

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

DISCRIMINAÇÃO DE AMBIENTES AQUÁTICOS
POLUÍDOS E NÃO POLUÍDOS ATRAVÉS DA
AMPLIFICAÇÃO E CLIVAGEM DO rDNA 16S

FRANCISCO FERNANDO DE CASTILHO KOLLER
Biólogo – PUCRS

Dissertação apresentada como um dos requisitos para a obtenção do grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre – RS
Maio de 2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

DISCRIMINAÇÃO DE AMBIENTES AQUÁTICOS
POLUÍDOS E NÃO POLUÍDOS ATRAVÉS DA
AMPLIFICAÇÃO E CLIVAGEM DO rDNA 16S

Dissertação de Mestrado

Francisco Fernando de Castilho Koller

Porto Alegre – RS, 2002.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Gertrudes Corção pela orientação e apoio durante a realização deste projeto.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela oportunidade de crescimento, em especial aos professoras Marisa da Costa e Sueli Van Der Sand pelo auxílio e colaboração, e ao professor João Henrique Corrêa Kanan por sua constante disponibilidade e importantes contribuições durante a fase mais conturbada deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia da UFRGS.

Aos colegas da turma de 2000 pela convivência agradável.

Aos colegas de laboratório Cristiana Valar, Diego Hoffmeister, Luiz Gustavo dos Santos Borges, Virgínia Dalla Vecchia e Tatiana Poletto, pela colaboração sempre que necessitei e por terem proporcionado momentos agradáveis apesar das dificuldades.

À bióloga Emanuele Kuhn, pela colaboração e incentivo indispensáveis à realização deste trabalho.

Aos meus pais Otto Carlos Koller e Carmem Regina de Castilho Koller por terem me dado as condições para que hoje possa lhes agradecer através desta conquista e aos meus avós Carlinda e Fernando pelo amor e carinho imensuráveis.

À minha esposa Elisa Campagna de Azevedo pelo amor, compreensão e incentivo e seus familiares pelo apoio e amizade.

DISCRIMINAÇÃO DE AMBIENTES AQUÁTICOS POLUÍDOS E NÃO POLUÍDOS ATRAVÉS DA AMPLIFICAÇÃO E CLIVAGEM DO rDNA 16S¹

Autor: Francisco Fernando de Castilho Koller
Orientadora: Gertrudes Corção

RESUMO

O crescimento desordenado da população e a expansão mal planejada das cidades, tem levado a precariedade das condições de saneamento e abastecimento hídrico, tornando a água um importante meio de desenvolvimento e transporte de microrganismos, muitos destes patogênicos. Desta maneira, torna-se necessário além da busca de soluções, o monitoramento eficiente e constante dos níveis e focos de contaminação. O presente trabalho teve como objetivo principal diferenciar ambientes aquáticos poluídos de não poluídos por contaminação de origem fecal, através de padrões moleculares. Para tanto foram escolhidos os arroios Feijó e Carvão, localizados na região metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, de onde foram coletadas amostras de água no verão e no inverno de 2001, submetidas a determinação do número mais provável (NMP) de coliformes totais e fecais, através da fermentação em tubos múltiplos. No Arroio Feijó foram observados índices de coliformes fecais superiores ao arroio Carvão, portanto o primeiro foi considerado modelo de ambiente aquático poluído e o segundo, não poluído. Seguiu-se a extração do DNA total das amostras brutas, amplificação do rDNA 16S pela PCR e clivagem destes com as enzimas de restrição *Rsa* I, *Taq* I e *Alu* I. Os padrões de clivagens observados com *Rsa* I sugerem a discriminação destes ambientes, uma variação sazonal foi observada entre as amostras de verão e inverno. O método mostrou-se sensível para uma análise comparativa entre estruturas de comunidades bacterianas em ambientes aquáticos.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS, Brasil, (91p.). Maio, 2002.

DISCRIMINATION OF POLLUTED AND NON-POLLUTED AQUATIC ENVIRONMENT THROUGH RESTRICTION OF AN AMPLIFIED FRAGMENT OF BACTERIA 16S rDNA 1

Author: Francisco Fernando de Castilho Koller
Adviser: Gertrudes Corção

ABSTRACT

The disordered population growth and the unplanned expansion of the cities has led the sanitary conditions and hydric supply to a precarious state, which has turned the water into an important source of microorganism up-growth and transport, even the pathogenic ones. Besides looking for solutions, an efficient and constant monitoring of contamination is needed. The aim of the present work was to differentiate polluted from non-polluted water environment through the use of molecular patterns. With this purpose, two streams were chosen. Arroio Feijó and Arroio Carvão, localized in the surroundings of the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Water samples from these streams were collected during the summer and winter and the presence or not of fecal pollution was determinate by multiple-tube fermentation technique. At Arroio Feijó higher levels of fecal coliform were observed, therefore it was considered as the polluted water environment model, and Arroio Carvão as the non-polluted one. Total DNA was extracted from water samples, a fragment of 16S rDNA was amplified using universal primers and it was cleaved with restriction enzymes (*Rsa* I, *Taq* I and *Alu* I). The observed restriction pattern with *Rsa* I suggests a discrimination of these environments and a seasonal variation was also observed among summer and winter samples. The methodology was sensitive enough to differentiate these aquatic environment and the structure of their bacterial communities.

1 Master of Science's Degree Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology , Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS, Brasil, (91 p.). May, 2002.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Ambiente aquático e contaminação biológica	4
2.2. Bioindicadores de poluição em ambientes aquáticos.....	6
2.3. Ecologia e diversidade microbianas	10
2.4. Métodos moleculares na avaliação da diversidade microbiana ...	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Coleta das amostras.....	20
3.2. Materiais.....	32
3.3. Métodos.....	34
3.3.1. Determinação de Coliformes Totais e Fecais.....	34
3.3.1.1. Contagem de Heterotróficos.....	35
3.3.1.2. Diferenciação entre ambientes aquáticos poluídos de	
3.4. Análise através do ARDRA.....	36
3.4.1. Extração do DNA total.....	36
3.4.2. Quantificação do DNA total por espectrofotometria	38
3.4.3. Diluições do DNA para a aplicação na PCR.....	38
3.4.4. Amplificação através da PCR do fragmento rDNA 16S.....	39
3.4.5. Análise dos produtos da PCR em gel de agarose 0,8%.....	40
3.4.6. Clivagem com as enzimas de restrição.....	40
3.4.7. Análise dos fragmentos após clivagem com as enzimas de	
restrição.....	41
3.4.8. Análise estatística.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1. Análise bacteriológica da água.....	42
4.1.1. Determinação do número mais provável de coliformes fecais	
e totais.....	42
4.1.2. Contagem de bactérias heterotróficas.....	43
4.2. Análise molecular.....	46
4.2.1. Extração do DNA total.....	46
4.2.2. Preparação do DNA para a PCR.....	48
4.2.3. Condições de amplificação.....	50
4.2.4. Clivagem com enzimas de restrição.....	54
4.2.5. Análise filogenética	67

	Página
5. CONCLUSÕES.....	76
6. PERSPECTIVAS.....	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
8 . APÊNDICES.....	87

RELAÇÃO DAS TABELAS

	Página
01. Datas e pontos de coleta das águas superficiais.....	31
02. Dados de coliformes e bactérias heterotróficas dos pontos de coleta situados no arroio Feijó, coleta de verão (janeiro) de 2001.....	44
03. Dados de coliformes e bactérias heterotróficas dos pontos de coleta situados no arroio Feijó, coleta de inverno (julho) de 2001.....	45
04. Dados de coliformes e bactérias heterotróficas dos pontos de coleta situados no arroio Carvão, coleta de verão (março) de 2001.....	45
05. Dados de coliformes e bactérias heterotróficas dos pontos de coleta situados no arroio Carvão, coleta de inverno (agosto) de 2001.....	46
06. Concentração de DNA extraído das amostras dos 5 pontos de coleta do arroio Feijó, obtido através de espectrofotometria.....	47
07. Concentração de DNA extraído das amostras dos 3 pontos de coleta do arroio Carvão, obtido através de espectrofotometria.....	47

RELAÇÃO DAS FIGURAS

	Página
01. Localização dos pontos de coleta dos arroios Feijó e Carvão.....	22
02. Vista do ponto 1 do arroio Feijó.....	23
03. Vista do ponto 2 do arroio Feijó.....	24
04. Vista do ponto 3 do arroio Feijó.....	25
05. Vista do ponto 4 do arroio Feijó.....	27
06. Vista do ponto 5 do arroio Feijó.....	27
07. Vista do ponto 1 do arroio Carvão.....	28
08. Vista do ponto 2 do arroio Carvão.....	29
09. Vista do ponto 3 do arroio Carvão.....	30
10. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio com os resultados da amplificação do segmento de aproximadamente 918 pb do rDNA 16S das amostras ambientais e dos controles negativos.....	53
11. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídio, com o resultado da clivagem das amostras ambientais de verão com a enzima de restrição <i>Rsa</i> I.....	55
12. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídio, com o resultado da clivagem das amostras ambientais de verão e inverno com a enzima <i>Rsa</i> I.....	56
13. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídio, com o resultado da clivagem das amostras ambientais de verão com a enzima <i>Rsa</i> I.....	57
14. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídio, com o resultado da clivagem das amostras ambientais de verão com a enzima <i>Taq</i> I.....	58

	Página
15. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídio, com o resultado da clivagem das amostras ambientais de inverno com as enzimas de restrição <i>TaqI</i>	59
16. Fragmentos observados a partir da clivagem das amostras de verão com a enzima <i>RsaI</i>	62
17. Tamanho dos fragmentos observados a partir da clivagem das amostras de verão com a enzima <i>TaqI</i>	63
18. Tamanho dos fragmentos observados a partir da clivagem das amostras de inverno com a enzima <i>RsaI</i>	64
19. Tamanho dos fragmentos observados a partir da clivagem dos isolados e das amostras de inverno com a enzima <i>TaqI</i>	65
20. Dendrograma da análise do rDNA 16S clivado com <i>RsaI</i> das amostras ambientais de verão.....	69
21. Dendrograma da análise do rDNA 16S clivado com <i>Taq I</i> das amostras ambientais de verão.....	70
22. Dendrograma da análise do rDNA 16S clivado com <i>RsaI</i> das amostras ambientais de inverno.....	71
23. Dendrograma da análise do rDNA 16S clivado com <i>TaqI</i> das amostras ambientais de inverno.....	71
24. Dendrograma da análise do rDNA 16S clivado com <i>RsaI</i> e <i>TaqI</i> das amostras ambientais de verão.....	73
25. Dendrograma da análise do rDNA 16S clivado com <i>RsaI</i> e <i>TaqI</i> das amostras ambientais de inverno.....	74

INTRODUÇÃO

Embora a água recubra o planeta em três quartos de sua superfície, sua maior fração é salgada, o que torna sua disponibilidade restrita. Além do consumo humano, existe uma grande demanda para as atividades industriais e agrícolas, de forma que serão crescentes os esforços para um maior controle da qualidade e da utilização racional deste bem valioso e finito.

O aumento desordenado da população e das cidades, provoca a urbanização forçada de áreas sem a estruturação e planejamento adequados para a ocupação, o que leva a precariedade das condições de saneamento e abastecimento de água.

O ambiente hídrico é muito suscetível ao desenvolvimento e transporte de microrganismos, de forma que a emissão de esgotos provenientes de atividades doméstica, agrícola e industrial, além de aumentar a disponibilidade de nutrientes, proporciona a introdução e disseminação de organismos patogênicos.

Estudos de microrganismos presentes em águas superficiais, sua diversidade e condições ecológicas em que ocorrem, nos oferecem não só informações fundamentais para o estabelecimento de padrões de

contaminação, como também para a descoberta de organismos indicadores alternativos da qualidade da água.

Tradicionalmente, as metodologias empregadas para a análise sanitária da água envolvem a detecção e quantificação presuntiva de bactérias do grupo coliforme, através da fermentação em tubos múltiplos. Atualmente avanços na biologia molecular permitiram o desenvolvimento de ferramentas com amplo poder de aplicabilidade, sendo utilizados tanto para detecção de organismos específicos como para o estudo da diversidade microbiana presentes em amostras ambientais.

Estudos prévios demonstraram que a amplificação e clivagem do fragmento rDNA 16S pode ser utilizada como ferramenta para detectar alterações na estrutura das comunidades bacterianas. Devido a crescente necessidade de diferenciar ambientes aquáticos com altos índices de contaminação fecal daqueles onde estes índices são mais baixos, pensou-se em escolher esta metodologia, uma vez que ambientes aquáticos poluídos possuem sua comunidade bacteriana natural afetada pelo despejo de matéria orgânica juntamente com bactérias exógenas ao ambiente.

O presente estudo teve como objetivo geral verificar a variação na estrutura de comunidades bacterianas presentes em amostras ambientais brutas, provenientes do Arroio Feijó e do Arroio Carvão, pela clivagem do fragmento rDNA 16S amplificado.

Entre os objetivos específicos cita-se: 1) diferenciar ambientes aquáticos poluídos de não poluídos pela metodologia de fermentação em tubos múltiplos para coliformes; 2) avaliar a diversidade microbiana em águas

superficiais, a partir de amostras provenientes do Arroio Feijó e do Arroio Carvão, através da clivagem do fragmento do rDNA 16S amplificado por PCR;

- 3) comparar os padrões de fragmentos obtidos, de amostras de águas poluídas e não poluídas;
- 4) estabelecer o uso desta metodologia na diferenciação de ambientes aquáticos poluídos e não poluídos;
- 5) contribuir para o conhecimento da diversidade microbiana presente nos locais em estudo;
- 6) formação de recursos humanos com capacitação e treinamento no desenvolvimento, execução e aplicação dos experimentos executados durante o projeto, em vários níveis de desenvolvimento científico e tecnológico (estágios específicos, iniciação científica e mestrado).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ambiente aquático e contaminação biológica

A água representa um dos elementos fundamentais à existência do homem. Seu espectro funcional abrange desde o abastecimento industrial e agropecuário, incluindo áreas destinadas à recreação e transporte, ainda que sua mais nobre utilização seja nas atividades domésticas (Sanchez, 1999). Embora vivamos em um planeta com três quartos de sua superfície recoberta de água, 97% desta água é salgada podendo ser utilizada para a maioria dos usos somente se for dessalinizada (o que elevaria muito seu custo). Dentre a água doce restante, a maior parte encontra-se congelada, de forma que água disponível no planeta, menos de 1% é constituído por águas superficiais

(lagos, rios, afluentes), o que a torna um recurso limitado e de precioso valor, haja visto ainda a desigualdade de sua distribuição verificada em escala global (Verner, 1994).

Apesar da limitação dos recursos hídricos disponíveis, o crescimento acentuado da população e o desenvolvimento não planejado das cidades, vêm elevando continuamente a demanda no fornecimento de água de qualidade à população. A deficiência de saneamento básico e do tratamento de esgotos, tem contribuído para a contaminação tanto da água doce quanto marinha (Ford & Colwell, 1998). Somado a isto, o crescimento da população também tem pressionado as práticas agrárias e industriais intensivas, que constituem-se em importantes origens de compostos orgânicos e inorgânicos que contribuem para a poluição da água e erosão do solo, aumentando o ritmo da demanda e deterioração dos recursos hídricos (Cho & Kim, 2000; Sanchez, 1999; Sorci *et al.*, 1999).

Além dos problemas acima referidos, a água pode facilmente se transformar em um excelente veículo transmissor de várias doenças infecciosas, o que ocorre quando microrganismos infecciosos são transportados por meio da água contaminada por matéria fecal, contendo patógenos humanos ou de animais. Quando estes patógenos contaminam a rede de abastecimento público ou de outras fontes de água potável utilizadas por muitas pessoas, podem aparecer surtos epidêmicos de várias doenças, afetando um grande número de pessoas em um curto período de tempo (Ford & Colwell, 1998; Sanchez, 1999).

É de suma importância, principalmente em países em desenvolvimento, a busca de soluções para o problema da transmissão de doenças através da água, haja visto que a redução da incidência destas doenças traz, conseqüentemente, efeitos significativos para a economia do país. Tão necessária quanto a busca de soluções, é o monitoramento dos níveis e focos de contaminação, pois muitas estratégias de controle têm falhado neste sentido, prova disso é a ressurgência de doenças infecciosas e o aparecimento de patógenos resistentes a antibióticos. Verifica-se deste modo, que a qualidade da água e a qualidade de vida estão intimamente relacionados, pois o contato com agentes infecciosos pode ocorrer tanto pela direta ingestão de água, quanto pela ingestão de peixes ou outros alimentos irrigados, lavados ou preparados com água contaminada, ou ainda em atividades de banho, recreação e higiene em ambientes inadequados (Ford & Colwell, 1998).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% das doenças que ocorrem nos países em desenvolvimento são ocasionadas pela contaminação da água. Sabe-se também que, a cada ano, 15 milhões de crianças de 0 a 5 anos morrem direta ou indiretamente em decorrência da falta ou deficiência dos sistemas de abastecimento de águas e esgotos. Tais dados refletem uma realidade, onde somente 30% da população mundial tem garantia de água tratada, sendo que os 70% restantes dependem de poços e outras fontes de abastecimento passíveis de contaminação (Sanchez, 1999).

2.2 Bioindicadores de Poluição em Ambientes Aquáticos

Entre o material em suspensão na água inclui-se a “parte viva” ou seja, os organismos presentes que também constituem impurezas e que, conforme sua natureza tem grande significado para os sistemas de abastecimento de água, tais como certas bactérias, vírus e protozoários patogênicos que podem ser causa de epidemias (Neto, 1987).

No ambiente aquático, a disponibilidade de nutrientes é escassa e variável (Atlas & Bartha, 1998), desta forma os microrganismos normalmente ocorrem em número reduzido o que torna necessário o emprego de organismos que habitam os intestinos de animais superiores como indicadores de contaminação fecal (Neto, 1987).

As bactérias do grupo coliforme constituem o indicador de contaminação fecal mais utilizado em todo o mundo, sendo empregadas como parâmetro bacteriológico básico na definição de padrões para monitoramento da qualidade das águas destinadas ao consumo humano, bem como para caracterização e avaliação da qualidade das águas em geral. Por definição, coliformes são bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos, que fermentam lactose com produção de ácido e gás em 24 - 48 horas a 35°C. Neste grupo são incluídos os gêneros: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* (Apha, 1998; Sanchez, 1999). Como o grupo coliforme inclui gêneros que não são de origem exclusivamente fecal, houve a formação de um subgrupo denominado

coliforme fecal (coliformes termotolerantes), os quais têm a capacidade de fermentar lactose em temperatura de 44,5°C (Sanchez, 1999).

As técnicas de análise tradicionalmente utilizadas na pesquisa de bactérias do grupo coliforme em amostras de água são as de fermentação em tubos múltiplos e de membrana filtrante. O primeiro utiliza o índice do número mais provável (NMP), baseado na fermentação em múltiplos tubos em uma série de diluições, onde através de fórmulas de probabilidade, o número de tubos com resultados positivos dará uma estimativa da densidade de coliformes na amostra. Na técnica de membrana filtrante, a amostra é filtrada por uma unidade filtrante que é depositada e incubada em placas com meios de cultura seletivos, para posterior contagem direta de colônias características (Apha, 1998).

Ultimamente foram desenvolvidos novos métodos como: presença/ausência (P/A), anticorpo fluorescente, sondas genéticas, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), entre outros (Apha, 1998; Ford & Colwell, 1998; Sanchez, 1999, Volossiuk *et al.*, 1995).

Os melhores microrganismos indicadores mostram uma clara relação com agentes biológicos que ofereçam risco à saúde pública (Ford & Colwell, 1998). Para a escolha de um agente indicador de contaminação fecal é preciso que este seja ou faça parte de um grupo de microrganismos que prevaleçam em esgotos e excretas do homem e outros animais homeotérmicos. Sua densidade deve ter uma relação direta com o grau de contaminação fecal e possível presença de patógenos específicos ou grupo de patógenos. Deve ser incapaz de se multiplicar no ambiente aquático ou

multiplicar-se menos do que as bactérias entéricas, é importante apresentar maior resistência aos desinfetantes que os microrganismos patogênicos e ser quantificável por métodos laboratoriais rápidos e simples (Sanchez, 1999; Ford & Colwell, 1998; Neto, 1987). Não existe um indicador ideal que reúna todos esses requisitos, sendo que os microrganismos utilizados apresentam vantagens e limitações que devem ser consideradas para sua aplicação (Sanchez, 1999).

Na maioria dos casos, *Escherichia coli* tem sido utilizada satisfatoriamente como organismo indicador, para medidas gerais da qualidade sanitária da água (Sanchez, 1999; Ford & Colwell, 1998; Neto, 1987). Contudo indicadores como *E. coli* podem crescer em ausência de contaminação fecal e sua presença não é correlata a bactérias patogênicas do ambiente, como *Legionella*, *Vibrio cholerae* e *Mycobacterium*. Além disso, *E. coli* em estágio viável mas não cultivável no ambiente aquático (como no inverno), pode não ser detectada pelos métodos tradicionais de cultura (Ford & Colwell, 1998).

Outro principal componente da microbiota intestinal humana é o enterococo fecal, um grupo de bactérias Gram positivas encontrado no intestino de animais de sangue quente. Sua utilização como indicador de poluição fecal na água, é importante também para prover indicações sobre a origem da contaminação (Bahirathan *et al.*, 1998; Knudtson *et al.*, 1992; Laukavá *et al.*, 1997; Harwood *et al.*, 2000). Métodos alternativos apontam o grupo *Bacteroides-Prevotella*, que embora não sejam do grupo coliforme

porém, devido a sua abundância nas fezes humanas e do gado, são propostos como organismos indicadores de poluição fecal (Bernhard & Field, 2000).

Além dos organismos indicadores de contaminação fecal, cianobactérias têm sido utilizadas como indicadores de poluição ambiental, onde *Microcystis*, *Anabaena* e *Aphanizomenon* podem representar o plâncton dominante em ambientes aquáticos (Atlas & Bartha, 1998). A descarga de esgoto ou fertilizantes podem levar à explosões populacionais de cianobactérias, das quais muitas espécies podem produzir neurotoxinas e hepatotoxinas, com conseqüências negativas não só ao equilíbrio ecológico como também à saúde pública (Atlas & Bartha, 1998; Rudi *et al.*, 1998).

2.3 Ecologia e Diversidade Microbianas

A pouco mais de 25 anos, análises sobre a estrutura e dinâmica das comunidades de animais e plantas têm levado nosso conhecimento ecológico, teórico e prático, a níveis cada vez mais elevados. No entanto na ecologia microbiana os estudos encontram-se atrasados, em parte pelas dificuldades das técnicas tradicionais de identificação e enriquecimento, face a alta seletividade dos métodos atuais (Polz & Cavanaugh, 1997). Desta forma, enormes esforços têm sido feitos por ecologistas microbianos, com o intuito de identificar microrganismos em amostras ambientais que não podem ser cultivadas pelos métodos tradicionais (Borneman, 1996). Tais informações são importantes para aumentar nosso entendimento sobre as relações entre

os ciclos dos nutrientes e a estrutura das comunidades bacterianas (Mccaig *et al.*, 2001).

Desde 1992, 142 países ratificaram a Convenção em Diversidade Biológica e concordaram em promover a conservação, utilização sustentável, e o compartilhamento eqüitativo de benefícios da diversidade biológica. Os ambientalistas, o público e políticos reforçaram a necessidade em aprofundar nossa compreensão sobre a diversidade de plantas e espécies animais neste planeta. Microbiologistas tiveram que educar estes mesmos indivíduos sobre o impacto enorme e o papel que os microrganismos têm em nossas vidas diárias, que inclui desde a manutenção da biosfera até o melhoramento do nosso estilo de vida (Hunter-Cevera, 1998).

Da mesma forma, para o completo entendimento do ecossistema aquático e terrestre é fundamental o conhecimento da diversidade, distribuição e função bacteriana devido à sua importância nos processos biogeoquímicos (Felske *et al.*, 1998; Øvreas *et al.*, 1997). Muitos estudos têm rotineiramente mostrado que populações microbianas novas e ainda não caracterizadas dominam os ecossistemas aquáticos. Além disso, mudanças nas relações entre os organismos e no ecossistema como influxo de matéria orgânica ou inorgânica, podem contribuir sensivelmente para alterações nas comunidades microbianas (Atlas & Bartha, 1998; Ford & Colwell, 1998; Hunter-Cevera, 1998; Cho & Kim, 2000; Mccaig *et al.*, 1999).

Análises sobre a diversidade microbiana, onde se examina o número de espécies dentro de uma comunidade e o tamanho destas populações nas comunidades, sofrem com os efeitos das dificuldades das

técnicas de cultivo tradicionais (Hunter-Cevera, 1998, Simpson *et al.*, 2000; Ohkuma & Kudo, 1996; Marteau *et al.*, 2001). Considerando que comunidades microbianas diferem em números e tipos, a proporção de membros individuais de uma comunidade está sujeita a mudanças físicas e químicas do ambiente, como também a mudanças causadas pelas atividades fisiológicas e metabólicas dos microrganismos. Da mesma forma, microrganismos que são abundantes e são cultivados sob certas condições, podem tornar-se dormentes e possivelmente não cultiváveis sob outras condições ambientais (Hunter-Cevera, 1998; Atlas & Bartha, 1998).

A riqueza de espécies é um parâmetro essencial para a delimitação da estrutura e diversidade de uma comunidade. No entanto, a análise destes dois parâmetros têm sido demasiadamente limitada devido aos métodos tradicionais de cultura. Em virtude deste fato, a maior fração dos organismos existentes na natureza aparecem como sendo refratários à cultura em laboratório (Liu *et al.*, 1997, Suzuki *et al.*, 1997). Sabe-se também que o abandono do ambiente original, durante o cultivo, muitas vezes é o bastante para alterar a estrutura da comunidade em razão das novas condições impostas, de forma que a nova constituição da comunidade pode não refletir exatamente a estrutura natural (Hunter-Cevera, 1998; Liu *et al.*, 1997).

2.4 Métodos moleculares na avaliação da diversidade microbiana

Segundo Hunter-Cevera (1998), a ecologia molecular indica que talvez apenas 1 - 10% das espécies microbianas tenham sido isoladas. Comparações feitas com relação à diversidade e quantificação de microrganismos entre métodos de cultivo tradicionais e técnicas moleculares, apontam grande discrepância na composição estrutural das comunidades (Dumbar *et al.*, 1997; Smit *et al.*, 2001), e reforçam a idéia de que a maior fração (de 85 a 99%) dos organismos existentes na natureza não sejam passíveis de cultivo em meios artificiais (Liu *et al.*, 1997). Enquanto que a utilização da metodologia de extração e amplificação do gene para o rDNA, de organismos provenientes de amostras ambientais, indicam que organismos previamente não caracterizados dominam os ecossistemas aquáticos e terrestres (Glöckmer *et al.*, 2000; Polz & Cavanaugh, 1997; Wise *et al.*, 1997; Øvreas *et al.*, 1997). As prováveis explicações para a não acessibilidade da maioria das bactérias da natureza por métodos de cultivo, oscilam entre a presença de células que estejam em estado não cultivável e o desconhecimento dos meios específicos requeridos para o cultivo destas bactérias (Felske *et al.*, 1998;).

Hoje, a adaptação de algumas metodologias moleculares as quais não exigem o isolamento de linhagens têm se tornado bastante populares, sendo freqüentemente utilizadas para detectar e caracterizar bactérias em ambientes naturais (Borneman, 1996; Leff *et al.*, 1995; Mccaig *et al.*, 2001; Muyzer & Ramsing, 1995; Polz & Cavanaugh, 1997; Suzuki *et al.*, 1997; Volossiuk *et al.*, 1995; Dumbar *et al.*, 1999).

Desde que a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi descrita, em 1985, a abrangência de sua aplicação tem expandido enormemente, incluindo: o enriquecimento de fragmentos e seqüenciamento de DNA; as relações entre diferentes espécies de plantas e animais; a geração de sondas moleculares; a detecção de mutações genéticas; o monitoramento ambiental, entre outros (Búa & Porcel, 1994; Ferreira & Grattapaglia, 1995).

A biologia molecular tem provido também metodologias de interesse à ecologia de patógenos do ambiente, responsáveis por muitos problemas de saúde pública. A variedade de ferramentas para identificação e análise de uma ampla variedade de moléculas biológicas, agora existentes, resultam num potencial que substitui ou suplementam as tradicionais técnicas de monitoramento ambiental. Podendo ser precisos tanto para a detecção de organismos patogênicos quanto de indicadores (Ford & Colwel, 1998).

Na década de 1970, foi indicado o rDNA como um importante marcador molecular filogenético e desde então o seqüenciamento nucleotídico e outras técnicas analíticas, em especial baseadas no método de amplificação *in vitro* do DNA (PCR), tem expandido drasticamente e disponibilizado publicamente dados referentes às seqüências do rDNA (Ludwig & Schleifer, 1999). Sua importância como marcador bacteriano baseia-se em sua distribuição universal em todos os organismos celulares, bem como em suas informações espécie-específicas (Felske *et al.*, 1998). Atualmente muitos projetos de genomas microbianos estão provendo marcadores filogenéticos alternativos amplamente aceitos, a partir da subunidade 16S do rDNA. De tal forma, futuras edições do Bergey's Manual of Systematic Bacteriology e The

Prokaryotes baseiam suas respectivas relações filogenéticas entre os microrganismos nas informações contidas no rDNA 16S (Ludwig & Schleifer, 1999). Da mesma forma, informações centralizadas sobre desenho e uso de oligonucleotídeos como sondas e para PCR como “Oligonucleotide Probe Database” ou “Ribossomal Database Project”, encontram-se disponíveis via “World Wide Web” (Alm *et al.*, 1996; Massana *et al.*, 1997).

O acesso à efetiva exploração da microbiologia ambiental e a identificação de organismos não cultiváveis têm se beneficiado pela amplificação de genes de DNA que codificam para o rDNA. Através dos produtos da amplificação é possível estimar a riqueza e homologia de uma comunidade pela determinação do polimorfismo de tamanho de fragmentos de rDNAs. De modo que, este método pode ser empregado para a rápida análise quantitativa do complexo microbiano de uma comunidade (Liu *et al.*, 1997).

De fato, as dificuldades no isolamento e limitações para o cultivo de muitos organismos têm impulsionado a aplicação dos métodos da biologia molecular para o estudo da composição e ecologia microbiana do solo e água. Novas descobertas e estudos adicionais promovem a constante expansão do banco de dados genômicos do rDNA 16S e contribuem significativamente para a identificação e análise filogenética das espécies nas comunidades, bem como para compreender o seu relacionamento fisiológico com o ambiente (Whitby *et al.*, 1999; Gray & Hergwig, 1996)

O desenvolvimento da ecologia microbiana e da biotecnologia, são seriamente dificultadas pela falta de um sistema de identificação confiável. E a dificuldade é ainda maior quando o objetivo é a identificação de bactérias

isoladas de ambientes naturais como solos, lagos ou oceanos (Boivin-Jahns *et al.*, 1995). Conforme Muyzer & Ramsing (1995) o uso de estratégias moleculares que utilizam oligonucleotídeos específicos do rDNA 16S têm permitido que bactérias sejam identificadas onde nunca foram encontradas antes. Outros estudos ressaltam sua importância em investigações de diversidade, abundância e distribuição de microrganismos no ambiente (Barns *et al.*, 1999; Buckley *et al.*, 1998).

Face às restrições que os métodos tradicionais de cultura impõem na análise da composição das populações microbianas, a utilização de técnicas que independam de cultivo, como as que envolvem a total comunidade de DNA seguido de amplificação do rDNA por PCR, têm revelado abundância de microrganismos ainda não cultiváveis em diferentes ambientes (Acinas *et al.*, 1999; Kuske *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1996; Weidner *et al.*, 1996). Como exemplos da versatilidade de tais metodologias pode-se citar seu emprego em pesquisas relativas à identificação e filogenia de diferentes organismos e locais como arqueobactérias no Mar Morto (Arahal *et al.*, 1996), na Antártica (Murray *et al.*, 1998), em sedimentos (Munson *et al.*, 1997), solos de campos de cultivo de arroz (Chin *et al.*, 1999), diversidade de microrganismos no solo da região Amazônica (Borneman & Triplett, 1997), microrganismos não cultiváveis associados a plantas aquáticas (Weidner *et al.*, 1996), como também na quantificação de cianobactérias toxigênicas em amostras de água (Rudi *et al.*, 1998), ou ainda em recentes métodos para a rápida identificação de patógenos em laboratórios de microbiologia clínica de

espécies bacterianas fastidiosa a partir de microcolônias ou diretamente de amostras de pacientes (Kolbert & Persing, 1999).

De acordo com Zheng *et al.* (1996) o rDNA pode ser considerado o mais útil biopolímero para análises filogenéticas comparativas, não só por sua distribuição universal como também por seu alto grau de conservação, e ausência de transferência interespecífica. A metodologia normalmente utilizada para a exploração de microrganismos ambientais baseia-se na amplificação por PCR de genes específicos, a partir de amostras brutas ou eventualmente enriquecidas por cultivo (Liu *et al.*, 1997; Moyer, *et al.*, 1996; Volossiuk *et al.*, 1995). Onde o DNA total da comunidade é isolado e utilizado como molde para a amplificação do rDNA 16S, com oligonucleotídeos universais ou de domínio específicos. Este procedimento normalmente é seguido de clivagem dos produtos amplificados com enzimas de restrição com 4 pares de bases de reconhecimento, técnica conhecida como análise de restrição do rDNA amplificado ou ARDRA (*amplified rDNA restriction analysis*). A análise dos produtos digeridos pode ser feito em gel de agarose ou em gel de poliacrilamida (Liu *et al.*, 1997; Moyer *et al.*, 1996). A análise dos fragmentos de rDNA gerados por ARDRA é rápida e simples, além de não necessitarem o seqüenciamento dos fragmentos amplificados (Weidner *et al.*, 1996). Desta forma permitem extensivos estudos sobre a diversidade microbiana de ecossistemas sem a necessidade de técnicas de cultura-pura (Acinas *et al.*, 1999).

A reação deve ser sensível o bastante para permitir a amplificação de virtualmente todos os genes de rDNA presentes na amostra,

ao mesmo tempo em que possa selecionar um taxon específico dentre os vários presentes. Para tanto, a escolha dos oligonucleotídeos é um parâmetro importante, pois além de promover as ampliações esperadas, a região a ser amplificada deve ter seqüências de nucleotídios com variabilidades suficientes para diferenciar grupos distintos presentes na amostra (Brunk *et al.*, 1996). O polimorfismo no comprimento de fragmentos obtidos da clivagem do rDNA amplificado, será obtido após a digestão dos mesmos com enzimas de restrição, que produzirão fragmentos de tamanhos diferentes, de acordo com a distância entre os sítios de clivagem. Este polimorfismo será influenciado pela quantidade de seqüências de bases reconhecidas e clivadas pela enzima, inserções, deleções ou outros rearranjos que alterem a distância entre pares de sítios de restrição. (Ferreira & Grattapaglia, 1995; Moyer *et al.*, 1996).

Como outra metodologia, o gradiente de gel de eletroforese por desnaturação ou DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), tem sido usado para resolver regiões de genes amplificadas por PCR que codificam para rDNA 16S baseadas simplesmente em diferenças na seqüência de nucleotídios (Øvreas *et al.*, 1997; Muyzer & Ramsing, 1995), onde é aplicada na identificação de variações na seqüência nucleotídica em genes de muitos grupos diferentes de organismos (Muyzer *et al.*, 1993).

Para o estudo de complexos de comunidades microbianas são propostos ainda métodos como o direto isolamento de ribossomos e subsequente purificação de seu rRNA de amostras ambientais (Felske *et al.*, 1996; Felske *et al.*, 1998), a PCR competitiva onde um modelo comparativo e o DNA alvo, com diferentes seqüências, são amplificados na mesma reação

para eliminar influências causadas pelo termociclador ou pela reação de mistura (Felske *et al.*, 1998), o polimorfismo de conformação de fita-única sob condições não desnaturantes, onde DNAs de fita-única formam estruturas secundárias de acordo com a seqüência de nucleotídios e interações intramoleculares. Devido a diferentes mobilidades eletroforéticas, fragmentos de mesmo tamanho mas com diferentes conformações podem ser separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante (Lee *et al.*, 1996; Schwieger & Tebbe, 1998). A análise da heterogeneidade de comprimento pela PCR, onde a discriminação de amplicons originários de diferentes organismos é baseada na variação natural no comprimento do rDNA 16S (Suzuki *et al.*, 1998), bem como a utilização de sondas moleculares grupo-específicas baseadas em seqüências do rDNA 16S (Giovannoni *et al.*, 1988).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos para a realização deste trabalho foram desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS, do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.1 Coleta das amostras

A coleta das amostras de água superficiais foram realizadas nos meses de janeiro e julho de 2001 no arroio Feijó e março e agosto de 2001 no arroio Carvão. Sendo cinco pontos no arroio Feijó, localizado nas divisas dos municípios de Porto Alegre, Viamão e Alvorada e três pontos no Arroio Carvão, afluente de primeira ordem do rio Maquiné, no município de Maquiné, no Rio Grande do Sul. A Figura 1 ilustra a localização geográfica dos dois arroios e os respectivos pontos de coleta, os pontos de 1 a 5 do arroio Feijó e de 1 a 3 do Carvão, podem ser visualizados nas Figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9, respectivamente.

Os pontos de coleta do arroio Feijó estão distribuídos em zonas urbanas, havendo locais onde o ambiente natural está bastante degradado

devido ao acúmulo de lixo, despejo de esgoto sem tratamento prévio e criação de animais. O ponto 5 sendo o mais próximo à nascente, está localizado na base do morro Santana numa área de baixa ocupação residencial sem sinais aparentes de degradação ambiental (acúmulo de lixo, emissão de esgoto residencial ou animal). Os pontos 4, 3, 2 e 1 situam-se em áreas com maior nível de ocupação residencial, onde foram verificados despejo de esgoto não tratado, assim como a presença de criação de porcos (pontos 4 e 1). O ponto 3 encontra-se num afluente canalizado numa região de grande densidade populacional que recebe grande volume de esgoto, o ponto 2 localiza-se adiante da junção dos pontos 3 e 4, enquanto o ponto 1 situa-se próximo à foz, onde o arroio Feijó deságua no rio Gravataí (figura 1 – A). Os pontos do arroio Carvão estão localizados numa área rural, rodeado por uma mata ciliar bastante preservada, onde não há residências próximas, porém eventualmente é rota de deslocamento de gado (figura 1 – B).

Durante a realização das coletas registrou-se temperatura e pH da água, de cada ponto. As amostras foram feitas com auxílio de frascos plásticos de 250 mL estéreis e devidamente identificados com o nome do local, data e ponto de coleta, conforme mostra a Tabela 1. Os frascos foram submersos a uma profundidade de aproximadamente 15 a 30 cm, direcionados no sentido contrário à correnteza e só então abertos. Após foram mantidos sob refrigeração e transportados para o Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde foram retiradas alíquotas para a determinação do número mais provável de coliformes totais e fecais

(NMP) e contagem de heterotróficos. O restante do material foi congelado até o momento da concentração por centrifugação.

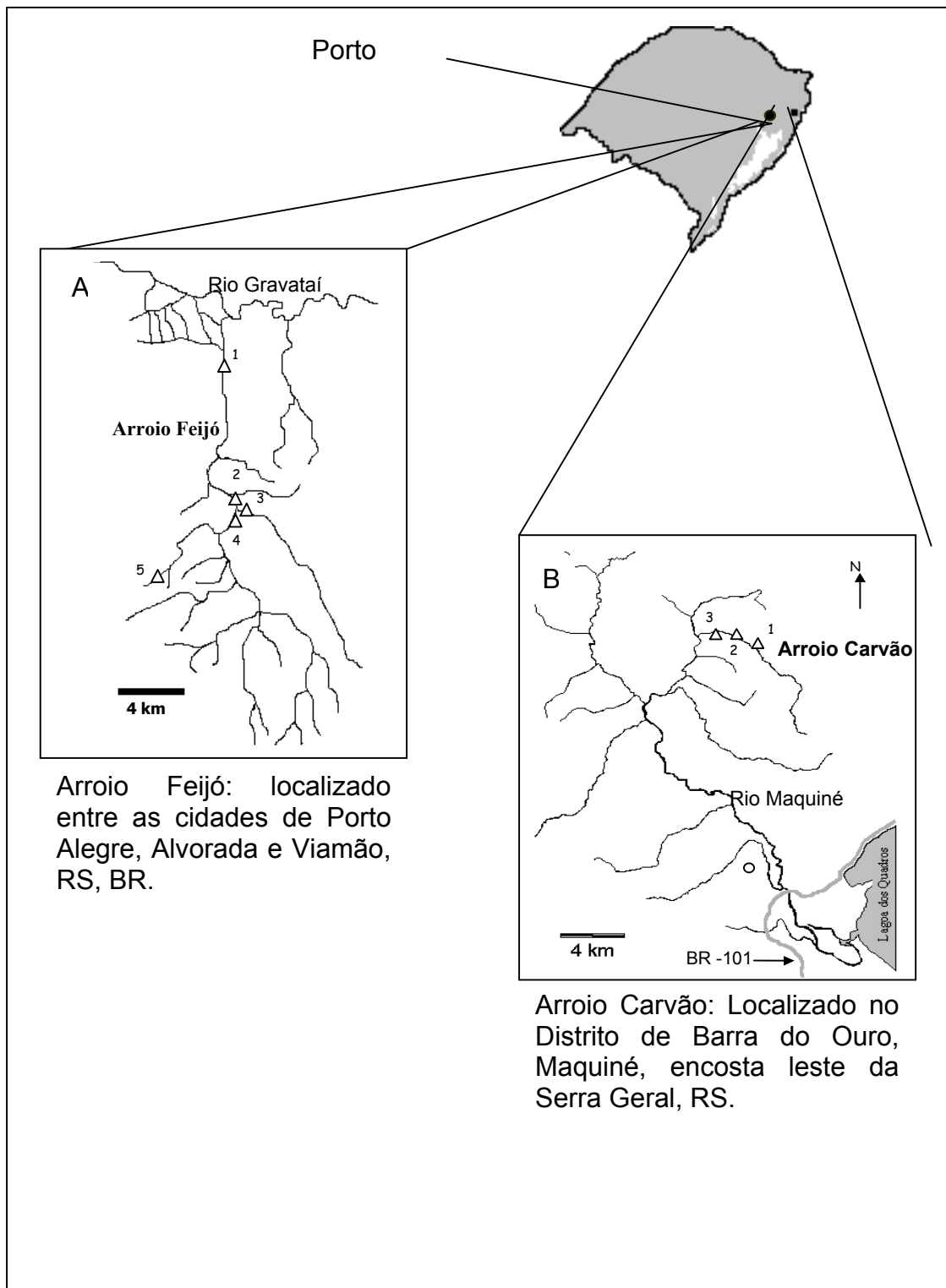


FIGURA 1. Localização dos pontos de coleta dos arroios Feijó (A) e Carvão (B).



FIGURA 2: Vista do ponto 1 do arroio Feijó.



FIGURA 3: Vista do ponto 2 do arroio Feijó.



FIGURA 4: Vista do ponto 3 do arroio Feijó.



FIGURA 5: Vista do ponto 4 do arroio Feijó.



FIGURA 6: Vista do ponto 5 do arroio Feijó.



FIGURA 7: Vista do ponto 1 do arroio Carvão.



FIGURA 8: Vista do ponto 2 do arroio Carvão



FIGURA 9: Vista do ponto 3 do arroio Carvão.

TABELA 1: Datas e pontos de coleta das águas superficiais

Identificação das Amostras	Data de coleta	Local
F1V	09/01/01	arroio Feijó
F2V	09/01/01	arroio Feijó
F3V	09/01/01	arroio Feijó
F4V	09/01/01	arroio Feijó
F5V	09/01/01	arroio Feijó
C1V	06/03/01	arroio Carvão
C2V	06/03/01	arroio Carvão
C3V	06/03/01	arroio Carvão
F1I	09/07/01	arroio Feijó
F2I	09/07/01	arroio Feijó
F3I	09/07/01	arroio Feijó
F4I	09/07/01	arroio Feijó
F5I	09/07/01	arroio Feijó
C1I	08/08/01	arroio Carvão
C2I	08/08/01	arroio Carvão
C3I	08/08/01	arroio Carvão

Os números de 1 a 5 indicam os respectivos pontos de coleta; as letras F e C referem-se aos arroios Feijó e Carvão, respectivamente, bem como I e V referem-se a estações inverno e verão.

3.2 MATERIAIS

Todos os meios de cultura foram preparados de acordo com as recomendações dos fabricantes ou segundo a literatura, enquanto que o preparo das soluções para as extrações de DNA seguiram Sambrook *et al.* (1989) e as concentrações utilizadas para PCR foram de acordo com Liu *et al.* (1997).

Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) - BIOBRÁS®

Ágar Tripticaseína de Soja (TSA) - BIOBRÁS®

R2A – preparado segundo Apha, 1998.

Caldo Verde Brilhante (Bile 2%) - BIOBRÁS®

Caldo Lactosado - BIOBRÁS®

Peptona de Soja - BIOBRÁS®

- Reagentes para biologia molecular

Agarose - GIBCOBRL®

Brometo de etídio - GIBCOBRL®

Acrilamida – USB®

Bisacrilamida (Metilenobisacrilamida) – PHARMACIA BIOTECH®

Persulfato de Amônio (APS) - MERCK®

N, N, N, N – Tetrametil – metileno – diamina (Temed) - PHARMACIA BIOTECH®

Clorofórmio/ álcool isoamílico - MERCK®/ SYNTH®

Dodecilsulfato de sódio (lauril sulfato de sódio) SDS 10% - SYNTH®

EDTA sal dissódico - SYNTH®

Etanol - NUCLEAR®

Fenol/ clorofórmio - REAGEN®/ MERCK®

Isopropanol - NUCLEAR®

Lisozima – PHARMACIA BIOTECH®

Proteinase K 20 mg/mL - GIBCOBRL®

RNAse – PHARMACIA BIOTECH®

Solução de cloreto de sódio (NaCl) 1 Molar - MERCK®

TE 1X

- Reagentes utilizados na PCR

Taq polimerase - GIBCOBRL®, BIOTOOLS®, PROMEGA® e INVITROGEN®

DNA λ - AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH®

Oligonucleotídeos iniciadores - GIBCOBRL®

Solução de cloreto de magnésio 2,5mM - GIBCOBRL®

Solução de dNTPs 2,5mM - AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH®

Tampão *Taq* polimerase 10X - GIBCOBRL®, BIOTOOLS®, PROMEGA® e INVITROGEN®

- Enzimas para clivagens

A/ul (10 U/ μ l) - GIBCOBRL[®]

*R*sal (10 U/ μ l) - GIBCOBRL[®]

Taq I (10 U/ μ l) - GIBCOBRL[®]

Tampões para as enzimas 10X - / μ l) - GIBCOBRL[®]

- Microrganismos utilizadas como controles positivos e negativos nas reações da PCR

As bactérias utilizadas como controles positivos foram *Enterococcus* sp., *E. coli*, *Klebsiella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp. e *Staphylococcus* sp. Como controle negativo para amplificação de eucariotos, foi utilizado o fungo *Metarhizium* sp. Todos os microrganismos utilizados neste trabalho foram provenientes da coleção do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS, do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Determinação de Coliformes Totais e Fecais

O método utilizado para a determinação do índice de coliformes fecais e totais seguiu Apha (1998). Foram feitas 3 diluições (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) a partir de 10 mL de amostra em água peptonada, a seguir adicionou-se 10 mL da diluição 10^{-3} em cinco tubos de ensaio contendo caldo lactosado na

concentração dupla, 1 mL em cinco tubos contendo caldo lactosado na concentração simples e 0,1 mL em cinco tubos contendo caldo lactosado na concentração simples. Os tubos foram incubados a 35°C durante 24-48 horas, sendo a produção de ácido e gás, a partir da fermentação da lactose, considerado resultado presuntivo positivo para bactérias do grupo coliforme.

A seguir efetuou-se a transferência de cada cultura com resultado presuntivo positivo, para tubos contendo caldo verde brilhante bile 2% que foram incubados a 35°C por 24-48 horas. A produção de ácido e gás a foi considerado resultado confirmativo positivo para coliformes totais.

Para a verificar a presença de coliformes fecais foram semeadas, em placas contendo ágar EMB, inóculos dos tubos com resultado confirmativo positivo, que foram incubados a 35°C por 24hs. Colônias características de *E. coli* foram então transferidas para tubos contendo caldo lactosado na concentração simples e incubados a 44,5°C por 24-48 horas. Inóculos de tubos com produção de gás foram submetidos ao teste de oxidase, o qual evidencia a presença da enzima citocromo-oxidase. Sendo considerados coliformes fecais os que obtiveram resultados negativos para o teste. Os índices de NMP/100mL são determinados de acordo com a combinação de resultados positivos e negativos, dos testes feitos para as cinco repetições das diluições 10mL, 1mL e 0,1mL a partir das amostras, que são interpretadas a partir da tabela para coliformes.

3.3.1.1 Contagem de Heterotróficos

A metodologia empregada para a contagem de heterotróficos foi de acordo com Apha (1998). Efetuou-se uma série de três diluições de cada amostra (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), a seguir 1 mL de cada diluição foi plaqueada, em duplicata, pelo método de semeadura em profundidade em ágar R2A e incubada a 35°C por 48-72 horas. Para efeito de registro foram consideradas apenas as placas que produziram de 30 a 300 colônias.

3.3.1.2 Diferenciação entre ambientes aquáticos poluídos de não poluídos

Tomou-se como referência para a determinação de ambientes aquáticos poluídos os padrões de balneabilidade brasileiros, estabelecidos pelo artigo 26 da resolução nº 20 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA): Classe de Qualidade de *Água Doce nº2*, categoria de *águas satisfatórias* para o padrão de balneabilidade. A qual determina que, para águas destinadas à recreação de contato primário (natação e mergulho), a contaminação por coliformes fecais não deverá exceder a 1000 unidades formadoras de colônia (UFC)/100mL.

3.4 Análise através do ARDRA

3.4.1 Extração do DNA total

Neste trabalho, não foi feito enriquecimento prévio das amostras. Para a concentração das células optou-se pelo método de centrifugação, também referido nos trabalhos de Arahall *et al.* (1996), Bond *et al.* (1995), Chin *et al.* (1999), Dang & Lovell (2000), Øvreas *et al.* (1997) e Wise *et al.* (1997). Para tanto utilizou-se tubos estéreis, sendo feitas séries de 50 mL a 3.800 g por 30 minutos mantidas a 4°C, em centrífuga refrigerada de bancada (SIGMA). O precipitado foi ressuspenso e fracionado em alíquotas de 1mL e congelado

até seu processamento. O protocolo de extração foi adaptado de Liu *et al.* (1997), onde a extração do DNA total foi feita utilizando-se três alíquotas de 1 mL que foram concentradas por centrifugação a 20.600 g por 10 minutos. O precipitado foi ressuscitado em 500 µl de TE 1X (10 mM tris, 1 mM EDTA). A seguir foi adicionado lisozima (1,0 mg/L) incubando-se a 37°C por 30 minutos. Após foi acrescentado proteinase K (200µg/mL) e SDS (1%) com incubação a 37°C por 2 horas. Seguiram-se três ciclos de congelamento e descongelamento com posterior adição de cloreto de sódio (0,7M) incubado a 65°C por 20 minutos. O precipitado foi removido por extração com igual volume de fenol/ clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado com 1 volume de isopropanol em temperatura ambiente, seguido de centrifugação por 10 minutos a 15.500 g. O precipitado foi lavado em etanol 70% e seco a temperatura ambiente por 24 horas. Após foi ressuscitado em 50µl de TE 1X e estocado a -20°C para posterior manipulação.

Nos pontos 5 do arroio Feijó e 2 do arroio Carvão, foram testadas duas metodologias adicionais para purificação do DNA extraído. A primeira mediante passagem em coluna *Wizard plus* (PROMEGA®). Na segunda foi adicionado 0,5 volume de acetato de amônio 7,5 M com incubação em gelo por 15 minutos, tendo-se como base os trabalhos de Lee *et al.* (1996) e de Fortin *et al.* (1998) e Marchesi *et al.* (1998). Em ambos os casos o DNA foi posteriormente precipitado, ressuscitado e estocado conforme as condições descritas anteriormente.

3.4.2 Quantificação do DNA total por espectrofotometria

A quantificação do DNA total extraído foi feita por espectrofotômetro (METROLAB). As leituras foram realizadas nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm. A leitura de 260 nm permite calcular a concentração de ácidos nucléicos na amostra, onde a densidade óptica (D.O.) igual a um corresponde, aproximadamente, a 50 µg/mL para DNA de fita dupla. A razão entre a leitura de 260 nm e 280 nm fornece a indicação de pureza do ácido nucléico, sendo os valores entre 1,5 e 1,8 correspondentes a uma preparação pura de DNA.

3.4.3 Diluições do DNA para a aplicação na PCR

As reações de PCR foram feitas a partir das seguintes condições: para as amostras de verão, as extrações provenientes das amostras de água dos pontos de 1 a 4 do arroio Feijó foram diluídas em 6%; o ponto 5 do arroio Feijó e o ponto 2 do arroio Carvão, passadas em coluna *Wizard plus* (PROMEGA®) para a purificação do DNA, foram utilizadas na reação sem diluição. As amostras dos pontos 1 e 3 do arroio Carvão, tratadas com acetato de amônio, foram diluídas a 6%. Para as reações de inverno, quando todas as extrações foram feitas com acetato de amônio, efetuou-se diluições em 6, 30 e 50% para testes posteriores de amplificação.

3.4.4 Amplificação através da PCR do fragmento rDNA 16S

O protocolo utilizado para amplificação foi modificado de Liu *et al.* (1997). Foram testadas enzimas *Taq* polimerase provenientes de quatro fabricantes (BIOTOOLS®, PROMEGA®, GIBCOBRL® e INVITROGEN®). As

condições de amplificação foram testadas a partir de um volume final de 30 µl e após estabelecidas, as reações foram feitas num volume final de 50 µl contendo: Tampão de reação 1X, deoxinucleotídeo trifosfatado na concentração de 2,5 mM (dNTPs) (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH®), 2,5 Mm MgCl₂, oligonucleotídeos iniciadores na concentração de 1µM, 1,5 unidade de *Taq* polimerase, água MilliQ esterilizada, 2 µl de DNA (a quantidade de DNA utilizado por reação, em cada ponto de coleta dos arroios Feijó e Carvão, está apresentada nas tabelas 6 e 7, respectivamente). Foram testados dois controles negativos, um para excluir a possibilidade de amplificação a partir de eucariotos, onde utilizou-se DNA do fungo *Metarhizium* sp, e outro no qual em lugar de DNA foi adicionado 2 µl de água MilliQ esterilizada. A seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados foi:

CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT (5' para 3') – referência 16S RNA 926r

AGA GTT TGA TCC TGG ATA AG (5' para 3') – referência 16S RNA 8f (Liu *et al.*, 1997). O fragmento amplificado esperado corresponde a 918 pb dos 1500 pb, do gene rDNA 16S.

As amplificações foram realizadas em dois termociladores: TECHNE-PROGENE e MJ REASEARCH - MINICYCLER, de acordo com as seguintes condições: 1 ciclo de 3 minutos a 94°C para desnaturação do DNA; 38 ciclos de: 1 minuto a 94°C; 1 minuto a 57°C (para o primeiro aparelho) ou a 56°C (para o segundo) para o anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores; 2 minutos a 72°C e 1 ciclo para extensão final de 5 minutos a 72°C.

3.4.5 Análise dos produtos da PCR em gel de agarose 0,8%

Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese de gel de agarose 0,8% com brometo de etídio (0,5ng/mL). A visualização dos fragmentos foi feita em transiluminador, sob luz ultravioleta. Os géis foram fotografados com auxílio de uma câmara digital (KODAK – DC120).

3.4.6 Clivagem com as enzimas de restrição

Neste estudo foram utilizadas as enzimas de restrição ou endonucleases de restrição de corte freqüente *Alu* I, *Rsa* I e *Taq* I, que reconhecem seqüências palindrômicas de quatro pares de bases.

As enzimas foram utilizadas em 100 µl do produto amplificado. Este foi previamente precipitado com 1/10 do volume com acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol 90%, incubado por 30 minutos a –20°C, seguido de centrifugação a 20.600 g. O precipitado foi lavado em etanol 70% e após secagem a temperatura ambiente, foi ressuscendido em 10 µl de TE 1X.

As reações de clivagem foram realizadas adicionando-se 7 unidades de cada enzima em 10 µl do DNA ressuscendido, 1,5 µl de tampão da enzima e completado um volume final de 20 µl com água MilliQ esterilizada. As reações foram incubadas por 2 horas nas temperaturas recomendadas pelos fabricantes (37°C para as enzimas *Alu*I e *Rsa*I e 65°C para *Taq*I). Todas as reações foram submetidas a uma incubação complementar de 2 horas, sendo adicionadas mais 7 unidades de cada enzima para cada reação.

3.4.7 Análise dos fragmentos após clivagem com as enzimas de restrição

Os fragmentos clivados foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, preparados segundo Sambrook *et al.* (1989) e corados com brometo de etídio. A visualização foi feita em transiluminador, sob luz ultravioleta. As imagens digitalizadas foram analisadas no programa KODAK 1D IMAGE ANALYSIS em microcomputador. Os tamanhos dos fragmentos do DNA clivado, foram determinados tendo-se como padrão os marcadores DNA Lambda clivado com *EcoRI/Hind III* e com *PstI*.

3.4.8 Análise estatística

Toda análise foi realizada pelo programa SPSS (*Statistics package for social science*) . Os dendrogramas foram construídos a partir de uma matriz de similaridade de dados de distância euclidiana utilizando-se o UPGMA (*Unweighted pair-group method using and arithmetic avarage*). O índice de similaridade foi calculado através do índice de Dice.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise bacteriológica da água

4.1.1 Determinação do número mais provável de coliformes fecais e totais

A análise do índice de coliformes, realizada pela técnica do número mais provável (NMP) por fermentação em tubos múltiplos, evidenciou que tanto para as coletas realizadas durante o verão (janeiro) quanto para o inverno (julho) de 2001, os pontos de 1 a 4 do arroio Feijó apresentaram altos níveis de contaminação por coliformes totais e fecais, tendo o ponto 3 superado os demais em contaminação fecal, na coleta de inverno. Os valores referentes aos 4 primeiros pontos de coleta ficaram acima dos limites estabelecidos para balneabilidade de acordo com a Resolução nº 20 do CONAMA. O ponto 5 manteve baixos níveis de contaminação por coliformes

totais e fecais, quando comparado aos demais pontos. Sendo o único ponto do arroio Feijó que apresentou-se abaixo dos limites para balneabilidade, tanto no verão quanto no inverno. Tal resultado era esperado, haja visto que este ponto situa-se próximo a uma das nascentes, sendo um local com baixo nível de ocupação populacional. As comparações podem ser feitas com o auxílio das tabelas 2 e 3. Os altos índices de contaminação fecal verificados nos pontos 1 a 4 do arroio Feijó, tanto no verão quanto no inverno, justificam-se em função destes estarem localizados em áreas onde há emissão de esgotos sem tratamento prévio, assim como criação de animais.

No arroio Carvão, tanto para as coletas realizadas durante o verão (março) quanto no inverno (agosto) de 2001, os três pontos apresentaram índices inferiores aos estabelecidos pelo CONAMA para balneabilidade, tendo o ponto 2 apresentado sempre o menor nível de contaminação por coliformes fecais. As tabelas 4 e 5 apresentam os valores das análises bacteriológicas de verão e inverno, respectivamente, para o arroio Carvão. Os baixos índices de contaminação fecal registrados para o arroio Carvão refletem o melhor estado de preservação ambiental da região onde está localizado, porém verificou-se um aumento no índice de coliformes fecais no inverno em relação ao verão, possivelmente por contaminação animal em função do trânsito de gado.

4.1.2 Contagem de bactérias heterotróficas

Para o arroio Feijó, os resultados da contagem de heterotróficos mostraram distribuição homogênea para os 4 primeiros pontos de coleta,

tanto no verão quanto no inverno, apresentando valores superiores em relação ao ponto 5, a exemplo do que ocorreu com o índice de coliformes (tabelas 2 e 3).

Os dados referentes ao arroio Carvão (tabelas 4 e 5) mostraram uma distribuição semelhante durante as coletas realizadas no verão, enquanto que no inverno, um aumento no número de microrganismos no ponto 1, em relação aos pontos 2 e 3 pode ser observado (tabela 5). Por outro lado, os índices de coliformes demonstraram que estes resultados não tiveram relação com uma maior contaminação fecal nesta coleta, uma vez que o maior índice de coliformes fecais foi observado no ponto 3 (Tabela 5).

A comparação dos resultados da contagem de bactérias heterotróficas e de coliformes totais e fecais do arroio Feijó, revelam um indício de que locais que recebem um maior aporte de substâncias orgânicas (tais como esgoto), apresentam maior quantidade de microrganismos. Resultado encontra concordância com o trabalho de Cho & Kim (2000), onde constataram o aumento na diversidade da comunidade bacteriana em aquíferos em função da contaminação por esterco de gado.

A partir dos resultados elegeu-se o arroio Feijó como ambiente aquático poluído e o Carvão como ambiente aquático não poluído e os dois serviram como modelo nas análises moleculares.

Tabela 2: Dados de coliformes e bactérias heterotróficas dos pontos de coleta situados no arroio Feijó, coleta de verão (janeiro) de 2001

Ponto	pH	Temperatura (°C)	CT (UFC/100mL)	CF (UFC/100mL)	H (UFC/mL)
1	7,5	34	$>1,6 \times 10^6$	$2,8 \times 10^5$	$6,9 \times 10^5$
2	7,0	33	$>1,6 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$	$5,9 \times 10^5$
3	6,5	31	$>1,6 \times 10^6$	$3,5 \times 10^5$	$4,7 \times 10^5$
4	7,0	32	$2,8 \times 10^5$	$2,2 \times 10^4$	$2,1 \times 10^5$
5	5,5	23	$5,0 \times 10^3$	$5,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^3$

CT: Coliformes Totais; CF: Coliformes Fecais; H: Bactérias Heterotróficas

Tabela 3 : Dados de coliformes e bactérias heterotróficas dos pontos de coleta situados no arroio Feijó, coleta de inverno (julho) de 2001

Ponto	pH	Temperatura (°C)	CT (UFC/100mL)	CF (UFC/100mL)	H (UFC/mL)
1	7,5	17	$1,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^4$	$6,2 \times 10^5$
2	7,5	18,5	$3,0 \times 10^5$	$2,6 \times 10^4$	$3,3 \times 10^5$
3	7,5	18	$1,6 \times 10^6$	$3,8 \times 10^5$	$7,6 \times 10^5$
4	7,5	16,5	$2,2 \times 10^5$	$4,0 \times 10^4$	$1,9 \times 10^5$
5	6,5	17	$3,0 \times 10^2$	20	$1,0 \times 10^3$

CT: Coliformes Totais; CF: Coliformes Fecais; H: Bactérias Heterotróficas

Tabela 4: Dados de coliformes e bactérias heterotróficas dos pontos de coleta situados no arroio Carvão, coleta de verão (março) de 2001

Ponto	pH	Temperatura (°C)	TC (UFC/100mL)	CF (UFC/100mL)	H (UFC/mL)
1	7,7	22	$1,6 \times 10^3$	26	$3,5 \times 10^3$

2	7,9	22	$1,6 \times 10^3$	7	$3,9 \times 10^3$
3	7,9	22	$1,6 \times 10^3$	12	$4,1 \times 10^3$

CT: Coliformes Totais; CF: Coliformes Fecais; H: Bactérias Heterotróficas

Tabela 5: Dados de coliformes e bactérias heterotróficas dos pontos de coleta situados no arroio Carvão, coleta de inverno (agosto) de 2001

Ponto	pH	Temperatura (°C)	CT (UFC/100mL)	CF (UFC/100mL)	H (UFC/mL)
1	5,5	16	$1,6 \times 10^3$	$1,7 \times 10^2$	$1,7 \times 10^4$
2	5,5	16	$5,0 \times 10^2$	80	$2,7 \times 10^3$
3	5,5	16,5	$9,0 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$

CT: Coliformes Totais; CF: Coliformes Fecais; H: Bactérias Heterotróficas

4.2. Análise molecular

4.2.1 Extração do DNA total

Os resultados obtidos após a análise em espectrofotômetro, revelaram uma grande variação na concentração de DNA extraído das amostras provenientes do arroio Feijó, tanto para as coletas de verão quanto de inverno, com exceção aos pontos 3 e 5 onde observou-se uma certa

constância (Tabela 6). Por outro lado as amostras do arroio Carvão esta variação foi bastante inferior (Tabela 7).

A diminuição da quantidade de DNA extraída das amostras de inverno nos pontos 1, 2 e 4 do arroio Feijó em relação ao verão, possivelmente deva ter ocorrido devido a presença de inibidores que influenciaram a eficiência do processo de extração, uma vez que o número de bactérias heterotróficas esteve muito próxima nas duas épocas de coleta (tabelas 2 e 3).

Tabela 6. Concentração de DNA extraído das amostras dos 5 pontos de coleta do arroio Feijó, obtidos através de espectrofotometria.

Pontos de Coleta	Coletas de Verão (ng/ μ l)	Coletas de Inverno (ng/ μ l)
1	230	80
2	330	50
3	390	300
4	362	60
5	30	50

Tabela 7. Concentração de DNA extraído das amostras dos 3 pontos de coleta do arroio Carvão, obtidos através de espectrofotometria.

Pontos de Coleta	Coletas de Verão (ng/ μ l)	Coletas de Inverno (ng/ μ l)
------------------	--------------------------------	----------------------------------

1	100	60
2	40	70
3	60	70

4.2.2 Preparação do DNA para a PCR

Durante os primeiros ensaios da PCR, somente foi visualizada amplificação dos pontos 1 a 4 do arroio Feijó (provenientes das coletas de verão) e dos controles positivos. Esta observação nos permitiu concluir que a não amplificação dos demais pontos de coleta foram, possivelmente, devido a presença de contaminantes provenientes da matéria orgânica em decomposição, como ácidos húmicos (Tavares *et al.*, 1996). Estes elementos são reconhecidos como fortes inibidores da PCR e podem ser co-extraídos com os ácidos nucleicos (Jacobsen, 1995; Kreader, 1996; Lee *et al.*, 1996; Sorci *et al.*, 1999; Wintzingerode *et al.*, 1997)

Várias metodologias são propostas para a remoção de substâncias húmicas ou para evitar seu efeito inibidor, durante ou após o processo de extração. Volossiuk *et al.* (1995) trabalhando com extração direta de amostras de solo, diluíram o DNA extraído em 50 vezes para evitar estas substâncias inibidoras, apontando a diluição como uma estratégia eficiente para se evitar a ação inibidora de contaminantes. Trabalhos como os de Lee *et al.* (1996) e Fortin *et al.* (1998) apontam o tratamento com 1,5 e 7,5M de

acetato de amônio durante a extração para a precipitação de proteínas e ácidos húmicos. Outros autores referem tratamentos com BSA (*Bovine Serum Albumin*) ou CTAB (*Cetyltrimethyl Ammonium Bromide*), como métodos para evitar a ação dos contaminantes (Kreader, 1996; Sorci *et al.*, 1999; Volossiuok *et al.*, 1995; Wintzingerode *et al.*, 1997). A passagem do DNA extraído em colunas *Sephadex* ou utilização de kits de purificação (Borneman *et al.*, 1996; Cho & Kim, 2000; Dumbar *et al.*, 2001), também são alternativas de purificação.

Neste trabalho foram testadas duas metodologias, a primeira em que foi adicionado o acetato de amônio após a incubação com SDS e proteinase K e a segunda através da passagem do DNA extraído em coluna Wizard plus (PROMEGA®). Como resultado observou-se amplificação das amostras passadas em coluna, sem a necessidade de diluição. Porém para obtermos amplificação das amostras submetidas ao tratamento com acetato de amônio, foi necessária repetir a extração com fenol/ clorofórmio/álcool isoamílico, bem como diluir as amostras em 50 ou 6%. De modo que todas as demais extrações foram feitas utilizando-se tratamento com acetato de amônio, seguido de duas extrações com fenol/ clorofórmio/álcool isoamílico e preparação de alíquotas com diluições de 50 e 6%.

Os resultados das amplificações obtidas a partir das amostras de verão, não foram repetidos com a mesma eficiência entre as amostras de inverno. Apesar de ter sido observado amplificação nas amostras de todos os pontos de coleta, algumas reações não apresentaram-se reproduzíveis durante todas as reações necessárias, de modo que a quantidade de produto da PCR para

estes pontos não foi suficiente para que se pudesse realizar as clivagens. Resultados satisfatórios e constantes, só foram observados para os pontos 1, 3 e 4 do arroio Feijó e para o ponto 3 do arroio Carvão (dados não mostrados).

Algumas possíveis causas para a dificuldade de amplificação das amostras ambientais de inverno, podem estar relacionadas ao tamanho do fragmento a ser amplificado, de aproximadamente 918 pb. Suzuki & Giovannoni (1996) observaram em seu trabalho a maior eficiência na amplificação, ao utilizarem um par de oligonucleotídeos iniciadores que produziam um fragmento de aproximadamente 311 pb, em relação a um outro que gerava um fragmento de aproximadamente 887 pb. Os mesmos sugerem que a *Taq* DNA polimerase possa não ser muito eficiente na amplificação de fragmentos longos. Os autores ressaltam ainda o fato de que longas moléculas de DNA reconhecem fitas complementares numa taxa mais elevada do que fitas menores, assim o reanelamento do DNA ocorreria com maior frequência que a reação com os oligonucleotídeos.

Entre outros fatores que possam ter influenciado na eficiência e reprodutibilidade da PCR, pode-se citar a propensão de fitas-simples do rDNA 16S amplificado em formarem estruturas secundárias durante a extensão do produto, conforme relatam Polz & Cavanaugh (1998) e Suzuki & Giovannoni (1996). Da mesma forma o conteúdo genômico de G+C pode variar amplamente entre populações microbianas, podendo influenciar nos processos de desnaturação das fitas de DNA molde e de hibridização com oligonucleotídeos iniciadores degenerados. Outro fator que deve ser levado em consideração é a baixa concentração de DNA molde nas amostras de

inverno, o que é referido por Polz & Cavanaugh (1998), onde relatam a falta de reprodutibilidade em testes realizados em reações com baixas concentrações de DNA molde.

4.2.3 Condições de amplificação

Objetivando-se ajustar as condições de reação da PCR, foram testadas diferentes concentrações de cloreto de magnésio (1,5mM, 2mM, 2,5mM e 3mM), onde os melhores resultados foram obtidos com 2,5mM de MgCl₂. Visando aumentar a concentração de produto amplificado, foram estendidos os tempos de desnaturação e de anelamento, bem como o número de ciclos estabelecidos por Liu *et al.* (1997). Tendo-se atingido os melhores resultados com 38 ciclos e tempos de desnaturação e de anelamento de 1 minuto, com extensão final de 5 minutos. Durante o desenvolvimento do trabalho observou-se que enzimas *Taq* polimerase provenientes de diferentes fabricantes podem requerer pequenos ajustes na concentração de cloreto de magnésio e na temperatura de anelamento. Também foi observado a amplificação do controle negativo (isento de DNA) quando utilizada a enzima da marca BIOTOOLS®. Devido à dificuldade de eliminação do contaminante, sugerimos que a origem do mesmo tenha sido resultante da copurificação de ácido nucléico durante o processo de produção da enzima. Como a enzima utilizada foi expressada como uma proteína recombinante em *E. coli*, esta pode ser origem da contaminação por DNA, como resultado da purificação incompleta da enzima, durante sua extração. Esta contaminação já foi referida nos trabalhos de

Wintzingerode *et al.* (1997) e Corless *et al.* (2000), neste último constam algumas estratégias para superar o problema, como tratamento por meios físico, químico e enzimático (não experimentados neste trabalho).

No entanto a amplificação do controle negativo pôde ser eliminada por meio da diminuição da concentração de enzima aplicada na reação ou com a diminuição do número de ciclos. Porém observou-se a conseqüente diminuição da eficiência da reação, optou-se assim pela troca do fabricante da enzima.

Em testes posteriores foram utilizadas enzimas dos fabricantes PROMEGA[®], GIBCO BRL[®] e INVITROGEN[®]. Nestas não foram constatadas amplificação do controle negativo, sendo assim, utilizou-se a segunda e terceira marcas para as demais reações. Sob as condições de amplificação descritas em materiais e métodos.

Com relação aos termocicladores utilizados, constatou-se a necessidade de redução em 1°C da temperatura de anelamento quando utilizado o aparelho MJ RESEARCH – MINICYCLER. Possivelmente a diminuição da temperatura deveu-se a utilização, neste equipamento, de tubos Eppendorf de 200 µl os quais além do menor volume, apresentam também uma espessura menor dos que os de 500 µl utilizados no aparelho TECHNE – PROGENE. O que sugere uma melhor distribuição da temperatura, facilitando assim o anelamento dos oligonucleotídeos aos sítios do DNA molde. Não foi observada diferença na especificidade ou na eficiência das reações, quando estas foram realizadas sob aquecimento apenas na região inferior do tubo ou nas regiões inferior e superior. Optou-se no entanto pela última por não haver

a necessidade de aplicação de óleo mineral à reação. A figura 10 mostra o resultado da amplificação do segmento de aproximadamente 918pb do gene rDNA 16S a partir de extrações de DNA total dos isolados utilizados como controles positivos: *Escherichia coli* e *L. monocytogenes*, e dos pontos de coleta F1V, F3V, C2V, C3V, C3I, F1I, F3I, do fungo utilizado como controle negativo para amplificação de eucariotos: *Metarhizium* sp. e do controle negativo isento de DNA .

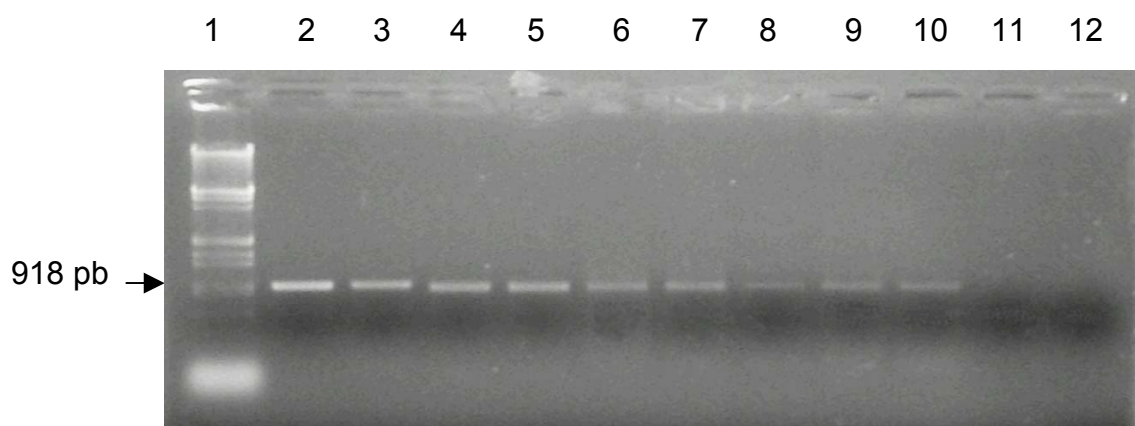
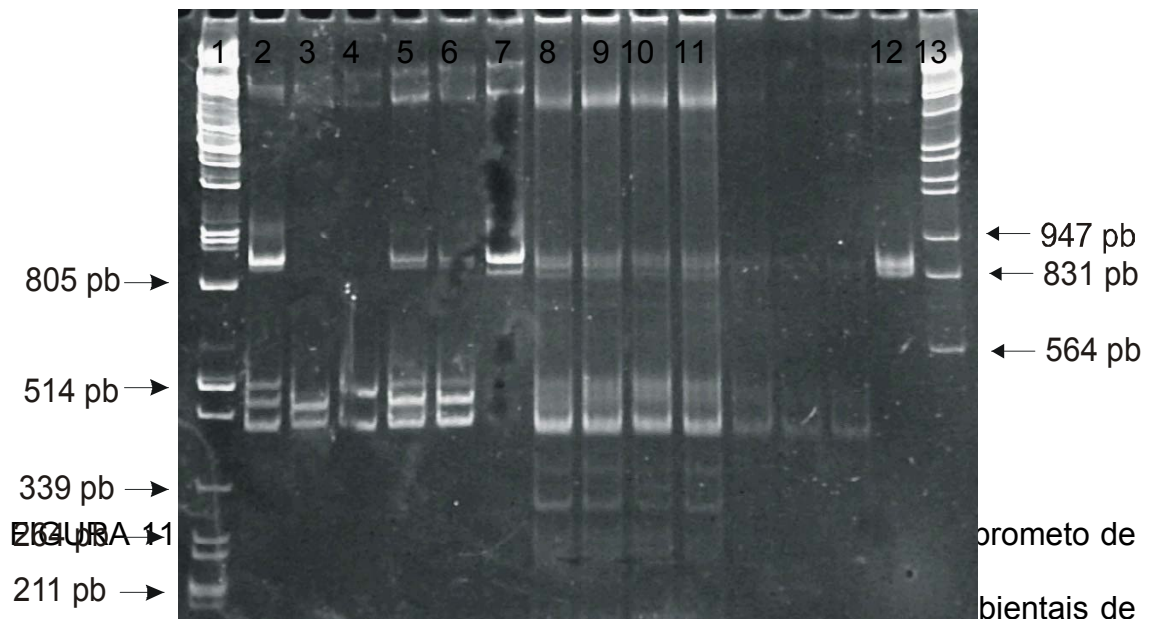


FIGURA 10. Eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio com os resultados da amplificação do segmento de aproximadamente 918 pb do rDNA 16S. (1) marcador λ *Hind* III e *Eco*RI; (2) *Escherichia coli*; (3) *L. monocytogenes*; (4) F1V; (5) F3V; (6) C2V; (7) C3V; (8) C3I; (9) F1I; (10) F3I; (11) *Metarhizium* sp., controle negativo; (12) controle negativo isento de DNA.

4.2.4 Clivagem com enzimas de restrição

Os resultados obtidos com as clivagens a partir dos produtos da PCR, utilizando a enzima *Rsa* I podem ser observados nas figuras 11, 12 e 13, e com *Taq* I nas figuras 14 e 15. A análise das amostras ambientais clivadas com a enzima *Alu* I não foi possível devido à degradação do DNA, verificada após o tratamento enzimático.



verão e dos padrões com a enzima de restrição *Rsa* I. 1) marcador λ *Pst* I, 2) *Salmonella* sp.; 3) *L. monocytogenes*; 4) *Staphylococcus* sp.; 5) *E. coli*; 6) *Shigella* sp.; 7) *Enterococcus* sp. (não clivado); 8) F1V; 9) F2V; 10) F3V; 11) F4V; 12) C3V (não clivado); 13) marcador λ *Hind* III e *EcoR* I

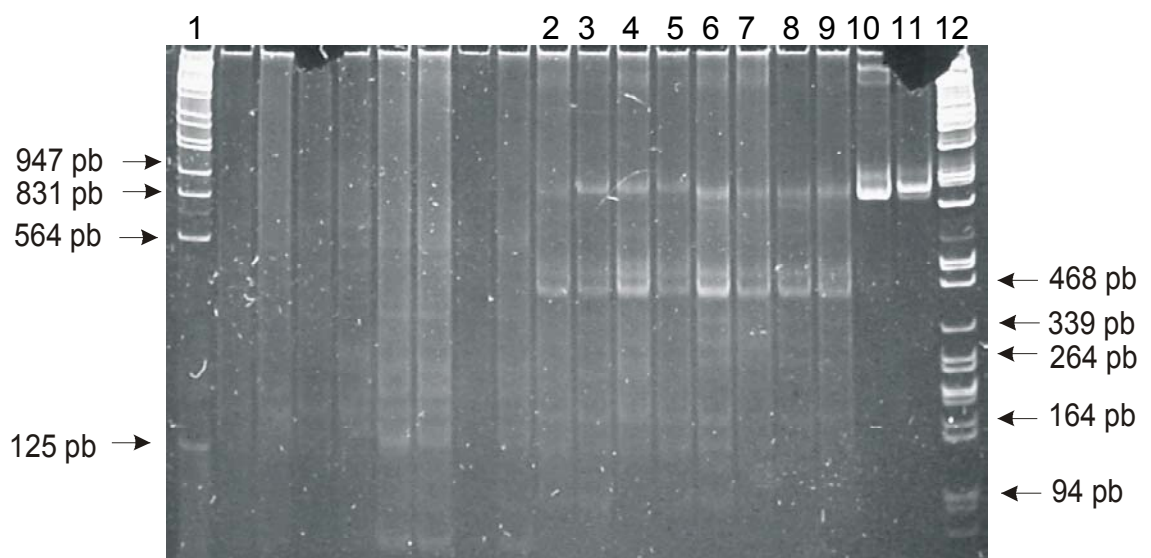


FIGURA 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídio, com o resultado da clivagem das amostras ambientais de verão e inverno e dos padrões com a enzima de restrição *Rsa*I. 1) marcador λ / *Hind*III e *Eco*RI; 2) C3I; 3) F4I; 4) F3I. 5) F1I; 6) C3V; 7) C2V; 8) C1V; 9) F5V; 10) *Klebsiella* sp. (não clivado); 11) *Enterococcus* sp. (não clivado); 12) marcador λ / *Pst* I

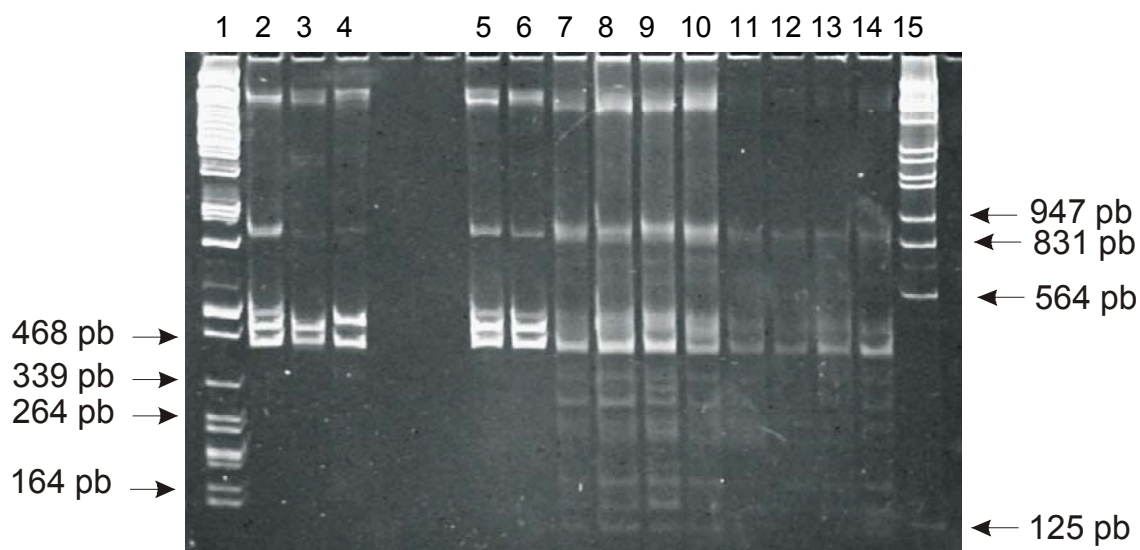


FIGURA 13. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídio, com o resultado da clivagem das amostras ambientais de verão e dos padrões com a enzima de restrição *Rsa*I. 1) marcador λ / *Pst* I; 2) *Salmonella* sp.; 3) *Listeria monocytogenes*; 4) *Staphylococcus* sp.; 5) *E. coli*; 6) *Shigella* sp.; 7) F1V; 8) F2V; 9) F3V; 10) F4V; 11) F5V; 12) C1V; 13) C2V; 14) C3V; 15) marcador λ / *Hind* III e *Eco*R I.

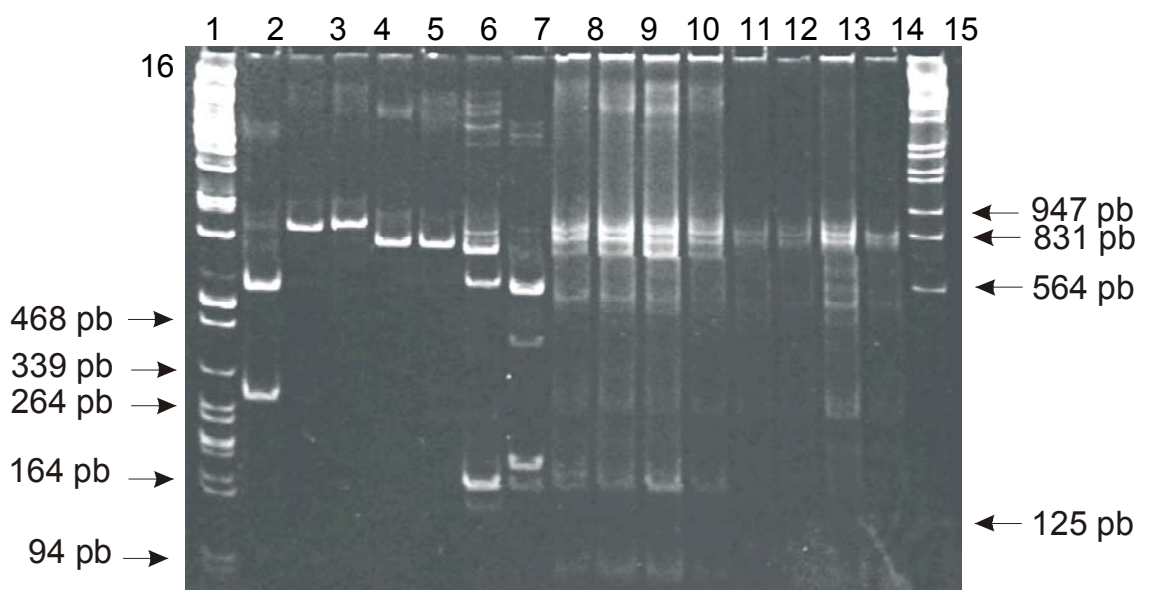


FIGURA 14. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídio, com o resultado da clivagem das amostras ambientais de verão e dos padrões com a enzima de restrição *Taq* I. 1) marcador λ *Pst* I; 2) *Salmonella* sp.; 3) *L. monocytogenes* (não clivado); 4) *Staphylococcus* sp. (não clivado); 5) *E. coli*; 6) *Shigella* sp.; 7) *Enterococcus* sp.; 8) *Klebsiella* sp. 9) F1V; 10) F2V; 11) F3V; 12) F4V; 13) F5V; 14) C1V; 15) C2V; 16) C3V; 17) marcador λ *Hind* III e *EcoR* I.

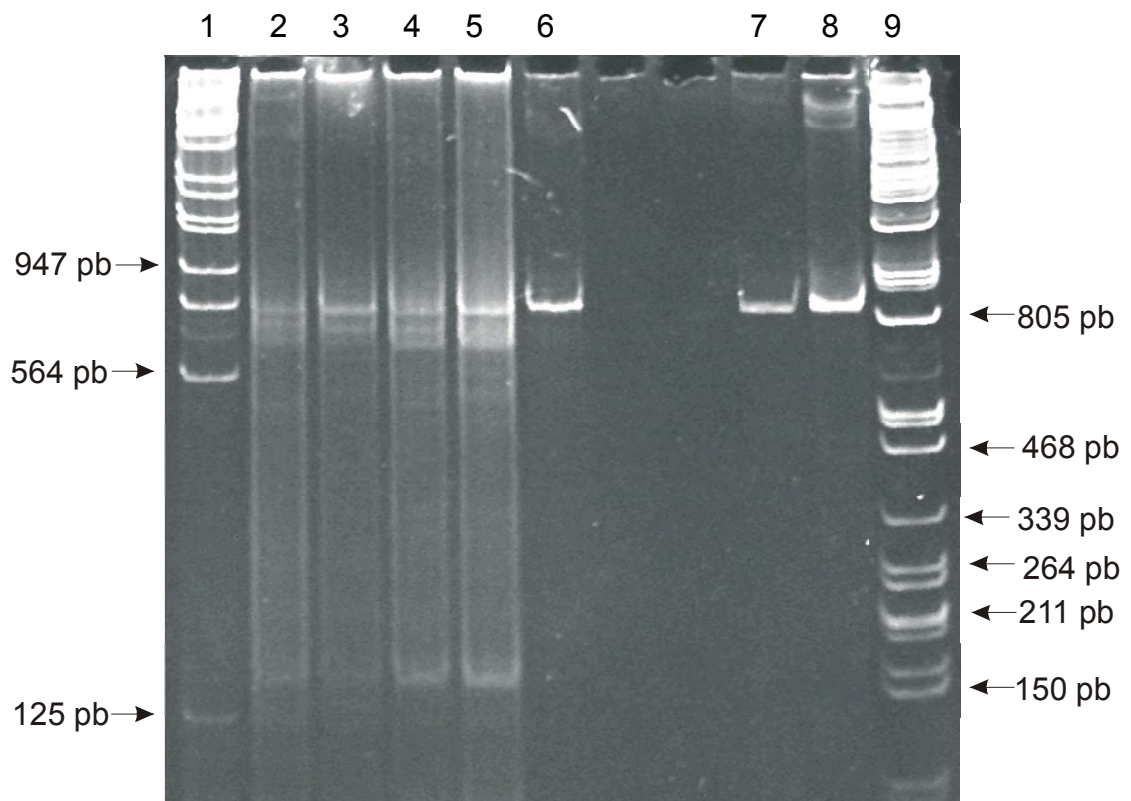


FIGURA 15. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídio, com o resultado da clivagem das amostras ambientais de inverno e dos padrões com as enzimas de restrição *Taq* I (canaletas 2 a 7) e *Alu* I (canaleta 8). 1) marcador λ / *Hind* III e *EcoR* I; 2) C3I; 3) F4I; 4) F3I; 5) F1I; 6) *Staphylococcus* sp. (não clivado); 7) *L. monocytogenes* (não clivado); 8) *Klebsiella* sp. (não clivado); 9) marcador λ / *Pst* I.

A análise dos tamanhos dos fragmentos de clivagem obtidos a partir do DNA de bactérias revelou que, com exceção aos produtos obtidos de *L. monocytogenes* e *Staphylococcus* sp. clivados com a enzima *RsaI*, ocorreram clivagens parciais em todas as demais culturas, com todas as enzimas utilizadas. Esta constatação indica que clivagens parciais possivelmente ocorreram também com as amostras ambientais testadas.

Fatores que podem distorcer os padrões de clivagem são referidos em trabalhos como o de Cho & Kim (2000) onde relatam que a tipagem de produtos de clivagem pode ser influenciada, entre outros fatores, pela eficiência e seletividade na extração do DNA, bem como pela formação de artefatos durante a PCR. Wintzingerode *et al.* (1997) e Waterhouse & Glover (1993), sugerem que polissacarídeos como peptidoglicano permanecem ligados ao DNA, mesmo após tratamentos com fenol-clorofórmio ou altas concentrações de sais. Estas moléculas teriam influência sobre a eficiência de algumas enzimas de restrição, impedindo o acesso destas a certos sítios de clivagem. Waterhouse & Glover (1993) fizeram suas observações trabalhando com rDNA 16S de *Bacillus subtilis*, bactéria Gram-positiva. Apesar de terem sido constatadas clivagens parciais tanto com bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, foi verificado uma dificuldade maior de clivagem nas reações que envolveram as primeiras, uma vez que não foi possível a clivagem de *Enterococcus* sp. com *RsaI* (figura 11) e de *Staphylococcus* sp. com *TaqI* (figura 14).

Suzuki *et al.* (1998) comentam sobre a heterogeneidade no tamanho de moléculas amplificadas devido a inserções e deleções em regiões variadas do genoma. Enquanto Farrelly *et al.* (1995) advertem que diferenças em número e tipos de *operons rrn* têm sido detectadas em espécies muito proximamente relacionadas e até mesmo em linhagens de uma mesma espécie. No trabalho de Nüsslein & Tiedje (1998) onde houve amplificação de mais de um fragmento em produtos de PCR obtidos de algumas cepas devido, segundo os autores a heterogeneidade destes *operons*. Desta forma variações que tenham vindo a afetar sítios de clivagem das enzimas, podem ter ocasionado distorções nos resultados das digestões enzimáticas.

Pode-se considerar ainda como origem de fragmentos visualizados nos géis de poliacrilamida, possíveis contaminações com DNA plasmidial co-extraído com o DNA cromossomal, assim como ampliações inespecíficas ou artefatos que não foram visualizados em gel de agarose durante a otimização da PCR.

Apesar da constatação de clivagens parciais e da possível formação de artefatos durante a PCR, houve uma diferenciação molecular entre os arroios Feijó e Carvão, nos géis pode-se observar padrões distintos eles (figuras 11, 12, 13, 14, 15). Para uma melhor análise optou-se por agrupar os dados em gráficos, onde foram inseridos os valores dos tamanhos de fragmentos obtidos e o número de pontos de coleta de cada arroio onde foram observados. Observa-se para todas as enzimas utilizadas a presença de fragmentos únicos provenientes tanto das amostras do arroio Feijó quando do Carvão (figuras 16,17,18 e 19).

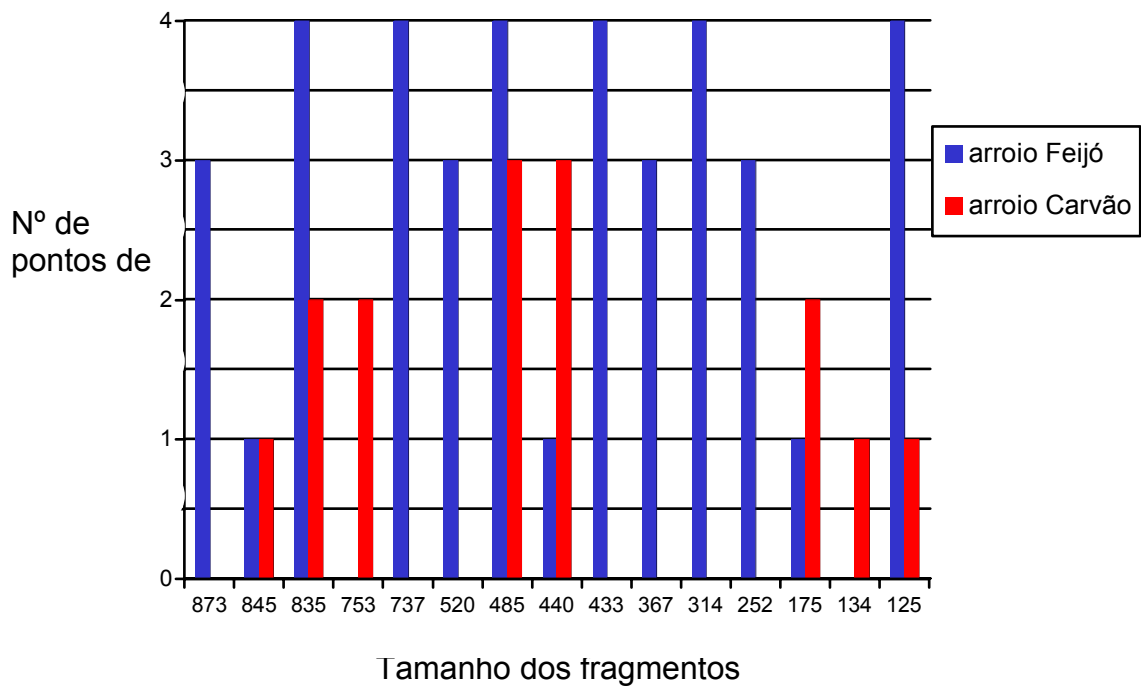


FIGURA 16. Ocorrência de fragmentos em relação ao número total de pontos de coleta, a partir da clivagem das amostras de verão com a enzima *RsaI*, no eixo do y número de pontos de coleta onde foram observados os fragmentos e no eixo do x tamanho dos fragmentos observados.

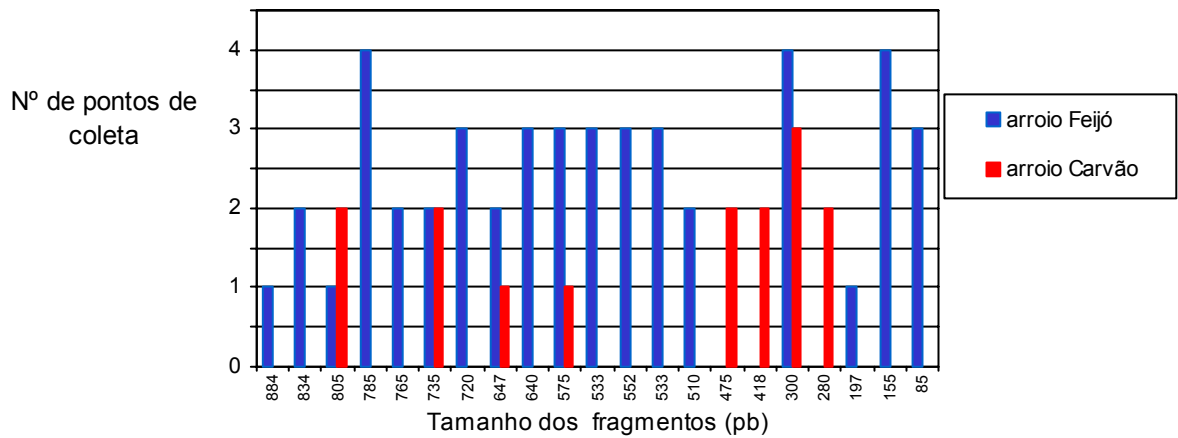


FIGURA 17. Ocorrência de fragmentos em relação ao número total de pontos de coleta, a partir da clivagem das amostras de verão com a enzima *TaqI*, no eixo do y número de pontos de coleta onde foram observados os fragmentos e no eixo do x tamanho dos fragmentos observados.

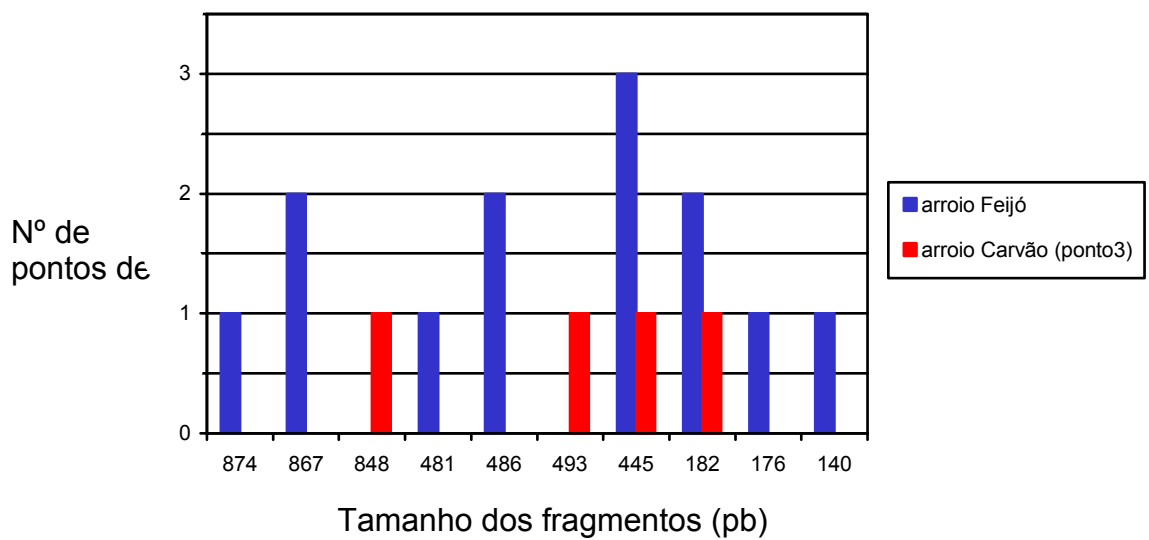


FIGURA 18. Ocorrência de fragmentos em relação ao número total de pontos de coleta, a partir da clivagem das amostras de inverno com a enzima *Rsal*, no eixo do y número de pontos de coleta onde foram observados os fragmentos e no eixo do x tamanho dos fragmentos observados.

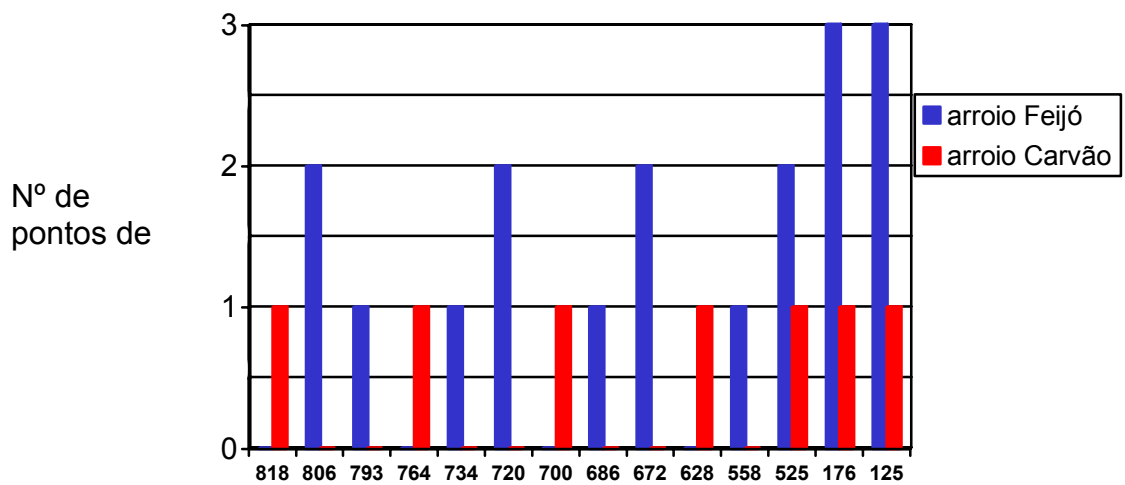


FIGURA 19. Ocorrência de fragmentos em relação ao número total de pontos de coleta, a partir da clivagem das amostras de inverno com a enzima *TaqI*, no eixo do y número de pontos de coleta onde foram observados os fragmentos e no eixo do x tamanho dos fragmentos observados.

Através dos gráficos referentes às clivagens com *Rsal* e *TaqI* das amostras de verão e inverno, constatou-se que houveram padrões de fragmentos distintos tanto para o arroio Feijó (figuras 16 e 18) quanto para o Carvão (figuras 17 e 19). Pela análise das figuras pode-se observar uma maior riqueza de fragmentos obtidos das amostras de verão, quando apesar terem sido feitas a partir de um maior número de pontos de coleta que no inverno, nos permite afirmar que houve uma mudança sazonal na composição das comunidades dos dois ambientes, principalmente nas clivagens com *Rsal*. Desta forma, indicamos a enzima *Rsal* como mais eficiente na distinção entre os modelos de ambientes aquáticos poluídos e não poluídos utilizados neste trabalho.

Pode-se constatar também um maior número de fragmentos nas amostras oriundas do arroio Feijó, o que pode refletir uma maior diversidade na composição das comunidades bacterianas, visto que neste arroio foram registrados índices de bactérias heterotróficas superiores ao Carvão (tabelas 2, 3, 4 e 5). Por outro lado, a amplificação pode ter sido mais eficiente para as bactérias presentes neste ambiente, uma vez que os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados a partir de *E. coli* e este arroio apresenta maior contaminação de bactérias relacionadas a poluição de origem fecal do que o Carvão (tabelas 2, 3, 4 e 5).

4.2.5 Análise filogenética

Foram construídos dendrogramas para cada enzima testada, onde foram analisadas em conjunto as distâncias Euclidianas e o grau de similaridade entre os diferentes pontos de coleta dos arroios Carvão e Feijó.

Na figura 20 , estão representados os agrupamentos das amostras de verão, feitos a partir da clivagem com a enzima *Rsal*. Neste dendrograma podemos observar a formação de dois grandes grupos onde houve uma separação entre os pontos de maior contaminação fecal (F1V, F2V, F3V e F4V) daqueles de menor contaminação (C1V, C2V, C3V e F5V). Numa análise mais apurada podemos subdividir os grupos maiores em quatro grupos menores, um com os pontos F2V e F3V com um índice de similaridade de 0,95; outro com os pontos F1V e F4V com índice de similaridade de 0,62; outro com os pontos C1V e F5V com índice de similaridade de 0,75 e um último grupo que reúne os pontos C2V e C3V com índice de similaridade de 0,2. Comparando-se os índices de similaridade do ponto F5V aos pontos do arroio Carvão observou-se uma variação de 0,75 a 0,28, enquanto que comparado aos demais pontos do arroio de origem esta variação foi de no máximo 0,18. Portanto, a partir da clivagem das amostras de verão com a enzima *Rsal*, verificou-se uma distinção filogenética entre os pontos com menores índices de contaminação fecal (pontos 1 a 3 do arroio Carvão e ponto 5 do Feijó) daqueles em que estes índices são mais elevados (pontos 1 a 4 do arroio Feijó).

A análise da figura 21, verifica-se que, após a clivagem das amostras de verão com a enzima *TaqI* observa-se a formação de quatro agrupamentos. Existe uma tendência de agrupamentos distintos entre os pontos de cada arroio, onde os pontos F1V e F2V apresentam índice de similaridade de 0,44 e os pontos F3V e F4V de 0,77. Enquanto que os pontos C2V e C3V têm como índice 0,66. No entanto os pontos C1V e F5V apresentaram baixa similaridade em relação aos demais pontos de seus respectivos arroios de origem, formado um grupo distinto com índice de similaridade de 0,33. Para a enzima *TaqI*, apesar de haver pequenos agrupamentos entre pontos com alta contaminação fecal e outros com pontos de menor contaminação, não houve uma distinção clara entre os modelos ambientais utilizados.

Com relação às análises de inverno feitos a partir da clivagem com *RsaI* (figura 22), formam-se três agrupamentos, onde pode-se observar o distanciamento entre o ponto C3I (único representante do arroio Carvão), dos pontos F1I, F3I e F4I. Os resultados indicam ainda uma variação sazonal nas comunidades do ponto F1 em relação ao F3 e F4, verificada pelos índices de similaridade quando comparados os agrupamentos referentes às clivagens de verão e inverno. No verão o ponto F1 apresentou um índice de similaridade de 0,63 com o ponto F3 e de 0,62 com o F4, no inverno este índice aumentou para 0,66 em relação ao F3 e baixou para 0,5 em relação ao F4. Entretanto, o índice de similaridade entre os pontos 3 e 4 praticamente não variou (0,58 no verão para 0,57 no inverno).

No dendrograma representado na figura 23 podem ser examinados os resultados das clivagens de inverno das amostras ambientais com a enzima

Taql. Entre os três agrupamentos observados, constatou-se a formação de um grupo distinto onde estão reunidas apenas os pontos do arroio Feijó, havendo portanto uma distinção entre os dois modelos utilizados. Esta constatação é prejudicada face a amplificação de apenas um ponto do arroio Carvão, o que dá pouco suporte à comparação. Também foi observado uma alteração sazonal entre os pontos do arroio Feijó, onde houve uma variação nos índices de similaridade entre os pontos F1 e F3 de 0,23 no verão para 0,4 no inverno, entre o F1 e F4 de 0,21 no verão para nenhuma no inverno e entre F3 e F4 de 0,77 no verão para 0,4 no inverno.

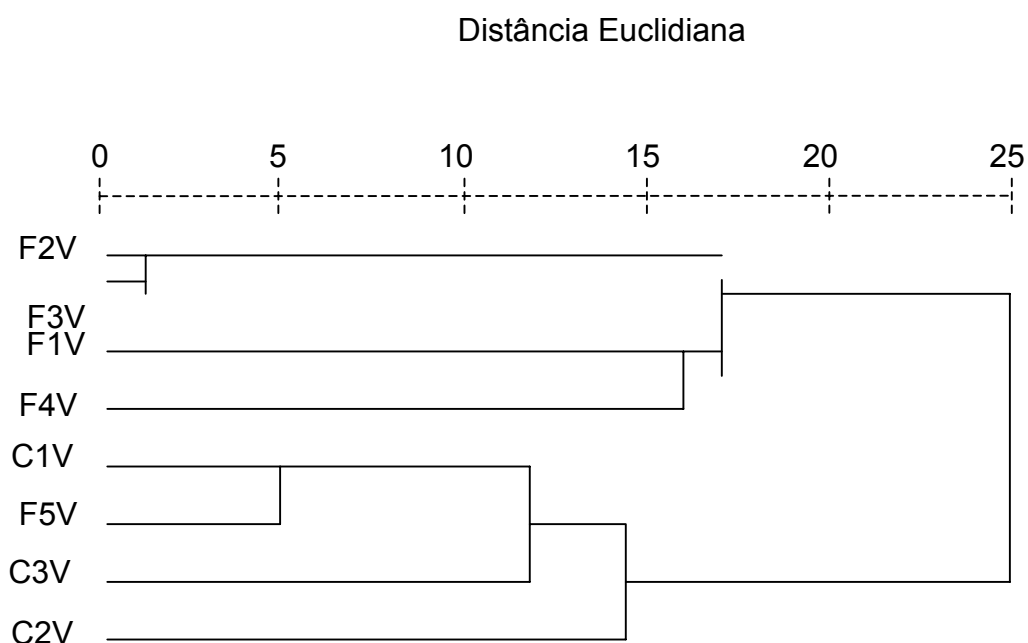


FIGURA 20. Dendrograma da análise do rDNA 16S clivado com *RsaI*, das amostras de verão dos arroios Feijó e Carvão.

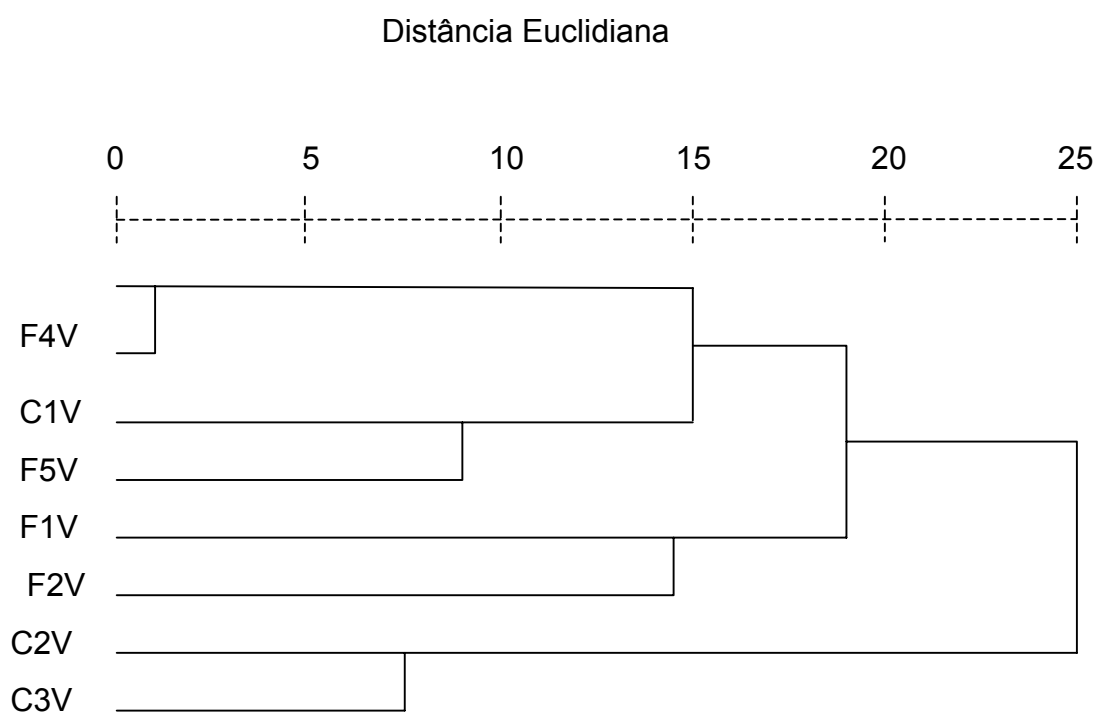


FIGURA 21. Dendrograma da análise do rDNA 16S clivado com *TaqI*, das amostras de verão dos arroios Feijó e Carvão.

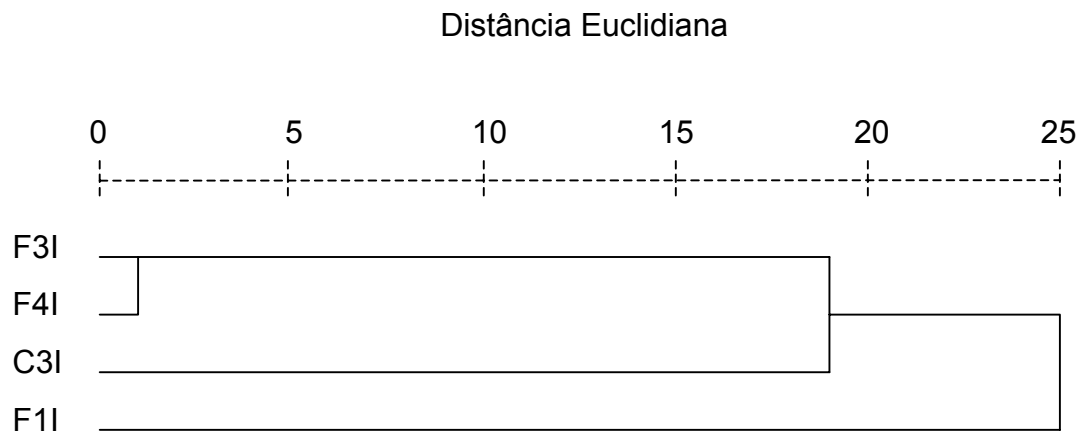


FIGURA 22. Dendrograma da análise do rDNA 16S clivado com *RsaI*, das amostras de inverno dos arroio Feijó e Carvão.

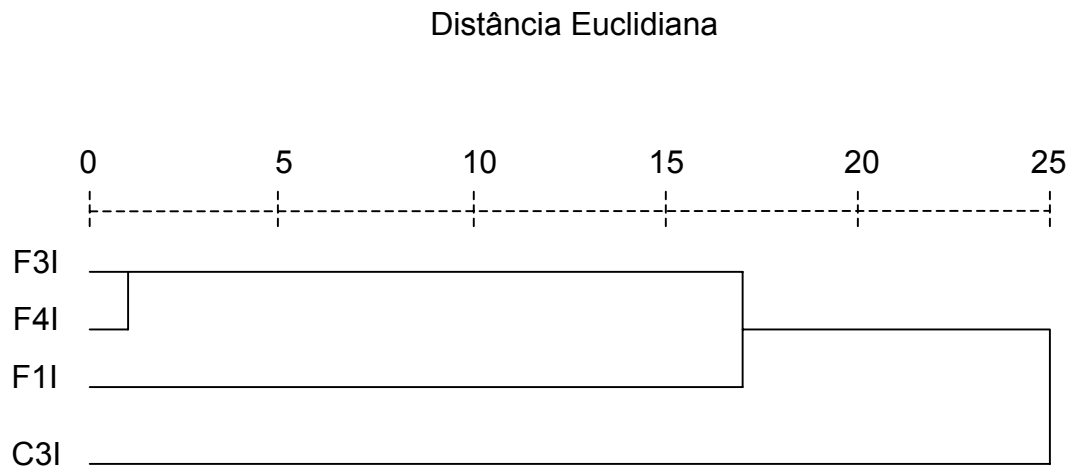


FIGURA 23. Dendrograma da análise do rDNA 16S clivado com *TaqI*, das amostras de inverno dos arroios Feijó e Carvão.

Foram construídos também dois dendrogramas reunindo os resultados das clivagens de verão e de inverno, com as duas enzimas utilizadas (figuras 24 e 25, respectivamente). Na figura 24 observa-se os resultados das clivagens de verão, onde houve uma clara distinção entre os modelos utilizados. Apesar de terem havido alterações na composição dos agrupamentos, quando comparados os resultados das clivagens individuais das enzimas com os referentes aos da reunião das clivagens com as duas enzimas, obteve-se dois agrupamentos maiores reunindo, um os pontos de menor contaminação fecal (C1V, C2V, C3V e F5V) e outro os de maior contaminação fecal (F1V, F2V, F3V e F4V). Mantendo-se assim a diferenciação filogenética constatada na análise a partir da clivagem com a enzima *Rsal* (figura 20).

Na figura 25 o dendrograma representa a reunião dos fragmentos obtidos das clivagens de inverno dos pontos 3 do arroio Carvão e dos pontos 1, 3 e 4 do Feijó com as duas enzimas (*Rsal* e *TaqI*). O dendrograma repete a configuração estrutural obtida da clivagem onde utilizou-se apenas a enzima *Rsal* (figura 22). Não evidenciando portanto, uma distinção entre os dois modelos utilizados neste trabalho e indicando assim a necessidade de um número maior de amostras, para uma comparação adequada com os resultados obtidos a partir das análises de verão.

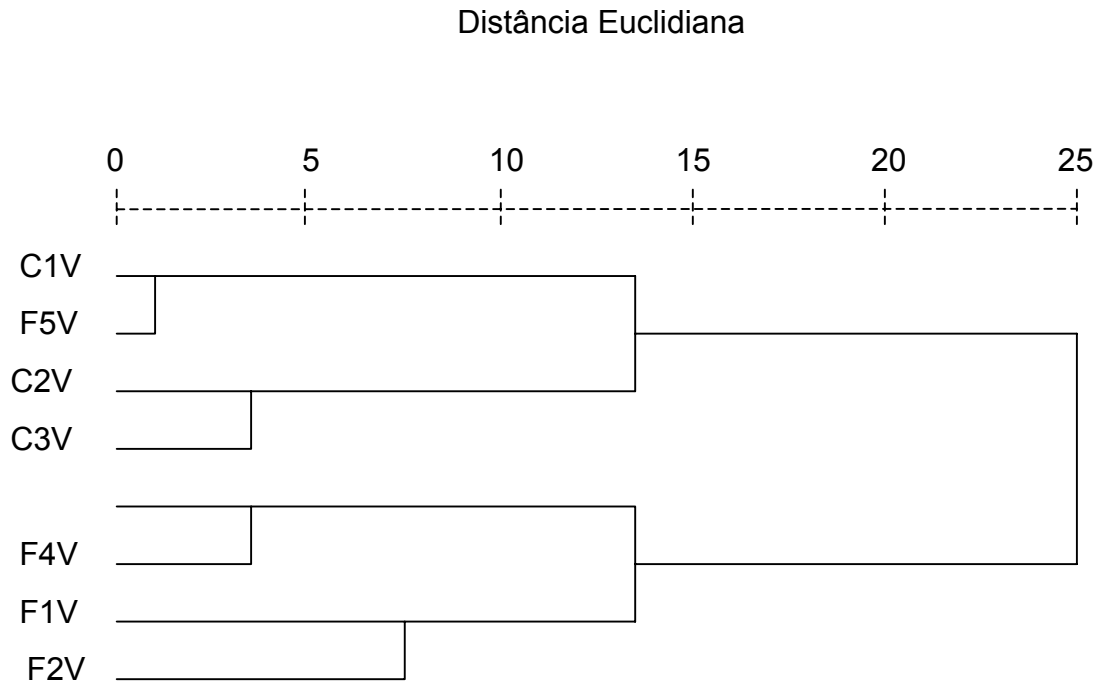


FIGURA 24. Dendrograma da análise do rDNA 16S clivado com *RsaI* e *TaqI*, das amostras de verão dos arroios Feijó e Carvão.

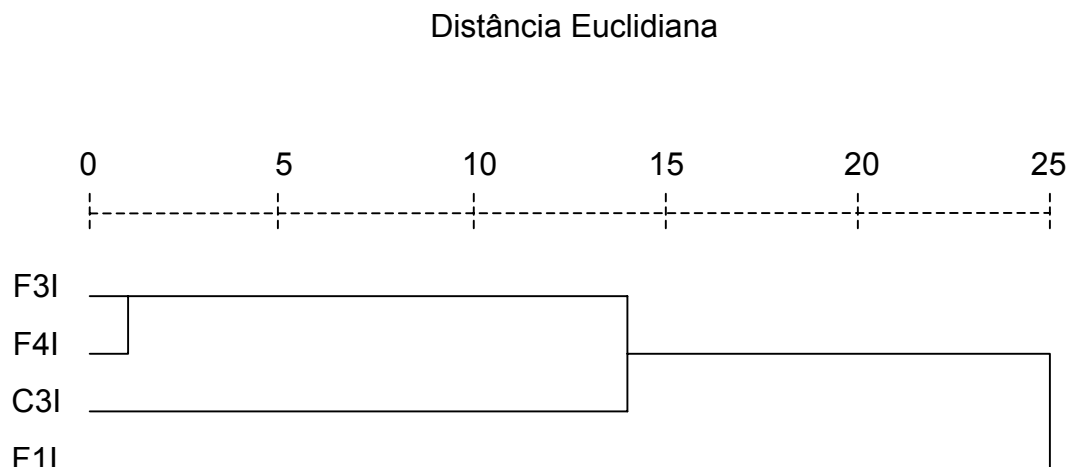


FIGURA 25. Dendrograma da análise do rDNA 16S clivado com *Rsal* e *TaqI*, das amostras de inverno dos arroios Feijó e Carvão.

Foi observada uma tendência do método de agrupamento (UPGMA) em dispor amostras com números baixos e altos de fragmentos em grupos distintos, possivelmente tenha influenciado no agrupamento das amostras ambientais com os isolados. É de se supor que um padrão de fragmentos mais rico indique uma maior diversidade na composição das comunidades, de forma que esta metodologia mostra-se relevante para as análises ambientais. Tal suposição encontra suporte no trabalho de Cho & Kim (2000), que analisaram o aumento da diversidade bacteriana em aquíferos que recebem efluentes orgânicos de origem animal. Neste trabalho pode-se

observar um maior número de padrões de fragmentos no arroio utilizado como modelo de ambiente aquático poluído, em relação ao não poluído.

Em conclusão, respaldados pelo trabalho de Cho & Kim (2000) os quais relatam que embora haja falhas na estimativa da composição de uma comunidade, esta pode ser comparada uma vez que o fator de influência opera uniformemente para amostras com tratamentos idênticos, consideramos que a metodologia foi válida haja visto que foi evidenciada a diferenciação molecular entre os modelos de ambientes aquáticos poluído do não poluído.

5. CONCLUSÕES

1. A metodologia empregada neste trabalho foi válida, uma vez que os agrupamentos por distâncias genéticas sugerem uma distinção entre ambientes com altos e baixos índices de contaminação fecal. Obteve-se um maior número de fragmentos provenientes das amostras dos pontos situados em locais de maior densidade populacional, o que relacionado aos resultados das contagens de heterotróficos, indica um provável aumento na diversidade das comunidades bacterianas que habitam corpos d'água que recebem descargas de resíduos orgânicos.

2. A eficiência das amplificações pela técnica da PCR a partir das amostras ambientais foi bastante influenciada pela ação de possíveis inibidores. Deste modo a purificação do DNA extraído através da passagem por colunas de purificação ou pelo tratamento com acetato de amônio e NaCl, assim como a diluição do DNA molde são alternativas para diminuir a influência de inibidores da PCR.

3. Observou-se que diferentes termocicladores podem requerer ajustes distintos na temperatura de anelamento, para um mesmo conjunto de oligonucleotídeos iniciadores.

4. Constatou-se a possível contaminação da enzima *Taq* polimerase da marca BIOTOOLS[®] com DNA, possivelmente resultante do processo de extração da enzima.

6. PERSPECTIVAS

- 1) Estabelecer uma melhor padronização da metodologia de extração para amostras brutas de água. Concentrando maior quantidade de água, para obtenção de maior quantidade de DNA, bem como comparar a quantidade de DNA extraído em diferentes metodologias de extração como passagem em coluna de purificação, tratamento com acetato de amônio, tratamento com NaCl, choque térmico com temperatura de – 40 °C e 65°C. Com o intuito de promover maior reprodutibilidade da PCR.
- 2) Promover um enriquecimento prévio das amostras ambientais, seguido de amplificação e clivagem do 16S rDNA para comparação dos resultados destes com os de amostras brutas. Verificando assim a influência ou não deste procedimento como alternativa para aumentar a quantidade de DNA extraído, bem como a diminuição do efeito de inibidores da PCR.
- 3) Testar a aplicação de outros marcadores moleculares como DGGE ou repPCR, de modo a evitar a clivagem com enzimas de restrição e assim obter resultados de forma mais rápida.
- 4) Realizar uma análise mais ampla, com amostras de água provenientes de um maior número de ambientes aquáticos com altos e baixos níveis de contaminação fecal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACINAS, S. G.; ANTÍN, J.; RODRÍGUEZ-VALERA, F. Diversity of Free-Living and Attached Bacteria in Offshore Western Mediterranean Waters as Depicted by Analysis of Genes Encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 2, p. 514-522, 1999.

ALM, E. W.; OERTHER, D. B.; LARSEN, N.; STAHL; RASKIN, L. The Oligonucleotide Probe Database. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 10, p. 3557-3559, 1996.

APHA. **Standard methods for the Examination of Water and Wastewater**, 20th ed. New York: American Public Health Association, 1998.

ARAHAL, D. R.; DEWHIRST, F. E.; PASTER, B. J.; VOLCANI, B. E.; VENTOSA, A. Phylogenetic analyses of some extremely halophilic Archaea isolated from Dead Sea Water, determined on the basis of their 16S rRNA sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 10, p. 3779-3786, 1996.

ATLAS , R. M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology: Fundamentals and Applications**. 4th ed. California: Benjamin/Cummings, 1998. 694p.

BAHIRATHAN, M.; PUENTE,L.; SEYFRIED, P. Use of Yellow-Pigmented Enterococci as a Specific Indicator of Human and Nonhuman Sources of Faecal Pollution. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 1066-1071, 1998.

BARNS, S. M.; TAKALA, S. L.; KUSKE, C. R. Wide Distribution and Diversity of members of the Bacterial Kingdom *Acidobacterium* in the Environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 4, p. 1731-1737, 1999.

BERNHARD, A. E.; FIELD, K. A PCR Assay To Discriminate Human and Ruminant Feces on the Basis of Host Differences in *Bacteroides-Provotella* Genes Encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 10, p. 4571-4574, 2000.

BOIVIN-JAHNS, V.; BIANCHI, A.; RUIMY, R.; GARCIN, J.; DAUMAS, S.; CHRISTEN, R. Comparison of Phenotypical and Molecular Methods for the Identification of Bacterial Strains Isolated from a Deep Subsurface Environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 9, p. 3400-3406, 1995.

BOND, P. L.; HUGENHOLTZ, P.; KELLER, J.; BLACKALL, L. L. Bacterial Community Structures of Phosphate-Removing and Non-Phosphate-Removing

Activated Sludges from Sequencing Batch Reactors. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 5, p. 1910-1916, 1995.

BORNEMAN, J.; SKROCH, P. W.; O'SULLIVAN, K. M.; PALUS, J. A.; RUMJANEK, N. G.; JANSEN, J. L.; NIENHUIS, J.; TRIPLETT, E. Molecular Microbial Diversity of an Agricultural Soil in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 6, p. 1935-1943, 1996,

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E. Molecular Microbial Diversity in Soils from Eastern Amazonia: Evidence for Unusual Microorganisms and Microbial Population Shifts Associated with Deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 7, p. 2647-2653, 1997.

BRUNK, C. F.; AVANISS-AGHJANI, E.; BRUNK, C. A. A Computer Analysis of Primer and Probe Hybridization Potential with Bacterial Small- Subunit rRNA Sequences. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 3, p. 872-879, 1996.

BÚA, J.; PORCEL, B. M. **The Polymerase Chain Reaction**: Obtainment and characterization of parasite molecules. Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Salud y Accion Social. Secretaria de Salud, 1994. p. 24-28.

BUCKLEY, D. H.; GRABER, J. R. ; SCHIMIDT, T. M. Phylogenetic Analysis of Nonthermophilic Members of the Kingdom *Crenarchaeota* and Their Diversity and Abundance en Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 11, p. 4333-4339, 1998.

CHIN, K.; LUKOW, T.; CONRAD, R. Effect of temperature on structure and function of the methanogenic Archaeal community in an anoxic rice field soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 6, p 2341-2349, 1999.

CHO, J.; KIM, S. Increase in Bacterial Community in Subsurface Aquifers Receiving Livestock Wastewater Input. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 3, p. 956-965, 2000.

CORLESS, C. E.; GUIVER, M.; BORROW, R.; EDWARDS-JONES, V.; KACZMARSKI, E. B.; FOX, A. J. Contamination and Sensitivity Issues with a Real-Time Universal 16S rRNA PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, p. 1747-1752, 2000.

DANG, H.; LOVELL, C. R. Bacterial Primary Colonization and Early Sucession on Surfaces in Marine Waters as Determined by Amplified rRNA Gene Restriction Analysis and Sequence Analysis of 16S rRNA Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 2, p. 467-475, 2000.

DUMBAR, J.; WHITE, S.; FORNEY, L. Genetic Diversity through the Looking

Glass: Effect of Enrichment Bias. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 4, p. 1326-1331, 1997.

DUMBAR, J.; TAKALA, S.; BARNS, S. M.; DAVIS, J. A.; KUSKE, C. R. Levels of Bacterial Community in Four Arid Soils Compared by Cultivation and 16S rRNA Gene Cloning. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 4, p. 1662-1669, 1999.

DUMBAR, J.; TICKNOR, L. O.; KUSKE, C. R. Phylogenetic Specificity and Reproducibility and New Method for Analysis of terminal Restriction Fragment Profiles of 16S rRNA Genes from Bacterial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 1, p. 190-197, 2001.

FARRELLY, V.; RAINEY, F. A.; STACKEBRANDT, E. Effect of genome Size and *rnn* Gene Copy Number on PCR Amplification of 16S rRNA Genes from a Mixture of Bacterial Species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 7, p. 2798-2801, 1995.

FELSKE, A.; ENGELN, B.; NUBEL, U.; BACKHAUS, H. Direct Ribosome Isolation from Soil To Extract Bacterial rRNA for Community Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 11, p. 4162-4167, 1996.

FELSKE, A.; WOLTERINK, A.; LIS, R.; AKKERMANS, A. D. L. Phylogeny of the Main Bacterial 16S rRNA Sequences in Drentse A Grassland Soils (The Netherlands). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 3, p. 871-879, 1998.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 2 ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220 p.

FORD, T.; COLWELL, R. R. **A Global Decline in Microbiological Safety of Water: A Call for Action** [S.I.]: The American Academy of Microbiology, 1998. 40 p.

FORTIN, N.; FULTHORPE, R. R.; ALLEN, D. G.; GREER, C. W. Molecular analysis of bacterial isolates and total community DNA from kraft pulp mill effluent treatment systems. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p.537-546, 1998.

GIOVANNONI, S.; DELONG, E. F.; OLSEN, G. J.; PACE, N. R. Phylogenetic Group-Specific Oligodeoxynucleotide Probes for Identification of Single Microbial Cells. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, n. 2, p. 720-729, 1988.

GLÖCKNER, F. O.; ZAICHIKOV, E.; BELKOVA, N.; DENISSOVA, L.;

PERNTHALER, J.; PERNTHALER, A.; AMANN, R. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 11, p. 5053-5065, 2000.

GRAY, J.; HERWIG, R. P. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 11, p. 4049-4059, 1996.

HARWOOD, V.; WHITLOCK, J.; WITHINGTON, V. Classification of Antibiotic Resistance Patterns of Indicator Bacteria by Discriminant Analysis: Use in Predicting the Source of fecal Contamination in Subtropical Waters. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 9, p. 3698-3704, 2000.

HUNTER-CEVERA, J. C. The value of microbial diversity. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 1, p. 278-285, 1998.

JACOBSEN, C. S. Microscale Detection of Specific Bacterial DNA in Soil with a Magnetic Capture-Hybridization and PCR Amplifications Assay. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 9, p. 3347-3352, 1995.

KNUDTSON, L. M.; HARTMAN, P. A. Routine Procedures for Isolation and Identification of Enterococci and Fecal Streptococci. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 3027-3031, 1992.

KOLBERT, C.; PERSING, D. Ribosomal DNA sequencing as a tool for identification of bacterial pathogens. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 2, p. 299-305, 1999.

KREADER, C. A. Relief of Amplification Inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 3, p. 1102-1106, 1996.

KUSKE, C. R.; BARNS, S. M.; BUSCH, J. Diverse Uncultivated Bacterial Groups from Soil of the Arid Southwestern United States That Are Present in Many Geographic Regions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 9, p. 3614-3621, 1997.

LEE, S.; BOLLINGER, J.; BEZDICEK, D.; OGRAM, A. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 10, p. 3787-3793, 1996.

LEFF, L. G.; DNAN, J. R.; McARTHUR, J. V.; SHIMKETS, L. J. Comparison of Methods of DNA Extraction from Stream Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, N. 3, p. 1141-1143, 1995.

LIU, W. T.; MARSH, T.; CHENG, H.; FORNEY, L. J. Characterization of microbial diversity by determining Terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 11, p. 4516-4522, 1997.

LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. Phylogeny of bacteria beyond the 16S rRNA standard. **Asm News**, Washington, v. 65, n. 11, 1999.

McCAIG, A. E.; GLOVER, L. A.; PROSSER, J. I. Numerical Analysis of Grassland Bacterial Community Structure under Different Land Management Regimens by Using 16S Ribosomal DNA Sequence Data and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Banding Patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 10, p. 4554-4559, 2001.

MARCHESI, J. R.; SATO, T.; WEIGHTMAN, A. J.; MARTIN, T. A.; FRY, J. C.; HIOM, S.; WADE, W. G. Design and Evaluation of Useful bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 2, p. 795-799, 1998.

MARTEAU, P.; POCHART, P.; DORÉ, J.; BÉRA-MAILLET, C.; BERNALIER, A.; CORTIER, G. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 10, p. 4939-4942, 2001.

MASSANA, R.; MURRAY, A.; PRESTON, C. M.; DELONG, E. F. Vertical Distribution and Phylogenetic Characterization of Marine Planktonic *Archaea* in the Santa Barbara Channel. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 1, p. 50-56, 1997.

McCAIG, A. E.; GLOVER, L. A.; PROSSER, J. I. Molecular Analysis of Bacterial Community Structure and Diversity in Unimproved and Improved Upland Grass Pastures. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 4, p. 1721-1730, 1999.

MOYER, G. L.; TIEDJE, J. M.; DOBBS, F. C.; KARL, D. M. A Computer-Simulated Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Bacterial Small-Subunit rRNA Genes: Efficacy of Selected Tetrameric Restriction Enzymes for Studies of Microbial Diversity in Nature. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 7, p. 2501-2507, 1996.

MUNSON, M. A.; NEDWELL, D. B.; EMBLEY, M. Phylogenetic diversity of *Archaea* in sediment samples from a coastal salt marsh. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 12, p. 4729-4733, 1997.

MURRAY, A. E. ; PRESTON, C. M.; MASSANA, R.; TAYLOR, L. T.; BLAKIS, A.; WU, K.; DELONG, E. F. Seasonal and spatial variability of bacterial and *Archaeal* assemblages in the coastal waters near Anvers Island, Antarctica. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 7, p. 2585-2595, 1998.

MUYZER, G.; RAMSING, N. B. Molecular methods to study the organization of microbial communities. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 32, n. 8, p.

1-9, 1995.

MUYZER, G.; WAAL, E. C.; UITTERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

NETO, J. M. A. **Técnica de Abastecimento e tratamento de Água**. 2 ed. São Paulo: CETESB/ASCETESB, 1987. p. 43-53.

NÜSSLEIN, K.; TIEDJE, J. M. Characterization of the Dominant and Rare Members of a Young Hawaiian Soil Bacterial Community with Small-Subunit Ribosomal DNA amplified from DNA Fractionated on the Basis of its Guanine and Cytosine Composition. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 4, p. 1283-1289, 1998.

OHKUMA, M.; KUDO, T. Phylogenetic Diversity of the Intestinal Bacterial Community in the Termite *Reticulitermes speratus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 2, p. 461-468, 1996.

ØVREÅS, L.; FORNEY, L.; DAAE, F. L.; TORSVIK, V. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 9, p. 3367-3373, 1997.

POLZ, M., F.; CAVANAUGH, C. M. A simple method for quantification of uncultured microorganisms in the environment based on in vitro transcription of 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 3, p. 1028-1033, 1997.

POLZ, M., F.; CAVANAUGH, C. M. Bias in Template-to-Product Ratios in Multitemplate PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n.10, p. 3724-3730, 1998.

RUDI, K.; SKULBERG, O. M.; LARSEN, F.; JAKOBSEN, K. S. Quantification of toxic cyanobacteria in water by use of competitive PCR followed by sequence-specific labeling of oligonucleotide probes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 7, p. 2639-2643, 1998.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 1355 p.

SANCHEZ, P. S. Microbiologia Sanitária: Atualização em Técnicas Para o Controle Microbiológico de Águas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20, 1999, Salvador.[S.L.]: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999. p 64.

SCHWIEGER, F.; TEBBE, C. C. A New Approach to Utilize PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 12, p. 4870-4876, 1998.

SIMPSON, J. M.; McCRAKEN, V. J.; GASKINS, H. R.; MACKIE, R. I. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of 16S Ribosomal DNA Amplicons To Monitor Changes in Fecal Bacterial Populations of Weaning Pigs after Introduction of *Lactobacillus reuteri* Strain MM53. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 66, n. 11, p. 4705-4714, 2000.

SMIT, E.; LEEFLANG, P.; GOMMANS, S.; BROEK, J.; MIL, S.; WERNARS, K. Diversity and Seasonal Flutuations of the Dominant Members of the Bacterial Soil Community in a Wheat Field as Determined by Cultivation and Molecular Methods. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 2284-2291, 2001.

SORCI, J. J.; PAULAUSKIS, J. D.; FORD, T. E. 16S rRNA restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Bacterial Diversity as a Biomarker of Ecological Health in Polluted Sediments from New Bedford Harbor, Massachusetts, USA. **Marine Pollution Bulletin**, Orford, v. 38, n. 8, p. 663-675, 1999.

SUZUKI, M. T.; GIOVANNONI, S. J. Bias Caused by Template Annealing in the Amplification of Mixtures of 16S rRNA Genes by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 2, p. 625-630, 1996.

SUZUKI, M. T.; RAPPÉ, M. S.; HAIMBERGER, W.; WINFIELD, H.; ADAIR, N.; STRÖBEL, J.; GIOVANNONI, E. J. Bacterial Diverity among Small-Subunit rRNA Gene Clones and Cellular Isolates from the Same Seawater Sample. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 3, p. 983-989, 1997.

SUZUKI, M.; RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI, S. J. Kinetic Bias in Estimates of Coastal Picoplankton Community Structure Obtained by Measurements os Small-Subunit rRNA Gene PCR Amplicon Length Heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 11, p. 4522-4529, 1998.

TAVARES, M. C. H.; LANDGRAF, M. D., VIEIRA, E. M.; REZENDE, M. O. O. Estudo da Adsorção-Dessorção da Trifluralina em Solo e em Ácido Húmico. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, p. 605-608, 1996.

VERNER, J. **O Meio Ambiente**. Campinas: Papirus, 1994. 132 p.

VOLOSSIOUK, T., ROBB, E. JANE; NAZAR, R. N. Direct DNA Extraction for PCR-Mediated Assays of Soil Organisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 11, p. 3972-3976, 1995.

WATERHOUSE, R.; GLOVER L. A. Differences in the Hybridization Pattern of *Bacillus subtilis* Genes Coding for rRNA Depend on the Method of DNA Preparation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 3, p. 919-921, 1993.

WEIDNER, S.; ARNOLD, W.; PÜHLER, A. Diversity of Uncultured Microorganisms Associated with the Seagrass *Halophila stipulacea* Estimated by Restriction Fragment length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 3, p.766-771, 1996.

WHITBY, C. B.; SAUNDERS, J. R.; RODRIGUEZ, J.; PICKUP, R. W.; McCARTHY, A. Phylogenetic differentiation of two closely related *Nitrosomonas* spp. That inhabit different sediment environments in an oligotrophic Freshwater lake. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 11, p. 4855-4862, 1999.

WINTZINGERODE, F. V.; GÖBEL, U. B.; SATCKEBRANDT, E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. **Fems Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 21, p. 213-229, 1997.

WISE, M. G.; McARTHUR, J. V.; SHIMKETS, L. Bacterial Diversity of a Carolina Bay as Determined by 16S rRNA Gene Analysis: Confirmation of Novel Taxa. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 4, p. 1505-1514, 1997.

ZHENG, D.; ALM, E. W.; STAHL, D. A.; RASKIN, L. Characterization of Universal Small-Subunit rRNA Hybridization Probes for Quantitative Molecular Microbial Ecology Studies. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 12, p. 4504-4513, 1996.

8. APÊNDICES

8.1. Introdução

A preparação dos meios de cultura foi realizada segundo as especificações dos fabricantes ou seguindo as instruções da bibliografia especializada.

8.2. Meios de cultura para crescimento e isolamento

8.2.1. Ágar R2A

	g/L
Ágar	15,0
Extrato de levedura	0,5
Polipeptona	0,5
Casamino ácido	0,5
Glicose	0,5
Dipotássio hidrogênio fosfato, K_2HPO_4	0,3
Magnésio sulfato heptahidrato, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,05
Piruvato de sódio	0,3

8.2.2. Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) – BIOBRÁS®

	g/L
Ágar bacteriológico	13,5
Azul de metileno	0,065
Eosina Y	0,4
Fosfato básico de potássio	2,0
Lactose	5,0
Peptona de gelatina	10,0
Sacarose	5,0
pH = 7,2 ± 0,2 a 25°C	

8.2.3. Ágar Trypticaseína de Soja - BIOBRÁS®	g/L
Ágar bacteriológico	15,0
Cloreto de sódio	5,0
Peptona de caseína	15,0
Peptona de soja	5,0
pH = 7,3 ± 0,2 a 25°C	

8.2.4. Caldo Verde Brilhante (bile 2%) - BIOBRÁS®	g/L
Bile bovina	20,0
Lactose	10,0
Peptona de gelatina	10,0
Verde brilhante	0,0133
pH = 7,2 ± 0,2 a 25°C	

8.2.5. Caldo Lactosado - BIOBRÁS®	g/L
Extrato de carne	3,0
Lactose	5,0
Peptona de gelatina	50
PH = 7,2 ± 0,2 a 25°C	

8.3. Reagentes para a biologia molecular

8.3.1. Solução de NaCl 1M

NaCl	5,844g
Água destilada	100mL

8.3.2. Solução de SDS 10%

SDS	10g
Água destilada	100mL

8.3.3. Clorofórmio: AIA

Solução de Clorofórmio e álcool isoamílico (24:1 v/v)

8.3.4. Fenol/Clorofórmio

Fenol tamponado (NUCLEAR®)	24 vol.
Álcool isoamílico (SYNTH®)	1 vol.

8.3.5. Solução TAE 50X

Tris base	242g
Ácido Acético Glacial	57,1mL
EDTA 0,5M – pH 8,0	100mL
Água destilada	1000mL

8.3.6. Solução TAE 1X

TAE 50X	10mL
Água destilada	490mL

8.3.7. Gel de Agarose 0,8%

Agarose	0,8g
TAE 1X	100mL
Brometo de Etídio	5µL

8.3.8. TE

Tris HCL (pH 8,0)	0,01M
EDTA (pH 8,0)	0,001M

8.3.9. Brometo de Etídio

Brometo de Etídio	1g
Álcool etílico	100mL

8.3.10. Tampão de corrida

Azul de bromofenol	125 μ L
Sacarose	200 μ L
Água MilliQ – estéril	175 μ L

8.3.11. TBE 5X

Tris base	13,5g
Ácido bórico	6,87g
EDTA (pH8,0 – 0,5M)	5mL
Água destilada	245mL

8.3.12. Acrilamida 30%

Acrilamida	30g
Bisacrilamida	0,8g
Água destilada	100mL

8.3.13. APS 10%

Persulfato de amônio	1g
Água destilada	10mL

9. Matrizes de Similaridade

9.1. Matriz de similaridade das amostras de verão dos arroios Carvão e Feijó clivados com *Rsal*, calculada pelo índice de Dice.

Variáveis	C1	C2	C3	F1	F2	F3	F4
C2	,5714						
C3	,5455	,2000					
F1	,1538	,1667	,0000				
F2	,2667	,1429	,1111	,7000			
F3	,2857	,1538	,1176	,6316	,9524		
F4	,3636	,2000	,1429	,6250	,6667	,5882	
F5	,7500	,2857	,7273	,0000	,1333	,1429	,1818

9.2. Matriz de similaridade das amostras de verão dos arroios Carvão e Feijó clivados com *TaqI*, calculada pelo índice de Dice.

Variáveis	C1	C2	C3	F1	F2	F3	F4
C2	,2222						
C3	,1333	,6667					
F1	,2667	,1905	,3333				
F2	,2667	,1905	,2222	,4444			
F3	,1429	,2000	,1176	,2353	,4706		
F4	,2500	,1818	,1053	,2105	,3158	,7778	
F5	,3333	,1111	,1333	,1333	,1333	,2857	,5000

9.3. Matriz de similaridade das amostras de inverno dos arroios Carvão e Feijó clivados com *RsaI*, calculada pelo índice de Dice.

Variáveis	C3	F1	F3
F1	,5000		
F3	,5714	,6667	
F4	,3333	,5000	,5714

9.4. Matriz de similaridade das amostras de inverno dos arroios Carvão e Feijó clivados com *TaqI*, calculada pelo índice de Dice.

Variáveis	C3	F1	F3
F1	,0000		
F3	,1818	,4000	
F4	,3636	,0000	,4000

9.5. Matriz de similaridade das amostras de verão dos arroios Carvão e Feijó clivados com *Rsal* e *TaqI*, calculada pelo índice de Dice.

Variáveis	C1	C2	C3	F1	F2	F3	F4
C2	,4000						
C3	,2857	,6400					
F1	,2500	,2143	,2069				
F2	,2400	,2069	,2000	,6667			
F3	,1697	,2143	,1379	,5000	,7273		
F4	,1905	,1600	,1538	,4138	,5333	,6897	
F5	,5000	,2000	,3810	,0833	,0800	,1667	,2857

9.6. Matriz de similaridade das amostras de inverno dos arroios Carvão e Feijó clivados com *Rsal* e *TaqI*, calculada pelo índice de Dice.

Variáveis	C3	F1	F3
F1	,1739		
F3	,3158	,4545	
F4	,3333	,1905	,4706