas Colilert® (NMP/100mL) e FISH (cel/100mL).

**Tabela 5.12** – Quantificação de *E. coli* pelas técnicas Colilert® e FISH em cada uma das coletas.

Coleta	Técnica	Esgoto Bruto	Lagoa 1	Lagoa 3
Coleta 1	Colilert® (NMP/100mL)	3,1E+07	4,6E+05	5,1E+03
	FISH (cel/100mL)	3,9E+07	3,8E+06	1,5E+06
Coleta 2	Colilert® (NMP/100mL)	3,2E+08	1,8E+06	1,4E+03
	FISH (cel/100mL)	9,8E+07	4,2E+06	2,6E+06
Coleta 3	Colilert® (NMP/100mL)	3,8E+07	4,6E+05	3,0E+04
	FISH (cel/100mL)	8,3E+06	5,4E+06	1,0E+07
Coleta 4	Colilert® (NMP/100mL)	2,1E+07	9,8E+04	6,3E+03
	FISH (cel/100mL)	2,5E+07	3,6E+06	3,6E+06
Coleta 5	Colilert® (NMP/100mL)	4,1E+07	5,9E+05	1,3E+03
	FISH (cel/100mL)	5,9E+07	5,1E+06	8,8E+05
Coleta 6	Colilert® (NMP/100mL)	1,8E+08	3,3E+05	1,7E+03
	FISH (cel/100mL)	9,4E+06	6,0E+05	1,3E+05

FISH – valores médios de triplicatas nas seis coletas

Colilert - coletas 1 a 4 valores de uma análise. Coletas 5 e 6 - valores médios de triplicatas



**Figura 5.3** – Quantificações de *E. coli* – apresentação por coletas e amostras.

Avaliando-se os dados da Tabela 5.12 e da Figura 5.3 percebe-se que utilizando a técnica do Colilert® houve variação dos resultados entre coletas de até duas ordens de grandeza para o esgoto bruto ( $10^8$  a  $10^6$  NMP/100mL) assim como para a lagoa 1 ( $10^4$  a  $10^6$  NMP/100mL), enquanto que para a lagoa 3 a mesma ordem de grandeza ( $10^3$  NMP/100mL) se manteve em cinco das seis coletas. Já com o FISH os resultados do esgoto bruto variaram em uma ordem de grandeza ( $10^7$  e  $10^6$  cel/100mL), na lagoa 1 os resultados entre coletas mantiveram-se da ordem de  $10^5$  e  $10^6$  cel/100mL, enquanto que na lagoa 3 variou de  $10^7$  até  $10^5$  NMP/100mL entre coletas.

As Tabelas 5.13 e 5.14 mostram a estatística descritiva dos resultados de *E. coli* obtidos por Colilert® e por FISH.

**Tabela 5.13** – Estatística descritiva da quantificação de *E. coli* (NMP/100mL) pela técnica de Colilert®.

Parâmetro	Esgoto bruto (NMP/100mL)	Lagoa 1 (NMP/100mL)	Lagoa 3 (NMP/100mL)
Média aritmética	1,1E+08	5,5E+05	5,2E+03
Média geométrica	7,0E+07	4,4E+05	2,5E+03
Mediana	4,3E+07	4,5E+05	1,7E+03
Desvio padrão	1,0E+08	4,6E+05	8,9E+03
Coef. de variação	0,95	0,83	1,72
Mínimo	2,1E+07	9,8E+04	1,0E+03
Máximo	3,2E+08	1,8E+06	3,0E+04

Obs. (número de dados = 6) referente ao valor obtido de uma análise para as coletas 1 a 4 e valores médios obtidos de análises em triplicata para as coletas 5 e 6.

**Tabela 5.14** – Estatística descritiva da quantificação de *E. coli* (cel/100mL) pela técnica de FISH.

Parâmetro	Esgoto bruto	Lagoa 1	Lagoa 3
Média aritmética	4,0E+07	3,8E+06	3,1E+06
Média geométrica	2,8E+07	3,1E+06	1,6E+06
Mediana	3,2E+07	4,0E+06	2,0E+06
Desvio padrão	3,4E+07	1,7E+06	3,6E+06
Coef. de variação	0,86	0,45	1,15
Mínimo	8,3E+06	6,0E+05	1,3E+05
Máximo	1,1E+08	5,4E+06	1,0E+07
Células totais (DAPI)*	9,7E+09		1,3E+09
% de células hibridadas com a sonda em relação ao total de células contidas na amostra	0,4	-	0,2

Número de dados = 6

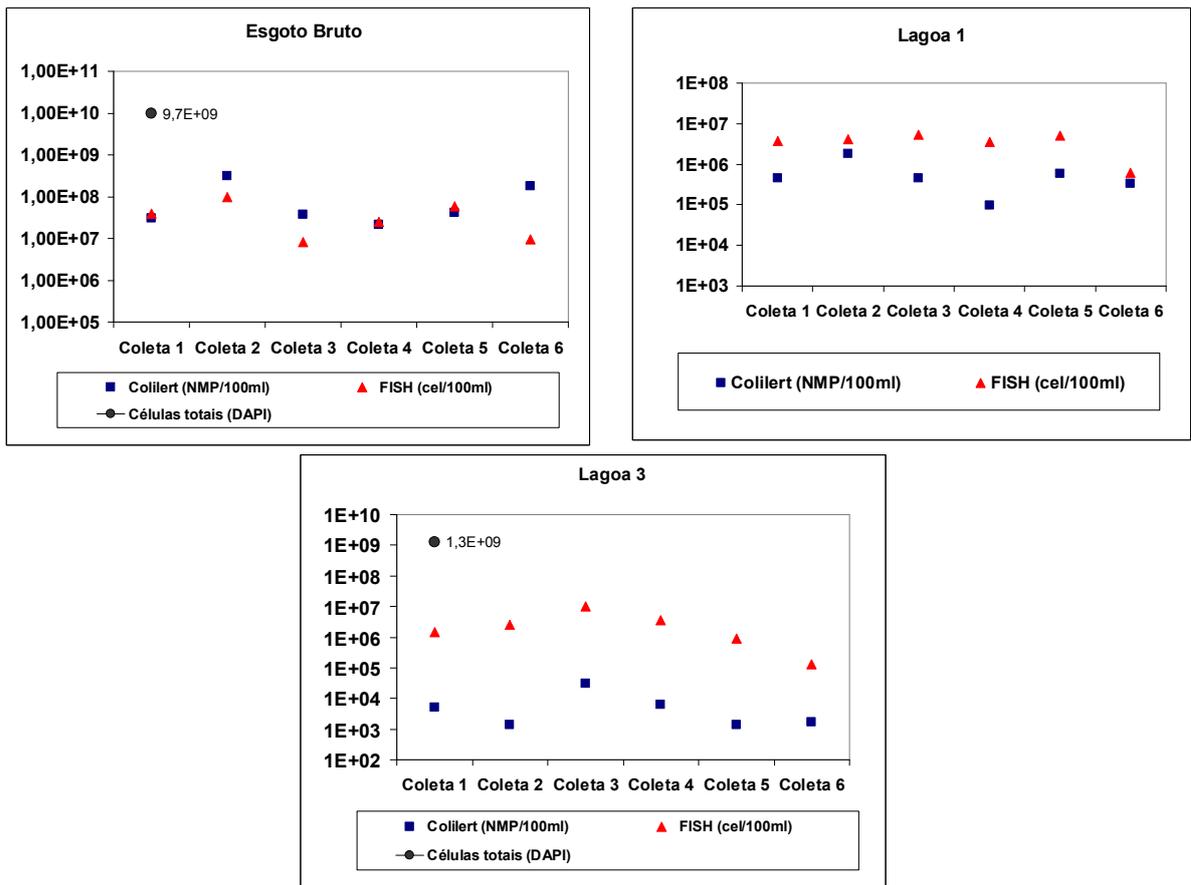
Todos os valores são referentes à média aritmética de triplicatas obtidas de seis coletas.

\*Células totais (coradas com DAPI). Valores médios obtidos de triplicatas nas seis coletas

Observando-se as Tabelas 5.13 e 5.14 verifica-se que os valores de *E. coli*, para a lagoa 3, obtidos por FISH (da ordem de  $10^6$  cel/100mL) quando comparados aos resultados obtidos pelo Colilert® ( $10^3$  NMP/100mL) apresentam uma diferença bastante expressiva.

Esse nível de variação verificada não era esperado, pois com respaldo na literatura (ANDRADA, 2005; MASCARENHAS, 2002; SOARES, *et al.* 2001; KATO e FLORÊNCIO, 2001; CEBALLOS, 2000), e também pelo perfil histórico de *E. coli*, apresentado no item 5.4 (Tabela 5.15), sabe-se que em sistemas de tratamento que utilizam lagoas de polimento em série, como alternativa de pós-tratamento, os valores de *E. coli* situam-se na faixa de  $10^3$  a  $10^4$  NMP/100 mL (baseados em Colilert®) na última lagoa da série. Esperava-se, inicialmente, que a técnica do FISH, pelo menos, acompanhasse estes valores, confirmando-se uma diminuição no número de células hibridadas com a sonda ao longo das unidades e o decaimento de *E. coli*.

A Figura 5.4 mostra as variações das quantificações de *E. coli* entre as duas técnicas. Devido ao fato de que somente nas coletas 5 e 6 o Colilert® foi feito em triplicata, o número de dados (N) de tamanho seis para o Colilert® é resultante de quatro valores únicos das coletas 1 a 4 e valores médios (média aritmética) obtidos de triplicatas nas coletas 5 e 6. Para FISH, foram considerados os valores médios obtidos de triplicatas nas seis coletas.



**Figura 5.4 –** Variação das quantificações de *E. coli* – segundo as metodologias Colilert® (NMP/100mL) e FISH (cel/100mL)

A Figura 5.4 confirma as observações feitas a partir da Figura 5.3 e das Tabelas 5.13 e 5.14. Percebe-se claramente, que no EB, a quantificação de *E. coli* por meio das duas técnicas foi relativamente próxima, excetuando-se as coletas 2, 3 e 6, em que os valores para o EB, obtidos pelo Colilert® foram maiores que aqueles obtidos pelo FISH. Para a L1, nota-se que, com FISH os valores das quantificações foram mais elevados em relação ao Colilert®, excetuando-se também a coleta 6, em que os valores verificados foram praticamente equivalentes. O resultado que, no entanto, mais chamou a atenção foi o da L3, no qual a diferença na quantificação entre as técnicas foi expressiva.

Para verificar se havia diferença estatisticamente significativa entre os dois métodos, na quantificação de *E. coli*, utilizou-se o teste não paramétrico “T de Wilcoxon” para amostras pareadas. Ainda que os valores dos métodos de quantificação de *E. coli*, Colilert® (NMP/100mL) e FISH (cel/100mL) sejam expressos em unidades diferentes, o “teste T de Wilcoxon” ajuda a expressar uma propensão do que ocorre entre as duas

metodologias. Ademais, tem-se a compreensão de que ambos os testes analíticos buscam expressar o número de organismos contidos em um mesmo volume (100 mL).

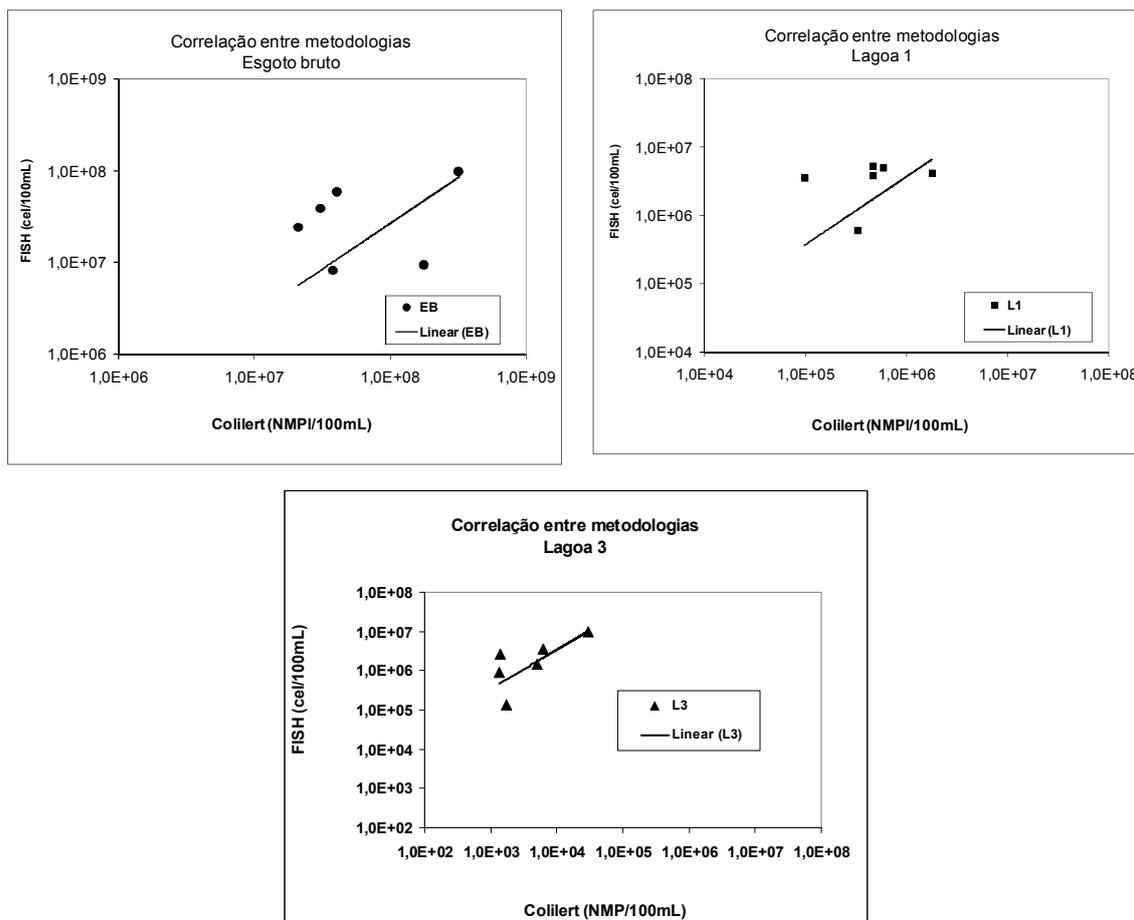
O teste foi aplicado a partir de um universo amostral (N) de tamanho seis considerando-se para o Colilert® quatro valores absolutos obtidos das coletas 1 a 4 e valores médios obtido de triplicatas nas coletas 5 e 6. Para FISH, foram considerados os valores médios obtidos de triplicatas nas coletas 1 a 6 (médias aritméticas).

Uma vez que as contagens por metodologias diferentes foram preparadas a partir de uma mesma amostra, a suposição do pareamento se aplica. A hipótese  $H_0$  adotada foi de que não havia diferença estatística entre as amostras, quanto à quantificação de *E. coli*, por Colilert® e FISH.

Após a realização do teste estatístico utilizando-se o Software Statistica 6.1 (Statsoft, Inc., 2003) verificou-se que para o EB  $H_0$  não pôde ser rejeitada, confirmando-se que para o esgoto bruto as diferenças dos valores das contagens de *E. coli* a partir dos dois métodos não são estatisticamente significativas. No entanto para as lagoas 1 e 3, a hipótese  $H_0$  pôde ser rejeitada.

Portanto, considerando um universo amostral de tamanho seis, por grupo, para cada amostra avaliada, o “teste T de Wilcoxon” sugeriu que para um nível de significância de 5%, não houve diferença estatística significativa entre as contagens para o esgoto bruto. Entretanto, para as lagoas 1 e 3 o teste indicou a ocorrência de diferenças estatísticas significativas nas contagens de *E. coli* utilizando os métodos Colilert® (NMP/100mL) e FISH (cel/100mL).

Foram feitas também análises de correlação entre os métodos Colilert® (NMP/100mL) e FISH (cel/100mL) na quantificação de *E. coli* nas amostras do EB, L1 e L3. O resultado de cada amostra está apresentado na Figura 5.5. A Correlação foi linear, com o coeficiente linear da equação da reta sendo fixado igual zero no pressuposto de que contagens nulas por Colilert® estejam também associadas às contagens nulas por FISH.



**Figura 5.5** – Relação entre as contagens de *E. coli* – segundo as metodologias Colilert® (NMP/100mL) e FISH (cel/100mL)

Analisando-se a Figura 5.5, nota-se que houve grande dispersão dos dados verificando-se que, de maneira geral, não há uma correlação clara que possa ser útil para as quantificações

### 5.3.2 Considerações sobre o objetivo específico 3 - Comparação das técnicas Colilert® e FISH na quantificação de *E. coli*

A partir da comparação das técnicas Colilert® (NMP/100mL) e FISH (cel/100mL) na quantificação de *E. coli*, duas possíveis condições de resultados poderiam ocorrer i) ambas as técnicas apresentariam valores próximos de quantificação, ii) utilizando-se FISH, ocorreria um aumento nos valores das quantificações de *E. coli*, visto que esta técnica permite a contagem individual de células, enquanto o Colilert® expressa os valores em termos de número mais provável e não detecta células VBNC. Porém, qualquer das condições que ocorresse, supunha-se que ocorreriam seguindo-se um

padrão nas três amostras. Contudo, a contagem de *E. coli* utilizando-se FISH se mostrou maior do que com o método do Colilert® somente nas lagoas, sobretudo na L3.

Ainda não estão completamente elucidados os motivos pelos quais os valores de *E. coli*, obtidos principalmente da lagoa 3, utilizando FISH se mostraram bem mais elevados do que para o método do substrato cromogênico - Colilert®.

Garcia-Arminsen e Servais, (2004) utilizaram a técnica FISH para avaliar a concentração de *E. coli* em água do Rio Sena/França e águas residuárias tratadas por processo de lodo ativado. Os autores submeteram as amostras a uma etapa prévia de enriquecimento ou “revivificação” das células proposto por Regnault *et al.* (2000). Esta etapa consiste em expor a célula em um meio contendo, geralmente, extrato de levedura e ácido nalidíxico, que inibe a divisão da célula, mas permite seu crescimento. Este método permite que as células viáveis fiquem mais robustas de modo que o conteúdo de RNAr torne-se mais acessível e mais facilmente detectável sob microscopia após a hibridação da célula.

Os autores verificaram também que células de *E. coli* viáveis, mas não cultiváveis (*viable but nonculturable* - VBNC) não são recuperadas por método de cultivo, e que ambientes submetidos a fortes condições adversas, tais como carência de nutrientes e também, intensa radiação solar (caso das lagoas de polimento, por exemplo) são responsáveis por uma grande fração de células VBNC que não podem ser detectadas por métodos de cultivo e que podem ser detectadas por FISH. Os autores consideram células VBNC aquelas com capacidade de “crescer” em meio, e não a sua real capacidade de exercer atividade celular em condições ambientais.

Oliver (2005) também relatou que várias espécies de bactérias, patogênicas ou não, incluindo *E. coli* e outras bactérias associadas ao trato gastrointestinal, quando submetidas a condições de “stress”, tais como, aumento da temperatura, excesso de oxigênio e de matéria orgânica e incidência de luz solar, entram em estado VBNC, e não são detectáveis por técnicas de cultivo.

Dentre as hipóteses levantadas com o intuito de se tentar explicar os valores elevados da contagem de *E. coli* pela técnica FISH no efluente das lagoas (principalmente na L3), um deles poderia estar associado à possibilidade de que uma quantidade expressiva de

células possam ter entrado em estado VBNC, conforme relatado por Garcia-Arminsen e Servais, (2004) e Oliver (2005) e com isso não puderam ser detectadas pelo Colilert®, subestimando os valores de *E.coli*, mas foram detectadas por FISH. Isto parece ter ocorrido mais expressivamente nas amostras da Lagoa 3 na qual as condições estariam afetando as células de *E. coli* e impedindo seu crescimento no meio de cultura.

Outras hipóteses têm sido levantadas na tentativa de entender estes resultados, atribuindo-se que esta variação entre o Colilert® e o FISH, pode ter ocorrido em virtude de alguns fatores, tais como:

(i) Os resultados obtidos pelo método do substrato cromogênico - Colilert® são expressos em NMP/100 mL, e seus valores podem ser subestimados quando comparado ao FISH, onde as células são contadas por unidade principalmente devido à presença de células VBNC;

(ii) A contagem, principalmente na lagoa 3, pela técnica de FISH, poderia estar sendo superestimada devido à ocorrência de hibridação cruzada entre *E. coli* e *Shigella*, que são muito próximas filogeneticamente, o que eleva os valores de *E. coli*. Como pôde ser visto no item 5.2.1, a sonda utilizada apresentou reação cruzada para o gênero *Shigella*. Não se pode afirmar, com certeza, se houve ou não hibridação cruzada entre *E. coli* e *Shigella*, a ponto de superestimar a contagem das células, uma vez que, um detalhe observado anteriormente foi o fato de que nas reações de PCR para *Shigella dysenteriae* e *Shigella* spp. (Tabela 5.1) os resultados não foram positivos na lagoa 3 em nenhuma das quatro coletas. Ainda assim, possivelmente, esta observação não seria suficiente para variar a ordem de grandeza de forma tão elevada. Foi feito um teste usando uma cultura pura de *Aeromonas* como controle negativo e a sonda de *E. coli* (ECO-1167), e não se verificou hibridação positiva para este gênero.

Além disso, outras hipóteses a exemplo daquelas relatadas por De Long *et al.* (1999), também têm sido levantadas e poderiam ter interferido no FISH, tais como: a existência de fluorescência de *background* e o fato de que as amostras, principalmente das lagoas, podem se mostrar fortemente auto-fluorescentes, devido à presença de matéria orgânica, e neste caso principalmente pela presença de algas. Isto poderia induzir em algum erro de contagem em função da ocorrência de resultado falso-positivo. No entanto, como relatado anteriormente, foram tomadas as precauções possíveis para que tais eventos

não interferissem nas quantificações. Uma vez que não se detectaram fatores adversos que pudessem justificar resultados falso-positivos, se algum fator realmente ocorreu, não foi identificado.

Em estudos em outros sistemas de tratamento de esgotos, a quantificação de bactérias oxidadoras de amônia e de nitrito obtida através das técnicas de Tubos Múltiplos e FISH foram realizadas no âmbito do projeto FINEP, no DESA/UFMG (coordenado e desenvolvido na UFMG pela equipe da prof<sup>a</sup> J. C. de Araújo). A comparação dos resultados permitiu verificar que, utilizando a técnica FISH, foi encontrado um número maior de bactérias *Nitrosomonas* por mL de lodo (da ordem de  $10^1$  a  $10^2$  células a mais por mL) em seis das oito amostras avaliadas, quando comparado com o valor encontrado pela técnica de Tubos Múltiplos. Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Konuma *et al.* (2001) e Schmidt *et al.* (2002). Uma das amostras estudadas apresentou resultados da mesma ordem de grandeza, tanto pela técnica de Tubos Múltiplos quanto de FISH, na determinação de oxidadoras de amônia. Já outras cinco amostras apresentaram valores de *Nitrosomonas* (por Tubos Múltiplos) superiores (cerca de 3 a 4 ordens de grandeza maiores) em relação aos valores obtidos por FISH. O teste estatístico, não paramétrico, de Wilcoxon para verificar a existência de diferenças significativas entre as técnicas sugeriu que para um nível de significância de 5%, não houve diferença estatística significativa entre as contagens de bactérias nitrificantes, pelos dois métodos (FISH e Tubos Múltiplos).

Tais observações permitem supor que quando se utiliza a técnica FISH (cel/mL) os valores de quantificação podem ser mais elevados do que quando se utiliza técnicas de cultivo, a exemplo do Colilert® (para *E. coli*), ou os Tubos múltiplos (ambas baseadas em NMP) talvez porque, como já discutido, o FISH quantifica número individual de células, e como relatado por Garcia-Arminsen e Servais (2004) e Oliver (2005), incorpora a elevada fração de células VBNC, principalmente quando enriquecidas, e que não pode ser detectadas por meio de cultivo, e podem ser quantificadas por FISH.

A questão a ser entendida no presente trabalho é que todos estes princípios poderiam ocorrer, na mesma proporção, também com as amostras da lagoa 1 e também do esgoto bruto e não somente com as amostras da lagoa 3, como foi verificado.

Considerando-se que esta foi a primeira vez que se utilizou a técnica FISH para quantificar *E. coli*, em amostras de esgotos brutos e lagoas de polimento, no âmbito do DESA, não se pode afirmar que as concentrações de *E. coli* nestes sistemas de pós-tratamento sejam realmente tão elevadas na última lagoa da série, como apresentado. Porém é fato que os valores podem ser mais elevados quando comparados com os resultados obtidos por meio do Colilert® e possam atingir valores maiores que  $10^3$ - $10^4$  NMP/100mL como registrado na literatura.

#### **5.4 Avaliação dos parâmetros físicos, químicos e *E. coli* obtidos no monitoramento rotineiro**

Para os parâmetros físicos e químicos que foram monitorados rotineiramente e a série histórica de *E. coli* (utilizando-se o método Colilert®), seguiram-se os métodos propostos pelo “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” (APHA/WEF/AWWA, 2005) e estão indicados na Tabela 4.9, que mostra ainda, a periodicidade das análises. O monitoramento dos parâmetros físico-químicos e da vazão iniciou-se em dezembro de 2006 e finalizou-se em março de 2009. O monitoramento dos parâmetros medidos *in loco* (pH, OD e temperatura) foi feito até julho de 2009. O monitoramento da série histórica de *E. coli* iniciou-se em novembro de 2007 e encerrou-se em julho de 2009. Para os diferentes parâmetros foram feitas coletas semanais, quinzenais e mensais.

Conforme apresentado no objetivo específico 4 (item 2.2) a avaliação das condições ambientais por meio do monitoramento de parâmetros físicos e químicos teve por finalidade a verificação da possível influência desses parâmetros no decaimento das bactérias patogênicas nas lagoas. O resultado do monitoramento rotineiro de *E. coli* (vinte meses de monitoramento) está apresentado na Tabela 5.15 por meio da estatística descritiva e na Figura 5.7 por meio do gráfico Box-Plot.

**Tabela 5.15** – Estatística descritiva das concentrações de *E. coli*, referente ao período de novembro/2007 a julho/2009 utilizando a técnica do Colilert®

	<b>EB</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>
Nº de dados	20	20	20	20
<b>Média aritmética</b>	<b>3,1E+08</b>	<b>2,0E+07</b>	<b>4,0E+06</b>	<b>9,4E+04</b>
Média geométrica	1,0E+08	1,2E+07	5,6E+05	5,7E+04
Mediana	9,8E+07	1,1E+07	4,6E+05	7,0E+04
Desvio padrão	5,4E+08	2,1E+07	1,5E+07	9,9E+04
Coef. de variação	1,74	1,01	3,78	1,06
Mínimo	3,0E+06	2,6E+06	9,8E+04	4,1E+03
Máximo	2,4E+09	6,9E+07	6,9E+07	4,4E+05

Obs.: valores em NMP/100 mL

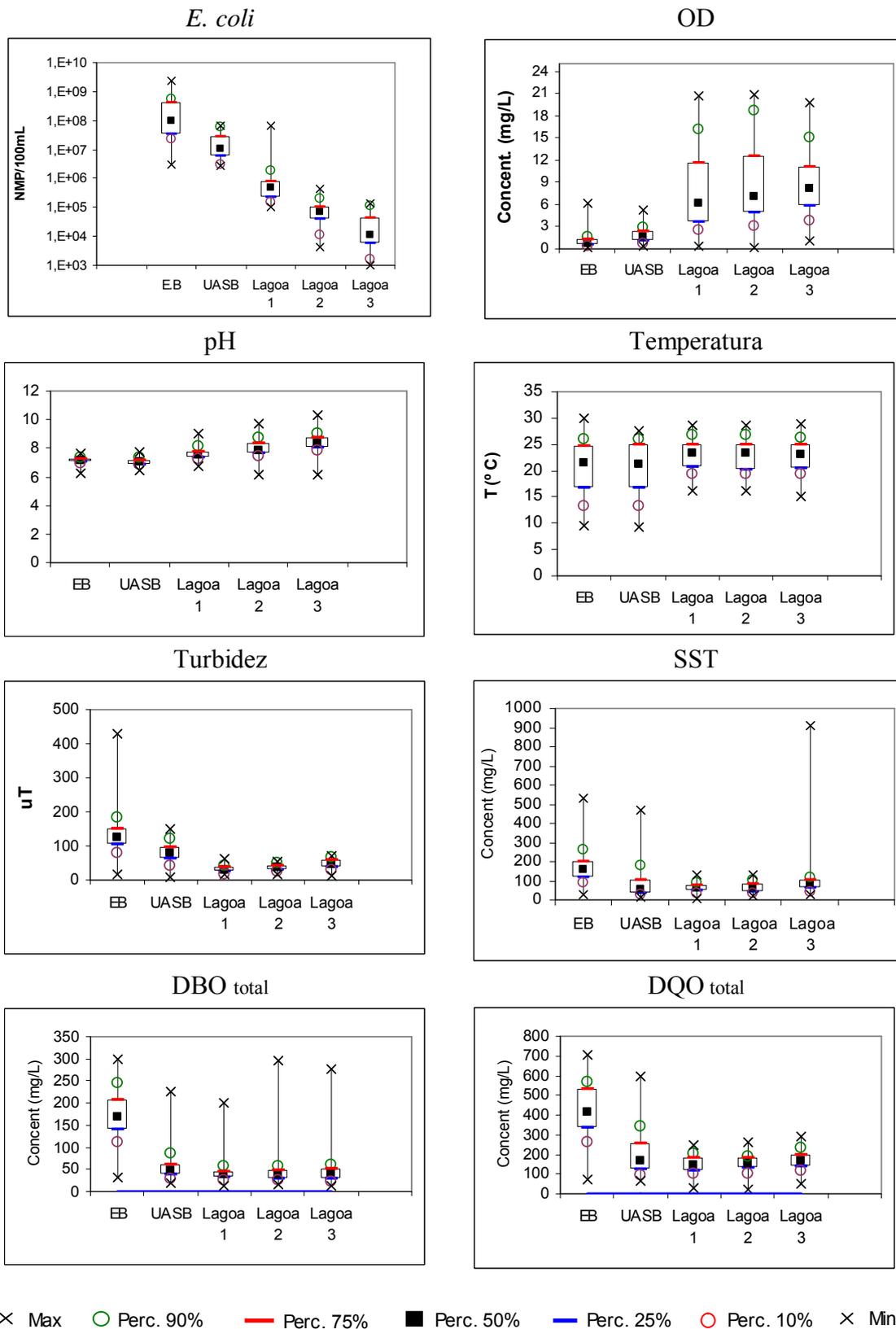
Avaliando-se a Tabela 5.15, percebe-se que os valores médios para *E. coli* no EB e na L1 permaneceram da ordem de  $10^8$  NMP/100mL e  $10^7$  NMP/100mL, respectivamente. Valores estes similares àqueles obtidos da quantificação pela técnica de FISH –  $10^7$  cel/100mL e  $10^6$  cel/100mL. Já para a L3, os valores mantiveram a média de *E. coli* em  $10^4$  NMP/100mL, conforme tem sido reportado pela literatura ao longo de vários anos de estudo. O número de amostras coletadas para FISH, neste caso, foi bem menor que as 20 amostras coletadas para o monitoramento da série histórica de *E. coli* pelo método do Colilert®.

A Tabela 5.16 mostra a estatística descritiva dos parâmetros físicos, químicos e os valores da vazão. O total de análises foi de 112 semanas de monitoramento para os parâmetros semanais, e 56 semanas de monitoramento dos parâmetros quinzenais. O número de dados (N) para os parâmetros variou entre os pontos de coleta devido a problemas operacionais ocorridos ocasionalmente na ETE e que dificultaram ou impediram a coleta (ex.: falta de energia elétrica, ruptura ou entupimento da tubulação, problemas nas bombas, eventos estes que são passíveis de ocorrer na maioria das estações). Para os parâmetros semanais, nenhum ficou abaixo de 90 dados, exceto OD, que deixou de ser monitorado por 14 semanas devido a defeito no equipamento, sendo necessária a aquisição de outro.

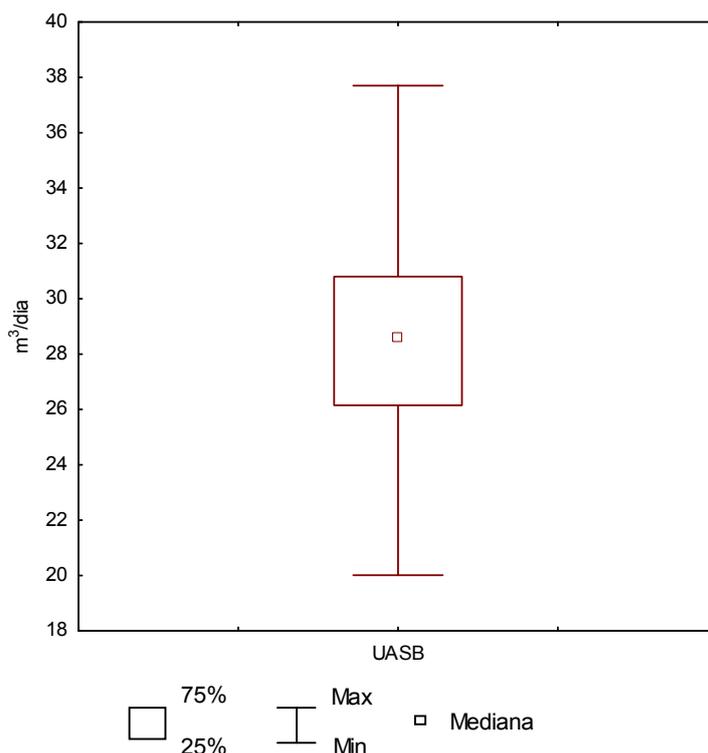
Na Figura 5.6 são apresentados os gráficos Box-plot das concentrações de *E.coli*, O.D, pH, Temperatura, Turbidez, SST, DBOt e DQOt. O gráfico Box - plot da vazão está apresentado na Figura 5.7.

**Tabela 5.16** – Estatística descritiva da concentração dos parâmetros físicos e químicos monitorados em cada ponto de amostragem.

Parâmetro	Unidade	Nº de dados	Estatística	EB	UASB	L1	L2	L3
DBO total	mg/L	43	Média aritmética	<b>173</b>	<b>56</b>	<b>45</b>	<b>44</b>	<b>46</b>
			Média geométrica	160	50	40	38	39
			Mediana	169	49	38	37	41
			Desvio padrão	59,5	33,7	29,5	39,9	39,5
			Coef. Variação	0,34	0,60	0,66	0,91	0,86
			Mínimo	31	18	13	16	13
			Máximo	299	225	199	297	277
DQO total	mg/L	65	Média aritmética	<b>413</b>	<b>200</b>	<b>147</b>	<b>150</b>	<b>170</b>
			Média geométrica	387	176	140	143	163
			Mediana	412	164	146	151	169
			Desvio padrão	132,9	110,1	43,3	40,4	46,2
			Coef. Variação	0,32	0,55	0,29	0,27	0,27
			Mínimo	69	66	27	23	53
			Máximo	706	597	250	263	289
SST	mg/L	62	Média aritmética	<b>200</b>	<b>82</b>	<b>55</b>	<b>58</b>	<b>82</b>
			Média geométrica	162	60	58	59	76
			Mediana	162	58	64	61	81
			Desvio padrão	100	59	25	28	30
			Coef. Variação	0,55	0,77	0,39	0,43	0,37
			Mínimo	63	13	9	22	25
			Máximo	532	291	128	134	178
pH	-	112	Média aritmética	<b>7,1</b>	<b>7,0</b>	<b>7,6</b>	<b>8,0</b>	<b>8,3</b>
			Média geométrica	7,1	7,0	7,6	8,0	8,4
			Mediana	7,1	7,0	7,5	7,9	8,3
			Desvio padrão	0,2	0,2	0,4	0,6	0,6
			Coef. Variação	0,03	0,03	0,05	0,07	0,07
			Mínimo	6,3	6,4	6,7	6,2	6,1
			Máximo	7,6	7,8	9,0	9,7	10,3
OD	mg/L	89	Média aritmética	<b>1,0</b>	<b>1,8</b>	<b>8,0</b>	<b>8,8</b>	<b>8,8</b>
			Média geométrica	0,7	1,5	7,0	7,2	8,0
			Mediana	0,7	1,7	6,9	7,3	8,2
			Desvio padrão	0,8	0,9	5,8	5,5	4,3
			Coef. Variação	0,82	0,50	0,66	0,61	0,48
			Mínimo	0,2	0,4	0,4	0,2	1,1
			Máximo	6,2	5,2	20,6	20,9	19,8
Turbidez	uT	110	Média aritmética	<b>126</b>	<b>81</b>	<b>34</b>	<b>37</b>	<b>45</b>
			Média geométrica	123	75	29	36	45
			Mediana	124	79	29	37	45
			Desvio padrão	52,0	29,7	10,1	9,8	14,6
			Coef. Variação	0,40	0,37	0,33	0,26	0,31
			Mínimo	41	10	17	18	21
			Máximo	268	149	61	54	69
Temperatura	°C	109	Média aritmética	<b>21</b>	<b>20</b>	<b>23</b>	<b>23</b>	<b>23</b>
			Média geométrica	20	20	23	23	23
			Mediana	22	21	23	23	23
			Desvio padrão	5,1	5,0	2,9	2,9	2,9
			Coef. Variação	0,21	0,24	0,13	0,13	0,13
			Mínimo	12	9	16	16	15
			Máximo	30	28	29	29	29
Vazão	m <sup>3</sup> /dia	106	Média aritmética	<b>29</b>	<b>29</b>	<b>29</b>	<b>29</b>	<b>29</b>
			Média geométrica	28	28	28	28	28
			Mediana	29	29	29	29	29
			Desvio padrão	4	4	4	4	4
			Coef. Variação	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
			Mínimo	20	20	20	20	20
			Máximo	40	40	40	40	40



**Figura 5.6** - Box-plot das concentrações de *E. coli*, OD, pH, Temperatura, Turbidez, SST, DBO total e DQO total.



**Figura 5.7** – Box-plot da variação da vazão afluyente ao sistema (m<sup>3</sup>/dia).

Fazendo-se uma avaliação conjunta dos dados, observa-se o expressivo decaimento de *E. coli* ao longo do sistema UASB-LP, e aumento do pH e O.D.

Quanto ao pH, observou-se que este aumentou ao longo do sistema nas três lagoas. Como reportado por Madigan *et al.* (2005) a maioria das bactérias de origem intestinal não tolera valores de pH muito acima de 9,0 e valores de oxigênio muito acima dos níveis de supersaturação, como os que são verificados nas lagoas. Este aumento do pH e do O.D nas lagoas está relacionado principalmente ao processo de fotossíntese que ocorre nas lagoas em presença de luz solar, no qual, ao consumir CO<sub>2</sub> as algas liberam íons hidroxila, o que gera aumento do pH no meio (PEARSON, 2003). Curtis *et al.* (1992) também mencionaram que o decaimento de bactérias patogênicas que ocorre em lagoas de maturação/polimento é devido a uma parceria de fatores tais como, luz solar, altos valores de pH e alta concentração de OD. Circunstâncias estas, que teoricamente, ocasionariam a morte de muitas delas.

Como mostrado na Tabela 5.16 e na Figura 5.6, os valores de pH nas lagoas mantiveram-se, em média, em uma faixa considerada elevada, e que seria prejudicial para a maioria das bactérias. Quanto ao oxigênio dissolvido, este apresentou

concentrações médias entre 8 e 9 mg/L, próximo às concentrações de supersaturação. Isto contribuiria para o decaimento de bactérias patogênicas, também intermediado por reações fotoquímicas.

Outros autores também têm demonstrado que nestes sistemas, o decaimento ocorre muito mais pelo efeito sinérgico da luz (que provoca o aquecimento da água), do pH (de neutro a elevado) e O.D elevados devido a atividade fotossintetizante das algas, do que pelos processos de morte celular, por falta de alimento e predação (TROUSELLIER *et al.* 1986; CURTIS *et al.*, 1994; PANT e MITTAL, 2007).

Depreende-se da Tabela 5.16 e da Figura 5.6 que, em geral, ocorreu o decaimento das concentrações da maioria dos parâmetros ao longo do sistema. Tanto a DBO quanto a DQO apresentaram decaimento com valores próximos aos detectados por Mascarenhas (2002) na avaliação de lagoas com e sem chicanas em Itabira/MG e Andrada (2005) nas mesmas lagoas do presente trabalho, porém com diferentes configurações. Assim como observado por Andrada (2005), a DQO na L3 aumentou em relação aos valores verificados para as lagoas 1 e 2 devido ao aumento das algas.

É possível que as elevadas concentrações de pH, OD, variações pequenas da temperatura e alterações pontuais na vazão do sistema, quando associados, sejam os parâmetros que mais possam interferir na avaliação da presença ou ausência de *Escherichia coli* e de outros gêneros investigados e sua respectiva quantificação, principalmente nas lagoas de polimento.

Quanto à vazão, ocorreram alterações importantes ao longo do período de monitoramento, mas de maneira geral, esta se manteve dentro do almejado, ou seja, valor médio de 29m<sup>3</sup>/dia. Como é conhecido, os reatores UASB não são sistemas indicados para remoção de microrganismos devido, principalmente, aos baixos TDH que são verificados (neste caso o TDH é de 11,8 horas). O processo de remoção de bactérias ocorre essencialmente nos sistemas de pós-tratamento, no caso, as lagoas. A variação da vazão, em conjunto com o TDH, e os demais parâmetros, físicos e químicos pode ter interferido nas quantificações de *E. coli* por ambas as técnicas, assim como nos resultados da PCR para alguns dos gêneros pesquisados.

## 6 CONCLUSÕES

A presente pesquisa teve por objetivo a investigação de bactérias patogênicas, no esgoto bruto e no efluente das lagoas de polimento, L1 e L3, utilizando-se a técnica da PCR, e quantificação das mesmas por FISH, após a identificação por PCR. Além disso, foi feita a quantificação de *Escherichia coli* pelo método de FISH e a comparação com os resultados obtidos pelo Substrato Cromogênico – Colilert®. Também se avaliaram as condições ambientais através do monitoramento de parâmetros físicos e químicos, para verificar a possível influência desses parâmetros na ocorrência e no decaimento de bactérias patogênicas nas lagoas.

Quanto ao primeiro objetivo específico - investigar a ocorrência das bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* (ser) Typhimurium, *Shigella dysenteriae*, *Shigella* spp., *Helicobacter pylori*, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter jejuni*, ao longo do sistema UASB - LP por meio da técnica PCR, conclui-se que:

- Todas as bactérias, exceto *H. pylori*, *S. Aureus* e *Y. enterocolitica*, foram detectadas em pelo menos duas unidades do sistema de tratamento.
- O fato de que um gênero ou espécie tenha se mostrado positivo em uma determinada coleta e negativo em outra pode ter sido em virtude das variações ocorridas entre coletas. O fato de que o gênero *Salmonella* tenha sido positivo nas lagoas e negativo no esgoto bruto não foi totalmente entendido e não foi possível se chegar a uma conclusão definitiva. Um conjunto de fatores físicos, químicos, ambientais e da própria natureza das bactérias, associados, pode ter propiciado as variações encontradas nos resultados.
- Além de *E. coli*, outros gêneros ou espécies, a exemplo de *Campylobacter jejuni*, poderiam ser avaliados na rotina, principalmente quando se optar por fazer o reúso de efluentes tratados na agricultura, sobretudo por aspersão, uma vez que diferentes gêneros de bactérias patogênicas podem apresentar doses infectantes muito baixas.

Quanto ao segundo objetivo específico, de quantificar as bactérias patogênicas detectadas por PCR no esgoto bruto, na lagoa 1 e na lagoa 3, utilizando-se a técnica de FISH, conclui-se que:

- De maneira geral não se verificou um decaimento no número de células bacterianas desde o EB até a L3 como uma regra. Observou-se que para *E. coli* ocorreu decaimento entre o EB e a L1, mas não se verificou decaimento entre as L1 e L3. Para *Salmonella* spp. ocorreu decaimento entre o EB e a L1, mas ao contrário, da L1 para a L3 observou-se um ligeiro aumento médio de células. Para *Enterococcus* observou-se decaimento do EB para a L1, e uma pequena diminuição do número de células quantificadas entre a L1 e L3. Para *Campylobacter* spp. verificou-se a ocorrência de decaimento entre o EB e a L1, e um pequeno aumento entre a L1 e L3.

Quanto ao terceiro objetivo específico, comparação dos métodos Colilert® (NMP/100mL) e FISH (cel/100mL) na quantificação de *E. coli*, tem-se que a avaliação da intensidade do sinal da sonda deve ser feita antes do seu uso efetivo nas amostras para garantir a qualidade do sinal fluorescente. As técnicas Colilert® e FISH utilizadas na quantificação de *E. coli* apresentaram resultados diferentes, sobretudo na lagoa 3.

Para o EB, verificou-se uma equivalência nas quantificações de *E. coli* entre as duas técnicas, sendo que em três das seis coletas realizadas, a quantificação com o Colilert® foi maior que com o FISH. Para a L1, foram verificadas diferenças de quantificações entre as coletas, com valores mais elevados para *E. coli* quando se utilizou a técnica FISH. Para a L3 foram verificados valores muito divergentes nas quantificações de *E. coli* utilizando-se Colilert® e FISH. Com a técnica FISH os valores permaneceram da ordem de  $10^6$  cel/100mL, enquanto que para o Colilert® permaneceram da ordem de  $10^3$  cel/100mL. Conclui-se que uma conjunção de fatores pode ter ocasionado o aumento na quantificação de *E. coli* com a técnica de FISH, em relação ao Colilert®, nas lagoas.

- Considera-se que, até o momento, o método Substrato Cromogênico/Colilert®, para se quantificar *E. coli* em amostras de esgotos, ainda deve ser o mais usado na rotina do monitoramento de *E. coli* até que os resultados encontrados no presente trabalho possam ser mais investigados e corroborados por outros pesquisadores. No entanto, no caso de análise para reúso do efluente tratado, há necessidade de complementar a análise de coliformes por uma investigação mais detalhada da presença e quantidade de microrganismos patogênicos.

Quanto ao quarto objetivo específico, avaliação das condições ambientais do sistema através do monitoramento dos parâmetros físicos, químicos e *E. coli* rotineiros, pode-se dizer que os parâmetros não se alteraram expressivamente. Isto sugere que, excetuando-se o pH, OD e temperatura, que tradicionalmente controlam o decaimento de bactérias patogênicas em sistemas de lagoas, e possivelmente a vazão, os parâmetros DBO, DQO e SST, nesta pesquisa, não interferiram no decaimento dos organismos patogênicos nas unidades.

- De forma global observa-se que avaliar a qualidade microbiológica do tratamento dos esgotos com base somente no grupo coliforme, centrados em *E. coli*, pode ser insuficiente, pois outros gêneros e espécies patogênicas podem estar presentes nos esgotos, a exemplo de *Campylobacter jejuni*, como verificado na presente pesquisa.
- O fato de que algumas reações da PCR se mostraram negativas para alguns gêneros pode não significar a total ausência de determinado microrganismo na amostra, e sim que ele poderia estar presente na amostra, porém em baixa concentração, não detectável pela técnica.
- Quando se utilizou a técnica de FISH para quantificação de *E. coli* e de outros gêneros de bactérias entéricas patogênicas, conclui-se que estas podem estar presentes nos esgotos brutos e tratados em concentrações maiores do que as que têm sido verificadas utilizando-se somente os métodos de cultivo para a quantificação. Esta observação poderia incorrer em riscos à saúde humana e dos animais, devido à baixa dose infectante que determinados grupos podem apresentar.
- O decaimento de microrganismos patogênicos em lagoas de polimento pode ser influenciado por outros fatores ambientais (influência de chuvas, por exemplo) além dos parâmetros tradicionais como pH, OD e temperatura, que são os principais responsáveis pelo decaimento de bactérias patogênicas em lagoas de polimento rasas.
- Quanto à técnica da PCR, esta se constituiu em uma ferramenta totalmente aplicável à pesquisa de bactérias patogênicas em amostras de esgotos brutos e tratados. Já para a técnica de FISH, embora tenha se mostrado difícil para se quantificar especialmente *E. coli*, tal dificuldade foi devida principalmente à presença da grande quantidade de algas

que ocorre nas lagoas. É possível que seu uso, com maior frequência, e também com o emprego de sondas mais sensíveis, sua utilização na rotina torne-se fácil e rápida.

## 7 RECOMENDAÇÕES

A partir da avaliação dos resultados obtidos no presente trabalho, recomenda-se para a condução de trabalhos futuros:

- Trabalhar, inicialmente, com um número menor de gêneros de bactérias para que possam ser feitas mais coletas, pelo menos uma a cada mês, dependendo do tempo em que o estudo vai ser conduzido, garantindo um maior número de dados, e um monitoramento mais representativo, além de se proceder à coleta em diferentes estações do ano, monitorando índice pluviométrico, temperatura, pH e O.D das lagoas em diferentes períodos do dia.
- Filtrar as amostras da lagoa somente em filtro de uma porosidade intermediária (a ser testada) uma vez que a filtração em filtros de duas ou três porosidades diferentes é bastante trabalhosa. Além disso, submeter também as amostras do esgoto bruto a um pré-tratamento na tentativa de minimizar a ocorrência de contaminantes que podem interferir na PCR.
- Para a PCR, utilizar, inicialmente, dois pares de *primers* para grupo bacteriano ou genes específicos e para FISH, quando possível, usar duas sondas diferentes para cada bactéria, testando sempre a temperatura de anelamento, por meio da PCR gradiente, e a concentração da formamida antes de se iniciar as reações e as contagens. Caso seja possível, recomenda-se ter dois observadores treinados para contar a mesma amostra de FISH, principalmente para amostras em que ocorra muita autofluorescência, como é o caso das lagoas.
- Aplicar a técnica da PCR em tempo real, para quantificação das espécies investigadas a fim de avaliar com mais precisão o decaimento das mesmas ao longo do sistema, uma vez que esta técnica não depende do olhar do pesquisador na quantificação das bactérias.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, E. F. *Estudo da diversidade microbiana metanogênica em reatores UASB tratando esgoto sanitário*. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

ACMSF – Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food. Second Report on *Campylobacter*, 2005. Disponível em: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/acmsfcampylobacter.pdf> > Acesso em 13/04/2009.

AHMED, W.; TUCKER, J.; BETTELHEIM, K.A.; NELLER, R.; KATOULI, M. Detection of virulence genes in *Escherichia coli* of an existing metabolic fingerprint database to predict the sources of pathogenic *E. coli* in surface waters. *Water Research*, v. 41, p. 3785-3791. 2007.

AHTIAINEN, J., NIEMI, M., SOMER, H.J. Staphylococci in polluted waters and in waters of uninhabited areas. *Water Science and Technology*, London, v. 24, n. 2, p. 103–108, 1991.

AISSA, R.B.; AL-GALLAS, N.; TROUDI, H.; BELHADJ, N.; BELHADJ, A. Trends in *Salmonella enterica* serotypes isolated from human, food, animal, and environment in Tunisia, 1994-2004. *Journal of infection*, v.55, p. 324-339, 2007.

ALBERTS B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J. *et al. Biologia Molecular da Célula*. Trad. Ana Leticia de Sousa Vanz *et al.*, 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ALONSO, M.C; DIONÍSIO, L.P.C.; BOSCH, A.; PEREIRA de MOURA, B.S.; GARCIA-ROSADO, E.; BORREGO, J.J. Microbiological quality of reclaimed water used for golf courses' irrigation. *Water Science and Technology*. London, v. 54, n. 3, p. 109-117, 2006.

AMANN, R.; FUCHS, B.M.; BEHRENS, S. The identification of microorganisms by *fluorescence in situ hybridization*. *Current Opinion in Biotechnology*, v.12, p. 231-236, 2001.

AMANN, R., LUDWIG, W., SCHLEIFER, K. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*, v. 59, p.143- 169, 1995.

APHA - AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 21ªed. Washington, APHA/WEF/AWWA. 2005.

AMPOFO, J.A.; CLERK, G.C. Diversity of bacteria in sewage treatment plant used as fish culture pond in southern Ghana. *Aquaculture Research*, v. 34, p.667-675, 2003.

ANDRADA, J. G. B. *Utilização de filtros grosseiros em efluentes de lagoas de polimento para remoção de algas*. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 102p. 2005.

ARAÚJO, J.C.; ABREU, E.F.; SILVA, E.C.; NETO, G.P.P; CORREA, M.M.S. Curso teórico-prático nas técnicas de extração de DNA, PCR e FISH para detecção e quantificação de microrganismos em sistemas de tratamento de efluentes. 35p. Apostila. Laboratório de Microbiologia do DESA/UFMG. Belo Horizonte, 1º a 4 de junho, 2009.

ARAÚJO, J.C., MORTARA, R., VAZOLLER, R.F., CAMPOS, J.R. Development and analysis of anaerobic biofilms onto hydrophobic and hydrophilic surfaces. *Environmental Technology*, v. 25, p. 809-817, 2004.

ARAÚJO, J.C. A utilização da hibridação in situ com sondas fluorescentes (FISH) na digestão anaeróbia. In: VII Taller y Simposio Latinoamericano sobre Digestión Anaeróbia, 22 a 25 de octubre. Sesión I, Taller. Mérida/México. 2002.

ARAÚJO, J.C. Biofilmes anaeróbios: desenvolvimento e caracterização filogenética usando a hibridação in situ sondas fluorescentes. 161 p. Tese (Doutorado) Escola de Engenharia de São Carlos. USP. 2001.

ARAÚJO, J.C., BRUCHA, G., CAMPOS, J.R.; VAZOLLER, R.F. Monitoring the development of anaerobic biofilms using fluorescent in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Water Science and Technology*, v. 41, n. 12, p. 69-77, 2000.

ARRIDGE, H.; ORAGUI, J.I.; PEARSON, H.W.; MARA, D.D.; SILVA, S. A. *Vibrio Cholerae* 01 and *Salmonellae* removal compared with the die-off of faecal indicator organisms in waste stabilization ponds in Northeast Brazil. *Water Science and Technology*, London, v. 31, n. 12, p. 249-256, 1995.

ASHBOLT, N. J.; GRABOW, W.K.; SNOZZI, M. Indicators of microbial water quality. *World Health Organization (WHO)*. Water Quality: guidelines, Standards and Health. IWA Publishing, London, UK, p. 289-316. 2001.

BASTOS, R.K.X., BEVILACQUA, P.D.; KELLER, R. *Desinfecção de efluentes sanitários*. In: Organismos patogênicos e efeitos sobre a saúde humana. Ed.: Gonçalves, R.F. Rio de Janeiro. ABES/RIMA/Projeto PROSAB, 438p. 2003.

BALE, M. J., P. M. BENNETT, J. E. BERINGER, AND M. HINTON. The survival of bacteria exposed to desiccation on surfaces associated with farm buildings. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 75, p. 519-528, 1993.

BEJ, A.K.; MAHBUBANI, M.H.; DICESARE, J.L.; ATLAS, R.M. Polymerase chain reaction-gene probe detection of microorganisms by using filter-concentrated samples. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n. 12, p. 3529-3534, 1991.

BEJ, A.K.; MAHBUBANI, M.H.; BOYCE, M.J.; ATLAS, R.M. Detection of *Salmonella* spp. in Oysters by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60, n.1, p. 368-373, 1994.

BEJ, A.K. *Detection of microbial nucleic acids by polimerase chain reaction in aquatic samples*. Second Edition. In: KOWALCHUK, G.; BRUIJN, F.J.; HEAD, I.; AKKERMANS, A.D.L.; van ELSAS, J.D. (eds.) *Molecular Ecology Manual*. 2ª ed. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. p. 369-432, 2004.

BIESTERFELD, S.; FIGUEROA, L. Nitrifying biofilm development with time: activity versus phylogenetic composition. *Water Environment Research*, 74 (5), pp. 470-478, 2002.

BITTON, G. *Wastewater Microbiology*. 3ª ed. Gainesville: Wiley-Liss, New York. 746p. 2005.

BRASIL, (2006). Ministério da Saúde – Vigilância em Saúde (Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos\\_conf\\_colera\\_1991\\_2008.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_conf_colera_1991_2008.pdf)). (Acesso em 23/08/2008).

- BRASIL, (1991). Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Cólera/Ministério da Saúde – 3 ed. 50 p.
- BROWN, T.A. *Molecular Biology*. 2 ed. Manchester: Academic Press, 1998. 255 p. (Gene Analysis; v. II).
- BURTSCHER, C. e WUERTZ, S. Evaluation of the use of PCR and reverse transcriptase PCR for detection of pathogenic bacteria in biosolids from anaerobic digestors and aerobic composters. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, p. 4618-4627, 2003.
- CARNIEL, E.; AUTENRIETH, I.; CORNELIS, G.; FUKUSHIMA, H.; GUINET, F.; ISBERG, R.; PHAM, J.; PRENTICE, M.; SIMONET, M.; SKURNIK, M.; WAUTERS, G. *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*. In: MARTIN, D.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K-H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.) *The Prokaryotes. A handbook on the biology of Bacteria*. 3. ed. Springer, New York, p.270-398. 2006.
- CAVALCANTI, P.F.F.; van HAANDEL, A.; KATO, M.T.; von SPERLING, M., LUDUVICE, M.; MONTEGGIA, L.O. (2001). Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios por lagoas de polimento. In: Chernicharo, C.A.L. (coord.). *Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios*, FINEP/PROSAB, 544 p. 2001.
- CEBALLOS, B.S.O. *Eliminación de microorganismos por medio del tratamiento de las aguas residuales*. In: MENDONÇA, S.R. Sistemas de lagunas de estabilización. Colômbia. McGrawHill. 370 p., 2000.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Nosocomial enterococci resistant to vancomycin – United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 42, p. 597-599. 1989-1993
- CHAN, K.; BAKER, S.; KIM, C. C.; CORRELLA S. D.; DOUGAN, G.; FALKOW, S. Genomic comparison of *Salmonella enterica* serovars and *Salmonella bongori* by use of an *S. enterica* serovar Typhimurium DNA microarray. *Journal of Bacteriology*. 185(2): 553–563, 2003.
- CHERNICHARO, C.A.L.; FLORENCIO, L.; BASTOS, R.K.X.; PIVELI, P.R.; VON SPERLING, M.; MONTEGGIA, L.O. *Tratamento de esgotos e produção de efluentes adequados a diversas modalidades de reúso de água*. In: Tratamento e utilização de esgotos sanitários. Coord. FLORÊNCIO, L.; BASTOS, R.K.X.; AISSÉ, M.M. Rio de Janeiro. ABES/Projeto PROSAB (4), p.63-110. 2006.
- CHERNICHARO, C.A.L. *Reatores anaeróbios*. 2 ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental DESA/UFMG. 379p. (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias; v.5). 2007.
- CHERNICHARO, C.A.L.; ZERBINI, A. M.; BITTENCOURT, R. B. *Análise comparativa das técnicas de tubos múltiplos e substrato definido, aplicadas à identificação de coliformes em amostras de esgotos brutos e efluentes anaeróbios*. In: Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios: coletânea de trabalhos técnicos. Coord. CHERNICHARO, C.A.L. Belo Horizonte, p. 61-69. 2001.
- CLOETE, T.E.; ROSE, J.; NEL, L.H.; FORD, T. IWA. *Microbial Waterborne Pathogens*. Publishing, London, UK, 231 p. 2004.
- CRAVIOTO, A.; MOLINA, J.; MANJARREZ, A.; ESLAVA, C. Enteropathogenic *Escherichia coli*: the Mexican experience. *Revista de Microbiol.*, São Paulo, v. 27,

(Suppl 1), p. 21-24, 1996 *apud* KOBAYASHI, K.T.R.; SARIDAKIS, H.O.; DIAS, A.M.G.; VIDOTTO, M.C. Molecular identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with infant diarrhea in Londrina, Parana, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.31, n. 4, p. 275-280, 2000.

CRAUN, M.F.; CRAUN, G.F.; CALDERON, R.L.; BEACH, M.J. Waterborne outbreaks reported in the United States. *Journal of Water and Health*, v.4 (Suppl. 2), p.19-30, DOI:102166/wh.2006.016, 2006.

CURTIS, T.P. The fate of *Vibrio cholera* in wastewater treatment plants. In: DRASAR, B.; FORREST, B. B. (ed). *Ecology and the ecology of Vibrio cholerae*. Chapman and Hall, London. 1996 *apud* CURTIS, T.P. *Bacterial pathogen removal in wastewater treatment plants*. In: The Handbook of Water and Wastewater Microbiology. Ed.(s): D. Mara and N. Horan. Academic Press, p. 477-490. London. 2003

CURTIS, T.P. *Bacterial pathogen removal in wastewater treatment plants*. In: The Handbook of Water and Wastewater Microbiology. Ed.(s): D. Mara and N. Horan. Academic Press, p. 477-490. London. 2003.

CURTIS, T.P.; MARA, D.D.; DIXO, N.G.H., SILVA, S.A. Light penetration in waste stabilization ponds. *Water Research*, v.27, n. 9, p. 1335-1343, 1992.

CURTIS, T.P.; MARA, D.D.; SILVA, S.A. influence of pH, oxygen and humic substances on ability of sunlight to damage faecal coliforms in waste stabilization pond water. *Applied and environmental Microbiology*, v.58, n.4, p.1447-1454, 1994.

D'AZEVEDO, P.A.; ANTUNES, A.L.S.; MARTINO, M.D.V.; PIGNATARI, A.C.C. *Staphylococcus cohnii* spp. *urealyticus*: relato de caso de um patógeno incomum. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.41, n.2, p. 197-199, mar-abr, 2008.

DeLONG, E.F.; WICKHAM, G.S.; PACE, N.R. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*, v.43, n. 4896, p. 1360-1364, 1989.

DEVRIESE, L.; BAELE, M.; BUTAYE, P. The Genus *Enterococcus*: Taxonomy. In: MARTIN, D.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K-H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.) *The Prokaryotes. A handbook on the biology of Bacteria*. 3. ed. Springer, New York, p. 163-174. 2006.

DOMBEK, P. E.; JOHNSON, L. K.; ZIMMERLEY, S. T.; SADOWSKY, J. M. Use of repetitive DNA sequences and the PCR to differentiate *Escherichia coli* isolates from human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology*, v.66, n.6, p. 2572-2577, 2000.

DOUSSE, C.; SCHNEIDER, E.; SCHWARTZBROD, J. Comparison of methods for isolating *Campylobacter* spp. from sewage. *Water Science and Technology*, London, v. 27, n. 3-4, p. 275-278, 1993.

EGLI, K.; LANGER, C.; SIEGRIST, H-R.; ZEHNDER, A.J.B.; WAGNER, M.; VAN DER MEER, J.R. Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers during start-up of nitrification reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 6, p. 3213-3222, 2003.

ELITSUR, Y.; YAHAV, J. *Helicobacter pylori* Infections in Pediatrics. *Helicobacter*, v. 10 (suppl. I), p. 47-53, 2005.

- EMBLEY, T.M. The linear PCR reaction: a simple and robust method for sequencing amplified rRNA genes. *Letters in Applied Microbiology*, v.13, p. 171-174, 1991
- ESLAVA, C.J.; VILLASECA, R.M.; NAVARRO, A.; CRAVIOTO, A. Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative *Escherichia coli*, abstr. B 105, p. 44. In: Abstracts of the 93<sup>rd</sup> General Meeting of the American Society for Microbiology 1993. American Society for Microbiology, Washington, D.C., *apud* NATARO, J.P; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 11, n. 1, p.142-201, jan. 1998.
- EVANS, J.B. Coagulase-positive staphylococci as indicator of potential health hazards from water. In: HOADLEY, A.W. and DUTKA, B.J. (eds.). Bacterial Indicators Health/Hazards Associated with Water. ASTM STP, 635p. Philadelphia. 1977 *apud* AHTIAINEN, J., NIEMI, M., SOMER, H.J. Staphylococci in polluted waters and in waters of uninhabited áreas. *Water Science and Technology*, London, v. 24, n. 2, p. 103–108, 1991.
- FALCÃO, J.P. FALCÃO, D.P. Importância de *Yersinia enterocolitica* em microbiologia médica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 27, nº 1, p. 9-19, 2006.
- FALCO, P.B. *Estrutura da comunidade microbiana (algas e bactérias) em um sistema de lagoas de estabilização em duas escalas temporais: nictemeral e sazonal*. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2005.
- FANG, G.D.; LIMA, A.A.M.; MARTINS, C.V; NATARO, J.P.; GUERRANT, R.L. Etiology and epidemiology of persistent diarrhea in northeastern Brazil: a hospital-based, prospective, case-control study. *Journal Pediatric Gastroenterology Nutr.*, v.21, p. 137-144, 1995.
- FASCIOLO, G.E.; MECA, M.I.; GABRIEL, E.; MORÁBITO, J. Effects on crops of irrigation with treated municipal wastewaters. *Water Science.and Technology*, Londres, v. 45, n. 1, p. 133–138. 2002.
- FEACHEM, R.G; BRADLEY, D.J.; GARELICK, H.; MARA, D.D. Sanitation and disease: health aspects of excreta and wastewater management. John Wilwy & Sons, New York. 1983.
- FIALHO, O.B. *Identificação de estirpes de Escherichia coli diarreiogênicas por PCR – Multiplex*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Análises Clínicas). Escola de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 106f. 2008.
- FORD, T. Future needs and priorities. In: *Microbial Waterborne Pathogens*. Ed.: CLOETE, T. E.; ROSE, J.; NEL, L.H.; FORD, T. IWA Publishing, London, UK, p. 187-204. 2004.
- FRAHM, E.; HEIBER, I.; LUDWIG, W.; OBST, U. Rapid Parallel Detection of Hygienically Relevant Microorganisms in Water Samples by PCR and Specific Hybridization in Microtiter Plates. *Systematic Applied Microbiology*, v. 24, p. 423-429, 2001.
- FUCHS, M.B.; WALLNER, G.; BEISKER, W.; SCHWIPPL, I.; LUDWING, W.; AMANN, R. Flow Cytometric Analysis of the In Situ Acessibility of *Escherichia coli*

- 16S rRNA for Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes. *Applied Environmental Microbiology*, v. 64, n. 12, p. 4973-4982, 1998.
- FUCHS, M.B; SYUTSUBO, K.; LUDWING, W; AMANN, R. In Situ Accessibility of *Escherichia coli* 23S rRNA to Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes. *Applied Environmental Microbiology*, v. 67, n. 2, p. 961-968, 2001.
- GARCIA-ARMISEN, T. & SERVAIS, P. Enumeration of viable *E. coli* in rivers and wastewaters by *fluorescent in situ hybridisation*. *Journal Microbiology Methods*, v. 58, p. 269-279, 2004.
- GARRITY, GM.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G. *Taxonomic Outline of The Prokaryotes Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. 2 ed. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg. 397p. 2003.
- GIESENDORF, B.A.J.; QUINT, W.G.V.; HENKENS, M.H.C.; STEGEMAN, H.; HUF, F.A.; NIESTERS, H.G.M. Rapid and Sensitive Detection of *Campylobacter* spp. in Chicken Products by Using the Polymerase Chain Reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, n. 12, p. 3804-3808, dec. 1992.
- GODFREE, A. F.; KAY, D.; WYER, M.D. Faecal Streptococci as indicator of faecal pollution in water. *Journal of Applied Microbiology*, v.83, p. 110-S-119-S, 1997.
- GODINHO, V.M. SILVA, S.Q., VON SPERLING, M. Avaliação de sondas moleculares para quantificação de *E. coli* em amostras de esgoto bruto e lagoa de polimento utilizando a técnica de hibridação fluorescente *in situ* – FISH. In: 25º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 20 a 25 de setembro. Recife/PE: ABES. 2009.
- GODINHO, V.M., SILVA, S.Q.; NASCIMENTO, F.M.S; von SPERLING, M. Desenvolvimento e aplicação de metodologia para concentração e extração de DNA de bactérias presentes em efluentes de lagoas de polimento. In: 24º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 02 a 07 de setembro. Belo Horizonte: ABES. 2007.
- GÖTZ, F.; BANNERMAN, T.; SCHLEIFER, K-H. The Genera *Stapylococcus* and *Macroccoccus*. In: MARTIN, D.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K-H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.) *The Prokaryotes. A handbook on the biology of Bacteria*. 3. ed. Springer, New York, p. 05-75. 2006.
- GREISEN, K.; LOEFFELHOLZ, M.; PUROHIT, A.; LEONG, D. PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 32, n. 2, p. 335-351, 1994.
- GRIFFIN, P.M. *Escherichia coli* O157:H7 and others Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: BLASER, M. J.; SMITH, P.D.; RAVDIN, J.I; GREENBERG, H.B.; GUERRANT, R.I. (eds). *Infections of the gastrointestinal tract*. Raven Press, New York, N.Y., 1995 *apud* NATARO, J.P; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. Washington, D.C, v. 11, n. 1, p.142-201, jan. 1998.
- GRUPO DE PESQUISAS RIO TOTAL. *Revista Vida Saudável*, ano 11- sem., 530, maio 2007. Disponível em: <[http:// www.riototal.com.br/saude](http://www.riototal.com.br/saude)> Acesso em 26/08/2008
- GUILLOT, E.; LORET, F-J. Waterborne pathogens: Review for the Drinking Water Industry. IWA publishing. Global Water Research Coalition. London, 193p. 2010.

GUPTA, A.; POLYAK, C.S.; BISHOP, R.D.; SOBEL, J.; MINTZ, E.D. Laboratory-Confirmed Shigellosis in the United States, 1989–2002: Epidemiologic Trends and Patterns. *Clinical Infections Disease*, v. 38, p.1372-1377. 2004.

HAHN, D. *In Situ* analysis of microbial populations. *Workshop “Sediments and Biofilms” Limnological Research Center*. Swiss Federal Institute for environmental science and Technology, EAWAG, Kastanienbaum, Switzerland, 10-14 sept. 2001.

HALAWEH, M.; BATES, J.; PATEL, B.K.C. Rapid detection and differentiation of pathogenic *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by real-time PCR. *Research in Microbiology*, v. 156, p.107-114, 2005.

HARWOOD, V.; LEVINE, D.A.; SCOTT, T. M.; CHIVUKULA, V.; LUKASIK, J.; FARRAH, S.; ROSE, J.B. Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Applied Environmental Microbiology*, v. 71, n. 6, p. 3163-3170, 2005.

HAWKSWORTH, D.L. Biodiversity in microorganisms and its role in ecosystem function. In: SOLBRIG, O.T.; VAN EMBEN, HM.; VAN OORDT, E.P.G.W.J.(Ed.) *Biodiversity and Global Change*. Paris: IUBS, p.83-89. 1992 *apud* ROSADO, A.S.; DUARTE, G.F. Utilização de eletroforese em gel com gradiente de desnaturantes (DGGE) e gel com gradiente de temperatura (TGGE) para estudar diversidade microbiana. In: MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C.; NASS L.L.; VALOIS, A.C.C. (Ed.) *Recursos genéticos e melhoramento-microorganismos*. Jaguariúna: EMBRAPA MEIO AMBIENTE, p. 98-127. 2002.

HEAD, I.M.; SAUNDERS, J.R., PICKUP, R.W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial Ecology*, v.35, p. 1-21, 1998.

HORÁKOVÁ, K.; MLEJNKOVÁ, H.; MLEJNEK, P. Evaluation of methods for isolation of DNA for polymerase chain reaction (PCR)- based identification of pathogenic bacteria from pure culture and water samples. *Water Science & Technology (WST)*, v. 58, n.5, p. 995-999, 2008, doi: 10.2166/wst.2008.453.

HUFFMAN, D.E.; QUINTER-BETANCOURT, W.; ROSE, J. Emerging waterborne pathogens, 12, p.193-208. In: MARA, D.D.; HORAN, N. (Eds). *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Academic Press/Elsevier. London, UK. 819 p. 2003.

HULTÉN, K.; ENROTH, H.; NYSTROM, T.; ENGSTRAND, L. Presence of *H. pylori* species DNA in Swedish water. *Journal of Applied Microbiology*, v. 85, p. 282-286, 1998.

IBEKWE, A.M., WATT, P.M., GRIEVE, C.M., SHERMA, V.K., LYONS, S.R.. Multiplex fluorescent real-time PCR for detection and quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy wastewater wetlands. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 10, p. 4853–4862, 2002.

IBRAHIM, A.; LIESACK, W.; STACKEBRAND, E. Polymerase chain reaction-gene probe detection system specific for pathogenic strain of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 84, p.1942-1947, 1992.

INA, K.; KUSUGAMI, K.; OHTA, M. Bacterial hemorrhagic enterocolitis. *Journal of Gastroenterology*, v.38, n.2, p. 111-120, 2003.

- ISHII S.; SADOWSKY, M.J. Minireview - *Escherichia coli* in the environmental: implications for water Quality and human health. *Microbes and Environments*, v. 23, n. 2, p. 101-108, 2008.
- ISHII, S.; HANSEN, D.L.; HICKS, R.E. SADOWSKY, M.J. Beach and sand and sediments are temporal sinks and source of *Escherichia coli* in Lake Superior. *Environmental Science Technology*, v. 41, p. 2203-2209, 2007a.
- ISHII, S.; MEYER, K.P.; SADOWSKY, M.J. Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. *Applied Environmental Microbiology*, v. 73, p. 5703–5710, 2007b.
- ISHII, S.; KSOLL, W.B.; HICKS, R.E. SADOWSKY, M.J. Presence and growth of naturalized *Escherichia coli* in temperate soils from Lake Superior watersheds. *Applied Environmental Microbiology*, v. 72, p. 612–621, 2006.
- JANSEN, G.J.; MOOIBROEK, M.; IDEMA, J.; HARMSSEN, H.J.M.; WELLING, G.W.; DEGENER, J.E. Rapid Identification of Bacteria in Blood Culture by Using Fluorescently Labeled Oligonucleotide Probes. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 2 p. 814-817, feb. 2000.
- JANZON, A.; SJÖLING, A.; LOTHIGIUS A.; AHMED, D.; QADRI, F.; SVENNERHOLM, A-M.; Failure to Detect *Helicobacter pylori* DNA in Drinking and Environmental Water in Dhaka, Bangladesh, using Highly sensitive Real-Time PCR Assays. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 10, p. 3039-3044, may. 2009
- JOACHIMSTHAL, E.L.; IVANOV, V.; TAY, S.T.L., TAY J.H. Quantification of whole-cell *in situ* hybridization with oligonucleotide probes by flow cytometric of *Escherichia coli* cells. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 19, p.527-533, 2003.
- KATO, M.; FLORÊNCIO, L. Pós-tratamento de efluentes anaeróbios em lagoas de polimento. In: CHERNICHARO, C.A.L. (Coordenador). *Pós-tratamento de Efluentes de Ratores Anaeróbios. Coletânea de Trabalhos Técnicos*. Vol. 2, PROSAB. 1ª Edição. Belo Horizonte, SEGRAC EDITORA, 2001, p.59-68.
- KE, D.; PICARD, F.J.; MARTINEAU, F.; MENARD, C.; ROY, P.H.; QUELLETTE, M.; BERGERON, G. Development of a PCR Assay for Rapid Detection of *Enterococci*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 37, n.11, p. 3497-3503, 1999.
- KEMPF, V.A.J.; TREBESIUS, K.; AUTENRIETH, I.B. Fluorescent In Situ Hybridization Allows Rapid Identification of Microorganisms in Blood Cultures. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, n. 2, p. 830-838, feb, 2000.
- KIM, H.-J.; PARK S.-H.; KIM, H.-Y. Comparison of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 and non-LT2 *Salmonella* genomic sequences, and genotyping of *Salmonellae* by using PCR. *Applied Environmental Microbiology*, v. 72, n. 9, p. 6142–6151, 2006.
- KOBAYASHI, K.T.R.; SARIDAKIS, H.O.; DIAS, A.M.G.; VIDOTTO, M.C. Molecular identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with infant diarrhea in Londrina, Parana, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.31, n. 4, p. 275-280, 2000.

- KOIVUNEM, J.; SIITONEN, A.; HEINONEN-TANSKI, H. Elimination of enteric bacteria in biological-chemical wastewater treatment and tertiary filtration units. *Water Research*, v. 37, p.690-698, 2003.
- KONUMA S., SATO H., MINO T., MATSUO T. Comparison of enumerations methods for ammonia-oxidizing bacteria. *Water Science and Technology*, Londres, v. 43, n. 1, p.107 – 114. 2001.
- KOTLOF, K.L. Global burden of *Shigella* infection: implication for vaccine development and implementation. *WHO Bulletin*, v. 77, p. 651-666. 1999.
- KRUMPPERMAN, P.H. Multiples antibiotic resistance indexing of *E. coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Applied Environmental Microbiology*, v. 46, p.165-170, 1983.
- LANGELAND, G. Salmonella spp. In the working environment of sewage treatment plants in Oslo, Norway. *Applied Environmental Microbiology*, v.43, n. 5, p.1111-1115, 1982.
- LAUBER, C.L.; GLATZER, L.; SINSABAUGH, R.L. Prevalence of pathogenic *Escherichia coli* in recreational waters. *Journal Great Lakes Resourch*, v. 29 p. 301-306, 2003.
- LECLERC, H.; SCHWARTZBROD, L.; DEI-CAS, E. Microbial agents associated with waterborne diseases. In: *Microbial Waterborne Pathogens*. Ed.: CLOETE, T. E. *et al*. IWA Publishing, London, UK, p. 1-54. 2004.
- LEE, A.; FOX, J.G; OTTO, G.; DICK, H.E.; KRAKOWA, S. Transmission of *Helicobacter* spp. A challenge to the dogma of faecal-oral spread. *Epidemiology and Infection*, v. 107, p.99-109, 1991.
- LEE, D-Y.; SHANNON, K.; BEAUDETTE, L.A. Detection of bacterial pathogens in municipal wastewater using an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods*, v.65, p. 453-467, 2006.
- LEHTOLA, J. M.; TORVINEN, E.; KUSNETSOV, J.; PITKÄNEN, T.; MAUNULA, L.; *et al*. Survival of *Mycobacterium avium*, *L. pneumophila*, *E. coli*, and Calicivirus in drinking water-associated biofilms grown under high-shear turbulent flow. *Applied Environmental Microbiology*, v.73, n. 9, p.2854-2859, 2007.
- LEHTOLA, J. M.; LOADES, C.J.; KEEVIL, C.W. Advantages of peptide nucleic acid oligonucleotides for sensitive site directed 16S rRNA fluorescence in situ hybridization (FISH) detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari*. *Journal of Microbiological Methods*, v. 62, p. 211-219, 2005.
- LEHOURS, P.; YILMAZ, O. Epidemiology of *H. pylori* infection. *Helicobacter*, v. 12, n.1, p.1-3, 2007.
- LEMARCHAND, K.; BERTHIAUME, F.; MAYNARD, C.; HAREL, J.; PAYMENT, P.; BAYARDELLE, P.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R. Optimization of microbial DNA extraction and purification from raw wastewater samples for downstream pathogen detection by microarrays. *Journal of Microbiological Methods*, v.63, p. 115-126, 2005.
- LEVINE, M.M.; PRADO, V.; LIOR, H.; LAGOS, R. Epidemiologic studies of diarrhea associated with enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in infants and young children in Santiago, Chile. *Revista de Microbiol.*, São Paulo, v. 27, (Suppl 1), p. 21-24, 1996 *apud* KOBAYASHI, K.T.R.; SARIDAKIS, H.O.; DIAS, A.M.G.;VIDOTTO, M.C.

Molecular identification of Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with infant diarrhea in Londrina, Parana, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.31, n. 4, p. 275-280, 2000.

LIM, C-H; FLINT, K.P. The effects of nutrients on the survival of *Escherichia coli* in lake water. *Journal of Applied Bacteriology*, v.66, p. 559-569, 1989.

LINCX Sistema de Saúde/FNS/1999-2000. Disponível em:

[http://www.lincx.com.br/lincx/saude\\_a\\_z/outras\\_doencas/aspectos\\_diarreicas.asp](http://www.lincx.com.br/lincx/saude_a_z/outras_doencas/aspectos_diarreicas.asp) -

(Acesso em 12/03/2010).

LU, Y.; REDLINGER, T.E.; AVITIA, R.; GALINDO, A.; GOODMAN, K. Isolation and genotyping of *H. pylori* from untreated municipal wastewater. *Applied Environmental Microbiology*, v. 68, n. 3, p. 1436-1439, 2002.

MADERA, C.A.; PEÑA, M.R.; MARA, D.D. Microbiological quality of a waste stabilization pond effluent used for restricted irrigation in Valle Del Cauca, Colombia. *Water Science and Technology*, Londres, v.45, n. 1, p. 139-143, 2002.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 10ª ed. São Paulo. Pearson Education do Brasil. 608p, 2004.

MAGISTRADO, P.A.; GARCIA, M.M.; RAYMUNDO, A. K. Isolation and polymerase chain reaction-based detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from poultry in the Philippines. *International Journal of Food Microbiology*, v. 70, p. 197-206, 2001.

MAKINO, S-I.; KII, T.; ASAKURA, H.; SHIRAHATA, T.; IKEDA, T.; TAKESHI, K.; ITOH, K. Does Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 enter the viable but nonculturable state in salted salmon roe? *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 12, p. 5536-5539, 2000.

MANERO, A.; BLANCH, A.R. Identification of *Enterococcus* spp. based on specific hybridization with 16S rDNA probes. *Journal of Microbiological Methods*, v. 50, p. 115-121. 2002.

MARA, D.D.; HORAN, N. (Eds). *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Academic Press/Elsevier. London, UK. 819 p. 2003.

MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; ROY, P.H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M.G. Species-Specific and Ubiquitous-DNA-Based Assays for Rapid Identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, n. 3, p.618-623. 1998.

MARTINS, T.M.; PESSOA, G.V.A; SANCHEZ, P.S.; SATO, M.I.Z.; COIMBRÃO, C.K.; MARQUES, E. Occurrence of *V. cholerae* 0:1 non-toxigenic in wastewaters from São Paulo, Brazil. *Water Science and Technology*, Londres, v. 24, n. 2, p. 363-366, 1991.

MASCARENHAS, L. C. A. M. *Avaliação do desempenho de lagoas de polimento rasas, em série, para o pós-tratamento de efluente de reator UASB*. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 121f. 2002.

MATSUKI, T.; WATANABE, K.; FUJIMOTO, J.; MIYAMOTO, Y.; TAKADA, T.; MATSUMOTO, K.; OYAIZU, H.; TANAKA, R. Development of 16S rRNA gene targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n. 11, p. 5455-5451, 2002.

- MATTÉ, M.H.; BALDASSI, L.; BARBOSA, L.M.; MALUCELLI, M.I.C.; NITRINI, S.M.O.O.; MATTÉ, G.R. Virulence factors of *Vibrio metschnikovii* strains isolated from fish in Brazil. *Food Control*, v.18, p.747-751, 2007.
- MAYNARD, C.; BERTHIAUME, F.; LEMARCHAND, K.; HAREL, J.; PAYMENT, P.; BAYARDELLE, P.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R. Waterborne Pathogen Detection by Use of Oligonucleotide-Based Microarrays. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 12, p. 8548-8557, dec. 2005
- McLAUHLIN, J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control*, v.7, p.187-193, 1996.
- MELO, H.N.S.; NETO, C.O.A.; MELO, J.L.S.; LIMA, M.A. Estudo comparativo entre os métodos da membrana filtrante e do substrato cromogênico para determinação de coliformes fecais (termotolerantes) e *E. coli*. In: Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios: coletânea de trabalhos técnicos. Coord. CHERNICHARO, C.A.L. Belo Horizonte, p. 51-60. 2001.
- MEZRIOURI, N.; OUDRA, B.; OUFDOU, K.; HASSANI, L.; LOUDIKI, M.; DARLEY, J. Effect of microalgae growing on wastewater batch culture on *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* survival. *Water Science and Technology*, Londres, v. 30, n.8, p. 295-302, 1994.
- MONTENEGRO, M.A.P., ARAÚJO, J.C., VAZOLLER, R.F. (2003) Microbial community evaluation of anaerobic granular sludge from a hybrid reactor treating pentachlorophenol by using fluorescence in situ hybridization. *Water Science and Technology*, Londres, v. 48, n.6, p. 65-73, 2003.
- MORENO, Y.; FERRÚS, M.A; ALONSO, J.L; JIMÉNEZ, A.; HERNÁNDEZ, J. Use of fluorescent in situ hybridization to evidence the presence of *H. pylori* in water. *Water Research*. Amsterdam, v. 37, p.2251-2256, 2003.
- MORENO, Y.; HERNÁNDEZ, M.; FERRÚS, M.A.; ALONSO, J.L.; BOTELLA, S.; MONTES, R.; HERNÁNDEZ, J. Direct detection of thermotolerant campylobacters in chicken products by PCR and in situ hybridization. *Research Microbiology*, v. 152, p. 577-582, 2001.
- MOTA, S. Introdução à Engenharia Ambiental. 4ª. ed. Rio de Janeiro:ABES. 388p. 2006.
- MOTER, A.; GÖBEL, U.B. Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, v.41, p 85-112. 2000.
- MOURAD-BAARS, P.; CHONG, S. *Helicobacter pylori* infection in pediatrics. *Helicobacter*, v. 11, n. 1, p.40-45, 2006.
- MURPHY, C.; CARROLL, C.; JORDAN, K.N. Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Journal of Applied Microbiology*, v. 100, p. 623-632, 2006.
- MURRAY, B.E. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 3, p. 46-65, 1990.
- NASCIMENTO, F.M.S. *Aplicação da técnica PCR para detecção de bactérias potencialmente patogênicas em um sistema UASB-lagoas de polimento para tratamento de esgoto doméstico*. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e

Recursos Hídricos) – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 90f. 2008.

NASSER, A.M.; TWETO, E.; NITZAN, Y. Die-off of *Cryptosporidium parvum* in soil and wastewater effluents. *Journal of Applied Microbiology*, v. 102, p. 169-176, 2007.

NATARO, J.P; MAI, V.; JOHNSON, J.; BLACKWELDER, W.C.; *et al.* Diarrheagenic *Escherichia coli* Infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. *Clinical Infectious Diseases*, v. 43, n. 4, p. 402-407, 2006.

NATARO, J.P; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. Washington, D.C, v. 11, n. 1, p.142-201, jan. 1998.

NEEF, A., AMANN, R., SCHLEIFER K-H. Detection of Microbial cells in aerosol using nucleic acid probes. *Systematic Applied Microbiology*, v.18, p.113-122, 1995.

NIOGY, S.K. Shigellosis. *Scopus – Journal of Microbiology*, v. 43, n. 2, p. 133-143, 2005.

NG, L.K.; KINGOMBE, C.I.B.; YAN, W.; TAYLOR, D.E.; HIRATSUKA, N.M.; GARCIA, M.M. Specific Dtection and confirmation of *Campylobacter jejuni* by DNA Hybridization and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 11, p. 4558-4563, nov, 2002.

NORDENTOFT, S.; CHRISTENSEN, H.; WEGENER, H.C. Evaluation of a Fluorescence-labelled oligonucleotide probe targeting 23SrRNA for in situ detections of *Salmonella* serovars in paraffin-embedded tissue sections and their rapid identification in bacterial smears. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 35, n. 10, p. 2641-2648, oct. 1997.

OLIVER, J.D. The Viable but Noncuturable State in Bacteria. *The Journal of Microbiology*, v.43 (Special issue), n. S, p. 93-100, feb. 2005.

OLIVEIRA, A.M.R.; ROCHA, G.A.; QUEIROZ, D.M.M.; BARBOSA, T. M.; SILVA, S. C. Prevalence of *H. pylori* in a population from the rural area of Araçuaí, MG, Brazil. *Revista de Microbiologia*, v. 30, p. 59-61, 1999.

OLIVEIRA, M.; BERNARDO, F. “*Fluorescent In Situ Hybridization*” aplicado à detecção rápida de *Salmonella* de origem alimentar e ambiental. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, v. 97, n. 542, p. 81-85, 2002.

OLIVEIRA, K.A.M. Prevalência de *Campylobacter* spp., e *Enterococcus* spp., no ambiente de criação de frango de corte. 164 p. Tese (Doutorado) Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa. UFV, 2006a.

OLIVEIRA, M.F.; PILZ, E.B.; BELLINCATA, G.S., *et al.* Avaliação da eficácia do tratamento de esgotos de um sistema de lagoa de estabilização através da identificação de população bacteriana. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 34, n.1, p. 31-37, 2006b.

OLSEN, G.J.; LANE, D. J.; GIOVANONNI, S.J.; PACE, N. R.; STAHL, D.A. “Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach”. *Annual Reviews Microbiology*, v. 40, p.337-365, 1986.

ORAGUI, J.I. The removal of excreted bacteria and viruses in deep waste stabilization ponds. *Water Science and Technology*, London, v. 19, p. 569-573, 1987.

ORSI, R. H.; STOPPE N.C.; SATO, M.I.Z; PRADO, P.I.; OTTOBONI, L.M.M. Phylogenetic group distribution among *Escherichia coli* isolated from rivers in São

Paulo State, Brazil. *World Journal Microbiology Biotechnonology*, v. 24, p. 1573-1577, 2008.

PACE, N.R.; STAHL, D.A.; LANE, D.J.; OLSEN, G.J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microbial. Ecology*, v. 9, p.1-55, 1986.

PADILHA, M.R.F.; FERNANDES, Z.F.; LEAL, T.C.A.; LEAL, N.C.; ALMEIDA, A.M.P. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C, comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 34, n. 2, p. 161-171, mar-abr., 2001.

PANT, A.; MITTAL, A.K. Monitoring of pathogenicity of effluents from the UASB based sewage treatment plant. *Environmental Monitoring Assessment*, v. 133, p. 43-51, 2007.

PARSONNET J.; SHMUELY H.; HAGGERTY; T. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults. *JAMA*, n. 282, p. 2240-2245, 1999.

PATRICK, M.E.; ADCOCK, P.M; GOMES, T.M.; ALTEKRUSE, S.F.; HOLLAND, R.V.; TAUXE, R.V.; SWERDLOW, D.L. *Salmonella enteriditis* infections, United Sates 1985-1999. *Emerg. Infection Disease*, v. 10, p. 1-7, 2004.

PAYMENT P.; PLANTE R.; CEJKA P. Removal of indicator bacteria, human enteric viruses, *Giardia* cysts, and *Cryptosporidium* oocysts at a large wastewater primary treatment facility. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 3, p. 188-193:(6) mar., 2001.

PEARSON, H. *Microbial interactions in facultative and maturation ponds*. In: The Handbook of Water and Wastewater Microbiology. Ed.(s): D. Mara and N. Horan. Academic Press, 2003. 27, 449-458.

PENG, X.; LUO, W.; ZHANG, J.; WANG, S.; LI, S. Rapid detection of *Shigella* species in environmental sewage by an immunocapture PCR universal primers. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 2580-2583, 2002.

PINHEIRO, E. S. *Campilobacteriose intestinal*. 2008. Artigo em Hypertexto.

Disponível em:

[http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_1/Campilobacteriose/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/Campilobacteriose/index.htm). Acesso em 15/07/2008.

POITRINEAU, P.C.; FORESTIER, M.; MEYER; JALLAT, C.; RICH, C.; MALPUECH, G.; DE CHAMPS, C. Retrospective case-control study of diffusely adhering *Escherichia coli* and clinical features in children with diarrhea. *Journal Clinical Microbiology*, v.33, p.1961-1962, 1995.

POLLARD, D.; JOHNSON, W.M., LIOR, H., TYLER, S.D., ROOZE, K.R. Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, n. 3, p. 540-545, 1990.

POULSEN, L.; LAN, F.; KRISTENSEN, C.S.; HOBOLTH, P.; MOLIN, S.; KROGFELT, K.A. Spatial Distribution of *Escherichia coli* in the Mouse Large Intestine Inferred from rRNA *In Situ* Hybridization. *Infection and Immunity*, v.62, n.11, p.5191-5194, 1994.

REGNAULT, B.; DELAUTRE, S.M.; COLLIN, L.M.; LEFÈVRE, M.; GRIMONT, P.A.D. Oligonucleotide probe for the visualization of *Escherichia coli/Escherichia*

*fergusonii* cells by in situ hybridization: specificity and potential applications. *Research Microbiology*, v.151 p.,521-533, 2000.

RINTILLÄ, T.; KASSINEN, A.; MALINEN, E.; KROGIUS, L.; PALVA, A. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, v.97, p.1166-1177, doi: 10.1111/j. 3652672. 2004.02409.x. 2004.

RODRIGUES, M.N; QUEIROZ, D.M.M.; RODRIGUES, R.T; ROCHA, A.M.C.; LUZ, C.R.L., BRAGA, L.L.B.C. Prevalence of *Helicobacter pylori* infections in Fortaleza, northeastern Brazil. *Revista de Saúde Pública*, v.39, p. 847-9, 2005.

ROMPRÉ, A.; SERVAIS, P.; BAUDART, J.; de-ROUBIN, M-R.; LAURENT, P. Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiology. Methods*, v. 49, p. 31-54, 2002.

ROSE, J.B.; DICKSON, L.J.; FARRAH, S. R.; CARNAHAM, R.P. Removal of pathogenic and indicator microorganisms by a full-scale water reclamation facility. *Water Research*, v. 30, p. 2785-2797, 1996.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.B.; SELDIN, L. and van ELSAS, J. D. Molecular microbial ecology: a minireview. *Revista. de Microbiologia*, v. 28. p. 135-147, 1997.

ROSADO, A.S.; DUARTE, G.B. Utilização de eletroforese em Gel com Gradiente de Desnaturantes (DGGE) e Gel com Gradiente de Temperatura (TGGE) para estudar diversidade microbiana. In: MELO, I. (Ed.) Recursos Genéticos e Melhoramentos de Microrganismos. EMBRAPA. p. 97-128. 2002.

SANSONETTI, P.J. Rupture, invasion and inflammatory destruction of the intestinal barrier by *Shigella*, making sense of prokaryote eukaryote cross-talks. *Microbiology Reviews*, v. 25, p. 3-14, 2001.

SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P.; OLIVEIRA, S.D.; FLORES, M.L.; PONTES, A.P.; PILOTTO, F.; NEVES, N.; SALLE, C.T.P.; LOPES, R.F.F. Identificação de *Salmonella* Através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). *Arquivos da Faculdade de Veterinária*. UFRGS, v. 29, n.2, p. 87-92, 2001.

SAVAGEAU, M.A. Genetic Regulatory Mechanisms and the Ecological Niche of *Escherichia coli*. *Proceedings National Academic Science of USA*, v. 71, n.6, p. 2453-2455, 1974.

SCHMID, M.W.; LEHNER, A.; STEPHAN, R.; SCHLEIFER, K-H.; MEIER, H. Development and application of oligonucleotide probes for in situ detection of thermotolerant *Campylobacter* in chicken faecal and liver samples. *International Journal of Food Microbiology*, v. 105, p. 245-255, 2005.

SCHMIDT, I; HERMELINK, C.; PAS-SCHOONEN, K.; STROUS, M.; CAMP, H.; KUENEN, J.G.; JETTEN, M.S.M. Anaerobic Ammonia Oxidation in the Presence of Nitrogen Oxides (NOx) by Two Different Lithotrophs. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, n.11, p. 5351-5357, 2002.

SCHROEDER, E.; WUERTZ, S. *Bacteria*. In: The Handbook of Water and Wastewater Microbiology. Ed (s). D. Mara and N. Horan. Academic Press. p. 57-68. 2003.

SHANNON, K.E.; LEE, D-Y; TREVORS, J.T.; BEAUDETTE, L.A. Application of rea-time quantitative PCR fpr the detection of selected bacterial pathogens during

municipal wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, v.382, p.121-129. 2007.

SHMUELY, H.; SAMRA, Z.; ASHKENAZI, S.; DINARI, G.; CHODICK, G.; YAHAV, J. Association of *H. pylori* infection with *Shigella* gastroenteritis in young children. *American Journal of Gastroenterology*, v. 99, p. 2041-2045, 2004.

SILVA, I.G. *Avaliação da microbiota gengival e subgengival de seres humanos por PCR*. Dissertação (Mestrado em Propedêutica complementar – Laboratório de Diagnóstico Genético de Doenças Infecciosas) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 97f. 2007.

SILVA, S.M.C.P; FERNANDES, F.; SOCCOL, V.T.;MORITA, D.M. (2001). Principais contaminantes do lodo. In: ANDREOLI, C.V.; VON SPERLING, M.; FERNANDES, F. (2001). *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias. Lodo de esgotos. Tratamento e disposição final*. Vol. 6. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG. Companhia de Saneamento do Paraná – SANEPAR. 484p.

SINGH, D.V.; MATTÉ, M.H.; MATTÉ, G.R; JIANG, S.; SABEENA, F.; SHUKLA, N.B.; SANYAL B.N.; HUQ, A.; COLWELL, R.R. Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n.2, p. 910-921, 2001.

SNELLING, W.J.; McKEENA, J.P.; LECKY, D.M.; DOOLEY, J.S.G. Survival of *Campylobacter jejuni* in Waterborne Protozoa *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n.9, p. 5560-5571, 2005.

SOARES, A.M.E; VON SPERLING, M.; CHERNICHARO, C.A.L; BRITO, L.H.N.C; ZERBINI, A.M.; MELO, M.C.; BARCELLOS, F.N.M. Avaliação da remoção de patógenos em duas lagoas de polimento com difrentes relações geométricas tratando efluente de um rator UASB compartimentado. In: CHERNICHARO, C.A.L. (Coordenador). *Pós-tratamento de Efluentes de Ratores Anaeróbios. Coletânea de Trabalhos Técnicos*. Vol. 2, PROSAB. 1ª Edição. Belo Horizonte, SEGRAC EDITORA, 2001, p.87-96.

SOLOMON, E.B.; HOOVER, D.G. *Campylobacter jejuni*: a bacterial paradox. *Journal of Food Safety*, Westport, v. 19, n. 2, p. 121-136, 1999.

St-PIERRE, K.; LÉVESQUE, S.; FROST, E.; CARRIER, N.; ARBEIT, RD.; MICHAUD,S. Thermotolerant Coliform are not a good surrogate for *Campylobacter* spp. in environmental water. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n.21, p. 6736-6744, 2009.

STELZER,W.; JACOB, J. A study of *Campylobacter* in sewage, sewage sludge and in river water. *Water Science and Technology*, Londres, v. 24, n. 2, p. 117-120, 1991.

STENDER, H.; BROOMER, A.J.; OLIVEIRA, K.; O'KEEFE, P.; NIELSEN, H.J.J. SAGE, A.; COULL, J. Rapid Detection, Identification, and Enumeration of *Escherichia coli* Cells in Municipal Water by Chemiluminescent In Situ Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n.1, p. 142-147, jan. 2001.

TAMANAI-SHACOORI, Z.; GOUGEON-JOLIVERT, A.; POMMEPUY, M.; CORMIER,M.; COLWELL, R.R. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* in

water by polymerase chain reaction amplification and hybridization. *Canadian Journal Microbiology*, v. 40, n. 4, p. 243-249, 1994.

TANG, Y.Z.; GIN, K.Y.H.; LIM, T.H. High-Temperature *Fluorescent In Situ Hybridization* for Detecting *Escherichia coli* in Seawater Samples, Using rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes and Flow Cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n.12, p. 8157-8164, 2005.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C.L. (2005). *Microbiologia*. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TOSIN, I.; MACHADO, R. A. Ocorrência de *Campylobacter* spp entre manipuladores de alimentos em cozinhas hospitalares de localidade urbana da região Sul do Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.29, n. 6, p.472-477, 1995.

TYLER, K.D.; WANG, G.; TYLER, S.D.; JOHNSON, W.M. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprint of representative bacterial pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, n. 2, p. 199-214, 1997.

TROUSSELLIER, M.; LEGENDRE, P.; BALEUX, B. Modelling the evolution of bacterial densities in an eutrophic ecosystem (sewage lagoons). *Microbial Ecology*, v. 12, p. 355-379, 1986 *apud* CURTIS, T. *Bacterial pathogen removal in wastewater treatment plants*. In: The Handbook of Water and Wastewater Microbiology. (Eds): D. Mara and N. Horan. Academic Press, p. 477-490. London. 2003.

VANCANNEYT, M.; LOMBARDI, A.; ANDRIGHETTO, C., *et al.* Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n.3, p. 1381-1391, 2002.

Van der MEER, J.R.; ZEEP, K.; EGGEN, R. Modern methods for detection of microorganisms and their activity. *BioWorld (Umwelt-Biotechnonology)*, v.5, p. 3-8, 1998 *apud* ARAÚJO, J.C. A utilização da hibridação in situ com sondas fluorescentes (FISH) na digestão anaeróbia. In: VII Taller y Simposio Latinoamericano sobre Digestión Anaeróbia, 22 a 25 de octubre. Sesión I, Taller. Mérida/México. 2002.

VARGAS, A.C.; CECIM, M.; VIANA, L.R; SPRICIGO, D.A.; COSTA, M.M. Isolamento de *Campylobacter jejuni* em feto ovino abortado: relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, n. 3, p. 317-320, 2005.

VANHOUTTE, T.; HUYS, G.; de BRANDT, E.; SWINGS, J. Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers). *Microbiology Ecology*, v. 48, 437-446, 2004.

VIDOTTO, M.C.; KOBAYASHI, K.T.R.; DIAS, A.M.G. Unidentified serogroups enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with diarrhoea in infants in Londrina, Parana, Brazil. *Journal Med. Microbiology*, Londres, v. 49, n.9, 823-826.

VON SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 3ª.ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG. 452p. (*Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, 1*). 2005.

VON SPERLING, M. Lagoas de Estabilização. 2ª.ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG. 196p. (*Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, 3*). 2002.

- WAAR, K.; DEGENER, J.E.; VAN LUYN, M.J.; HARMSSEN, H.J. *Fluorescent in situ hybridization* with specific DNA probes offers adequate detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* in clinical samples. *Journal of Medical Microbiology*, Londres, v. 54, p. 937-944. 2005.
- WAGNER, R. The regulation of ribosomal RNA synthesis and bacterial cell growth. *Archives of Microbiology*, v.161, p.100-109, 1994.
- WALKER, M.; RAPLEY, R. (tradução: Fernando Salvador Moreno). *Guia de rotas na tecnologia do gene*. São Paulo: Editora Ateneu, 1999.
- WALLNER, G.; AMANN, R.; BEISKER, W. Optimizing Fluorescent In Situ Hybridization with rRNA- Targeted Oligonucleotide Probe for Flow Cytometric Identification of Microorganisms. *Cytometry*, v.14, p. 136-143. 1993.
- WANG, H.; FARBER, J.M.; MALIK, N.; SANDERS, G. Improved PCR detection of *Campylobacter jejuni* from chicken rinses by a simple sample preparation procedure. *International Journal of Food Microbiology*, Elsevier Science, v. 52, p. 39-45, 1999.
- WANG, R-F.; CAO, W.W; CERNIGLIA, C.E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *Journal of Applied Microbiology*, Washington, v. 83, p. 727-736, 1997.
- WELLINGHAUSEN, N.; BARTEL, M.; ESSIG, A.; POPPERT S. Rapid Identification of Clinically Relevant *Enterococcus* Species by Fluorescence in Situ Hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 10, oct. 2007.
- WILSON, I.G. Inhibition and Facilitation of Nucleic Acid Amplification. Minireview. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 10, p. 3741-3751, 1997.
- WILSON, S.G.; CHAN, S.; DEROO, M.; GARCIA, M.V.; JOHNSON, A.; LANE, D.J.; HALBERT, D. Development of a colorimetric, second generation nucleic acids hybridization method for detection of *Salmonella* in foods and a comparison with conventional culture procedure. *Journal Food of Science*, v.55, p. 1394-1398, 1990.
- WHO (2004). Water, Sanitation and hygiene links to health: facts and figures. World Health Organization. Geneva, Switzerland [On line] [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/factsfigures2005.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/factsfigures2005.pdf). Acesso em 10/12/2009.
- WOLF, M.K. Ocurrence, distribution and association of O and H serogroups, colonization factors, antigens and toxins of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, Washington, v. 10, n. 4, p. 569-584, 1997.
- WOESE, C.R.; KANDLER, O.; WHEELIS, M.L.; Towards natural systems for organisms: proposal for the domain *Archaea*, *Bacteria* and *Eucarya*. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 87, p. 4576-4579, 1990
- WOESE, C.R. Bacterial evolution. *Microbiology Reviews*, Washington, v. 51, p. 221-271, 1987
- YAN, T.; HAMILTON, M.J; SADOWSKI, M.J. High-throughput and quantitative procedure for determining sources of *Escherichia coli* in waterway by using host-specific DNA marker genes. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, p. 890-896, 2007.

YAZIZ, M.I.; LLOYD, B.J. The Removal of Salmonellas in conventional Sewage Treatment Processes. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 46, p. 131-142.1979.

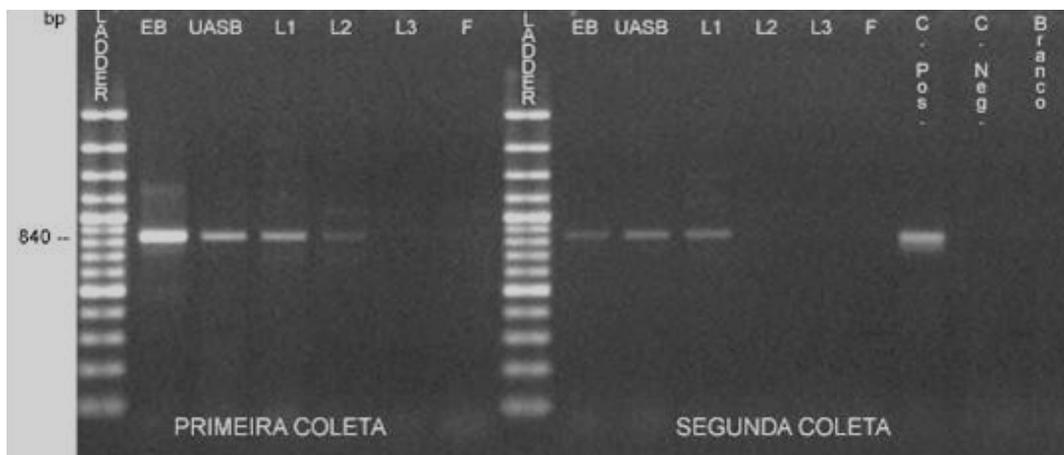
YILMAZ, S.L.; HATICE, E. O. NOGUERA, D.R. Making All Parts of the 16S rRNA of Escherichia coli Accessible In Situ to Single DNA Oligonucleotide. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 72, n.1, jan. 2006.

YU, Z.; MOHN W.W. Killing two birds with one stone: simultaneous extraction of DNA and RNA from activated sludge biomass. *Canadian. Journal of Microbiology*, v. 45, p. 269-272, 1999.

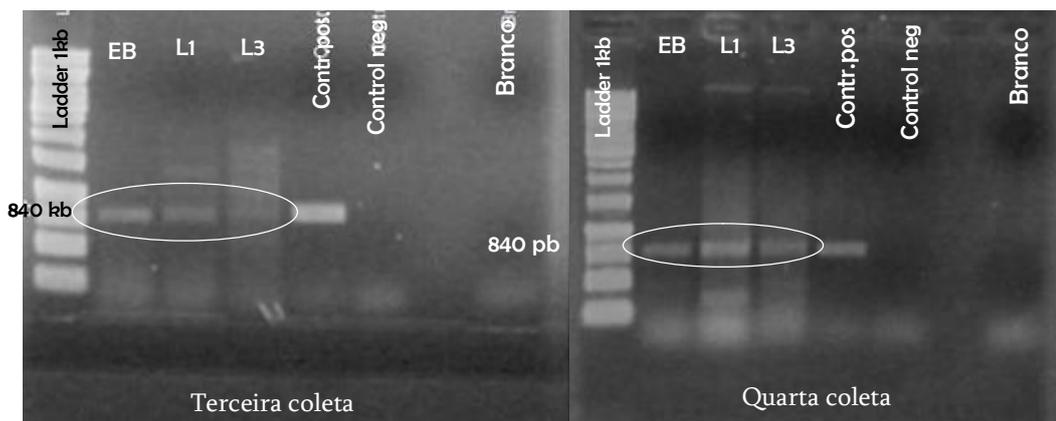
## 9 APÊNDICES

### 9.1 Géis de PCR das Bactérias Investigadas

*E. coli* total

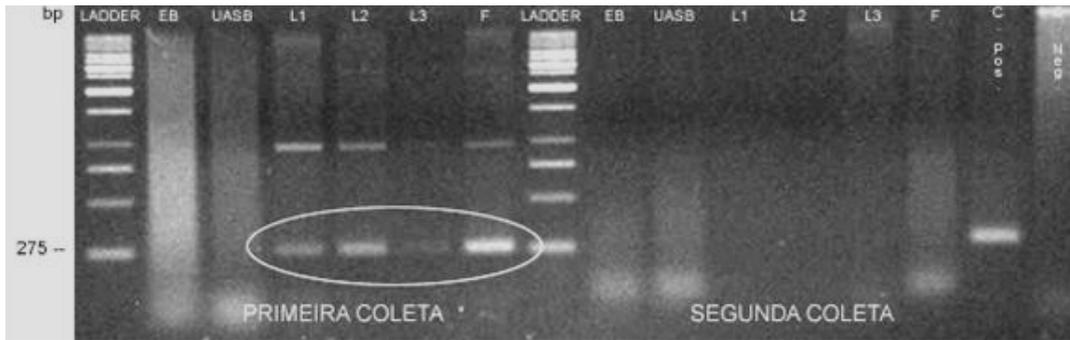


PCR das amostras do esgoto bruto, efluente do UASB e das lagoas 1, 2, 3 utilizando os primers para *Escherichia coli* Ladder – 100pb.

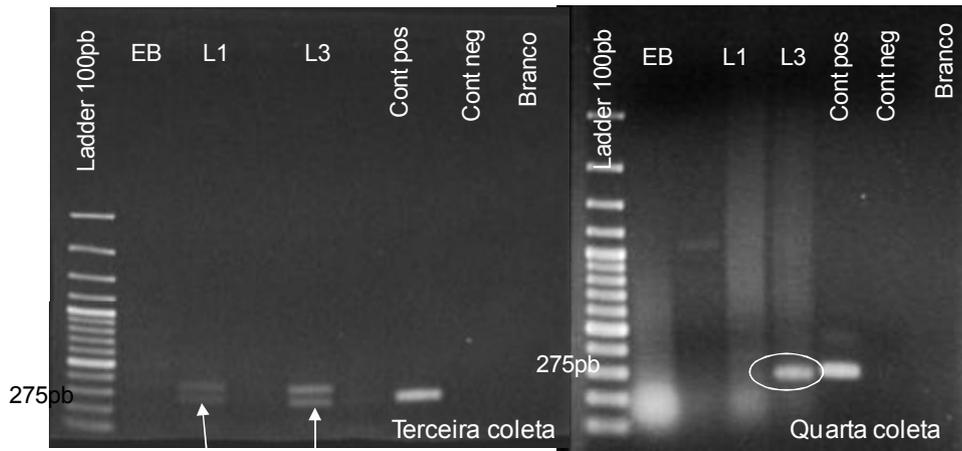


PCR das amostras do esgoto bruto, L1 e L3 utilizando os primers para *Escherichia coli* Ladder – 1kb.

*Salmonella* spp.

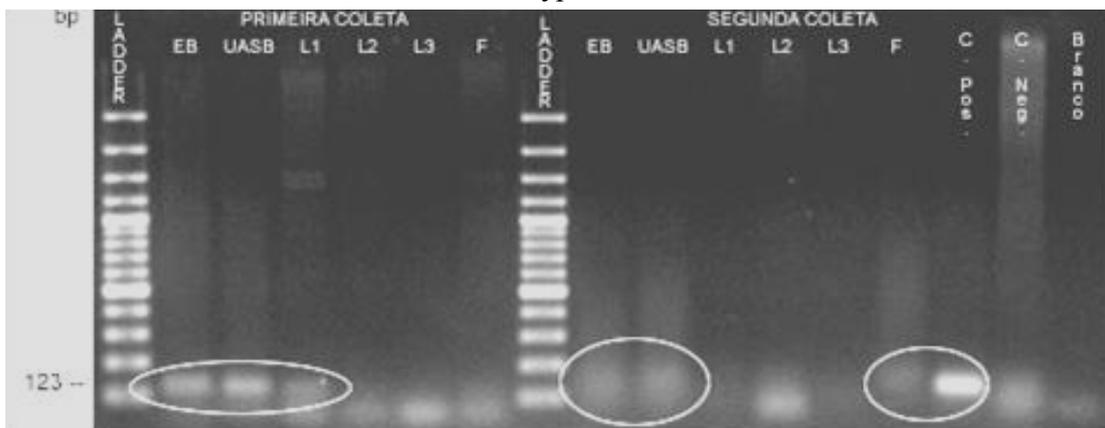


PCR das amostras do esgoto bruto, efluente do UASB e das lagoas 1, 2, 3, utilizando os *primers* para *Salmonella* spp. *Ladder* – 1 kb.

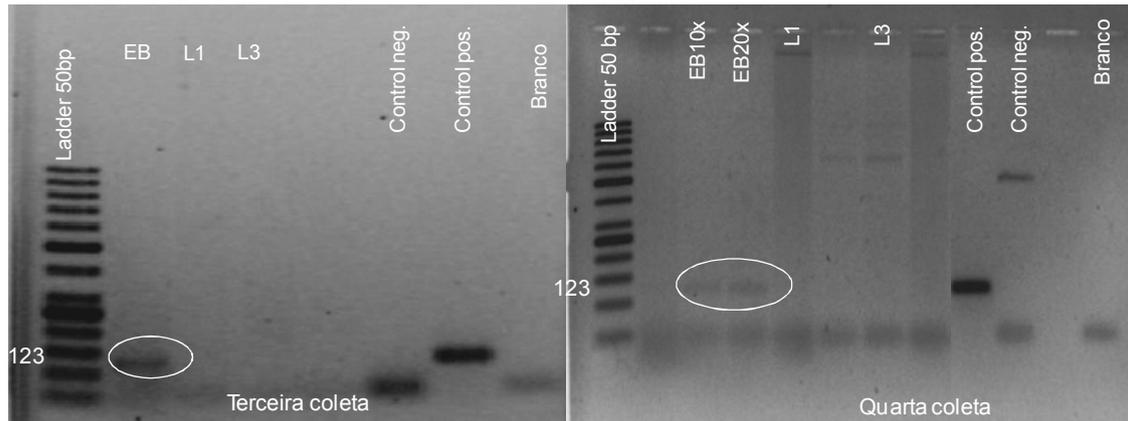


PCR das amostras do esgoto bruto, L1 e L3 utilizando os *primers* para *Salmonella* spp  
*Ladder* – 100pb

*Salmonella* Typhimurium

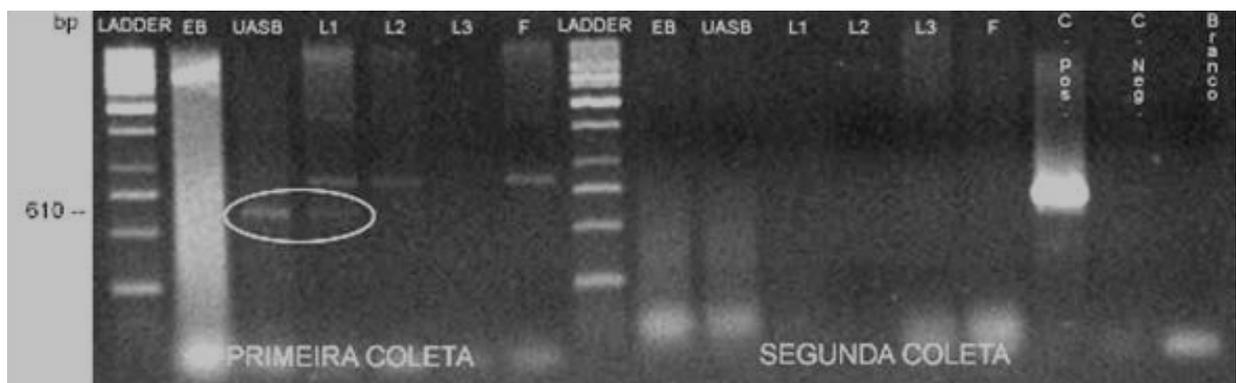


PCR das amostras do esgoto bruto, efluente do UASB e das lagoas 1, 2, 3, utilizando os *primers* para *Salmonella* Typhimurium *Ladder* – 100 pb.

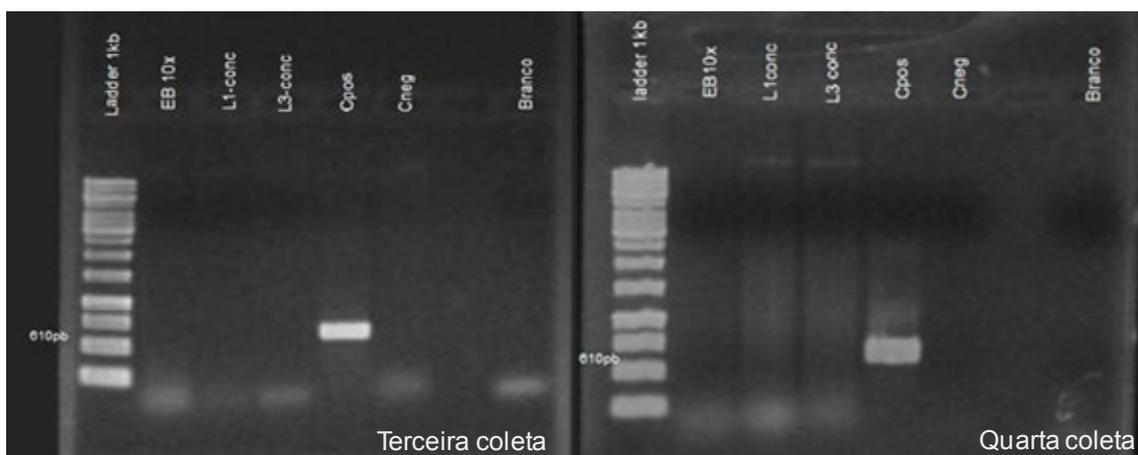


PCR das amostras do esgoto bruto, L1 e L3, utilizando os *primers* para *Salmonella Typhimurium*. *Ladder* – 50 pb.

*Shigella spp.*

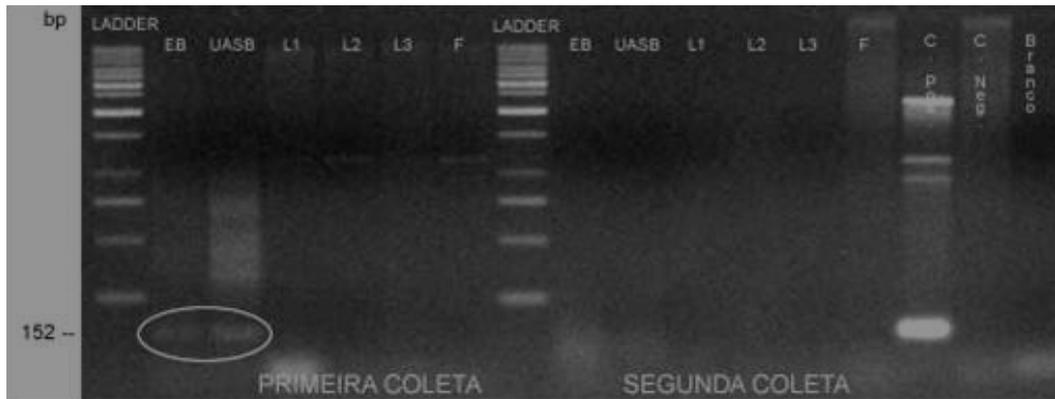


PCR das amostras do esgoto bruto, efluente do UASB e das lagoas 1, 2, 3 utilizando *primers* para *Shigella spp.* *Ladder* – 1kb.

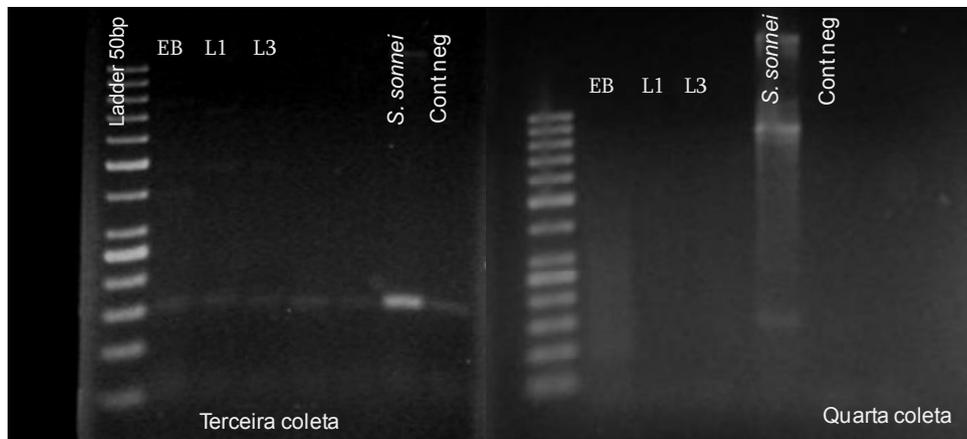


PCR das amostras de esgoto bruto, L1 e L3 utilizando *primers* para *Shigella spp.* *Ladder* – 1kb.

*Shigella dysenteriae*

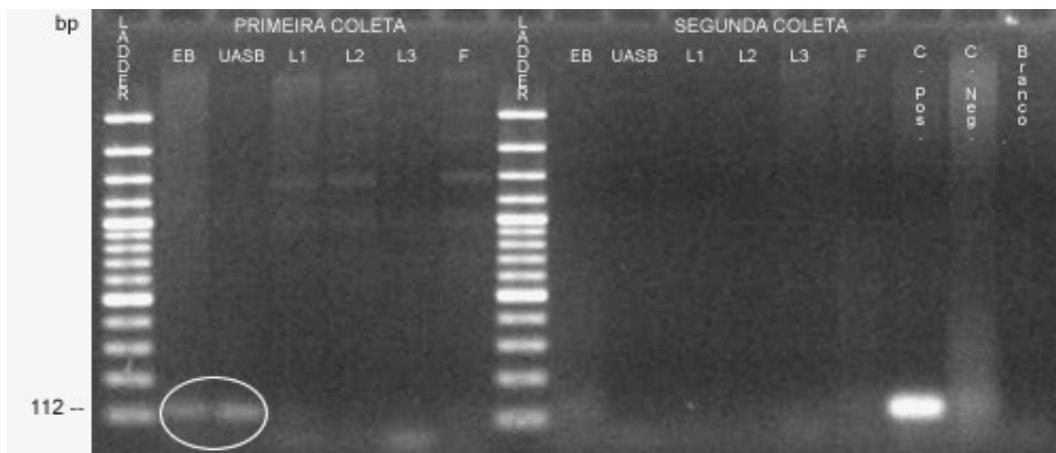


PCR das amostras do esgoto bruto, efluente do UASB e das lagoas 1, 2, 3 utilizando *primers* para *Shigella dysenteriae*. Ladder – 100pb.

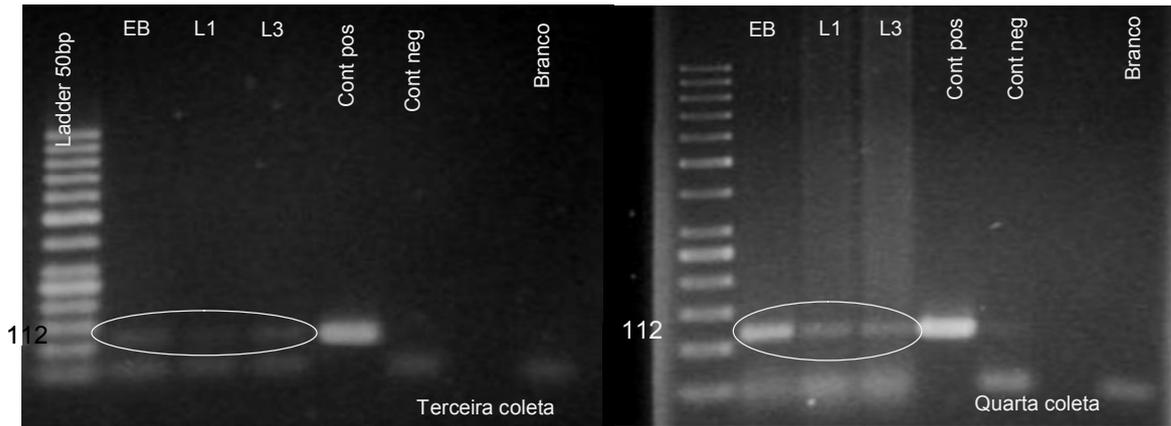


PCR das amostras de esgoto bruto, L1 e L3 utilizando *primers* para *Shigella dysenteriae*. Ladder – 50pb.

*Enterococcus spp*

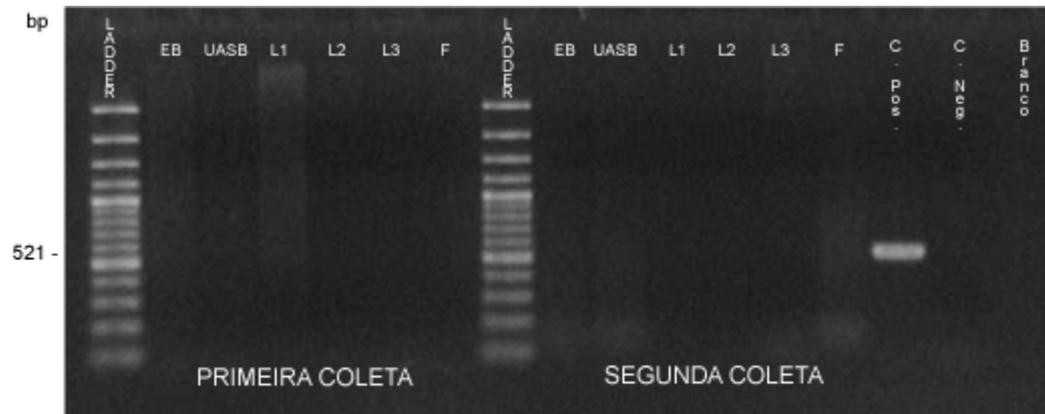


PCR das amostras de esgoto bruto, efluente do UASB e das lagoas 1, 2,3 utilizando *primers* para *Enterococcus spp* Ladder – 100pb.

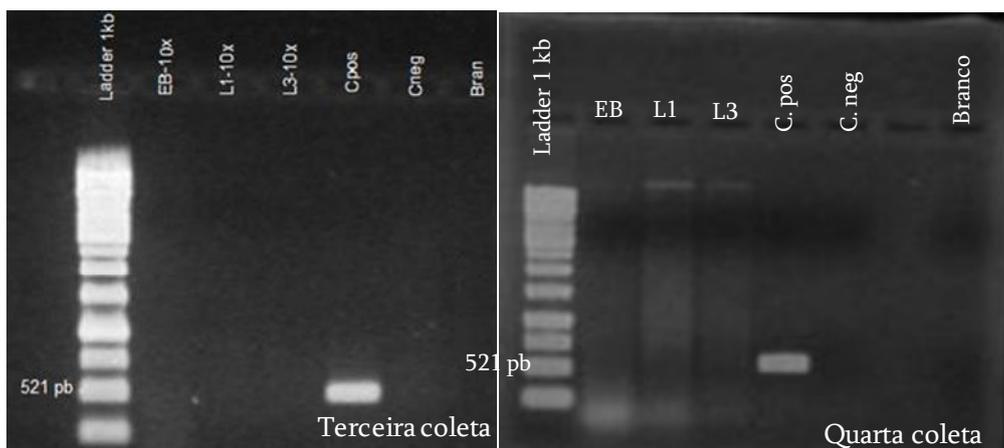


PCR das amostras de esgoto bruto, L1 e L3 utilizando *primers* para *Enterococcus* spp  
Ladder – 50pb.

*Helicobacter pylori*

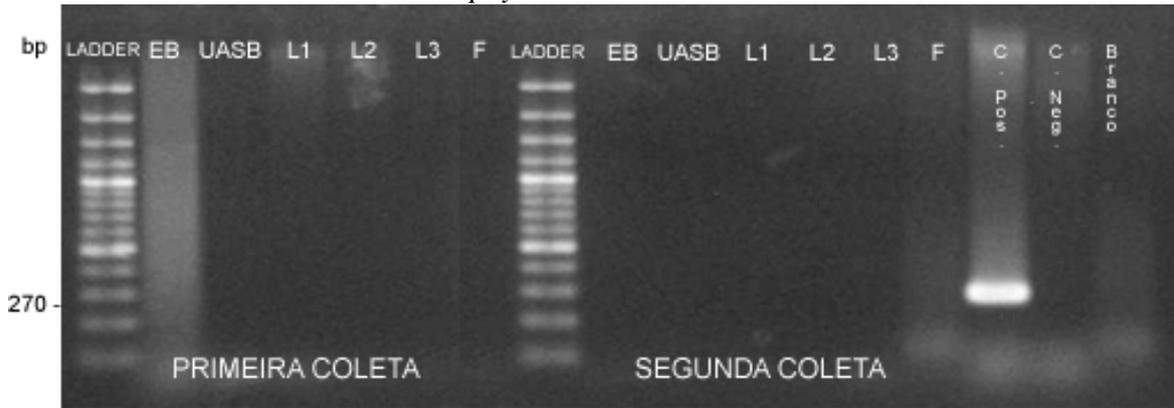


PCR das amostras do esgoto bruto, efluente do UASB e das lagoas 1, 2, 3 utilizando os *primers* para *Helicobacter pylori*. Ladder 100 pb

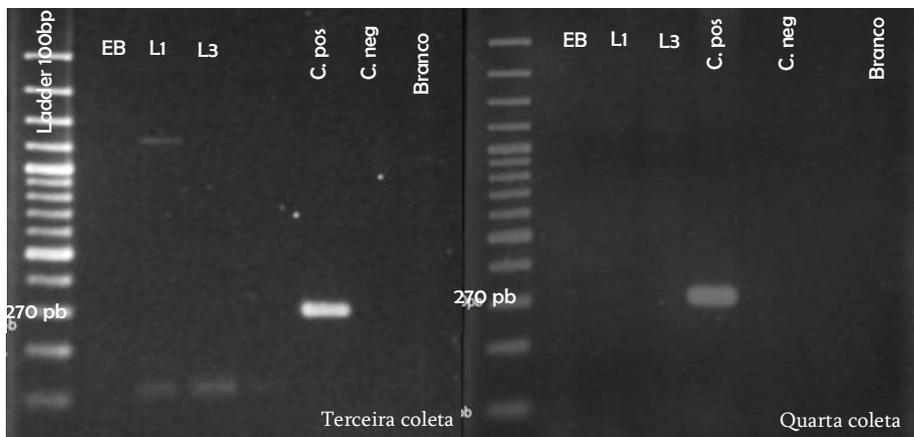


PCR das amostras do esgoto bruto, L1 e L3 utilizando *primers* para *Helicobacter pylori*  
Ladder – 1Kb.

*Staphylococcus aureus*

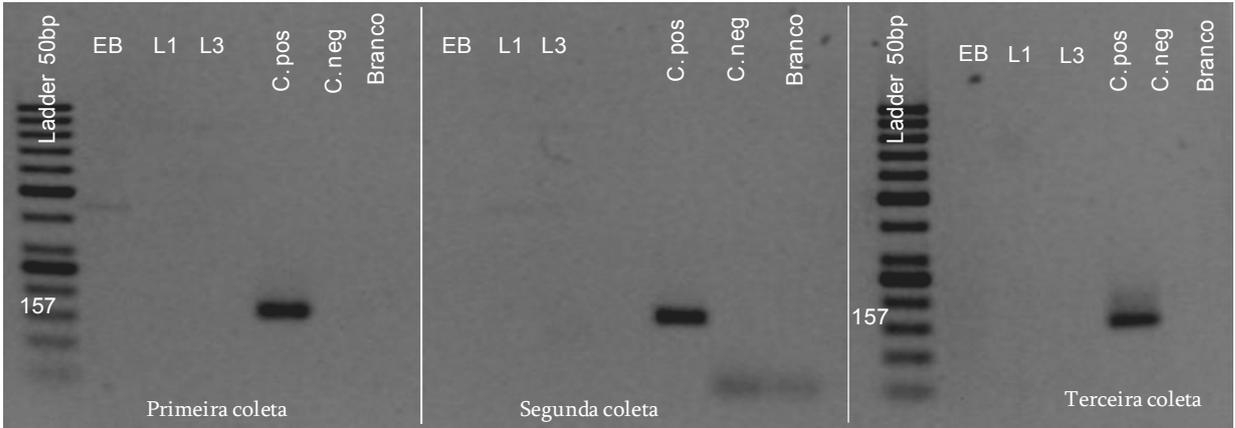


PCR das amostras do esgoto bruto, efluente do UASB e das lagoas 1, 2, 3 utilizando os primers para *Staphylococcus aureus*. Ladder 100 bp

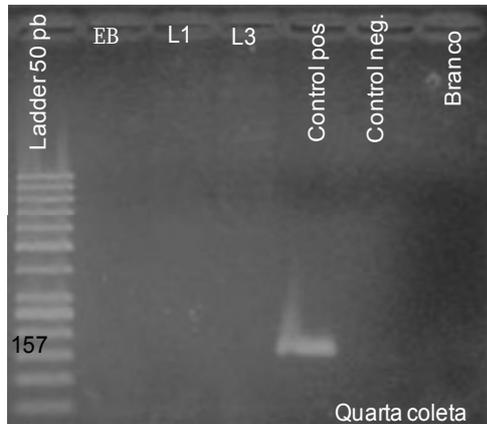


PCR das amostras de esgoto bruto, L1, L3 utilizando primers para *Staphylococcus aureus* Ladder 100 bp

*Yersinia enterocolitica*

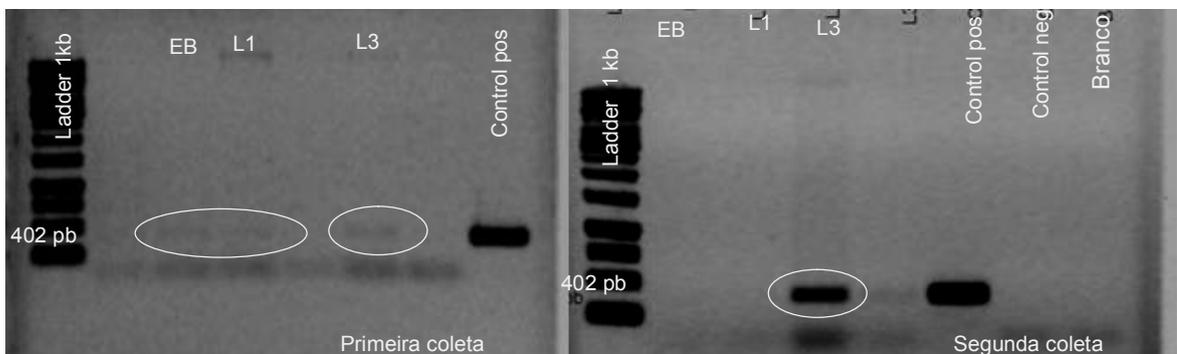


PCR das amostras do esgoto bruto, L1 e L3 utilizando *primers* para *Yersinia enterocolitica* - Ladder – 50 pb.

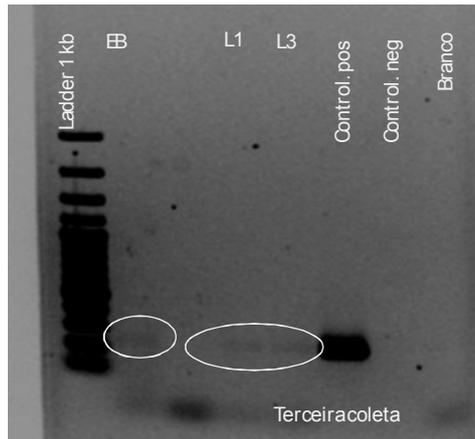


PCR das amostras do esgoto bruto, L1 e L3 utilizando *primers* para *Yersinia enterocolitica* - Ladder – 50 pb.

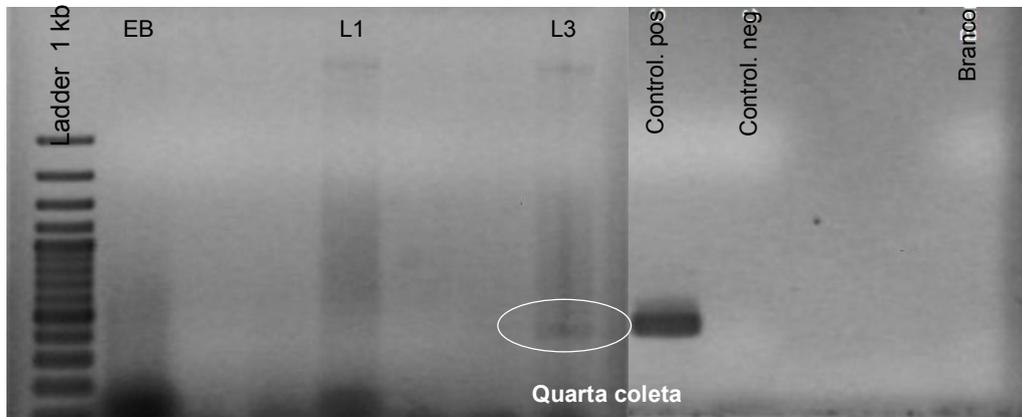
*Campylobacter jejuni*



PCR das amostras do esgoto bruto, L1 e L3 utilizando *primers* para *Campylobacter jejuni* – Ladder – 1kb



PCR das amostras do esgoto bruto, L1 e L3 utilizando *primers* para *Campylobacter jejuni* - Ladder – 1kb



PCR das amostras do esgoto bruto, L1 e L3 utilizando *primers* para *Campylobacter jejuni* - Ladder – 1kb.

## 9.2 Estatística descritiva da quantificação de bactérias utilizando FISH

Estatística descritiva da quantificação de *E. coli* pela técnica de FISH

	Coleta	EB	L1	L3
<b>Média aritmética</b>	Coleta 1	1,3E+07	8,0E+06	6,8E+06
	Coleta 2	8,3E+06	5,4E+06	1,0E+07
	Coleta 3	5,9E+07	5,2E+06	8,8E+05
	Coleta 4	9,4E+06	6,0E+05	1,3E+05
<b>Média geométrica</b>	Coleta 1	1,3E+07	7,3E+06	6,8E+06
	Coleta 2	8,3E+06	5,3E+06	9,7E+06
	Coleta 3	5,8E+07	5,1E+06	7,8E+05
	Coleta 4	9,3E+06	6,0E+05	1,3E+05
<b>Mediana</b>	Coleta 1	1,3E+07	7,8E+06	6,8E+06
	Coleta 2	8,4E+06	5,4E+06	8,4E+06
	Coleta 3	6,4E+07	5,6E+06	9,2E+05
	Coleta 4	9,6E+06	6,0E+05	1,5E+05
<b>Desvio padrão</b>	Coleta 1	1,5E+06	4,0E+06	9,6E+05
	Coleta 2	6,1E+05	1,1E+06	3,0E+06
	Coleta 3	1,1E+07	1,0E+06	4,8E+05
	Coleta 4	1,6E+06	1,0E+05	2,9E+04
<b>CV</b>	Coleta 1	0,11	0,49	0,14
	Coleta 2	0,07	0,20	0,30
	Coleta 3	0,18	0,20	0,55
	Coleta 4	0,17	0,17	0,22
<b>Variância</b>	Coleta 1	2,4E+12	1,6E+13	9,3E+11
	Coleta 2	3,8E+11	1,2E+12	9,1E+12
	Coleta 3	1,1E+14	1,1E+12	2,3E+11
	Coleta 4	2,6E+12	1,0E+10	8,4E+08
<b>Mínimo</b>	Coleta 1	1,3E+07	4,1E+06	5,9E+06
	Coleta 2	7,6E+06	4,2E+06	8,0E+06
	Coleta 3	4,7E+07	4,0E+06	3,9E+05
	Coleta 4	7,6E+06	5,0E+05	1,0E+05
<b>Máximo</b>	Coleta 1	1,5E+07	1,2E+07	7,8E+06
	Coleta 2	8,8E+06	6,4E+06	1,3E+07
	Coleta 3	6,6E+07	5,9E+06	1,4E+06
	Coleta 4	1,1E+07	7,0E+05	1,5E+05

Estadística descritiva da quantificação de *Salmonella* spp pela técnica de FISH

	Coleta	EB	L1	L3
<b>Média aritmética</b>	Coleta 1	1,3E+07	3,7E+06	4,1E+06
	Coleta 2	2,0E+07	9,8E+06	1,7E+07
	Coleta 3	8,0E+05	4,8E+04	4,8E+04
	Coleta 4	8,0E+05	5,0E+04	5,0E+04
<b>Média geométrica</b>	Coleta 1	1,1E+07	2,9E+06	4,0E+06
	Coleta 2	2,0E+07	9,4E+06	1,7E+07
	Coleta 3	8,0E+05	4,8E+04	4,8E+04
	Coleta 4	8,0E+05	5,0E+04	5,0E+04
<b>Mediana</b>	Coleta 1	1,2E+07	4,9E+06	3,5E+06
	Coleta 2	2,0E+07	1,0E+07	1,8E+07
	Coleta 3	8,0E+05	4,8E+04	4,8E+04
	Coleta 4	8,0E+05	5,0E+04	5,0E+04
<b>Desvio padrão</b>	Coleta 1	7,8E+06	2,4E+06	1,2E+06
	Coleta 2	2,2E+06	3,3E+06	2,3E+06
	Coleta 3	0,0E+00	0,0E+00	0,0
	Coleta 4	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
<b>CV</b>	Coleta 1	0,61	0,64	0,30
	Coleta 2	0,17	0,88	0,55
	Coleta 3	0,00	0,00	0,00
	Coleta 4	0,00	0,00	0,00
<b>Variância</b>	Coleta 1	6,0E+13	5,8E+12	1,5E+12
	Coleta 2	4,9E+12	1,1E+13	5,1E+12
	Coleta 3	0,0E+00	0,0E+00	7,9E-23
	Coleta 4	0,0E+00	0,0E+00	0,0E+00
<b>Mínimo</b>	Coleta 1	5,1E+06	9,6E+05	3,3E+06
	Coleta 2	1,8E+07	6,3E+06	1,5E+07
	Coleta 3	8,0E+05	4,8E+04	4,8E+04
	Coleta 4	8,0E+05	5,0E+04	5,0E+04
<b>Máximo</b>	Coleta 1	2,1E+07	5,3E+06	5,5E+06
	Coleta 2	2,2E+07	1,3E+07	1,9E+07
	Coleta 3	8,0E+05	4,8E+04	4,8E+04
	Coleta 4	8,0E+05	5,0E+04	5,0E+04

Estatística descritiva da quantificação de *Campylobacter* spp pela técnica de FISH

	<b>Coleta</b>	<b>EB</b>	<b>L1</b>	<b>L3</b>
<b>Média aritmética</b>	Coleta 1	4,0E+06	7,4E+05	1,2E+06
	Coleta 2	3,6E+06	1,0E+06	8,7E+05
	Coleta 3	3,9E+06	3,8E+05	3,7E+05
	Coleta 4	6,6E+06	3,0E+05	4,7E+05
<b>Média geométrica</b>	Coleta 1	4,0E+06	7,3E+05	1,2E+06
	Coleta 2	4,0E+06	7,3E+05	1,2E+06
	Coleta 3	3,9E+06	3,7E+05	3,7E+05
	Coleta 4	6,3E+06	3,0E+05	3,9E+05
<b>Mediana</b>	Coleta 1	3,7E+06	6,8E+05	1,2E+06
	Coleta 2	3,8E+06	1,0E+06	8,0E+05
	Coleta 3	4,0E+06	3,6E+05	3,4E+05
	Coleta 4	5,6E+06	3,0E+05	6,0E+05
<b>Desvio padrão</b>	Coleta 1	7,1E+05	1,1E+05	1,1E+05
	Coleta 2	5,3E+05	0,0E+00	1,2E+05
	Coleta 3	2,3E+05	5,1E+04	5,6E+04
	Coleta 4	2,4E+06	0,0E+00	2,8E+05
<b>CV</b>	Coleta 1	0,18	0,15	0,09
	Coleta 2	0,15	0,00	0,13
	Coleta 3	0,06	0,13	0,15
	Coleta 4	0,36	0,00	0,59
<b>Variância</b>	Coleta 1	5,0E+11	1,2E+10	1,2E+10
	Coleta 2	2,8E+11	0,0E+00	1,3E+10
	Coleta 3	5,4E+10	2,6E+09	3,1E+09
	Coleta 4	5,5E+12	0,0E+00	7,7E+10
<b>Mínimo</b>	Coleta 1	3,5E+06	6,8E+05	1,2E+06
	Coleta 2	3,0E+06	1,0E+06	8,0E+05
	Coleta 3	3,6E+06	3,4E+05	3,4E+05
	Coleta 4	4,8E+06	3,0E+05	1,5E+05
<b>Máximo</b>	Coleta 1	4,8E+06	8,7E+05	1,4E+06
	Coleta 2	4,0E+06	1,0E+06	1,0E+06
	Coleta 3	4,0E+06	4,3E+05	4,3E+05
	Coleta 4	9,2E+06	3,0E+05	6,5E+05

Estatística descritiva da quantificação de *Enterococcus* spp. pela técnica de FISH

	Coleta	EB	L1	L3
<b>Média aritmética</b>	Coleta 1	2,7E+06	4,5E+05	0,0E+00
	Coleta 2	1,3E+06	0,0E+00	4,0E+05
	Coleta 3	9,4E+05	0,0E+00	4,8E+04
	Coleta 4	1,5E+06	5,9E+05	5,0E+04
<b>Média geométrica</b>	Coleta 1	2,7E+06	4,0E+05	-
	Coleta 2	1,3E+06	-	4,0E+05
	Coleta 3	9,2E+05	-	-
	Coleta 4	1,4E+06	5,8E+05	5,0E+04
<b>Mediana</b>	Coleta 1	2,7E+06	4,8E+05	0,0E+00
	Coleta 2	1,4E+06	0,0E+00	4,0E+05
	Coleta 3	8,0E+05	0,0E+00	4,8E+04
	Coleta 4	1,6E+06	5,5E+05	5,0E+04
<b>Desvio padrão</b>	Coleta 1	0,0E+00	2,4E+05	0,0E+00
	Coleta 2	5,1E+05	0,0E+00	0,0E+00
	Coleta 3	2,3E+05	0,0E+00	0,0E+00
	Coleta 4	6,1E+05	5,8E+04	0,0E+00
<b>CV</b>	Coleta 1	0,00	0,54	-
	Coleta 2	0,38	-	0,00
	Coleta 3	0,25	-	0,00
	Coleta 4	0,42	0,10	0,00
<b>Variância</b>	Coleta 1	0,0E+00	5,9E+10	0,0E+00
	Coleta 2	2,6E+11	0,0E+00	0,0E+00
	Coleta 3	5,4E+10	0,0E+00	0,0E+00
	Coleta 4	3,8E+11	3,4E+09	0,0E+00
<b>Mínimo</b>	Coleta 1	2,7E+06	1,9E+05	0,0E+00
	Coleta 2	8,0E+05	0,0E+00	4,0E+05
	Coleta 3	8,0E+05	0,0E+00	4,8E+04
	Coleta 4	8,0E+05	5,5E+05	5,0E+04
<b>Máximo</b>	Coleta 1	2,7E+06	6,8E+05	0,0E+00
	Coleta 2	1,8E+06	0,0E+00	4,0E+05
	Coleta 3	1,2E+06	0,0E+00	4,8E+04
	Coleta 4	2,0E+06	6,5E+05	5,0E+04

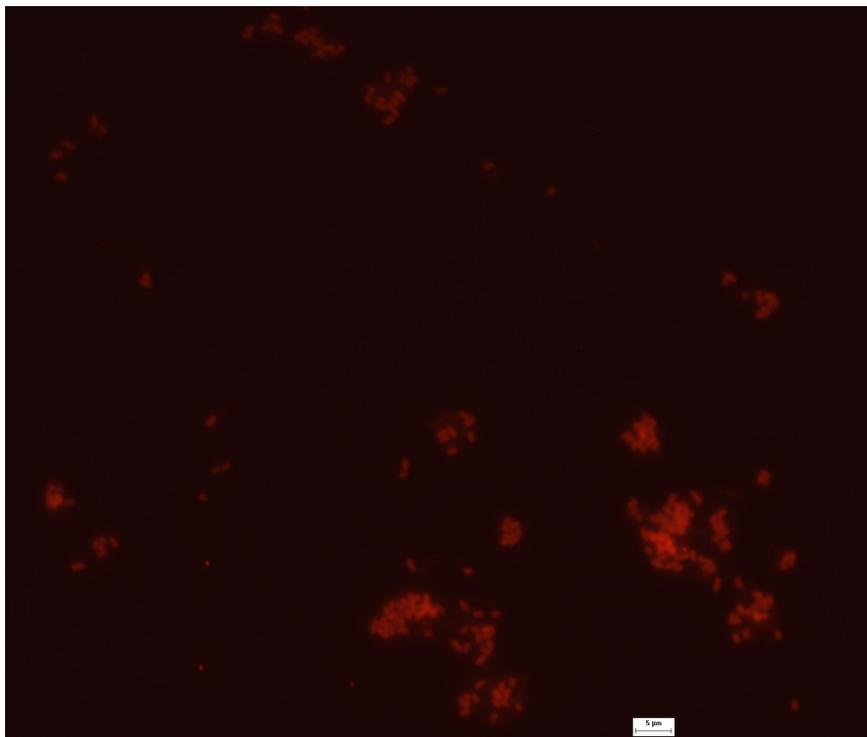
Estadística descritiva da quantificação de *E. coli* pela técnica de FISH  
em cada coleta (Comparação FISH e Colilert®)

	Coleta	Esgoto bruto	Lagoa 1	Lagoa 3
<b>Média aritmética</b>	1	3,9E+07	3,8E+06	1,5E+06
	2	9,8E+07	4,2E+06	2,6E+06
	3	8,3E+06	5,4E+06	1,0E+07
	4	2,5E+07	3,6E+06	3,6E+06
	5	5,9E+07	5,1E+06	8,8E+05
	6	9,4E+06	6,0E+05	1,3E+05
<b>Média geométrica</b>	1	3,8E+07	3,8E+06	1,5E+06
	2	9,6E+07	4,1E+06	2,5E+06
	3	8,3E+06	5,3E+06	9,7E+06
	4	2,4E+07	3,5E+06	3,6E+06
	5	5,8E+07	5,0E+06	7,8E+05
	6	9,3E+06	6,0E+05	1,3E+05
<b>Mediana</b>	1	4,12E+07	3,87E+06	1,50E+06
	2	1,04E+08	4,29E+06	2,32E+06
	3	8,44E+06	5,40E+06	8,44E+06
	4	2,81E+07	3,62E+06	3,86E+06
	5	6,43E+07	5,60E+06	9,17E+05
	6	9,65E+06	6,03E+05	1,51E+05
<b>Desvio padrão</b>	1	9,4E+06	3,5E+05	2,3E+05
	2	1,9E+07	6,7E+05	7,7E+05
	3	6,1E+05	1,1E+06	3,0E+06
	4	7,1E+06	1,0E+06	5,4E+05
	5	1,1E+07	9,2E+05	4,8E+05
	6	1,6E+06	1,0E+05	2,9E+04
<b>CV</b>	1	0,24	0,09	0,15
	2	0,20	0,16	0,30
	3	0,07	0,20	0,30
	4	0,29	0,29	0,15
	5	0,18	0,18	0,55
	6	0,18	0,17	0,22
<b>Mínimo</b>	1	2,9E+07	3,5E+06	1,3E+06
	2	7,6E+07	3,5E+06	2,0E+06
	3	7,6E+06	4,2E+06	8,0E+06
	4	1,7E+07	2,5E+06	3,0E+06
	5	4,7E+07	4,0E+06	3,9E+05
	6	7,6E+06	5,0E+05	1,0E+05
<b>Máximo</b>	1	4,8E+07	4,2E+06	1,7E+06
	2	1,1E+08	4,8E+06	3,5E+06
	3	8,8E+06	6,4E+06	1,3E+07
	4	2,9E+07	4,6E+06	3,9E+06
	5	6,6E+07	5,6E+06	1,4E+06
	6	1,1E+07	7,0E+05	1,5E+05

Obs. (média e desvio padrão de 6 contagens em triplicata por coleta) (em 100 mL de amostra).

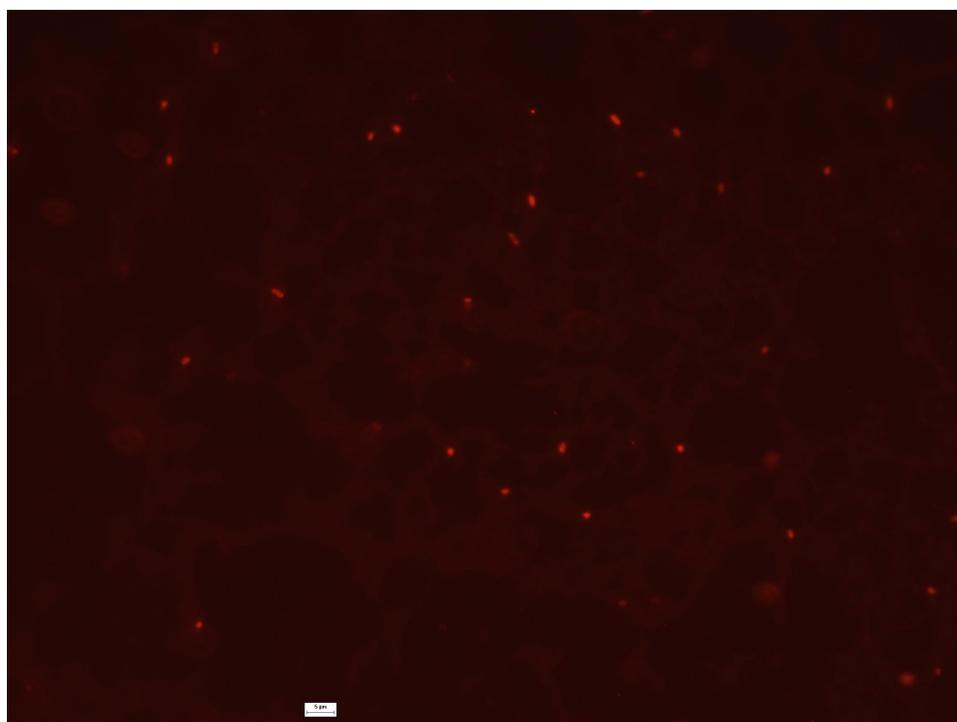
### 9.3 Controle positivo das bactérias quantificadas por FISH

*E. coli* (sonda ECO-1167)



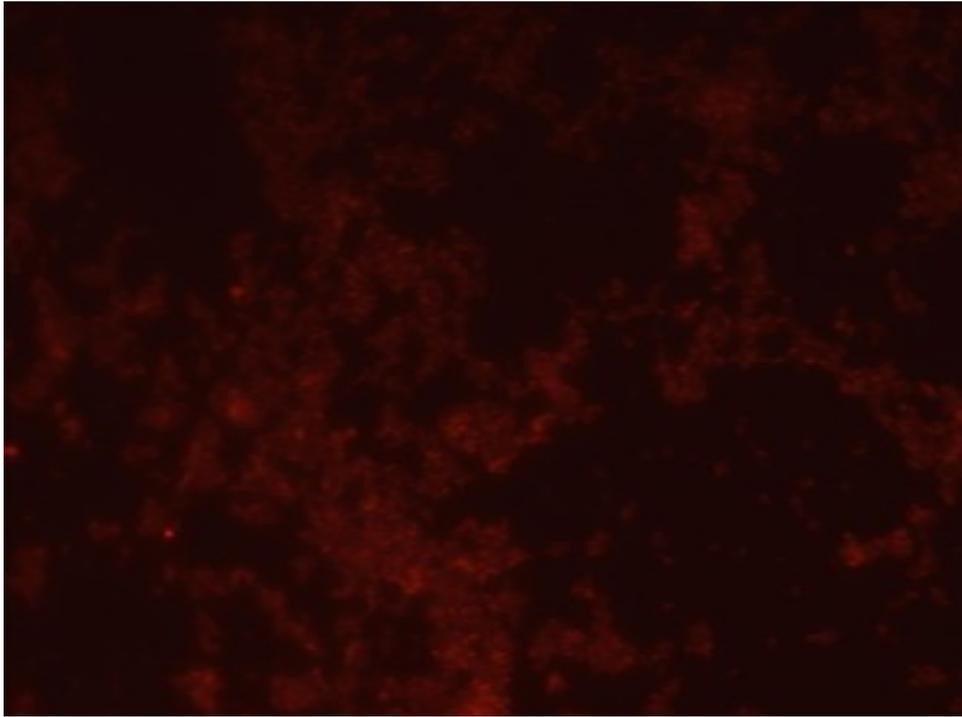
Hibridação *in situ* com células de *E. coli* e sonda ECO-1167

*Salmonella* spp. (sonda Sal-3)



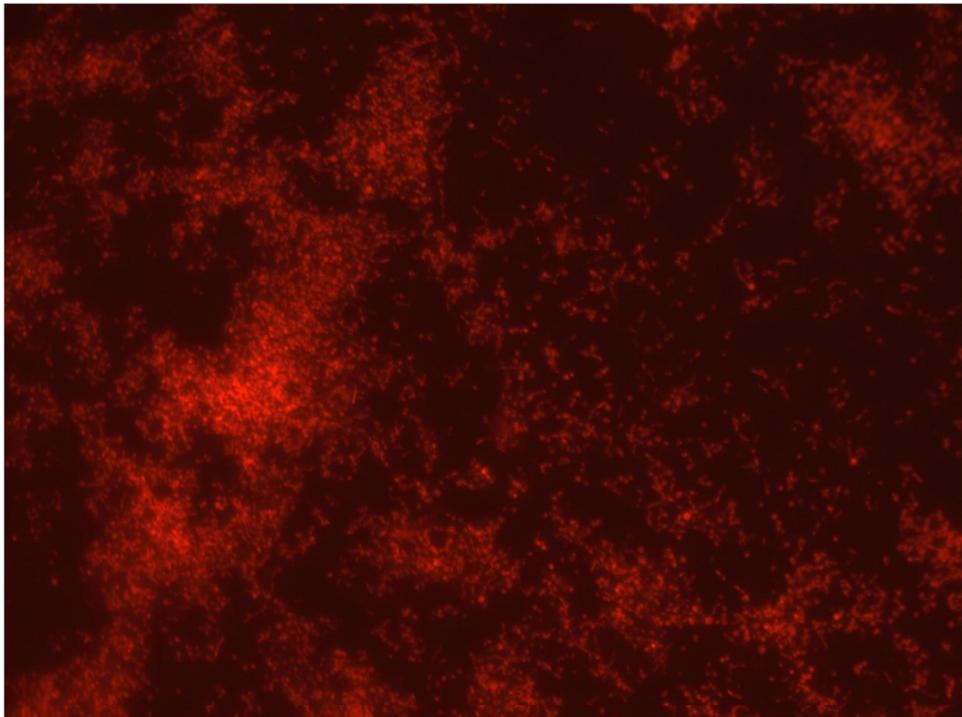
Hibridação *in situ* com células de *Salmonella* spp. e sonda Sal-3

*Enterococcus* spp. (sonda Enc-38)



Hibridação *in situ* com células de *Enterococcus* spp. e sonda Enc-38

*Campylobacter* spp. (sonda CAJECO 1427)



Hibridação *in situ* com células de *Campylobacter* spp. e sonda CAJECO 1427

#### 9.4 Dados de monitoramento do Colilert®

DATA	Concentração afluyente e efluente a cada unidade do tratamento (NMP/100mL).				
	Esgoto Bruto	UASB	Lagoa 1	Lagoa 2	Lagoa 3
22/11/2007	3,2E+08	5,9E+06	1,8E+06	8,6E+03	1,4E+03
20/12/2007	1,2E+08	1,3E+07	1,3E+05	6,0E+04	1,6E+03
10/01/2008	1,5E+08	3,1E+07	3,2E+05	6,9E+04	4,4E+04
20/02/2008	3,8E+07	1,8E+07	4,6E+05	7,5E+04	3,0E+04
2/04/2008	2,1E+07	3,1E+07	9,8E+04	3,1E+04	6,3E+03
07/05/2008	2,8E+07	6,2E+06	8,6E+05	2,3E+05	1,1E+05
18/08/2008	3,4E+07	5,0E+06	7,6E+05	6,5E+04	1,1E+04
17/07/2008	2,3E+07	7,7E+06	6,1E+05	9,3E+04	5,6E+04
20/06/2008	5,0E+07	5,8E+07	1,8E+05	9,6E+04	1,6E+04
17/07/2008	4,1E+08	2,5E+07	1,7E+06	2,0E+05	1,3E+05
20/08/2008	5,1E+08	2,7E+07	1,7E+05	5,8E+04	1,2E+04
17/09/2008	5,5E+08	6,1E+07	3,7E+05	2,0E+04	6,3E+03
15/10/2008	3,0E+06	2,9E+06	1,6E+05	4,1E+03	4,1E+03
19/11/2008	7,7E+07	2,6E+06	4,6E+05	4,2E+04	9,7E+03
10/12/2008	4,6E+07	7,1E+06	6,6E+05	1,1E+04	1,0E+03
28/12/2008	4,9E+08	2,2E+07	6,6E+05	8,1E+04	4,3E+04
24/06/2009	2,4E+07	4,4E+06	2,2E+05	1,1E+05	6,3E+03
16/07/2009	2,0E+08	8,6E+06	3,6E+05	7,0E+04	3,1E+03

## **9.5 Composição dos principais reagentes utilizados na execução das técnicas empregadas no presente trabalho**

### **TAE 50X, pH = 7,5 9 (Volume final: 1000 mL)**

- Pesar 242g de Tris e adicionar 57,1 mL de ácido acético glacial (capela de exaustão) e 100 mL de EDTA 0,5M (pH = 8,0).
- Adicionar 600 mL de água Mili-Q.
- Acertar o pH até 7,5 com adição de HCl.
- Completar o volume com água Mili-Q até 1000 mL.

### **TAE 1X**

- Adicionar 20 mL de TAE 50X em 980 mL de água Mili-Q.
- Armazenar a temperatura ambiente.

### **PBS 10X – (pH = 7,2 – 7,4)**

- Pesar 75,97 g de NaCl ou aliquotar 260 mL da solução de NaCl 5M.
- Pesar 9,94 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.
- Pesar 4,14 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- Dissolver em 800 mL de água Mili-Q e levar ao Mag - Mix.
- Ajustar o pH com micropérolas de NaOH até o valor 7,2 (adicionar aos poucos as micropérolas).
- Completar o volume para 1000 mL com água Mili-Q.
- Autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

### **PBS 1X**

- Adicionar 100 mL de PBS 10X em 900 mL de água Mili-Q.
- Armazenar a temperatura ambiente.

### **EDTA 0,5M, pH = 8,0**

- Pesar 18,61 g de EDTA.
- Adicionar 80 ml de água destilada.
- Levar no Mag Mix e adicionar micropérolas de NAOH para dissolver a solução.
- Ajustar o pH para 8,0 com HCl.

- Autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

### **NaCl 5M**

- Pesar 292 g de NaCl.
- Adicionar 800 ml de água destilada.
- Ajustar o volume para 1000 ml.
- Levar no Mag Mix para misturar bem.
- Autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

### **Tampão TE**

- Aliquotar 1 mL da solução de Tris-HCl (pH = 8,0) e 0,2 ml de solução de EDTA (0,5M, pH = 8,0), adicionar 80 mL de água Mili-Q.
- Ajustar o pH para 8,0.
- Completar o volume para 100 ml com água Mili-Q.
- Autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

### **Tampão TEN**

- Aliquotar 1 mL da solução de NaCl (0,5M) e 49 ml de solução de TE 1X.
- O pH já estará ajustado para 8,0.
- Autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

### **Álcool Isoamílico:Clorofórmio (1:24) (Volume final 100 ml)**

- Aliquotar 4 mL de Álcool Isoamílico (AIA) em capela de exaustão.
- Adicionar 96 mL de Clorofórmio em capela de exaustão.
- Estocar na geladeira em frasco escuro.

### **Tampão de Fixação (Volume final 50 mL)**

- Aquecer 40 ml de água destilada a 55°C;
- Adicionar 150 µl de 1M NaOH;
- Adicionar 2g de paraformaldeído;
- Dissolver o paraformaldeído
- Adicionar 5 ml de PBS 10X;
- Ajustar o pH para uma faixa de 7,2 a 7,4 com HCl concentrado

- Completar o volume para 50 ml com água destilada armazenar em geladeira (até 10 dias).

#### **Tampão de Hibridação FISH (Bactéria) – Estoque -(Volume final 500 mL)**

- Aliquotar 90 mL da solução de NaCl (5M).
- Aliquotar 5 mL da solução de EDTA (0,5M; pH = 8,0).
- Aliquotar 10 mL da solução de Tris-HCl (pH = 8,0).
- Aliquotar 0,250 mL da solução de SDS 20%.
- Completar o volume para 500 mL com água destilada.
- Transferir para Frasco Schott, autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

#### **Tampão de Lavagem – (Bactéria) – Estoque -(Volume final 500 mL)**

- Aliquotar 5 mL da solução de EDTA (0,5M; pH = 8,0).
- Aliquotar 0,250 mL da solução de SDS 20%.
- Aliquotar 10 mL da solução de Tris-HCl (pH = 8,0).
- Completar o volume para 500 mL com água destilada.
- Transferir para Frasco Schott, autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

#### **Tris-HCl (100 mL)**

- Pesar 12,1 g de Tris base.
- Adicionar 80 ml de água destilada.
- Ajustar o pH para uma faixa entre 7,5 a 8,0 com HCl concentrado.
- Completar o volume para 100 ml.

#### **Acetato de sódio 3M, pH = 5,2**

- Pesar 40,83 g de acetato de sódio trihidratado ( $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )
- Adicionar 80 ml de água Mili-Q.
- Ajustar o pH para 5.2 com ácido acético glacial.
- Autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

#### **Agarose 1%**

- Pesar 3,0 g de agarose.
- Dissolver em 300 mL de TAE 1X.

- Levar ao microondas até dissolver a agarose completamente. Ir aquecendo por 30 segundos e agitando o frasco Schott com cuidado.

### **Brometo de Etídio**

- Retirar a solução de brometo de etídio da geladeira com luva.
- Adicionar uma gota dessa solução em 400 ml de água destilada.
- Atenção: todo o manuseio do brometo deve ser feito com luva!

### **Ladder 1 Kb (Corrida em gel de agarose)**

- Aliquotar em um tubo eppendorf 50  $\mu$ L de Ladder.
- Adicionar 50  $\mu$ L de Loading.
- Adicionar 200  $\mu$ L de água Mili-Q.
- A relação, portanto, é 1  $\mu$ L de Ladder : 1  $\mu$ L de Loading : 4  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O.

### **Fenol equilibrado**

- Fazer sempre a metade do volume total do frasco, visto que o fenol tem maior durabilidade sem o tampão.
- Adicionar 50 mL de fenol e 2,5 mL de tampão fenol (procedimento tem que ser feito em capela de exaustão com uso de luvas).
- Esperar formar as duas fases no frasco mantendo-o dentro da geladeira, pois a formação das duas fases indica que o pH atingiu o valor de 8,0.

### **SDS 20%**

- 20g SDS (mesmo que Lauryl sulfato) em 100mL de água Mili-Q.
- Aquecer para dissolver.
- Armazenar a temperatura ambiente.

(Colaboração: CAMPOS, A.P., 2010)

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.