

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DE BACTÉRIAS PARA A DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS, EM AMOSTRAS AMBIENTAIS DE ÁGUA, ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).

Manuel Rodrigues Loncan

Porto Alegre, julho de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DE BACTÉRIAS PARA A DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS, EM AMOSTRAS AMBIENTAIS DE ÁGUA, ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).

Manuel Rodrigues Loncan

Trabalho de conclusão de curso apresentado como um dos requisitos para obtenção do grau de Farmacêutico.

Orientadora: Profa. Dra. Roberta da Silva Bussamara Rodrigues

Co-orientadora: Profa. Dra. Tânia Mara Pizzolato

Porto Alegre, julho de 2017

RESUMO

A contaminação dos ecossistemas naturais por fármacos é reconhecida como um dos principais problemas emergentes em química ambiental. Os antimicrobianos, em particular, despertam grande preocupação porque podem alterar a dinâmica populacional de microrganismos, incluindo a seleção de resistência, com potenciais consequências para a saúde humana. Recentemente, foi relatada a presença de fármacos antimicrobianos, na faixa de ng.L^{-1} , em águas residuais e em águas superficiais de Porto Alegre, o que levou à preocupação quanto ao risco de desenvolvimento de resistência bacteriana, especialmente em pontos de captação de água para consumo humano. Neste contexto, o objetivo principal desse trabalho consiste na otimização e aplicação de um método *in house* de extração de DNA total (DNA_T) de linhagens de microrganismos modelo, bem como, de amostras ambientais, para posterior estudo de um gene de resistência a antimicrobianos β -lactâmicos ($\text{bla}_{\text{TEM-1}}$), por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para o desenvolvimento da metodologia, foram utilizadas duas cepas da espécie *Escherichia coli*, a *E. coli* ATCC 11775^T, que é suscetível ao antimicrobiano β -lactâmico ampicilina e a *E. coli* Top10, resistente à ampicilina. A partir de cultivos dessas cepas realizaram-se extração de DNA_T , por método de extração orgânica com fenol:clorofórmio, e extração de DNA plasmidial (DNA_P), por método de lise alcalina. Na extração de DNA_T , foram testadas três formulações de tampão de lise celular: TES_A , TES_B e TET. Os produtos de extração de DNA_T e DNA_P foram analisados por eletroforese em gel de agarose e amostras de DNA_T foram quantificadas por método fluorimétrico. As amostras de DNA_T e DNA_P das *E. coli* ATCC 11775^T e Top10 foram submetidas à técnica de PCR. Foram testados dois pares de primers universais para o gene bacteriano *rRNA 16S* e um par de primers para detecção do gene $\text{bla}_{\text{TEM-1}}$. Posteriormente, foram coletadas amostras de águas superficiais em seis pontos do Arroio Dilúvio. Para concentrar células bacterianas, as amostras foram filtradas à vácuo em membranas de $0,22 \mu\text{m}$. A partir das membranas, realizou-se extração de DNA_T , pelo método do fenol:clorofórmio, com duas formulações de tampão de lise celular, TES_A e TET, e condições variadas de incubação. A partir da análise dos géis de agarose, podem-se observar bandas compatíveis com DNA genômico nas amostras das duas cepas, e bandas compatíveis com DNA plasmidial apenas para a cepa *E. coli* Top10. As formulações TES_A e TES_B foram igualmente eficazes na extração de DNA_T , e TET não produziu resultados. O rendimento médio das extrações de DNA_T foi de $0,028 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, quantidade suficiente para amplificação por PCR. Os produtos de PCR obtidos com os pares de primers que amplificam o gene *rRNA 16S* apresentaram o tamanho esperado nas amostras de *E. coli* ATCC 11775^T e Top10. Bem como, foram obtidos amplicons de tamanho esperado com o par de primers $\text{bla}_{\text{TEM-F}}$ e $\text{bla}_{\text{TEM-R}}$ nas amostras de *E. coli* ATCC 11775^T e Top10, sendo as bandas mais intensas para *E. coli* Top10. Verificou-se, ainda, a partir da extração de DNA_T dos microrganismos das amostras de água, a presença de bandas de DNA com parcial degradação quando utilizou-se o tampão TES_A e nenhum DNA utilizando-se o tampão TET. Pode-se concluir, portanto, que a otimização de um método *in house* de extração de DNA_T a partir de cultivos de microrganismos foi realizada com sucesso, obtendo-se DNA em quantidade e qualidade suficiente para a técnica de PCR. A cepa *E. coli* Top10 apresenta potencial para ser utilizada como um controle positivo no estudo do gene $\text{bla}_{\text{TEM-1}}$. O método *in house* de extração de DNA_T a partir de amostras ambientais, no entanto, ainda requer otimização.

Palavras-chave: fármacos no meio ambiente, genes de resistência a antimicrobianos, $\text{bla}_{\text{TEM-1}}$, DNA de amostras ambientais, extração de DNA total, fenol:clorofórmio, extração de DNA plasmidial, lise alcalina, reação em cadeia da polimerase (PCR).

ÍNDICE

1. Introdução	6
1.1. Contaminantes emergentes	6
1.2. Fármacos no meio ambiente	9
1.2.1. Fontes de contaminação de fármacos no meio ambiente e os riscos associados	9
1.2.2. Estudos de monitoramento de fármacos no meio ambiente	11
1.2.3. Estudos de monitoramento de genes de resistência a antimicrobianos no meio ambiente	13
1.3. Objetivos gerais	14
1.3.1. Objetivos específicos	14
2. Materiais e métodos	15
2.1. Linhagens microbianas e plasmídeos	15
2.1.1. <i>Escherichia coli</i> ATCC® 11775™	16
2.1.2. <i>Escherichia coli</i> Top10 com plasmídeo pET	16
2.2. Cultivos e armazenagem das linhagens bacterianas em meio sólido	18
2.3. Cultivos microbianos em meio líquido	18
2.4. Otimização do método <i>in house</i> de extração de DNA total em pequena escala	18
2.5. Extração de DNA plasmidial em pequena escala	20
2.6. Eletroforese em gel de agarose	21
2.7. Tratamento do DNA com enzima RNase	21
2.8. Quantificação de ácidos nucleicos	21
2.9. Construção de vetores de clonagem	22
2.10. Avaliação das linhagens de bactéria escolhidas como controles positivo e negativo quanto à amplificação do gene <i>bla_{TEM-1}</i> pela reação em cadeia da polimerase (PCR).....	22
2.11. Coleta de amostras de água do Arroio Dilúvio	24
2.12. Concentração de células bacterianas das amostras de água, em membranas de 0,22 µm, por filtração	24
2.13. Obtenção de membranas saturadas em bactérias (controle positivo para extração de DNA)	25
2.14. Extração de DNA total de bactérias provenientes de amostras de água do Arroio Dilúvio	25
3. Resultados e discussão	28
3.1. Análises <i>in silico</i>	28
3.2. Otimização do método <i>in house</i> de extração de DNA total em pequena escala	28

3.3. Avaliação das linhagens de bactéria escolhidas como controles positivo e negativo quanto à amplificação do gene <i>bla_{TEM-1}</i> pela reação em cadeia da polimerase (PCR).....	31
3.4. Extração de DNA total de bactérias provenientes de amostras de água do Arroio Dilúvio	33
4. Conclusões	37
5. Perspectivas	38
6. Referências bibliográficas	39
7. Anexos	44

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONTAMINANTES EMERGENTES

Os contaminantes emergentes (CEs) são poluentes, de origem sintética ou natural, cuja ocorrência no ambiente tem sido amplamente investigada, principalmente nos últimos 20 anos, devido ao desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis o suficiente para detectá-los em níveis relativamente baixos (tipicamente na faixa de $\mu\text{g/L}$) (NOGUERA-OVIEDO e AGA, 2016). Para os CEs, em geral, não existem informações suficientes para determinar o seu risco potencial para o meio ambiente ou para a saúde pública e, desta forma, ainda não estão sujeitos a critérios ou normas regulamentadoras para a proteção da saúde humana e ambiental (HOUTMAN, 2010; SAUVÉ e DESROSIERS, 2014; NAIDU *et al.*, 2016).

De acordo com Sauvé e Desrosiers (2014), o termo contaminantes emergentes abrange os seguintes conceitos: (i) os **contaminantes emergentes** "verdadeiros ou realmente novos", que são os novos compostos ou moléculas, que não eram conhecidos anteriormente ou que apareceram na literatura científica apenas recentemente; (ii) os **contaminantes de interesse emergente** cuja existência já era conhecida, mas para os quais os problemas de contaminação ambiental não haviam sido ainda descobertos ou totalmente compreendidos; e (iii) as **questões emergentes sobre contaminantes conhecidos**, ou seja, situações em que novas informações estão avançando a compreensão acerca dos riscos ambientais e para a saúde humana relacionados a tais contaminantes tradicionais.

Em consonância com esse conceito mais abrangente, a terminologia **contaminantes de preocupação emergente** ("contaminants of emerging concern" ou CECs) tem recebido mais aceitação recentemente. O termo CEC compreende os riscos associados a um determinado composto ou substância, independentemente de ter sido descoberto recentemente, ou há algum tempo (HALDEN, 2015). Há ainda, outros autores que utilizam o termo *contaminantes orgânicos emergentes* ("emergent organic contaminants" - EOCs)" (BARCELÓ, 2012; LAPWORTH *et al.*, 2012; PAL *et al.*, 2014; LLORCA *et al.*, 2016) para enfatizar a natureza orgânica da maioria dos CEs estudados.

O quadro 1 apresenta uma lista de classes e subclasses de alguns contaminantes emergentes e de compostos representativos que vem sendo estudados em amostras ambientais de águas (estações de tratamento de água e esgoto, águas continentais superficiais e subterrâneas, águas costeiras, e outros).

Quadro 1. Lista de classes e subclasses de alguns contaminantes emergentes e de compostos representativos.

CLASSES DE CEs	SUBCLASSES E COMPOSTOS REPRESENTATIVOS	REFERÊNCIAS
Fármacos de uso humano e veterinário, reagentes de diagnóstico, metabólitos e produtos de transformação	Antimicrobianos: amoxicilina, sulfametoxazol, sulfametazina, trimetoprima, eritromicina, claritromicina, tilosina, ciprofloxacino, norfloxacino, cloranfenicol, gentamicina, tetraciclina; Analgésicos e antiinflamatórios não-esteroidais: diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno, ácido salicílico; Antilipêmicos: gemfibrozil, rosuvastatina e ácido clofíbrico; Beta-bloqueadores: metoprolol, atenolol; Antidepressivos: desvenlafaxina, fluoxetina; Antiepiléticos: carbamazepina, primidona, diazepam; Antineoplásicos: ifosfamida, ciclofosfamida, tamoxifeno; Contraceptivos: 17 α -etinilestradiol, mestranol; Meios de contraste raios-X: iopamidol, iodopromida;	Halling-Sorensen <i>et al.</i> (1998); Daughton e Ternes (1999); Heberer (2002); Petrovic <i>et al.</i> (2005); Richardson e Ternes (2005); Fent <i>et al.</i> (2006); Kim e Aga (2007); Kümmerer (2009a); Hughes <i>et al.</i> (2012); Lapworth <i>et al.</i> , (2012); Gravilescu <i>et al.</i> (2015); Llorca <i>et al.</i> (2016)
Compostos disruptores endócrinos (EDCs) e hormônios esteróides naturais ou sintéticos	Progestágenos: progesterona (P4); Andrógenos: testosterona; androstenediona; Estrógenos: 17 β -estradiol (E2), estriol (E3), 17 α -etinilestradiol (EE2); Fitoesteróides: 17 β -sitosterol, coumestrol; Pesticidas: atrazina; Ftalatos: di- <i>n</i> -butil ftalato (DBP); Alquilfenóis: nonilfenol; Dioxinas e bifenilas policloradas coplanares (PCBs); Bisfenóis: bisfenol A;	Richardson e Ternes (2005); Houtman (2010); Lapworth <i>et al.</i> , (2012); Sauvé e Desrosiers (2014); Noguera-Oviedo e Aga (2016); Naidu <i>et al.</i> (2016)
Produtos de cuidados pessoais e produtos de transformação	Filtros UV inorgânicos: dióxido de titânio, óxido de zinco; filtros UV orgânicos: benzofenona-3 (BP-3), etilhexil metoxicinamato (EHMC); antimicrobianos: triclosan, triclocarban, clorofeno, metilparabeno; microplásticos (cosméticos abrasivos); fragrâncias (almíscares policíclicos): galaxolida e tonalida;	Daughton e Ternes (1999); Richardson e Ternes (2005); Houtman (2010); Lapworth <i>et al.</i> , (2012); Sauvé e Desrosiers (2014); Llorca <i>et al.</i> (2016); Naidu <i>et al.</i> (2016)
Drogas ilícitas, não controladas ou de uso abusivo e metabólitos	Anfetamina; metanfetamina; morfina; metilenodioximetanfetamina (MDMA); cocaína e benzoilecgonina; cafeína; nicotina;	Fent, <i>et al.</i> (2006); Lapworth <i>et al.</i> , (2012); Noguera-Oviedo e Aga (2016)
Adoçantes artificiais	Acesulfame, sacarina, ciclamato, sucralose;	Houtman (2010); Lapworth <i>et al.</i> , (2012); Naidu <i>et al.</i> , (2016)
Pesticidas, inseticidas, herbicidas, fungicidas, metabólitos e produtos de transformação	Organoclorados: diclorodifeniltricloroetano (DTT); Organofosforados: acefato; Carbamato:3-hidroxycarbofurano; Tiocarbamatos; Piretróides; <i>N,N</i> -dietil-metatuamida (DEET); Neonicotinóides: imidacloprida, acetamiprida; Triazinas: atrazina; Cloroacetanilidas: acetoclor, alaclor; Ciclohexanodionas: clethodim;	Richardson e Ternes (2005); Houtman (2010); Lapworth <i>et al.</i> (2012); Sauvé e Desrosiers (2014); Halden (2015); Llorca <i>et al.</i> (2016); Naidu <i>et al.</i> , (2016)
Subprodutos de desinfecção (cloração) da água (DBPs)	Nitrosaminas: N-nitrosodimetilamina (NDMA); ácidos haloacéticos (HAAs): ácido tricloroacético (TCAA), ácido iodoacético, ácidobromoiodoacético; trihalometanos (THMs): tribromonitrometano;	Richardson e Ternes (2005); Sauvé e Desrosiers (2014); Halden (2015); Naidu <i>et al.</i> (2016); Noguera-Oviedo e Aga (2016)

Plastificantes, solventes orgânicos, reagentes e sub-produtos industriais	Bisfenóis: bisfenol A; Ftalatos: di- <i>n</i> -butil ftalato (DBP); Bifenilas policloradas (PCBs); Alquilfenóis; 1,4-dioxano; tricloroetileno (TCE); diglima; éter di-isopropílico; Benzotriazóis;	Richardson e Ternes (2005); Houtman (2010); Lapworth <i>et al.</i> , (2012); Sauvé e Desrosiers (2014); Halden (2015)
Retardantes de chamas	Éteres de difenila polibromados (PBDEs): 2,2',4,4'-tetra-bromodifenil éter; Bromados: tetrabromobisfenol A; Organofosfatos: tributilfosfato, tris(2-cloroetil)fosfato;	Richardson e Ternes (2005); Houtman (2010); Lapworth <i>et al.</i> , (2012); Sauvé e Desrosiers (2014); Llorca <i>et al.</i> (2016)
Surfactantes perfluoroalquilados e polifluoroalquilados (PPFAs)	Ácido perfluoro-octanoico (PFOA); ácido perfluoro-octanossulfônico (PFOS);	Richardson e Ternes (2005); Houtman (2010); Lapworth <i>et al.</i> , (2012); Sauvé e Desrosiers (2014); Llorca <i>et al.</i> (2016)
Percloratos (sais derivados do ácido perclórico)	Perclorato de amônia;	Richardson e Ternes (2005); Halden (2015)
Aditivos de combustíveis (solventes orgânicos)	Éter <i>terc</i> -butílico de metila (MTBE), éter <i>terc</i> -butílico de etila (ETBE);	Richardson e Ternes (2005); Houtman (2010); Halden (2015)
Tintas organometálicas anti-incrustantes	Piritionato de zinco; óxidos de arsênio; acetoarsenito; alquiltinas: monoalquiltinas, dialquiltinas, trialquiltinas;	Richardson e Ternes (2005); Sauvé e Desrosiers (2014);
Metais	Chumbo; arsênico: arsenito (III) e arsenato (IV)	Richardson e Ternes (2005); Sauvé e Desrosiers (2014); Naidu <i>et al.</i> , (2016)
Nanomateriais, nanocompostos e nanopartículas	Nanotubos de carbono; fulerenos; óxidos metálicos nanoestruturados: dióxido de titânio; metais de valência zero: nanop prata; quantum dots;	Sauvé e Desrosiers (2014); Halden (2015); Noguera-Oviedo e Aga (2016)
Microrganismos	Vírus: adenovírus, calicivírus, coxsackievírus, SARS coronavírus; Bactérias: <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Mycobacterium avium</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7; Fungos: <i>Enterocytozoon bieneusi</i> , Protozoários: <i>Cryptosporidium parvum</i> ;	Richardson e Ternes (2005); Gravilescu <i>et al.</i> (2015);
Toxinas de cianobactérias e algas	Cianobactérias: microcistinas, saxitoxinas, anatoxinas, nodularinas; Dinoflagelados: brevetoxinas; Diatomáceas: ácido domoico;	Richardson e Ternes (2005); Sauvé e Desrosiers (2014)
Genes de resistência a antibióticos (ARGs)	Sulfonamidas (<i>sulI</i> , <i>sulIII</i>); Tetraciclina (<i>tetA</i> , <i>tetO</i> , <i>tetW</i>); Trimetoprima (<i>dfrA1</i> , <i>dfrA17</i>); Quinolonas (<i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> , <i>qnrS</i>); Vancomicina (<i>vanA</i> , <i>vanB</i>); Macrolídeos (<i>ermA</i> , <i>ermB</i>); β-lactâmicos (<i>ampC</i> , <i>bla_{VIM}</i> , <i>bla_{TEM-1}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i>);	Manaia <i>et al.</i> (2011); Rizzo <i>et al.</i> (2013); Berglund (2015); Noguera-Oviedo e Aga (2016); Sanderson <i>et al.</i> (2016)
Príons (proteínas infectivas)	PrP ^{Sc} (proteína priônica "Scrapie", causadora da doença priônica);	Halden (2015); Naidu <i>et al.</i> , (2016)

1.2. FÁRMACOS NO MEIO AMBIENTE

A presença de fármacos no meio ambiente foi relatada já no início da década de 1980 (RICHARDSON e BOWRON, 1985). A ocorrência e o destino destes compostos no meio ambiente são reconhecidos como um dos principais problemas emergentes em química ambiental (DAUGHTON e TERNES, 1999; RICHARDSON e TERNES, 2005; SCHWARZENBACH *et al.*, 2006). Inicialmente, as pesquisas eram voltadas para a detecção desses contaminantes. Mais tarde, tornou-se mais intensa a investigação sobre o seu destino e os seus efeitos ecotoxicológicos (KÜMMERER, 2009c).

1.2.1. Fontes de contaminação de fármacos no meio ambiente e os riscos associados

Os fármacos de uso humano e veterinário geralmente ocorrem no meio ambiente em níveis baixos de concentração, o que reflete um aporte coletivo e contínuo de quantidades ínfimas, a partir de um grande número de fontes difusas (KÜMMERER, 2009c; DAUGHTON, 2013).

Para os fármacos de uso humano, a principal via de transporte para o meio ambiente é a eliminação das excretas através do esgoto. Os medicamentos vencidos ou sem uso também são frequentemente descartados pelo esgoto doméstico. Quando são descartados no lixo doméstico, os fármacos terminam em aterros sanitários, onde podem passar para o lixiviado (chorume). Este, quando não coletado, pode ser uma fonte de contaminação para águas superficiais ou subterrâneas. Outras fontes de emissão significativa de fármacos no contexto urbano são os efluentes da indústria farmacêutica e dos hospitais (FENT *et al.*, 2006; KÜMMERER, 2009c; HOUTMAN, 2010; PAL *et al.*, 2014).

Muitos fármacos, por serem compostos relativamente polares (geralmente ácidos fracos ou bases fracas), não são eliminados pelos processos convencionais de tratamento de esgotos. Desta forma, os fármacos, seus metabólitos e produtos de transformação podem entrar no ambiente aquático e, eventualmente, chegar a água potável (HEBERER, 2002; KÜMMERER, 2009c; PAL *et al.*, 2014; NOGUERA-OVIEDO e AGA 2016). Para os antimicrobianos, a biodegradabilidade é ainda mais limitada, uma vez que são concebidos

para serem biologicamente ativos e ainda podem manter a sua atividade bactericida e/ou bacteriostática mesmo em concentrações muito baixas (p. ex., ng.L^{-1}) (ABELLÁN *et al.*, 2009; HOMEM e SANTOS, 2011; JANK, *et al.*, 2014).

As atividades agropecuárias também contribuem bastante para a liberação de fármacos no meio ambiente. Quando são aplicados bio-sólidos (lodos de ETE) em campos agrícolas, pode ocorrer a contaminação do solo, o escoamento para águas superficiais, e permeação para lençóis freáticos. Os fármacos de uso veterinário, especialmente os antibióticos usados como promotores do crescimento animal, podem entrar nos sistemas aquáticos através da aplicação de estrume nos campos e o subsequente escoamento, e também através da aplicação direta na aquicultura e piscicultura (FENT *et al.*, 2006; PAL *et al.*, 2014; NOGUERA-OVIEDO e AGA, 2016). A figura 1 esquematiza as possíveis rotas de fármacos para o meio ambiente.

A introdução contínua de fármacos nos corpos d'água, em concentrações de ng.L^{-1} a $\mu\text{g.L}^{-1}$, constitui uma preocupação especial para a comunidade científica e para os órgãos reguladores. Embora as concentrações nestas faixas não representem potencial para toxicidade aguda, existem lacunas substanciais de conhecimento em termos de bioacumulação e exposição crônica para os organismos aquáticos, e os efeitos sobre os ecossistemas (DAUGHTON e TERNES, 1999; FENT *et al.*, 2006; KÜMMERER, 2009c; SCHRIKS *et al.*, 2010; NOGUERA-OVIEDO e AGA, 2016).

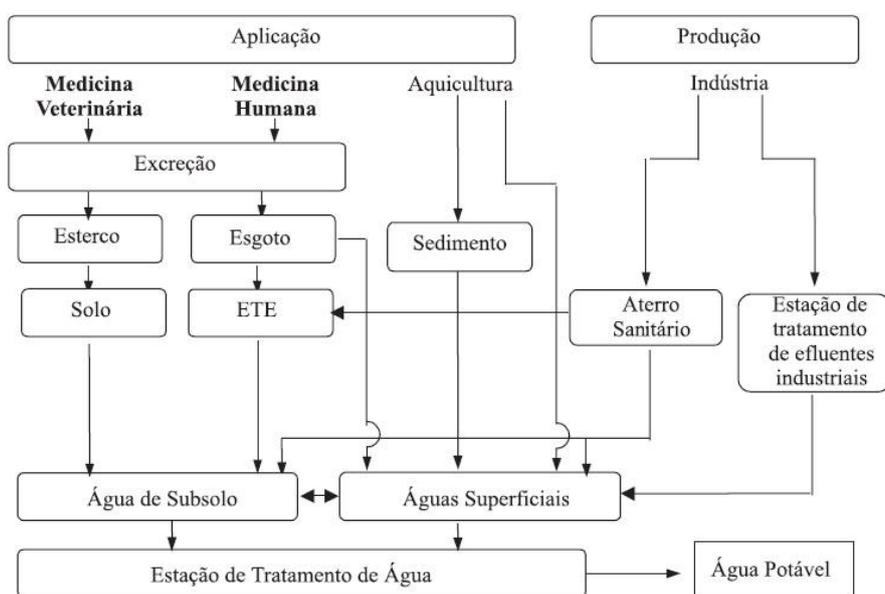


Figura 1. Possíveis rotas de fármacos no meio ambiente (BILA e DEZOTTI, 2003).

A exposição ambiental a certos compostos químicos, sintéticos e naturais, pode interferir com o sistema endócrino de animais e seres humanos, imitando ou bloqueando a ação de hormônios. Essa exposição pode levar a efeitos adversos para a saúde, designados coletivamente por "disrupção endócrina", em qualquer processo controlado por hormônios, como crescimento, desenvolvimento, fertilidade e reprodução. Os disruptores endócrinos (quadro 1) são de particular preocupação devido aos seus potenciais ecotoxicológicos e toxicológicos (RICHARDSON e TERNES, 2005; HOUTMAN, 2010; NAIDU *et al.*, 2016).

Dentre os CEs, a classe dos antimicrobianos pode representar o maior de todos os desafios (ERICKSON, 2002; PETROVIC *et al.*, 2005; PAL *et al.*, 2014). A liberação de grandes quantidades desses fármacos nos ecossistemas naturais pode alterar a dinâmica populacional dos microrganismos, incluindo a seleção de resistência, com potenciais consequências para a saúde humana (DAUGHTON e TERNES, 1999; RICHARDSON e TERNES, 2005; KIM e AGA, 2007; SILVIA DÍAS-CRUZ e BARCELÓ, 2007; MARTÍNEZ, 2008;).

1.2.2. Estudos de monitoramento de fármacos no meio ambiente

Embora o estudo sobre a presença de fármacos no meio ambiente seja um tema relativamente recente, uma grande quantidade de literatura já foi publicada. Estudos sistemáticos de monitoramento de fármacos em diferentes ambientes vem sendo realizados em vários países, inclusive no Brasil (STUMPF *et al.*, 1999; GROS *et al.*, 2008; LOCATELLI *et al.*, 2011; JANK *et al.*, 2014).

Há também na literatura, revisões e meta-análises que sumarizam e exploram essa vasta quantidade de dados, em especial acerca da ocorrência, fontes e destino dos fármacos no meio ambiente; e, dos potenciais riscos associados à exposição aos fármacos para a saúde humana, e para os ecossistemas aquáticos (HALLING-SÖRENSEN *et al.*, 1998; DAUGHTON e TERNES, 1999; HEBERER, 2002; PETROVIC *et al.*, 2005; FENT *et al.*, 2006; DÍAZ-CRUZ e BARCELÓ, 2007; PAL *et al.*, 2010; HUGHES *et al.*, 2012; LAPWORTH *et al.*, 2012; PETRIE *et al.*, 2014; GRAVILESCU *et al.*, 2015).

O conhecimento atual indica a ocorrência de uma ampla variedade de fármacos, em quantidades-traço no ciclo da água, incluindo: águas naturais superficiais e subterrâneas,

águas residuais, e, menos frequentemente, água potável (DAUGHTON e TERNES, 1999; HEBERER, 2002; FENT *et al.*, 2006; KÜMMERER, 2009c; HUGHES *et al.*, 2012; WHO, 2012).

Atualmente, os fármacos de interesse ambiental incluem, entre outros: antimicrobianos, analgésicos e antiinflamatórios, reguladores lipídicos, antidepressivos, antiepiléticos, beta-bloqueadores, antineoplásicos e hormônios esteróides (HEBERER, 2002; FENT *et al.*, 2006; KÜMMERER, 2009c; WHO, 2012; LAPWORTH *et al.*, 2012; PAL *et al.*, 2014; NOGUERA-OVIEDO e AGA, 2016).

Em uma recente meta-análise, Hughes *et al.* (2012) reportou que um total de 203 fármacos já foi detectado e quantificado em águas superficiais de todo o mundo. De acordo com este estudo, a classe dos antimicrobianos é a segunda em frequência de detecção, com 21% dos registros, e a maior em concentração mediana, com 8128 ng.L⁻¹ (figura 2). Além disso, entre os 61 fármacos mais frequentemente encontrados, 24 são antimicrobianos (39%).

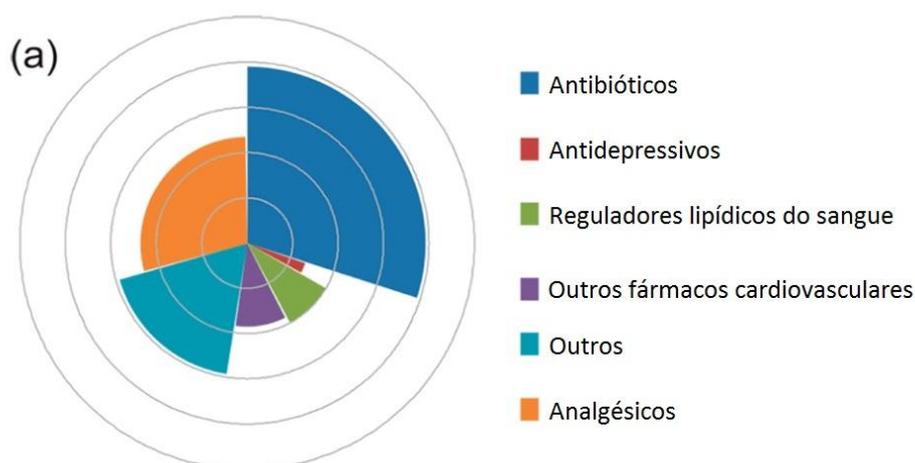


Figura 2. Frequência relativa de detecção e concentração mediana de fármacos em águas receptoras (dados globais). Legenda: as circunferências são escalonadas pela proporção relativa de detecções. Cada círculo representa 10^y da concentração mediana em ng.L⁻¹. P. ex., o círculo mais interno representa 10¹ ng.L⁻¹; o segundo representa 10² ng.L⁻¹, etc.) (HUGHES *et al.*, 2012).

Recentemente, foi realizado um estudo sobre a presença de fármacos antimicrobianos em águas residuais (ETE) e em águas superficiais (Arroio Dilúvio) em Porto Alegre (JANK, *et al.*, 2014). Os antimicrobianos estudados representam as classes com as maiores taxas de

consumo, incluindo: sulfonamidas (sulfametoxazol e sulfapiridina), macrolídeos (eritromicina, tilosina e azitromicina), tetraciclina (tetraciclina e demeclociclina), cefalosporinas (ceftiofur e cefalexina), fluoroquinolonas (ciprofloxacino, norfloxacino e enrofloxacino) e inibidores da dihidrofolato redutase (trimetoprima). Todos os antimicrobianos foram detectados e quantificados nas amostras da ETE, e, no Arroio Dilúvio, apenas eritromicina, tetraciclina e cefalexina não foram detectados.

1.2.3. Estudos de monitoramento de genes de resistência a antimicrobianos no meio ambiente

A evidência mostra que os genes de resistência a antibióticos são comuns em ambientes naturais e existiram, mesmo em plasmídeos, antes do uso de antibióticos. Porém, as atividades humanas provavelmente aumentaram a prevalência de bactérias resistentes no solo, águas e ar (KIM e AGA, 2007; KÜMMERER, 2009b; ALLEN *et al.*, 2010).

Estudos metagenômicos mostraram que os genes de resistência aos antibióticos são amplamente presentes no ambiente, o que levou à sugestão de que existe um risco elevado de que esses genes se espalhem para bactérias que causam infecções humanas (SILVIA DÍAS-CRUZ e BARCELÓ, 2007; MARTÍNEZ, 2008; KÜMMERER, 2009b; KÜMMERER, 2009c; ALLEN *et al.*, 2010; MARTINEZ *et al.*, 2015).

A maioria dos estudos de resistência em bactérias do ambiente baseia-se em cultura seguida de testes de susceptibilidade. No entanto, esta metodologia não é padronizada, o que dificulta a comparação de resultados entre os estudos (ALLEN *et al.*, 2010). Por isso, é importante a aplicação de métodos de estudo de resistência a antimicrobianos que sejam independentes de cultura, como as técnicas de PCR e as abordagens de metagenômica.

Uma vez que o Arroio Dilúvio flui para o Rio Guaíba, os níveis de concentração de antimicrobianos encontrados no estudo de Jank *et al.* (2014), na faixa de ng.L^{-1} , levaram a uma preocupação quanto ao risco de desenvolvimento de resistência bacteriana, especialmente em pontos de captação de água para consumo humano. Neste sentido, constata-se ser de suma importância o estudo da presença de genes de resistência a antimicrobianos em amostras destes corpos d'água.

1.3 OBJETIVOS GERAIS

Otimizar e aplicar um método *in house* de extração de DNA total de linhagens de microrganismos modelo, bem como, de amostras ambientais para posterior estudo de um gene de resistência a antimicrobianos β -lactâmicos (*bla_{TEM-1}*), por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

1.3.1. Objetivos específicos

- Otimizar a metodologia de extração de DNA bacteriano total utilizando reagentes de baixo custo e de uso rotineiro no laboratório;
- Aplicar a metodologia de extração de DNA bacteriano plasmidial utilizando reagentes de baixo custo e de uso rotineiro no laboratório;
- Otimizar um protocolo de reação em cadeia da polimerase (PCR) para a detecção dos genes *bla_{TEM-1}* e rRNA 16S nos microrganismos selecionados;
- Coletar amostras de água em diferentes pontos do Arroio Dilúvio na cidade de Porto Alegre;
- Concentração das células bacterianas das amostras de água, em membranas de 0,22 μ m, por filtração;
- Concentração das células bacterianas de cultivos de laboratório, em membranas de 0,22 μ m, por filtração;
- Extração de DNA total de bactérias, a partir das membranas, pelo método do fenol-clorofórmio.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho experimental foi realizado integralmente no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnológica, localizado no Centro de Biotecnologia da UFRGS (CBiot - UFRGS), através de uma parceria firmada com a Professora Marilene Henning Vainstein.

Para o estudo do gene de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos (*bla*_{TEM}), foram selecionadas duas cepas de bactéria da espécie *Escherichia coli*, para servir como controles positivo e negativo em experimentos de reação em cadeia da polimerase (PCR) (HUERTA *et al.*, 2013; RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2015).

Foram realizadas análises *in silico*, utilizando os algoritmos BLAST e TBLASTN (ALTSCHUL *et al.*, 1990; JOHNSON *et al.*, 2008) para pesquisar a presença do gene *bla*_{TEM-1} nas sequências genômicas e plasmidiais das cepas bacterianas escolhidas para este estudo (quadro 2). Também foram realizadas análises utilizando o algoritmo Primer-BLAST (YE *et al.*, 2012), para verificar a adequação dos primers em relação às referidas sequências.

2.1. LINHAGENS MICROBIANAS E PLASMÍDEOS

A espécie *Escherichia coli* é um bacilo gram-negativo, de metabolismo anaeróbio facultativo, que ocorre naturalmente no intestino grosso de animais endotérmicos. *E. coli* é frequentemente usada como um organismo modelo em estudos de microbiologia, em especial as cepas cultivadas, as quais são bem adaptadas ao ambiente laboratorial (SCHEUTZ e STROCKBINE, 2005).

A bactéria *E. coli* foi um dos primeiros organismos a ter seu genoma completamente sequenciado. O genoma da cepa de laboratório MG1655 (linhagem K-12) de *E. coli* foi publicada em 1997 (BLATTNER *et al.*, 1997). O tamanho do genoma de *E. coli* de diferentes cepas pode variar entre 4,6 e 5,3 milhões de pares de bases (SCHEUTZ e STROCKBINE, 2005).

2.1.1. *Escherichia coli* ATCC® 11775™

A cepa *E. coli* ATCC® 11775™ é uma cepa de tipo selvagem ("wildtype"), ou seja, é uma cepa que mantém a sua capacidade de crescer no intestino de animais. A cepa ATCC 11775^T é a cepa tipo ("typestrain") da espécie *E. coli*. A cepa foi isolada em 1941, em Copenhague (Dinamarca), a partir da urina de um paciente com cistite (ATCC, 2015; MEIER-KOLTHOFF *et al.*, 2014).

Recentemente, a cepa ATCC 11775^T teve o seu genoma sequenciado. O genoma possui um tamanho de 5,04 milhões de pares de bases e inclui um plasmídeo circular de 131 kb, o qual codifica um sistema de secreção do tipo IV. Além disso, seu fenótipo foi extensamente caracterizado, incluindo o seu perfil de resistência a antimicrobianos, o qual revelou que a cepa é suscetível à ampicilina (MEIER-KOLTHOFF *et al.*, 2014).

2.1.2. *Escherichia coli* Top10 com plasmídeo pET

Foi utilizada uma cepa comercial de bactéria *E. coli* transformada com um plasmídeo da série pET para servir como controle positivo no estudo. Esta cepa foi gentilmente cedida pela Professora Marilene Vainstein.

A *E. coli* Top10 é uma cepa comercial utilizada em clonagem molecular. Ela possui modificações genéticas (nocautes gênicos) que permitem uma alta eficiência de transformação e a replicação estável de plasmídeos de alto número de cópias. A cepa Top10 é geneticamente similar à cepa *E. coli* DH10B™, a qual teve o seu genoma sequenciado, e que deriva da linhagem K-12 (DURFEE *et al.* 2008; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2015).

Um vetor pET é um plasmídeo bacteriano, derivado do vetor pBR322 (4,3 kb), desenvolvido para a clonagem e a expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*. Os plasmídeos da série pET contêm vários elementos genéticos importantes, como genes de resistência a antimicrobianos, que são usados como marcadores de seleção para o isolamento de bactérias transformantes (NOVAGEN, 2011). O plasmídeo pET possui o gene *amp^r* (*bla_{TEM-1}*), que codifica uma β-lactamase que confere resistência à ampicilina. Este gene possui uma ORF ("open reading frame") de 861 nucleotídeos e a sua sequência é apresentada

no anexo 1 (SUTCLIFFE, 1978; 1979; BRADFORD, 2001). A figura 3 e o quadro 2 apresentam as informações relativas aos genomas e às sequências do plasmídeos referidos.

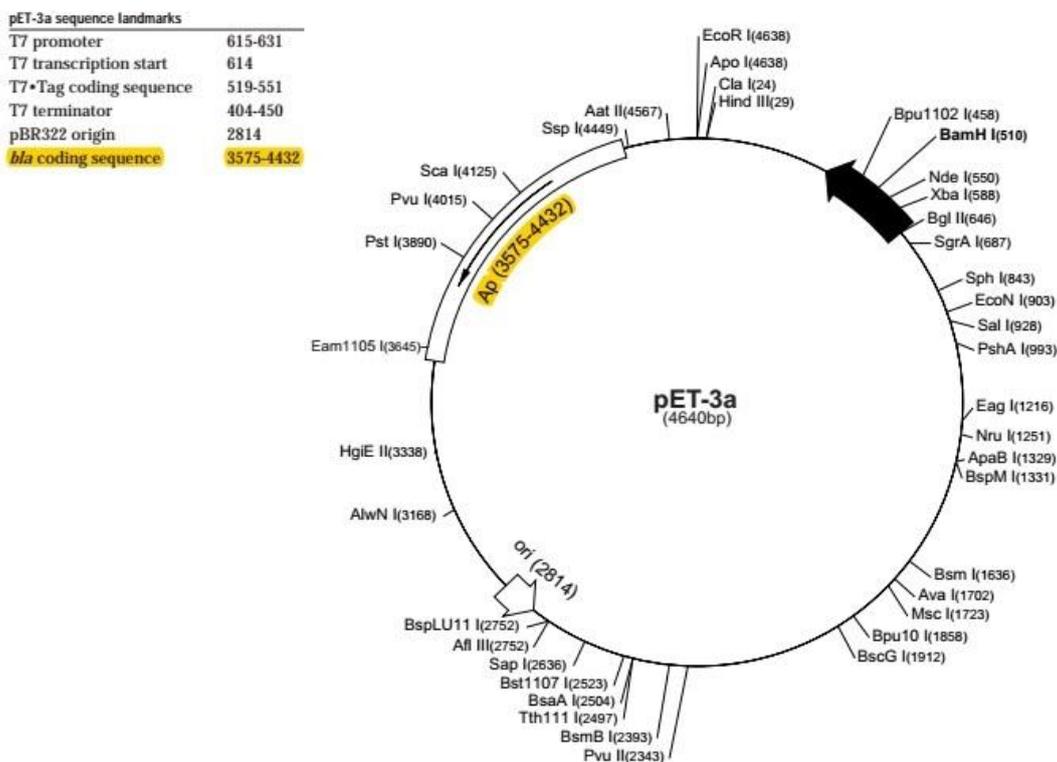


Figura 3. Representação esquemática do vetor pET. O vetor pET possui uma ORF que confere resistência a ampicilina. **Fonte:** adaptado de Novagen (2011).

Quadro 2. Genomas e plasmídeos de interesse para este trabalho.

Sequência genômica/plasmidial	Acesso GenBank/NCBI	Referência
Genoma <i>E. coli</i> linhagem K-12 sub. MG1655	NC_000913.3	Blattner <i>et al.</i> (1997)
Genoma <i>E. coli</i> ATCC 11775	KK583188.1	Meier-Kolthoff <i>et al.</i> (2014)
Plasmídeo <i>E. coli</i> ATCC 11775	AGSE01000004.1	
Genoma <i>E. coli</i> linhagem K12 sub. DH10B	NC_010473.1	Durfee <i>et al.</i> 2008
Plasmídeo pBR322	J01749.1	Sutcliffe, 1979

2.2. CULTIVOS E ARMAZENAGEM DAS LINHAGENS BACTERIANAS EM MEIO SÓLIDO

As linhagens bacterianas *E. coli* Top10 e *E. coli* ATCC® 11775™ foram mantidas em placas de Petri contendo meio de cultivo sólido LB-ágar (triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, ágar 15 g/L, água destilada). Ao meio de cultivo da linhagem *E. coli* Top10 foi adicionado o antibiótico ampicilina (100 µg/mL). Os inóculos foram realizados por meio da técnica de semeadura por esgotamento, a partir de cultivos mais antigos. As placas eram incubadas overnight em estufa a 37°C, identificadas e estocadas em refrigerador a 4 °C. Os cultivos foram renovados mensalmente.

2.3. CULTIVOS MICROBIANOS EM MEIO LÍQUIDO

Com o objetivo de realizar a extração de DNA, a partir das culturas de estoque, foram feitos inóculos em tubos de ensaio contendo 3 mL de meio de cultura líquido LB (triptona 10 g/L, NaCl 10 g/L, extrato de levedura 5 g/L, água destilada). Ao meio de cultura da linhagem *E. coli* Top10 foi adicionado o antibiótico ampicilina (100 µg/mL). Estes inóculos eram incubados em agitador de bancada por 16 a 20 horas, a 37°C, com agitação de 200 rpm.

2.4. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO *IN HOUSE* DE EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL EM PEQUENA ESCALA

A extração de DNA total (genômico e plasmidial) em pequena escala foi realizada por meio de uma adaptação do método clássico de extração orgânica com fenol:clorofórmio de Sambrook e Russel (2001). O protocolo pode ser dividido essencialmente em três etapas: (i) lise celular química e enzimática; (ii) separação orgânica líquido-líquido para separar proteínas, lipídeos e outras macromoléculas dos ácidos nucleicos; e, (iii) precipitação de ácidos nucleicos.

O protocolo otimizado, que era um dos objetivos principais deste trabalho, é apresentado no anexo 3. Aqui é apresentada uma breve descrição do método, com ênfase para os parâmetros que foram objeto de modificação em relação ao protocolo inicial.

Na etapa inicial de clarificação do sedimento de células, foi testada a substituição de água ultrapura por um tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM), com o objetivo de aumentar a estabilidade do DNA na etapa subsequente de lise química e enzimática das células.

Na etapa de lise celular, utilizou-se um tampão contendo um detergente aniônico desnaturante, o dodecil sulfato de sódio (SDS). O SDS se liga às proteínas hidrofóbicas de membrana permitindo a sua dispersão em meio aquoso. Para a lise enzimática, utilizou-se lizozima isolada de ovos de galinha, a qual catalisa a reação de hidrólise da camada de peptidoglicana presente nas paredes celulares bacterianas. Foram testadas três formulações diferentes de tampão de lise química: TES_A (Tris-HCl 50 mM, EDTA 100 mM, SDS 10%, pH 8,0) e TES_B (Tris-HCl 50 mM, EDTA 100 mM, SDS 1,5%, pH 8,0) e TET (Tris-HCl 1 M, EDTA.Na₂ 0,5 M, Triton X-100 1,2%). A homogeneização foi feita por vórtex ou manualmente. Também testou-se a ordem de adição do tampão de lise e da solução de lizozima.

Na etapa de separação orgânica, utilizou-se uma mistura 1:1 de fenol (equilibrado em pH 8,0) e clorofórmio, em duas extrações. O fenol desnatura e dissolve as proteínas, e a presença do clorofórmio torna a deproteinização ainda mais eficiente. Após centrifugação, os detritos celulares indesejados ficam na fase orgânica e na interfase, e os ácidos nucleicos, na fase aquosa (SAMBROOK e RUSSELL, 2001; MOORE e DOWHAN, 2002). Testou-se a adição de mais uma etapa de extração, usando apenas clorofórmio, com o objetivo de remover resíduos de fenol na solução de DNA. A homogeneização foi feita por vórtex ou manualmente.

Na etapa de precipitação dos ácidos nucleicos, utilizou-se NaCl em uma concentração final de 0,2 M e um volume de isopropanol. O isopropanol reduz a constante dielétrica da solução, enquanto que o sal fornece os cátions Na⁺ que neutralizam a carga negativa do fosfato da cadeia de DNA, tornando as moléculas de DNA menos hidrofílicas e mais propensas a precipitar (MOORE e DOWHAN, 2002). Foi testada a precipitação no congelador, a -20 °C, por uma hora e "overnight".

2.5. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL EM PEQUENA ESCALA

Uma alíquota de 1,5 mL de cultivo bacteriano (item 2.3) foi utilizada para a extração de DNA plasmidial em pequena escala pelo método clássico de lise alcalina de Birnboim e Doly (1979), conforme o protocolo a seguir, uma adaptação de Sambrook e Russel (2001).

Em um tubo de centrifuga do tipo Eppendorf de 2,0 mL, as células foram centrifugadas a 15000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o tubo mantido em posição invertida, sobre papel, para retirar o excesso de meio de cultivo.

Ressuspendeu-se o pellet de bactérias adicionando-se 150µL de Solução I (glicose 50 mM, Tris-Cl 25 mM, EDTA 10 mM) gelada e agitou-se o tubo vigorosamente. Adicionou-se 150 µL de Solução II (NaOH 0,2 M, SDS 1%) preparada na hora e homogeneizou-se manualmente, invertendo-se o tubo de 4 a 6 vezes, com movimentos suaves. Incubou-se a mistura no gelo por 5 min. Nesta etapa, a mistura torna-se bastante viscosa. Posteriormente, adicionou-se 150 µL de Solução III (K^+ 3 M, Íon acetato 5 M) gelada, e homogeneizou-se manualmente, invertendo-se o tubo de 4 a 6 vezes com movimentos suaves. Incubou-se no gelo por 5 min. e centrifugou-se o lisado de bactérias por 5 min, a 14000 rpm.

A fase superior aquosa, contendo o DNA plasmidial foi coletada, e transferida para um novo tubo. Adicionou-se um volume de fenol:clorofórmio e homogeneizou-se vigorosamente para formar uma emulsão. Centrifugou-se por 5 min, a 14000 rpm sendo a fase superior aquosa coletada e transferida para outro tubo.

Precipitou-se o DNA com a adição de dois volumes de etanol 96% gelado, e homogeneizou-se manualmente, por inversão. O tubo foi mantido em repouso à temperatura ambiente, por 5 min. Centrifugou-se por 5 min, a 14000 rpm sendo o sobrenadante desprezado. Adicionou-se 1 mL de etanol 70%, e, novamente, desprezou-se o sobrenadante. Deixou-se o tubo em posição invertida, sobre papel, para retirar o excesso de etanol. Manteve-se tubo secando à temperatura ambiente, por 15 min, para evaporação completa do etanol.

Ao final, o pellet foi ressuspendido em 30 µL de água ultrapura (milliQ), homogeneizou-se manualmente e estocado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.6. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos de extração de DNA total ou plasmidial e os produtos de amplificação por PCR foram submetidos a uma análise por eletroforese em gel de agarose para confirmação da presença e da integridade do DNA. Para tanto, foi utilizado um sistema de eletroforese horizontal de gel submerso (Sub-Cell® GT Cell, Bio-Rad). Utilizou-se gel de agarose, em concentração de 0,8% ou 1,0%, preparados com 60 mL de tampão TAE 1X (Tris base 40 mM, EDTA 1 mM, ácido acético 20 mM, água deionizada), e com a adição de corante de ácidos nucleicos, GelRed™ (Biotium) ou UniSafeDye® (Uniscience), nas concentrações recomendadas pelos fabricantes. O volume de amostra aplicado nas canaletas do gel foi de 10 µL. Para estimar a massa dos fragmentos de DNA, utilizou-se um padrão de peso molecular com bandas de 100 pb a 12000 pb (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen). A voltagem aplicada foi de 90 V, e o tempo de corrida variou de 25 a 50 minutos. Após a corrida, os géis foram visualizados e fotografados sobre um transluminador de luz ultravioleta.

2.7. TRATAMENTO DO DNA COM ENZIMA RNase

Para degradar as moléculas de RNA, foi realizado um tratamento com a enzima RNase, em concentração de 182 µg/mL por amostra de DNA. As amostras foram incubadas por 30 min, a 37 °C e 300 rpm (catálise), e depois, por 15 min, a 65 °C e 300 rpm (inativação), em um agitador de tubos de bancada (Thermomixer comfort, Eppendorf).

2.8. QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Após a extração de DNA total a partir dos cultivos bacterianos, foi realizada a quantificação do DNA para verificar a eficiência do protocolo de extração utilizado, e também para avaliar a viabilidade da aplicação da técnica de PCR nestas amostras. Para tanto, foi utilizado o kit de ensaio Qubit® dsDNA BR (Broad-Range) (Life Technologies) e um

fluorímetro Qubit® (Life Technologies). O método se baseia na detecção de fluorescência, induzida por luz UV, de corantes intercalantes, que se ligam a moléculas de DNA, exclusivamente sob a forma de dupla fita. O método é sensível e preciso, e pouco susceptível a ácidos nucleicos contaminantes. O kit foi utilizado segundo as instruções do fabricante.

2.9. CONSTRUÇÃO DE VETORES DE CLONAGEM

Com o objetivo de realizar futuramente a quantificação absoluta de genes de resistência por meio da técnica de PCR em tempo real, foram construídos vetores de clonagem que contém sequências parciais de genes interesse para o estudo (insertos). Foi utilizado o plasmídeo pIDTSmart, que possui 1962 pb, e contém o gene de resistência à canamicina. A síntese das sequências de oligonucleotídeos e a clonagem em plasmídeos foi realizada pela companhia Integrated DNA Technologies. No anexo 1, são apresentadas as sequências nucleotídicas dos insertos, e a identificação das sequências completas nas bases de dados do NCBI.

2.10. AVALIAÇÃO DAS LINHAGENS DE BACTÉRIA ESCOLHIDAS COMO CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO QUANTO À AMPLIFICAÇÃO DO GENE *bla_{TEM-1}* pela REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Foram realizados experimentos de PCR convencional com o objetivo de avaliar a adequação das linhagens de bactéria escolhidas como controles positivo e negativo para o estudo do gene *bla_{TEM-1}*, e também para avaliar a qualidade do DNA obtido nas extrações.

Para confirmar a origem bacteriana do DNA, foram testados dois pares de *primers* universais que amplificam fragmentos do gene rRNA 16S bacteriano. Estes pares de *primers* são complementares a sequências altamente conservadas dentro do gene rRNA 16S. Em *E. coli* (linhagem K-12, sublinhagem MG1655), o gene possui 1542 nucleotídeos. Os oligonucleotídeos F27 e R1492 pareiam com sequências próximas às duas extremidades do

gene, produzindo um amplicon de aproximadamente 1500 pb, dependendo da linhagem de *E. coli* (LANE, 1991). O par F1048 e R1194, por sua vez, amplifica uma sequência mais central do gene, e portanto menor, com 147 pb (MAEDA *et al.*, 2003).

Para avaliar a presença do gene *bla_{TEM-1}*, foi testado um par de primers bla-TEM-F e bla-TEM-R, o qual foi desenhado para reconhecer sequências consenso do gene (XI *et al.*, 2009). Este par amplifica uma sequência central do gene, com 247 pb, considerando a sequência referência para o *bla_{TEM-1}* (J01749.1), de 861 pb, publicada por Sutcliffe (1978). Os primers foram sintetizados pela Invitrogen.

Quadro 3. Caracterização dos pares de *primers* usados na PCR.

Gene alvo	Primers	Sequência (5' → 3')	Amplicon (pb)	Referência
rRNA 16S	F27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1500	Lane (1991)
	R1492	TACGGYTACCTTGTTACGACTT		
rRNA 16S	F1048	GTGSTGCAYGGYTGTCGTCA	147	Maeda <i>et al.</i> (2003)
	R1194	ACGTCRTCCMCACCTTCCTC		
<i>bla_{TEM-1}</i>	bla-TEM-F	GCKGCCAACTTACTTCTGACAACG	247	Xi <i>et al.</i> (2009)
	bla-TEM-R	CTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTA		

Legenda: bases não especificadas nos *primers* degenerados: K = G ou T; M = A ou C; R = G ou A; S = G ou C; Y = T ou C. **Fonte:** Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB).

Para a reação de PCR utilizou-se os reagentes do Kit Taq DNA Polymerase recombinante (Invitrogen): 2,5 µL de dNTP (1 mM), 1 µL de *primer forward* (10 pmol/µL), 1 µL de *primer reverse* (10 pmol/µL), 2,5 µL de tampão 10X (tris-HCl 10 mM, pH 8,0, KCl 50 mM), 1 µL MgCl₂ (50 mM), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (5 U/µL) e 1 µL de amostra de DNA, para um volume final da reação de 25 µL.

Como amostras de DNA, utilizou-se o DNA total ou plasmidial obtidos a partir dos cultivos (item 2.3), e como controles positivos, utilizou-se os plasmídeos pIDTSmart clonados com sequências de interesse (item 2.9 e anexo 1). As amostras de DNA foram diluídas 100X para uso na reação de PCR. Os plasmídeos foram usados na concentração de aproximadamente 50 ng/µL e também em diluições de 100X.

O programa utilizado para a amplificação no termociclador (TC-412, Techne) tinha as seguintes condições: desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos; seguido de 35 ciclos de desnaturação (95 °C por 15 seg), anelamento (60 °C por 1 min), e extensão (72°C por 30 seg); e 72 °C de extensão final por 5 min. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose nas mesmas condições descritas no item 2.6.

2.11. COLETA DE AMOSTRAS DE ÁGUA DO ARROIO DILÚVIO

Utilizando frascos de vidro de 1 L, previamente autoclavados, foram coletadas amostras de água em seis pontos diferentes ao longo do Arroio Dilúvio. A descrição e a localização dos pontos de coleta encontram-se no anexo 4.

2.12. CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS BACTERIANAS DAS AMOSTRAS DE ÁGUA, EM MEMBRANAS DE 0,22 µm, POR FILTRAÇÃO

A filtração à vácuo foi realizada com materiais previamente autoclavados e no interior de um ambiente estéril. As amostras foram filtradas, primeiramente, utilizando-se membranas de nylon com poros de 0,45 µm (Millipore) para a retenção de células de organismos maiores (fungos, fitoplâncton e zooplâncton). A partir do primeiro filtrado, foi realizada uma segunda filtração, utilizando-se membranas de nylon com poros de 0,22 µm para a retenção de células bacterianas. Ao término da filtração, as membranas (0,22 µm) foram colocadas no interior de placas de Petri, previamente autoclavadas, e armazenadas a -20 °C até o procedimento de extração de DNA.

2.13. OBTENÇÃO DE MEMBRANAS SATURADAS EM BACTÉRIAS (CONTROLE POSITIVO PARA EXTRAÇÃO DE DNA)

Para servir de controle de positivo no procedimento de extração de DNA de bactérias a partir de membranas de amostras ambientais, foram obtidas membranas saturadas em bactérias cultivadas no laboratório. Utilizando-se membranas de nylon com poros de 0,22 µm, filtrou-se um litro de água destilada enriquecida com bactérias da cepa *E. coli* ATCC 11775^T. Conforme o procedimento do item 2.3, foram inoculados quatro tubos, contendo 4 mL de meio de cultivo líquido LB. Após 18 horas de cultivo, o conteúdo dos tubos foi homogeneizado (vórtex) e então adicionados e misturados a um litro de água destilada.

2.14. EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DE BACTÉRIAS PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE ÁGUA DO ARROIO DILÚVIO

Com o objetivo de extrair DNA total bacteriano, foram testadas diferentes condições experimentais para a obtenção de lisados de células a partir das membranas de amostras ambientais e membrana controle positivo. Segue a descrição dos procedimentos realizados, com ênfase para os diferentes tratamentos.

As membranas de nylon das amostras 1 a 5 e a membrana controle positivo foram enroladas e colocadas no fundo de tubos falcon de 15 mL. A seguir, adicionou-se um volume de 5,0 ou 3,0 mL de tampão de lise TET ou TES_A às amostras de modo a imergir as membranas. A seguir, colocou-se os tubos sob agitação moderada em agitador de bancada do tipo basculante (TA) ou *shaker* (37 °C, 200 rpm), por tempos de 1 ou 2 horas.

Adicionou-se em cada tubo, um volume de solução de lisozima (50 mg/mL em Tris-HCl 10 mM), para uma concentração final de 10 mg/mL de enzima. Agitou-se os tubos vigorosamente, em vórtex, por 3 segundos e colocou-se em banho-maria (37 °C) ou *shaker* (37 °C, 200 rpm), por tempos de 30 minutos ou 1 hora.

Após a segunda incubação, a amostra 2b foi submetida a uma centrifugação (10 min, 9000 rpm), e as amostras 3, 4, 5 e controle positivo foram congeladas *overnight* (-20 °C).

Retirou-se as membranas dos tubos e coletou-se alíquotas de 500, 700 ou 750 μL , as quais foram transferidas para tubos de microcentrífuga de 2 mL. O quadro 4 sumariza os diferentes tratamentos aplicados às amostras e ao controle positivo.

As alíquotas coletadas foram então submetidas ao protocolo para extração de DNA total (anexo 3), a partir da adição do acetato de amônio 7,5 M (item 8), fazendo-se as adaptações necessárias ao volume de lisado celular de partida. Após a etapa de secagem final do pellet de DNA (item 19), o DNA de cada alíquota foi ressuscitado em volumes de 7,5 ou 12,5 μL de água ultrapura (milliQ), e transferidos para um único tubo para cada amostra de DNA. Os produtos de extração de DNA de membranas foram separados por eletroforese em gel de agarose nas mesmas condições descritas no item 2.6.

Quadro 4. Condições experimentais aplicadas na extração de DNA total a partir de membranas de nylon de amostras ambientais e controle positivo.

Condições experimentais	Amostras/controlado positivo						
	1	2a	2b	C(+)	3	4	5
Volume de tampão de lise	5,0 mL TET	5,0 mL TET	5,0 mL TES _A	3,0 mL TES _A	3,0 mL TES _A	3,0 mL TES _A	3,0 mL TES _A
Incubação 1	2 hs, basculante, TA	2 hs, basculante, TA	2 hs, basculante, TA	1 h, <i>shaker</i> , 37 °C, 200 rpm	1 h, <i>shaker</i> , 37 °C, 200 rpm	1 h, <i>shaker</i> , 37 °C, 200 rpm	1 h, <i>shaker</i> , 37 °C, 200 rpm
Volume de solução de lisozima (10 mg/mL)	1,25 mL	1,25 mL	1,25 mL	0,75 mL	0,75 mL	0,75 mL	0,75 mL
Volume final de lisado celular	6,25 mL	6,25 mL	6,25 mL	3,75 mL	3,75 mL	3,75 mL	3,75 mL
Incubação 2	30 min, BM, 37 °C	30 min, BM, 37 °C	30 min, BM, 37 °C	1 h, <i>shaker</i> , 37 °C, 200 rpm	1 h, <i>shaker</i> , 37 °C, 200 rpm	1 h, <i>shaker</i> , 37 °C, 200 rpm	1 h, <i>shaker</i> , 37 °C, 200 rpm
Centrifugação	-	-	9000 rpm, 10 min	-	-	-	-
Congelamento	-	-	-	-20 °C, <i>overnight</i>	-20 °C, <i>overnight</i>	-20 °C, <i>overnight</i>	-20 °C, <i>overnight</i>
Alíquotas para extração orgânica	2 x 500 µL	2 x 500 µL	4 x 700 µL	4 x 750 µL	4 x 750 µL	4 x 750 µL	4 x 750 µL

Legenda: C(+) - controle positivo; BM - banho-maria; TA - temperatura ambiente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. ANÁLISES *IN SILICO*

Foram realizadas análises *in silico*, utilizando os algoritmos BLAST e TBLASTN (ALTSCHUL *et al.*, 1990; JOHNSON *et al.*, 2008). A pesquisa pela sequência do gene *bla_{TEM-1}* (J01749.1), no genoma (KK583188.1) e no plasmídeo (AGSE01000004.1) da linhagem *E. coli* ATCC 11775^T, não retornou nenhum alinhamento significativo (dados não apresentados). Também foram realizadas análises usando o algoritmo Primer-BLAST (YE *et al.*, 2012), para verificar a adequação (validação) dos primers em relação às referidas sequências (quadro 2). Estas análises confirmaram que a amplificação dos genes de interesse por PCR é possível, e também confirmaram que o tamanho dos amplicons obtidos (quadro 3) estão de acordo com a literatura (LANE, 1991; MAEDA *et al.*, 2003; XI *et al.*, 2009). A título de ilustração, foram incluídos no anexo 2, os resultados das análises com o software Primer-BLAST para a validação dos primers que amplificam o gene *bla_{TEM-1}* e o gene rRNA 16S (F27 e R1492).

3.2. OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO *IN HOUSE* DE EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL EM PEQUENA ESCALA

Após algumas tentativas sem sucesso, conseguiu-se extrair DNA total das linhagens *E. coli* Top10 e *E. coli* ATCC 11775^T. Em relação às modificações feitas ao protocolo inicial, podemos inferir que algumas delas tenham contribuído para a obtenção de DNA íntegro de alto peso molecular. O uso do tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM), como meio aquoso para a lise celular, pode aumentar a estabilidade do DNA, pois o EDTA sequestra íons de metais divalentes necessários para as enzimas que degradam DNA/RNA. Similarmente, a substituição do uso do vórtex por homogeneização manual e suave em algumas etapas do protocolo previne a quebra de moléculas grandes de DNA por agentes químicos como o SDS e o fenol (CSHP, 2006a; CSHP, 2006b).

Na extração de DNA total (item 2.4), obteve-se bandas compatíveis com DNA genômico e plasmidial de bactérias. Na extração de DNA plasmidial (item 2.5), obteve-se bandas compatíveis com DNA plasmidial e um pouco de contaminação de DNA genômico. O resultado das extrações de DNA, após o tratamento com RNase (item 2.7), pode ser observado na figura 4.

No protocolo de extração de DNA total (DNA_T), foram testadas, com cada cepa, duas formulações diferentes de tampão de lise TES: TES_A (EDTA 100 mM, Tris-HCl 50 mM, SDS 10%, pH 8,0) e TES_B (EDTA 100 mM, Tris-HCl 50 mM, SDS 1,5%, pH 8,0). Na extração de DNA plasmidial (DNA_P), foram feitas extrações em duplicata com cada linhagem.

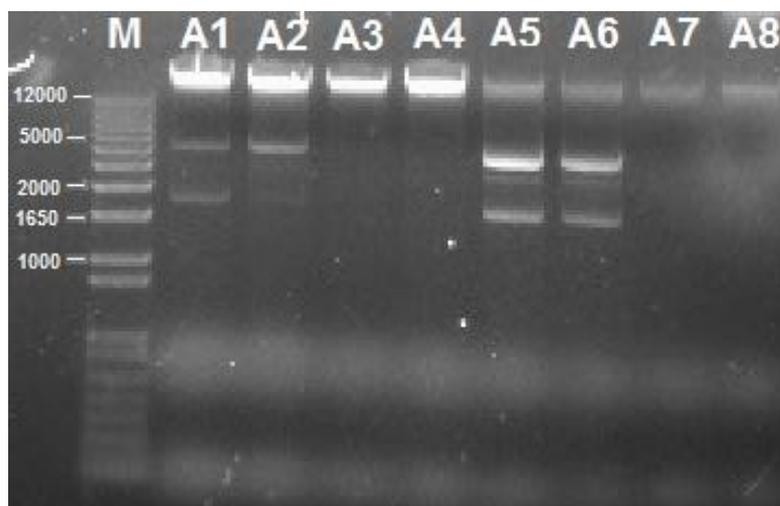


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) de amostras de extração de DNA total (A1 a A4) e DNA plasmidial (A5 a A8) de linhagens de *E. coli*. Legenda: M - padrão de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen), A1 - *E. coli* Top10 (DNA_T, TES_A), A2 - *E. coli* Top10 (DNA_T, TES_B), A3 - *E. coli* ATCC 11775 (DNA_T, TES_B), A4 - *E. coli* ATCC 11775 (DNA_T, TES_A), A5 - *E. coli* Top10 (DNA_P), A6 - *E. coli* Top10 (DNA_P), A7 - *E. coli* ATCC 11775 (DNA_P) e A8 - *E. coli* ATCC 11775 (DNA_P).

A extração de DNA genômico das duas cepas foi bem sucedida com ambas as formulações do tampão de lise (figura 4: A1, A2, A3 e A4). Baseando-se no conhecimento prévio das características genéticas dos microrganismos (item 2.1), podemos inferir que a extração do DNA plasmidial da cepa Top10 foi bem sucedida, tanto na extração de DNA total (figura 4: A1 e A2), quanto na extração de DNA plasmidial (figura 4: A5 e A6). Observam-se duas bandas de DNA compatíveis com DNA plasmidial, sendo a maior delas, em tamanho próximo de 5000 pb, o que é compatível com o tamanho de um plasmídeo pET (cerca de 5 kb) (NOVAGEN, 2011). A cepa ATCC 11775 possui um plasmídeo circular de 131 kb

(MEIER-KOLTHOFF *et al.*, 2014). Este plasmídeo é grande, e, talvez por isso, não seja possível isolá-lo pelo método da lise alcalina. O plasmídeo pode estar presente na extração de DNA total, porém, devido ao tamanho, ele pode estar junto à banda do DNA genômico. Portanto, não se pode inferir sobre a sua presença ou ausência no gel.

Após a extração de DNA total (figura 4: A1, A2, A3 e A4) foi realizada a quantificação do DNA pelo método de fluorimetria (Qubit® dsDNA BR, Life Technologies). O rendimento médio das extrações foi de 1,4 µg (0,028 µg/µL) de DNA total (dados não apresentados). Considerando-se o potencial do método, conforme descrito na literatura, podemos dizer que esse é um rendimento baixo de extração. Segundo Moore e Dowhan (2002), partindo-se de um cultivo de 1,5 mL de bactérias, por meio de um protocolo de fenol:clorofórmio, é possível obter até cerca de 50 µg de DNA (em 50 µL de volume final). Contudo, esse rendimento é suficiente para amplificação por PCR, uma vez que a quantidade de amostra de DNA recomendada pelo fabricante do "kit Taq DNA Polymerase, recombinant" (Invitrogen) é de 1 a 500 ng (0,001 a 0,5 µg).

Quanto às diferentes formulações de tampão de lise TES empregadas, não é possível afirmar se há ganho de eficiência com alguma das formulações. Observa-se que a amostra A1 (TES_A) tem duas bandas compatíveis com DNA plasmidial, enquanto que a amostra A2 (TES_B) apresenta apenas uma banda. Porém, isto pode ser um artefato experimental, sendo necessários outros experimentos para avaliar as diferentes formulações.

O tratamento das amostras de DNA com a enzima RNase (item 2.7) funcionou, pois observa-se menos "arraste" de moléculas de RNA no gel de agarose feito após o tratamento, do que era possível observar antes do tratamento (dados não mostrados). Porém, a eliminação de RNA não foi total, pois ainda se observa fluorescência de moléculas de baixo peso molecular no gel da figura 4. Isso pode ser explicado pela alta concentração de enzima utilizada, que foi cerca de nove vezes superior ao recomendado (20 µg/mL), o que pode acarretar em inibição da enzima e baixa eficiência da reação.

3.3. AVALIAÇÃO DAS LINHAGENS DE BACTÉRIA ESCOLHIDAS COMO CONTROLES POSITIVO E NEGATIVO QUANTO À AMPLIFICAÇÃO DO GENE *bla*_{TEM-1} pela REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Nos experimentos de PCR, foram utilizados três pares de primers diferentes (quadro 3), com diferentes amostras e controles positivos. Todos os produtos de PCR foram separados por eletroforese (item 2.6) em um único em gel de agarose. O resultado encontra-se apresentado na figura 5.

Para confirmar a amplificação de DNA bacteriano, foi utilizado um controle positivo (C(+)) nas reações com os dois pares de *primers* do gene rRNA 16S. Este controle é uma amostra de DNA genômico de bactérias do gênero *Vibrio*, a qual foi gentilmente cedida pela MSc. Vanessa Barcellos. O controle negativo de cada reação (C(-)), continha todos os reagentes do kit (item 2.10), os *primers*, e nenhuma amostra de DNA. As amostras de DNA total e de DNA plasmidial das linhagens *E. coli* ATCC 11775 e *E. coli* Top10 encontravam-se nas diluições de 100X do produto de extração. Os plasmídeos (item 2.9 e anexo 1) foram utilizados em concentrações de aproximadamente 50 ng/μL e também em diluições de 100X.



Figura 5. Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR. Legenda: M - padrão de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen), 16S_{ext.} - *primers* F27 e R1492, 16S_{int.} - *primers* F1048 e R1194, *bla*_{TEM} - *primers* blaTEM-F e blaTEM-R, C(-) - controle negativo de cada reação, C(+)- controle positivo (DNA_T de *Vibrio* spp.), A1 - DNA_T *E. coli* ATCC 11775, A2 - DNA_T *E. coli* Top10, A3 - DNA_P *E. coli* ATCC 11775, A4 - DNA_P *E. coli* Top10, P1 - Plasmídeo rRNA 16S, P1_D - Plasmídeo rRNA 16S (1/100), P2 - Plasmídeo *bla*_{TEM}, P2_D - Plasmídeo *bla*_{TEM} (1/110).

Analisando a figura 5, podemos fazer as seguintes constatações. Os produtos de PCR (amplicons) do gene rRNA 16S produzidos com o par de primers F27 e R1492 do C(+), A1 e A2 - apresentaram somente uma banda do tamanho esperado de cerca de 1500 pb (quadro 3), o que confirma a amplificação da sequência alvo no controle positivo, e nas amostras das duas cepas de bactérias. Não houve amplificação na reação de controle negativo.

Os amplicons do gene rRNA 16S produzidos com o par de primers F1048 e R1194 nas reações C(+), A1, A2 e P1, apresentaram somente uma banda do tamanho esperado de cerca de 150 pb (quadro 3), o que confirma a amplificação da sequência alvo no controle positivo, nas amostras de ambas as cepas de bactérias, e também no plasmídeo que contém um inserto do gene (item 2.9 e anexo 1). Não se observou amplificação da amostra P1_D, o que pode indicar que esta amostra de plasmídeo estava diluída demais, ou que tenha havido algum erro de pipetagem na diluição ou preparo da reação. Não houve amplificação na reação de controle negativo.

Os amplicons do gene *bla*_{TEM-1} produzidos com o par de primers blaTEM-F e blaTEM-R nas reações A1, A2, A3, A4, P2 e P2_D, apresentaram somente uma banda do tamanho esperado de cerca de 250 pb (quadro 3), o que confirma a amplificação da sequência alvo em todas as amostras das duas cepas de bactérias, e também no plasmídeo que contém um inserto do gene (item 2.9 e anexo 1). Nesta reação, houve amplificação na reação de controle negativo.

Estes resultados, tomados em conjunto, podem ser interpretados da seguinte forma. A bactéria *E. coli* Top10 de fato possui o gene de resistência à ampicilina (*bla*_{TEM-1}), o qual reside no plasmídeo pET, conforme era de conhecimento prévio (NOVAGEN, 2011). A amplificação observada na reação com o controle negativo, na qual nenhum DNA é inserido, deu-se, possivelmente, pela contaminação de algum dos reagentes utilizados na PCR, com DNA que contenha a sequência alvo. Há relatos na literatura da presença do gene *bla*_{TEM-1} como contaminante em preparações comerciais de Taq DNA polimerase recombinante (CHIANG *et al.*, 2005). Outra hipótese, é de que tenha havido contaminação durante a manipulação dos reagentes. Assim, poderíamos explicar porque a amplificação ocorre em todas as reações em que se utilizou o par de primers blaTEM-F e blaTEM-R. Cabe salientar ainda, que as bandas em A2, A4 e P2 são mais intensas do que aquelas observadas em C(-), A1 e A3. Isso reforça a hipótese de que a amplificação em C(-), A1 e A3 seja produto de contaminação, pois nas amostras onde a presença da sequência alvo era esperada, o amplicon está presente em maior número.

3.4. EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DE BACTÉRIAS PROVENIENTES DE AMOSTRAS DE ÁGUA DO ARROIO DILÚVIO

Com o objetivo de extrair DNA total bacteriano, foram testadas diferentes condições experimentais (quadro 4) para a obtenção de lisados de células a partir de membranas de amostras ambientais (item 2.12).

Em uma primeira tentativa de obter DNA a partir de amostras ambientais, submeteu-se as amostras 1 e 2 e cultivos bacterianos de *E. coli* ATCC 11775 (controles positivos) ao protocolo de extração de DNA total (anexo 3), com modificações. Neste experimento, foram testados dois tampões de lise celular: TES_A (Tris-HCl 50 mM, EDTA 100 mM, SDS 10%) e TET (Tris-HCl 1 M, EDTA.Na₂ 0,5 M, Triton X-100 1,2%) (RODRIGUEZ-MOZAZ *et al.*, 2015). O resultado dessa extração de DNA é apresentado na figura 6.

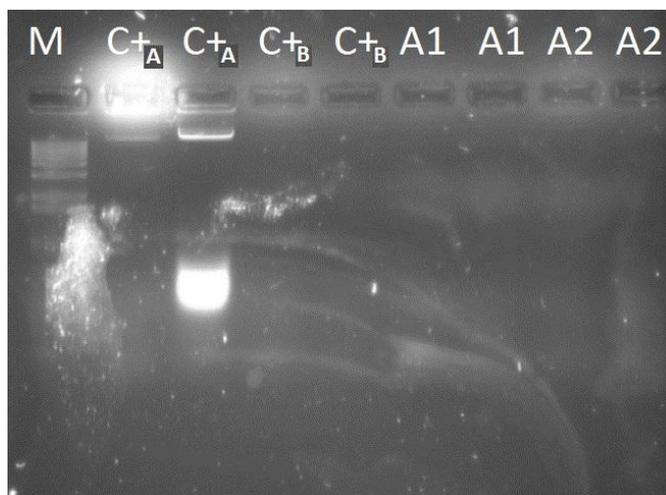


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose (1%) de produtos de extração de DNA total de cultivos de *E. coli* ATCC 11775 e de amostras ambientais. Legenda: M - padrão de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen), C_{+A} - *E. coli* ATCC 11775 (DNA_T, TES_A), C_{+B} - *E. coli* ATCC 11775 (DNA_T, TET), A1 - Membrana amostra 1 (DNA_T, TET), A2 - Membrana amostra 2 (DNA_T, TET).

Na figura 6, podemos observar a presença de bandas características de DNA apenas nos produtos de extração de DNA total de *E. coli* ATCC 11775 - C_{+A} (duplicata), em que se utilizou o tampão de lise TES_A. O tampão TET, relatado na literatura por Rodriguez-Mozaz *et al.* (2015) para a extração de DNA de amostra ambientais a partir de membranas, não se mostrou eficaz neste experimento. É possível que no tratamento com TET, tenha ocorrido

inversão de fases na separação orgânica, pois uma fase aquosa muito concentrada em sais, pode se tornar mais densa do que a fase orgânica. Desta forma, é possível que o DNA tenha sido inadvertidamente descartado.

No experimento seguinte, utilizou-se o tampão de lise TES_A com a amostra ambiental 2, e adicionou-se uma etapa de centrifugação após a incubação 2 para a eliminação de debris celulares (XI *et al.*, 2009). Na figura 7, podemos observar que há presença de bandas características de DNA, porém, em baixíssima concentração e degradado (apenas moléculas de baixo peso molecular).

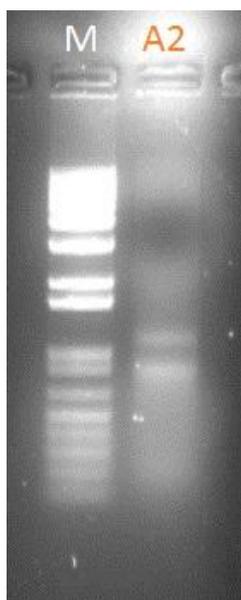


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose (1%) de produto de extração de DNA total de uma amostra ambiental. Legenda: M - padrão de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen), A2 - Membrana amostra 2 (DNA_T, TES_A).

A partir desse resultado, reformulou-se alguns parâmetros do procedimento (quadro 4), e implementou-se o uso de membranas saturadas com bactérias de cultivo como controle positivo (item 2.13). Visando aumentar a concentração de DNA obtida, diminui-se o volume de tampão de lise aplicado às membranas. Eliminou-se a centrifugação, por não ter se mostrado vantajosa, e adicionou-se uma etapa de congelamento da membrana após as incubações 1 e 2.

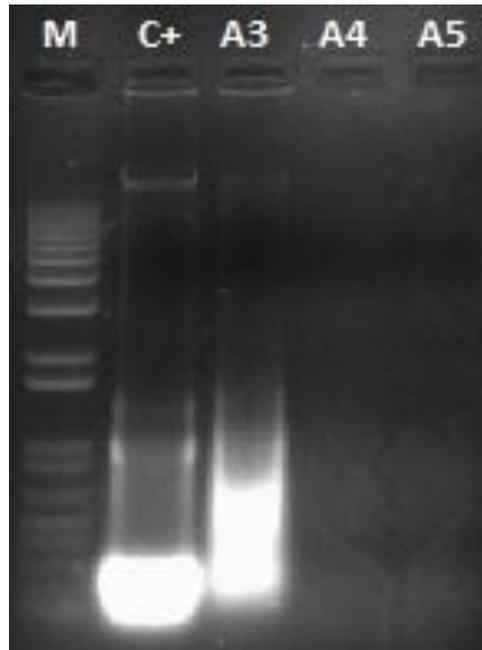


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose (1%) de produtos de extração de DNA total de amostras ambientais. Legenda: M - padrão de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen), C+ - Membrana controle positivo (DNA_T, TES_A), A3 - Membrana amostra 3 (DNA_T, TES_A), A4 - Membrana amostra 4 (DNA_T, TES_A), A5 - Membrana amostra 5 (DNA_T, TES_A).

Na figura 8, podemos observar que há presença de bandas características de DNA nos produtos de extração do controle positivo e da amostra 3. Nas canaletas referentes a essas amostras, observa-se a presença de bandas de DNA com peso molecular acima de 12 kb, e também de bandas com peso molecular de aproximadamente 1 kb. Além disso, observa-se uma grande quantidade de ácidos nucleicos de baixo peso molecular (RNA e DNA degradado). Para as amostras 4 e 5 não é possível evidenciar a presença de ácidos nucleicos no gel.

O uso de uma membrana controle positivo se mostrou bastante interessante como parâmetro para averiguar a eficácia e a eficiência do método de extração de DNA total aplicado a amostras ambientais. Observa-se que o produto da extração obtido a partir da amostra 3 se assemelha, em termos qualitativos, com aquele obtido a partir do controle positivo. Desta forma, podemos inferir que com mais alguns ajustes no protocolo será possível obter DNA de amostras ambientais de concentração e integridade adequadas para a aplicação em PCR.

Para melhorar a qualidade do DNA obtido, pode ser acrescentada uma etapa de inativação de nucleases, com banho-maria ou agitador de bancada a uma temperatura entre 65

e 80 °C (NEW ENGLAND BIOLABS), conforme já é feito no protocolo de extração de DNA total otimizado para amostras de cultivo (anexo 3, item 6). Foi observado, ao término das etapas de lise química (incubação 1) e de lise enzimática (incubação 2), que a eficácia da primeira, em remover às células da membranas, é muito inferior àquela da segunda. Assim, com vistas a otimização desse protocolo, sugere-se que a lise celular seja feita em uma única etapa de incubação com TES_A e lisozima (50 mg/mL).

4. CONCLUSÕES

- Realizou-se com sucesso a otimização de um método *in house* de extração de DNA total a partir de cultivos microbianos e obteve-se DNA em quantidade e qualidade suficiente para a técnica de PCR.
- Aplicou-se com sucesso um método de extração *in house* de DNA plasmidial a partir de cultivos microbianos e obteve-se DNA em quantidade e qualidade suficiente para a técnica de PCR.
- Os primers selecionados para o estudo são capazes de amplificar as sequências alvo em amostras de DNA. Os plasmídeos clonados com insertos das sequências de interesse e também os amplicons obtidos neste trabalho poderão ser utilizados como controles positivos em reações de PCR.
- A cepa *E. coli* Top10 com plasmídeo pET apresenta potencial para ser utilizada como um controle positivo no estudo do gene *bla_{TEM-1}*.
- Foi desenvolvido um método para produzir controles positivos de membranas saturadas com bactérias.
- O método *in house* de extração de DNA total a partir de amostras ambientais ainda requer melhorias.

5. PERSPECTIVAS

a) Curto prazo:

- Continuar a otimização dos protocolos de extração de DNA total, realizando a quantificação do DNA, até a obtenção de um processo que alcance a eficiência esperada da técnica, em particular, para as amostras ambientais.
- Realizar testes de sensibilidade com as linhagens *E. coli* Top10 e *E. coli* ATCC 11775^T, para determinar a susceptibilidade e a concentração inibitória mínima (MIC) em relação a um ou mais antimicrobianos β -lactâmicos.
- Aplicar o método de PCR para amplificação de genes de resistência a antimicrobianos (*bla*_{TEM-1} e outros) a partir do DNA extraído de amostras ambientais.

b) Médio e longo prazo

- Aplicar a mesma metodologia para estabelecer controles positivos e negativos para o estudo de outros genes de resistência a antimicrobianos.
- Começar a padronização da técnica de PCR em tempo real.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELLÁN, M. N.; GIMÉNEZ, J.; ESPLUGAS, S. Photocatalytic degradation of antibiotics: the case of sulfamethoxazole and trimethoprim. **Catalysis Today**, v. 144, n. 1–2, p. 131–136, 2009.
- ALLEN, H. K. *et al.* Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 251–259, 2010.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–10, 1990.
- American Type Culture Collection (ATCC). **Product sheet. *Escherichia coli* (ATCC®11775™)**. 2015. Disponível em: <<https://www.atcc.org/Products/All/11775.aspx>>. Acesso em: 20 nov. 2016.
- BARCELÓ, D. (Ed.). **Emerging Organic Contaminants and Human Health**. Berlim: Springer-Verlag, 2012. 466 p. (The Handbook of Environmental Chemistry, v. 20).
- BERGLUND, B. *et al.* Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. **Infection Ecology and Epidemiology**, v. 5, n. 28564, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3402/iee.v5.28564>>. Acesso em: 26 nov. 2016.
- BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no meio ambiente. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 523–530. 2003.
- BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 7, n. 6, p. 1513–23, 1979.
- BLATTNER, F. R. *et al.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* k-12. **Science**, v. 277, n. 5331, p. 1453–1462, 1997.
- BRADFORD, P. A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 933–51, 2001.
- CHIANG, C.-S. *et al.* Presence of beta-lactamase gene TEM-1 DNA sequence in commercial Taq DNA polymerase. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 530–1, 2005.
- COLD SPRING HARBOR PROTOCOLS (CSHP). **Recipe TES Lysis Buffer**. 2006. Disponível em: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.rec594.full?text_only=true>. Acesso em: 7 jul. 2017.
- COLD SPRING HARBOR PROTOCOLS (CSHP). **Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol:Chloroform**. 2006. Disponível em: <<http://cshprotocols.cshlp.org/content/2006/1/pdb.prot4455.long>>. Acesso em: 7 jul. 2017.
- DAUGHTON, C. G.; TERNES, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. SUPPL. 6, p. 907–938, 1999.
- DAUGHTON, C. G. Pharmaceuticals in the environment: sources and their management. In: PETROVIC, M. *et al.* (Ed.) **Analysis, Removal, Effects and Risk of Pharmaceuticals in the Water Cycle**. 2 ed. Oxford: Elsevier, 2013, p. 37–69. (Comprehensive Analytical Chemistry, v. 62).
- DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Analysis of antibiotics in aqueous samples. In: BARCELÓ, D.; PETROVIC, M. (Ed.) **Analysis, Removal, Effects and Risk of Pharmaceuticals in the Water Cycle**. Oxford: Elsevier, 2007, p. 61–93. (Comprehensive Analytical Chemistry, v. 50).

- DURFEE, T. *et al.* The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 7, p. 2597–606, 2008.
- ERICKSON, B. E. Analyzing the ignored environmental contaminants. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 7, p. 140A–145A, 2002.
- FENT, K.; WESTON, A.; CAMINADA, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. **Aquatic Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 122–159, 2006.
- GAVRILESCU, M. *et al.* Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. **New Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 147–156, 2015.
- GROS, M. *et al.* Trace level determination of beta-blockers in waste waters by highly selective molecularly imprinted polymers extraction followed by liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography. A**, v. 1189, n. 1–2, p. 374–84, 2008.
- HALDEN, R. U. Epistemology of contaminants of emerging concern and literature meta-analysis. **Journal of Hazardous Materials**, v. 282, p. 2–9, 2015.
- HALLING-SORENSEN, B. *et al.* Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - a review. **Chemosphere**, v. 36, n. 2, p. 357–393, 1998.
- HEBERER, T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. **Toxicology Letters**, v. 131, n. 1–2, p. 5–17, 2002.
- HOMEM, V.; SANTOS, L. Degradation and removal methods of antibiotics from aqueous matrices – a review. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 10, p. 2304–2347, 2011.
- HOUTMAN, C. J. Emerging contaminants in surface waters and their relevance for the production of drinking water in Europe. **Journal of Integrative Environmental Sciences**, v. 7, n. 4, p. 271–295, 2010.
- HUERTA, B. *et al.* Exploring the links between antibiotic occurrence, antibiotic resistance, and bacterial communities in water supply reservoirs. **Science of the Total Environment**, v. 456–457, p. 161–170, 2013.
- HUGHES, S. R.; KAY, P.; BROWN, L. E. A global synthesis and critical evaluation of pharmaceutical datasets collected from river systems. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 2, p. 661–677, 2012.
- JANK, L. *et al.* Simultaneous determination of eight antibiotics from distinct classes in surface and wastewater samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 94, n. 10, p. 1013–1037, 2014.
- JOHNSON, M. *et al.* NCBI BLAST: a better web interface. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. Web Server issue, p. W5-9. doi:10.1093/nar/gkn20, 2008.
- KIM, S.; AGA, D. S. Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants. **Journal of Toxicology and Environmental Health, part b**, v. 10, n. 8, p. 559–573, 2007.
- KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 417–434, 2009.
- KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. **Chemosphere**, v. 75, n. 4, p. 435–441, 2009.

- KÜMMERER, K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 8, p. 2354–2366, 2009.
- LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**. Nova York: John Wiley & Sons, 1991, p. 115-176.
- LAPWORTH, D. J. *et al.* Emerging organic contaminants in groundwater: a review of sources, fate and occurrence. **Environmental Pollution**, v. 163, p. 287–303, 2012.
- LLORCA, M. *et al.* Review of emerging contaminants in aquatic biota from Latin America: 2002-2016. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 9999, n. 9999, p. 1–12, 2016.
- LOCATELLI, M. A. F.; SODRÉ, F. F.; JARDIM, W. F. Determination of antibiotics in brazilian surface waters using liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 3, p. 385–393, 2011.
- MAEDA, H. *et al.* Quantitative real-time PCR using TaqMan and SYBR Green for *Actinobacillus actinomycescomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *tetQ* gene and total bacteria. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 81–86, 2003.
- MANAIA, C. M. *et al.* Antibiotic resistance in waste water and surface water and human health implications. In: BARCELÓ, D. (Ed.). **Emerging Organic Contaminants and Human Health**. Berlin: Springer-Verlag, 2012, p. 173–212. (The Handbook of Environmental Chemistry, v. 20)
- MARTÍNEZ, J. L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. **Science**, v. 321, n. 5887, p. 365–7, 2008.
- MARTÍNEZ, J. L.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F. What is a resistance gene? ranking risk in resistomes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 116–123, 2014.
- MEIER-KOLTHOFF, J. P. J. P. *et al.* Complete genome sequence of DSM 30083T, the type strain (U5/41T) of *Escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy. **Standards in Genomic Sciences**, v. 9, n. 1, p. 2, 2014.
- MOORE, D. M.; DOWHAN, D. UNIT 2.1A Purification and Concentration of DNA from Aqueous Solutions In: AUSUBEL, F. M. *et al.* (Ed.). **Current Protocols In Molecular Biology**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2003. doi: 10.1002/0471142727.
- NAIDU, R. *et al.* Emerging contaminants in the environment: risk-based analysis for better management. **Chemosphere**, v. 154, p. 350–357, 2016.
- NEW ENGLAND BIOLABS. **Heat inactivation**. 2017. Disponível em: <<https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/heat-inactivation>>. Acesso em: 13 jul. 2017.
- NOGUERA-OVIEDO, K.; AGA, D. S. Lessons learned from more than two decades of research on emerging contaminants in the environment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 316, n. 5, p. 242–251, 2016.
- Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry (NC-IUB). **Nomenclature for Incompletely Specified Bases in Nucleic Acid Sequences. Recommendations 1984**. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/misc/naseq.html>>. Acesso em: 15 nov. 2016.
- NOVAGEN. **User Protocol TB055 Rev. C 0611JN: pET System Manual 11th Edition**. 2011. 63 p. Disponível em: <<http://www.merckmillipore.com/BR/pt/search/TB055?SearchTerm=TB055&bd=1>>. Acesso em: 20 nov. 2016.

- PAL, A. *et al.* Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. **Environment International**, v. 71, p. 46–62, 2014.
- PETRIE, B.; BARDEN, R.; KASPRZYK-HORDERN, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. **Water Research**, v. 72, p. 3–27, 2014.
- PETROVIĆ, M. *et al.* Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, n. 1–2, p. 1–14, 2005.
- RICHARDSON, M. L.; BOWRON, J. M. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 1–12, 1985.
- RICHARDSON, S. D.; TERNES, T. A. Water analysis: emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 12, p. 3807–3838, 2005.
- RIZZO, L. *et al.* Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. **Science of the Total Environment**, v. 447, p. 345–360, 2013.
- RODRIGUEZ-MOZAZ, S. *et al.* Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. **Water Research**, v. 69, p. 234–242, 2015.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Appendix 8 “Commonly Used Techniques in Molecular Cloning”. In: SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. (Ed.). **Molecular Cloning**, v. 3, 3 ed., Cold Spring Harbor: CSHL Press, 2001. p. A8.9–A8.10.
- SANDERSON, H. *et al.* Antibiotic resistance genes as an emerging environmental contaminant. **Environmental Reviews**, v. 218, p. 27–39, 2016.
- SAUVÉ, S.; DESROSIERS, M. A review of what is an emerging contaminant. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 15, 2014. Disponível em: <<http://journal.chemistrycentral.com/content/8/1/15>>. Acesso em: 1 jan. 2017.
- SCHRIKS, M. *et al.* Toxicological relevance of emerging contaminants for drinking water quality. **Water Research**, v. 44, n. 2, p. 461–76, 2010.
- SCHWARZENBACH, R. P. *et al.* The challenge of micropollutants in aquatic systems. **Science**, v. 313, n. 5790, p. 1072–1077, 2006.
- STUMPF, M. *et al.* Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 225, n. 1–2, p. 135–141, 1999.
- SUTCLIFFE, J. G. Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 8, p. 3737–41, 1978.
- SUTCLIFFE, J. G. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 43, n. 1, p. 77–90, 1979.
- SCHEUTZ, F.; STROCKBINE, N. A. Genus I. *Escherichia* Castellani and Chalmers 1919. In: BRENNER, D. J. *et al.* (Ed.). **Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed. (The Proteobacteria, v. 2). Nova York: Springer, 2005, p. 607–624.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Product Information Sheet. One Shot™ TOP10 Chemically Competent E. coli**. Catalog Number C4040-10 (10 reactions), C4040-03 (20 reactions), and C4040-06 (40 reactions). Doc. Part No. C4040.pps Pub. No. MAN0001491 Rev. A.0. 2015. Disponível em:

<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/oneshottop10_chemcomp_man.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (Org.). **Pharmaceuticals in drinking water**. Genebra: WHO Press, 2012. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2012/pharmaceuticals/en/>. Acesso em: 27 nov. 2016.

XI, C. *et al.* Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 17, p. 5714–5718, 2009.

YE, J. *et al.* Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 134, 2012. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2105/13/134>>. Acesso em: 4 dez. 2016.

7. ANEXOS

ANEXO 1. Sequências nucleotídicas dos genes e insertos mencionados neste trabalho, com os respectivos números de acesso para as sequências completas no NCBI. São destacadas em vermelho as sequências onde ocorre o pareamento com os *primers*.

Sequência completa do gene *bla_{TEM-I}* contida no plasmídeo pET (861 nucleotídeos)

GenBank: J01749.1 - Vetor de clonagem pBR322, sequência completa: locus 3293-4153 (861 nts) (SUTCLIFFE, 1978).

```
TTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCC
TGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATG
ATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGC
CGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCT
AGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTG
TCACGCTCGTCTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGAT
CCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGG
CCGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGCATGCCATCCGTAAG
ATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAG
TTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAAATACCGCGCCACATAGCAGAAGTTTAAAAGTGCTCAT
CATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGAT
GTAACCCACTCGTGCACCCAAGTATCTTCAGCATCTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCA
AAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCA
T
```

Sequência do inserto (sequência parcial) do gene rRNA 16S clonada no plasmídeo pIDTSmart (147 nucleotídeos)

NCBI Reference Sequence: NC_000913.3 - *Escherichia coli* linhagem K-12 sub. MG1655, genoma completo (RILEY *et al.*, 2006).

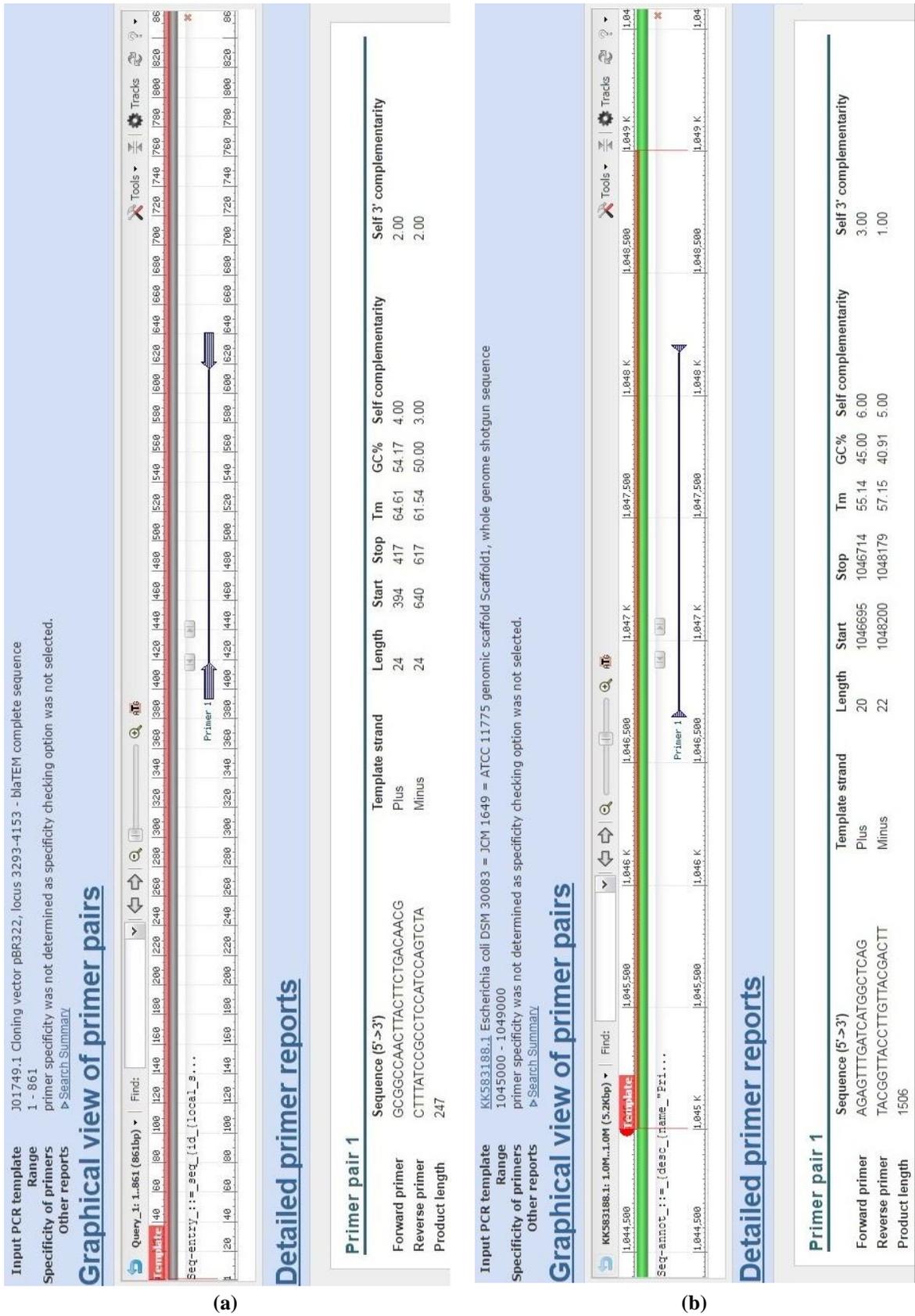
```
GTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACC
CTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGA
AGGTGGGGATGACGT
```

Sequência do inserto (sequência parcial) do gene *bla_{TEM}* clonada no plasmídeo pIDTSmart (247 nucleotídeos)

NCBI Reference Sequence: NC_019062.1 - plasmídeo p838C-R1 de *Escherichia coli*, sequência completa (não publicada).

```
GCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATG
GGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGA
GCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACT
TACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAG
```

ANEXO 2. Capturas de tela com os resultados das análises do software Primer-BLAST (YE *et al.*, 2012) para a validação dos primers que amplificam os genes (a) blaTEM e (b) rRNA 16S.



ANEXO 3. PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL MÉTODADO ADAPTADO DE SAMBROOK e RUSSELL (2001)

- 1) Adicionar 1,5 mL de uma cultura cultivada *overnight* a um tubo de microcentrífuga de 2,0 mL e centrifugar a 13.000 rpm por 2 min; descartar o sobrenadante;
- 2) Adicionar 1 mL de tampão TE (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8) e homogeneizar manualmente; centrifugar a 13.000 rpm por 2 min e descartar o sobrenadante;
- Repetir o item 2, se necessário, até que se observe um sobrenadante límpido;
- 3) Adicionar 400 µL de tampão TE e homogeneizar manualmente;
- 4) Adicionar 100 µL de tampão de lise TES (50 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH 8,0, 10% SDS) e homogeneizar manualmente;
- 5) Adicionar 100 µL de solução de lisozima (lisozima 50 mg/mL, tris-HCl 10 mM, pH 8) e homogeneizar o tubo manualmente; colocar o tubo sob gelo por 10 s; repetir este ciclo, até observar a desagregação do *pellet* e o aumento da viscosidade da solução;
- 6) Incubar a 60 °C e 600 rpm por 15 min (incubador de bancada - Thermomixer, Eppendorf);
- 7) Resfriar à temperatura ambiente por 10 min;
- 8) Adicionar 120 µL de acetato de amônio 7,5 M;
- 9) Incubar no gelo por 15 min;
- 10) Adicionar 1 volume de fenol-clorofórmio e homogeneizar manualmente, até formar emulsão; extrair o sobrenadante (fase aquosa/DNA) e transferir para outro tubo; deixar em repouso até a formação de um sistema trifásico (se necessário, centrifugar a 9000 rpm por 1 min);
- 11) Repetir a etapa 10, até que não se observe uma interfase (proteínas);
- 12) Adicionar 1 volume de clorofórmio e extrair o sobrenadante (fase aquosa/DNA) e transferir para outro tubo de microcentrífuga de 1,5 mL;
- 13) Adicionar solução de NaCl para a concentração final de 0,2 M e homogeneizar manualmente;
- 14) Adicionar 0,6 a 1 volume de isopropanol e armazenar overnight a -20 °C;
- 15) Centrifugar a 14.000 rpm por 20 min;
- 16) Aspirar todo o sobrenadante e descartar, cuidando para não aspirar o *pellet* de DNA;
- 17) Adicionar 200 µL de etanol 70%, cuidando para não desagregar o *pellet* de DNA; em seguida aspirar e descartar todo o volume de etanol;
- 18) Centrifugar a 9000 rpm por 3 min;
- 19) Secar a temperatura ambiente por 1 hora;
- 20) Ressuspender o *pellet* em 30 a 50 µL de H₂O milliQ e homogeneizar manualmente;
- 21) Armazenar a -20 °C;

ANEXO 4. Pontos de coleta de amostras do Arroio Dilúvio em Porto Alegre:

- 1 - Campus do Vale - UFRGS (próximo à nascente do Arroio Dilúvio);
- 2 - Av. Ipiranga, próximo à Av. Antônio de Carvalho;
- 3 - Av. Ipiranga, próximo à Av. Dr. Salvador França;
- 4 - Av. Ipiranga, próximo à Rua Vicente da Fontoura;
- 5 - Av. Ipiranga, próximo à Av. da Azenha;
- 6 - Desembocadura do Arroio Dilúvio no Rio Guaíba.

