

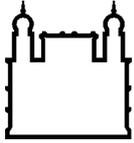
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biologia Computacional e
Sistemas

**Avaliação de poluição biológica no Complexo de Manguinhos
usando marcadores moleculares e filogenia molecular**

PRISCILA GONÇALVES MOURA

Rio de Janeiro
Abril de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas

PRISCILA GONÇALVES MOURA

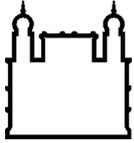
Avaliação de Poluição Biológica no Complexo de Manguinhos usando marcadores moleculares e filogenia molecular

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Computacional e Sistemas.

Orientador: Dr. Alberto M. R. Dávila

RIO DE JANEIRO

Abril de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas

AUTOR: PRISCILA GONÇALVES MOURA

Avaliação de Poluição Biológica no Complexo de Manguinhos usando marcadores moleculares e filogenia molecular

ORIENTADOR: Prof. Dr. Alberto M. R. Dávila

EXAMINADORES:

Prof. Dr^o. Renata Schama - Presidente

Prof. Dr^o. Ana Paula Assef

Prof. Dr. Juliano Cury

Prof. Dr. Eduardo Volotão

Prof. Dr. Gonzalo Bentancor

Rio de Janeiro, 28 de Abril de 2015.

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M929 Moura, Priscila Gonçalves

Avaliação de poluição biológica no Complexo de Manguinhos usando marcadores moleculares e filogenia molecular / Priscila Gonçalves Moura. – Rio de Janeiro, 2016.

xv, 100 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Computacional e Sistemas, 2016.

Bibliografia: f. 67-74

1. Indicadores de poluição biológica. 2. Marcadores moleculares de poluição. 3. Análises metagenômicas. 4. Filogenia molecular. 5. Complexo de Manguinhos. I. Título.

CDD 628.161

Dedico este trabalho a minha amada Mãe, Edilma G. Moura, que me conduziu a carreira acadêmica e sem esta, certamente não teria alcançado caminhos tão distantes.

Dedico também a minha querida amiga e colega de laboratório Elisa Cavalcanti, que carinhosamente dedicou seu tempo e conhecimento para a realização desta obra, contribuindo em grande parte da minha formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me fortalecido até aqui e sustentado os meus sonhos.

A minha família em especial minha mãe Edilma Moura, tia Edilcéia Affonso e tia Dr^a. Luciene Neves, por compartilharem das minhas angustias e compreenderem as renúncias necessárias para a conclusão deste curso, sempre acreditando na minha capacidade e apostando no meu sucesso.

Agradeço ao meu orientado Dr. Alberto Dávila, por me apresentar este trabalho que de fato mudou a minha vida.

A minha querida amiga Dr^a. Adriana Sotero-Martins por ter me fornecido as amostras de água e por todo apoio durante o curso.

As minhas queridas amigas Dr^a. Rachel Lins, Dr^a. Raquel Hora, M^a Ludimila Amaral, Elisa Cavalcanti e Mayla Abrahim, pelas valorosas contribuições físicas e intelectuais na elaboração desta pesquisa, amizade, companheirismo e otimismo.

Ao Dr. Rodrigo Jardim, vulgo Dr. Ioda e Dr. Rafael Ricardo pelo constante apoio, suporte nas análises de bioinformática e contribuições na elaboração deste manuscrito.

Aos meus colegas de laboratório Dr. Fábio Mota, M^e. Fábio Bernardo e M^e. Nelson Kotowski pelas constantes contribuições e por compartilharem comigo suas experiências durante a minha permanência no laboratório.

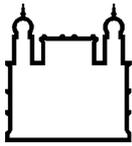
A Dr^a. Helena Santos da Coleção de Protozoários, Dr^a. Ana Tereza Fernandes Laboratório de Imunologia e Imunogenética em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas e ao INCQS pelo fornecimento de controles positivos.

Agradeço aos meus colegas de turma, em especial Janaína Cruz, Vanessa Silva, Gisele Vieira e Rafael Ferreira pelo companheirismo durante o curso de pós-graduação, tornando esta experiência muito mais prazerosa, com a certeza de que grandes foram os obstáculos, mas a vitória é nossa.

A agência financiadora Capes, por financiar os meus estudos e a Fundação Oswaldo Cruz/ Instituto Oswaldo Cruz, que forneceu todo o necessário para a minha formação acadêmica.

"Ele te fez um sonhador, com um propósito, uma missão e nada vai frustrar os planos do Senhor, você é um vencedor...".

Ana Paula Valadão



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

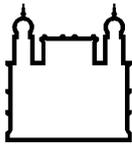
Avaliação de Poluição Biológica no Complexo de Manguinhos usando marcadores moleculares e filogenia molecular

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA COMPUTACIONAL E SISTEMAS

Priscila Gonçalves Moura

Indicadores de poluição tais como *Escherichia coli* e coliformes totais são universalmente utilizados para avaliar a qualidade da água. No entanto, vem sendo descrito na literatura, uma série de marcadores moleculares de poluição que forneceriam uma avaliação mais precisa e abrangente de poluição em corpos hídricos. Foi avaliada a poluição biológica em três rios que percorrem o Complexo de Manguinhos (rios Faria-Timbó, Jacaré e Canal do Cunha), através do teste por PCR (Reação da polimerase em cadeia) com os marcadores moleculares 16S rRNA, uidA, nifH, HadV, T-antigen, COWP e beta-giardin para bactérias, vírus e protozoários que vem sendo utilizados como marcadores de poluição biológica, por serem microrganismos associados à humanos. Foi avaliado também o relacionamento filogenético dos marcadores de poluição através de ferramentas de filogenia molecular no MEGA versão 6, com o método de construção *Neighbor-joining* e matriz de distância -p, além de análises *in silico* para avaliar a detecção dos marcadores no metagenoma da Baía de Guanabara. Todos os PCRs com os marcadores moleculares apresentaram-se positivos com exceção de *Cryptosporidium* spp. O resultado do sequenciamento seguido de análises *in silico* como BLASTN contra o banco de dados REFSEQ do NCBI (Centro Nacional para informação Biotecnológica) demonstram similaridade entre as sequências obtidas e as sequências de nucleotídeos disponíveis nas bases de dados. A filogenia mostrou pouca variabilidade entre as sequências o que dificultou ter uma boa avaliação do relacionamento filogenético entre os marcadores. Pelo uso dos marcadores moleculares no presente estudo, fomos capazes de detectar poluição antrópica e mostrar a biodiversidade da poluição microbiológica que pode ser encontrado em águas contaminadas por esgoto.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Evaluation of Biological Pollution in Complex of Manguinhos using molecular markers and molecular phylogeny.

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIC COMPUTATION AND SISTEMMS

Priscila Gonçalves Moura

Pollution indicators such as *Escherichia coli* total coliforms are universally used in the evaluation of water quality index. Nevertheless, a number of pollution molecular markers providing a more precise and wide-ranging results in studies with water bodies are being extensively described in literature. Biological pollution in three rivers coursing the Manguinhos Complex (Faria-Timbó, Jacaré and Canal do Cunha rivers) were evaluated through Polymerase Chain Reaction (PCR) with 16S rRNA, uidA, nifH, HadV, T-antigen, COWP e beta-giardin molecular markers for bacteria, virus, and protozoan, markers biological pollution applied because of their association with humans. Phylogenetic relationships were inferred with these pollution markers using molecular phylogeny softwares MEGA version 6, with the method of construction *Neighbor-joining* and “p” distance matrix, *in silico* approaches were also applied to detect these marks in the Baía de Guanabara Metagenome. All molecular markers were positive, except for *Cryptosporidium* spp. Sequencing results followed by *in silico* analyses using BLATN against REFSEQ database of NCBI (National Center for Biotechnology Information) showed similarity between sequences obtained and nucleotide sequences of database available in REFSEQ. Phylogeny analyses showed low variability among the sequences studied, resulting in a not trustful relationship among pollutants. By using molecular markers in the present study we were able to detect anthropic pollution and show the biodiversity of microbiological pollution that can be found in sewage-contaminated water.

ÍNDICE

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Avaliação da qualidade de água e indicadores de poluição	3
1.1.1 Avaliação da balneabilidade	3
1.1.2 Poluição biológica	4
1.1.3 Marcadores de fontes microbianas	5
1.2 Metagenômica, marcadores moleculares e sua aplicação	9
1.3 Bioinformática	10
1.4 Filogenia molecular	11
1.5 Contexto Histórico e caracterização da área de estudo	11
1.5.1 Complexo de Manguinhos	11
1.5.2 Sub-bacia do Canal do Cunha	12
1.5.3 Atividades poluidoras e saneamento	14
1.6 Justificativa	16
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Pesquisa <i>in silico</i> dos marcadores moleculares de poluição	18
3.2 Coleta das Amostras	20
3.3 Análises colimétricas	21
3.4 Extração de DNA metagenômico	21
3.5 Controles positivos	22
3.6 Análises moleculares	23
3.7 Purificação dos produtos da PCR	30
3.8 Clonagem e extração de DNA plasmidial (mini-prep)	30
3.9 Sequenciamento	31
3.10 Análises das sequências	31
3.11 Análises filogenéticas	32

3.12 Fluxograma	33
4 RESULTADOS	34
4.1 Pesquisa <i>in silico</i> dos marcadores moleculares de poluição no metagenoma da Baía de Guanabara.....	34
4.2 Avaliação da qualidade da água por análises colimétricas.....	34
4.3 Extração de DNA	35
4.4 Ensaios Moleculares	36
4.4.1 PCR de <i>Bacteroides</i> associados a Humanos primers HF183F/ BAC708R	36
4.4.2 PCR de <i>Bacteroides</i> spp. primers HUBAC 566F/ 692R.....	37
4.4.3 PCR de <i>Methanobrevibacter smithii</i> primers nifH 342F/363R	37
4.4.4 PCR de <i>Escherichia coli</i> primers uidA 298F/ uidA 884R.....	38
4.4.5 PCR <i>Enterococcus faecalis</i> primers M66-M107/M66-M107EFR.....	38
4.4.6 PCR de <i>Faecalibacterium</i> primers HFB F/HFB R	39
4.4.7 PCR de <i>Bifidobacterium dentium</i> primers Bi-DEN 1/Bi-DEN 2	39
4.4.8 PCR de <i>Bifidobacterium adolescentis</i> primers Bi-ADO 1/Bi-ADO 2.....	40
4.4.9 PCR de Adenovírus primers VTB1-HAdVF F/ VTB1-HAdVR.....	40
4.4.10 PCR de HPyV primers SM2 F/P6 R.....	41
4.4.11 PCR de <i>Giardia</i> spp. primers G7F/G759R.....	41
4.4.12 PCR <i>Cryptosporidium</i> spp. primers Cry-3/Cry-6R	42
4.5 Detecção dos marcadores moleculares por recurso hídrico	44
4.6 Análises das sequências	47
4.7 Alinhamento local pelo BLASTN no REFSEQ.....	48
4.7.1 BLASTN <i>Bacteroides</i> associados a humanos	48
4.7.2 BLASTN <i>Escherichia coli</i>	49
4.7.3 BLASTN <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	50
4.7.4 BLASTN de <i>Giardia</i> spp.....	51
4.8 Árvores.....	52

4.8.1	Árvore <i>Bacteroides</i> associados a humanos.....	53
4.8.2	Árvore <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	54
5	DISCUSSÃO	55
6	CONCLUSÕES	65
7	PERPECTIVAS	66
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
9	ANEXOS	75
9.1	Alinhamentos usados para a construção das árvores	75
9.1.1	Alinhamento <i>Bacteroides</i> associados a humanos	75
9.1.2	Alinhamento <i>Escherichia coli</i>	79
9.1.3	Alinhamento <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	91
9.1.4	Alinhamento <i>Giardia</i> spp.....	95

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa do Território de Manguinhos com delimitação das comunidades (microáreas). Fonte: Projeto Inquérito de Manguinhos, PDTSP-TEIAS.....	12
Figura 2: Grandes empreendimentos e o potencial poluidor das atividades licenciadas, RH-V Baía de Guanabara. Fonte: SEA/INEA 2010 (Bastos & Napoleão, 2010), modificado por Priscila Moura.....	15
Figura 3: Pontos de coleta. As marcações em vermelho representam os pontos onde foram realizadas as coletas.	20
Figura 4: Mapa com a variação dos níveis de <i>Escherichia coli</i> por ponto amostral.	34
Figura 5: Gel de extração de DNA da água coletada no complexo de Manguinhos. DNA controle EPICENTRE com 100 ng e 40 KB. Amostras de 1 a 8 contendo 1µl do DNA ambiental.	35
Figura 6: PCR <i>Bacteroides</i> associados a humanos.....	36
Figura 7: PCR <i>Bacteroides</i> spp.....	37
Figura 8: PCR <i>Methanobrevibacter smithii</i>	37
Figura 9: PCR <i>Escherichia coli</i>	38
Figura 10: PCR <i>Enterococcus faecalis</i>	38
Figura 11: PCR <i>Faecalibacterium</i> spp.	39
Figura 12: PCR <i>Bifidobacterium dentium</i>	39
Figura 13: PCR <i>Bifidobacterium adolescentis</i>	40
Figura 14: PCR de Adenovirus.....	40
Figura 15: PCR HPyV.	41
Figura 16: PCR <i>Cryptosporidium</i> spp.	42
Figura 17: Alinhamento local das sequências geradas de <i>Bacteroides</i> associados a humanos, com as sequências disponíveis na base de dados REFSEQ do NCBI.	48
Figura 18: Alinhamento local das sequências geradas de <i>Escherichia coli</i> , com as sequências disponíveis na base de dados REFSEQ do NCBI.	49
Figura 19: Alinhamento local das sequências geradas de <i>Bifidobacterium adolescentis</i> , com as sequências disponíveis na base de dados REFSEQ do NCBI.	50
Figura 20: Alinhamento local das sequências geradas de <i>Giardia</i> spp., com as sequências disponíveis na base de dados REFSEQ do NCBI.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rios da sub-bacia do Cunha apresentados no trabalho.....	13
Tabela 2: Controles positivos.....	22
Tabela 3: Iniciadores de PCR testados de bactérias.....	24
Tabela 3.1: Iniciadores testados de vírus e protozoários.....	25
Tabela 4: Protocolos das reações de PCR.....	26
Tabela 5: Ciclos de amplificação.....	28
Tabela 6: Resultados da amplificação por PCR.....	43
Tabela 7: Resultado do BLASTN entre as amostras sequenciadas contra o banco de dados REFSEQ do <i>Genbank</i>	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Presença dos marcadores moleculares no rio Faria-Timbó.....	44
Quadro 2: Presença dos marcadores moleculares no rio Jacaré.....	45
Quadro 3: Presença dos marcadores moleculares no Canal do Cunha.....	46

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

16S rDNA - subunidade 16 do DNA ribossomal.

18S rDNA - subunidade 18 do DNA ribossomal.

ABI – 3730 - sequenciador capilar automático.

BLAST – do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*

CONAMA - Conselho Nacional do Ambiente.

DH5 α – cepa da bactéria *Escherichia coli*

DNA - ácido desoxirribonucleico.

DNTP – Deoxi-nucleotídeos tri-fosfatados

EDTA - do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*

IPTG – é um composto de biologia molecular utilizado como um metabólito de lactose que provoca a transcrição do operon lac.

KEGG - do inglês *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

Ladder – Padrão de tamanho de fragmento de DNA (DNA Ladder)

LB – Luria-Bertani. Meio utilizado para cultivo de *E. coli*

mm - unidade de medida de milímetro

μm - unidade de medida micrômetro, equivale à milésima parte do milímetro

μL – micro-litro

MgCl $_2$ - cloreto de magnésio

MIX - mistura

NCBI - (Centro nacional para informação biotecnológica).

NJ - *Neighbor-joining*.

pb – pares de bases

PCR - Reação em cadeia Polimerase.

PDTIS - Plataformas Tecnológicas do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde.

Perl – do inglês *Practical Extraction and Report Language*

Pmol – unidade de medida pico mola

qPCR - Reação em cadeia Polimerase em tempo real.

quantitativa ou/e em tempo real

RNA - ácido ribonucleico

TAE - tampão Tris-Acetato-EDTA

Taq – *Thermofillus aquaticus* DNA polimeras

X-gal–5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

1 INTRODUÇÃO

Pode-se chamar de poluição a introdução de qualquer tipo de substância diferente do meio, por ação antrópica direta ou indireta que impacta negativamente a saúde humana e animal. Considerando como dois tipos de poluição: poluição industrial (poluição gerada a partir de resíduos industriais) e Poluição biológica (poluição gerada pela disposição de matéria orgânica), avaliar poluição biológica demonstra ser uma abordagem interessante pela constante disposição de esgoto em recursos hídricos atribuindo sérios riscos a saúde pública. Indicadores de bactérias fecais como *Escherichia coli*, Coliformes Totais e *Enterococcus* spp. são atualmente os recomendados pela legislação do Conselho Nacional de Meio Ambiente - CONAMA nr. 274 (2001) , como indicadores da qualidade da água para balneabilidade e na Portaria nr. 2.914 (Brasil, 2011) para potabilidade.

No entanto, trabalhos como de McQuaig e colaboradores (2012) recomendaram que a abordagem de utilizar os indicadores de bactérias fecais juntamente com marcadores de fontes microbianas (marcadores moleculares de poluição) resulta numa avaliação mais definitiva da qualidade da água e risco a saúde humana do que os indicadores de bactérias fecais sozinhos, além de demonstrar que o esgoto é pelo menos parcialmente responsável pela degradação da qualidade da água. Isto só foi possível, com o avanço da biologia molecular e com a possibilidade de se extrair DNA metagenômico de amostras ambientais.

Com a metagenômica, tornou-se possível acessar todo o material genético disponível numa amostra ambiental como solo e água, a fim de avaliar a biodiversidade dos organismos ali presentes, além de com o uso das ferramentas da biologia molecular tais como, PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e qPCR (Reação em cadeia da polimerase quantitativa ou/e em tempo real), podemos então utilizar marcadores moleculares, para identificar a presença de genes alvos nestas amostras. Esta abordagem também proporciona a detecção de organismos não cultiváveis, o que representa uma vantagem, comparada às metodologias de cultura amplamente utilizadas na identificação de indicadores de bactérias fecais.

Métodos independentes de cultura permitem análises de um conjunto de genes metabólicos a partir de comunidades microbianas, que podem ser usadas para determinar condições ambientais tais como: poluição, definir a composição de uma comunidade e a diversidade de genes (Singh *et al.*, 2009). Essas metodologias têm sido um sucesso aplicado em estudos de composição, dinâmica e função de comunidades microbianas, na variação de ecossistemas, incluindo aqueles sujeitos a modificações antropogênicas (Gilbert & Dupont, 2011). No entanto, estes estudos podem resultar na produção de uma grande quantidade de sequências, usando mais recentemente os equipamentos de sequenciamento de nova geração. As ferramentas da bioinformática oferecem o suporte para tratar dados genômicos e metagenômicos e posterior inferência genética, como por exemplo, avaliando as comunidades microbianas em estudos de poluição da água.

Uma prática comum atrelada às ferramentas de bioinformática é construção de árvores filogenéticas. A filogenia molecular é amplamente utilizada para demonstrar a diversidade de sequências dentro de amostras e para determinar como estas sequências estão relacionadas entre si em termos evolutivos (Cardoso *et al.*, 2012).

Neste trabalho abordaremos a avaliação molecular da poluição ambiental nos 3 principais rios do no Complexo de Manguinhos, situado no município do Rio de Janeiro: rio Jacaré, rio Faria Timbó e Canal do Cunha, utilizando um conjunto de marcadores de fontes microbianas (tendo com alvos bactérias, vírus e protozoários) e que tem sido empregados em diversos estudos, como marcadores filogenéticos de poluição biológica por esgoto em recursos hídricos. Um exemplo destes estudos é o de Sidhu e colaboradores (2013) , que utilizou múltiplos marcadores de fontes microbianas associados à humanos como: *Bacteroides* spp., *Methanobrevibacter smithi*, Adenovírus e Polyomavírus humano, na avaliação de poluição por esgoto em águas pluviais urbanas a partir de 6 bacias urbanas na Austrália.

Apresentaremos também as inferências filogenéticas das sequências resultantes das análises a fim de avaliar a relação entre as sequências obtidas e aquelas disponíveis em bancos de dados públicos. Ainda, usaremos os

marcadores de fontes microbianas para uma pesquisa comparativa *in silico*, com o metagenoma da Baía de Guanabara, disponível no banco de dados MG-RAST (servidor de análises metagenômicas) disponível em <http://metagenomics.anl.gov/metagenomics.cgi?page=Home>.

1.1 Avaliação da qualidade de água e indicadores de poluição

1.1.1 Avaliação da balneabilidade

No Brasil, a rede coletora de esgoto sanitário chega a 53,8% da população urbana. Sendo que a maior parte do volume recolhido não recebe nenhum tratamento e é despejado nos rios, represas e oceanos. Apenas 35% do esgoto coletado são submetidos a algum tratamento (Cipis *et al.*, 2003).

Existem no Brasil legislações específicas que tratam sobre a qualidade e uso da água:

- Resolução CONAMA nr. 274/2001 (Brasil, 2001)– Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras;
- Portaria nr. 2.914/2011 (Brasil, 2011) - Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade;
- Resoluções CONAMA nr. 396/2008 (Brasil, 2008)– Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas;
- Resolução CONAMA nr. 357/2005 (Brasil, 2005)– Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes;
- Lei de Saneamento nr.11.445/2007 e Decreto nr. 7217/2010 – Estabelece a Política Nacional de Saneamento Básico e os princípios e diretrizes dessa política, responsabilizando os diferentes órgãos pela fiscalização e implantação de programas para controle das atividades poluidoras.

1.1.2 Poluição biológica

A poluição biológica caracteriza-se pela presença de microrganismos de origem fecal que são geralmente associados ao despejo de esgoto. Assim podemos encontrar: bactérias, vírus, protozoários e helmintos indicando a presença de contaminação biológica em ambientes aquáticos. A avaliação da qualidade da água, associada aos riscos à saúde pública é necessária para propor efetivas estratégias de remediação e descontaminação microbiana.

Indicadores de bactérias fecais, tais como *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. estão presentes em grande abundância no trato gastrointestinal dos animais de sangue quente. A detecção destes organismos na água indica a presença de poluição (EPA, 2000) e assim, rotineiramente utilizados para avaliar a qualidade microbiológica de águas sendo sugeridos pela resolução CONAMA nr. 274 (Brasil, 2001).

Com a abordagem molecular, marcadores de fontes microbianas têm sido sugeridos para a avaliação de recursos hídricos. **Marcadores de fontes microbianas** referem-se a um conjunto de marcadores moleculares que podem ser usados para testar as amostras de água e avaliar poluição biológica assim como as fontes de contaminação. Os experimentos podem atingir qualquer número de marcadores microbianos sejam virais, bacterianos ou protozoários (Soule *et al.*, 2006), mas todos eles são destinados a auxiliar os gestores de bacias hidrográficas em conformidade com os requisitos de carga diárias totais máximas e com planos de mitigação para as águas microbiologicamente depreciadas (Soule *et al.*, 2006).

Pesquisas para definir os marcadores moleculares mais úteis para o monitoramento de fontes de poluição (Bower *et al.*, 2005) e a utilização de múltiplos marcadores para a detecção de poluição biológica (McQuaig *et al.*, 2012), tem sido amplamente sugeridos e estudados para avaliar a qualidade da água. A avaliação da qualidade da água pelos indicadores de poluição fecal cultiváveis (*E. coli*, *Enterococcus* e coliformes totais) pode não ser universalmente seguro, pois patógenos associados a humanos, atribuídos ao despejo de esgoto, têm sido detectados mesmo quando estes indicadores cultiváveis apresentam-se em baixa

quantidade (em níveis balneáveis segundo os padrões recomendados) ou até mesmo quando estão ausentes nestas amostras (Jiang *et al.*, 2001; Lipp *et al.*, 2001; Committe on Indicators for Waterborne, 2004).

Assim, a fim de avaliar poluição biológica em água ocasionada por despejo de esgoto, utilizaremos marcadores de fontes microbianas e indicadores de bactérias fecais através de ensaios moleculares. Estes marcadores foram selecionados a partir de um levantamento bibliográfico, onde foram escolhidos os principais vírus, bactérias e protozoários que tem sido pesquisado a nível molecular em poluição de recursos hídricos e estão descritos a seguir.

1.1.3 Marcadores de fontes microbianas

1.1.3.1 Bacteroides spp.

Bacteroides spp. são bactérias gram-negativas, estritamente anaeróbicos e em fezes de animais e humanos, ultrapassam em número os convencionais indicadores de bactérias fecais, como coliformes e *Enterococcus* (Wexler, 2007). Devido a alta sensibilidade e sua posição como primeiro marcador de fonte microbiana direcionado a fontes fecais humanas, o ensaio de *Bacteroides* totais e associados a humanos tem sido largamente usado para avaliar fontes de poluição tanto por PCR e qPCR (McQuaig *et al.*, 2012).

1.1.3.2 Bifidobacterium spp.

Bifidobactérias são bactérias gram-positivas, anaeróbicas e as mais comumente encontradas no intestino de humano, sendo o maior grupo que compoem a flora intestinal e podem ser utilizados como indicadores de contaminação fecal humana (Bonjoch *et al.*, 2004). Segundo Bonjoch e colaboradores (2004) das nove espécies relacionadas a humanos, apenas *Bifidobacterium adolescentis* e *Bifidobacterium dentium* foram encontrados exclusivamente no esgoto humano.

Bacteroides e *Bifidobacterium* foram sugeridos como indicadores alternativos para o grupo coliformes fecais (Carrillo *et al.*, 1985; Fiksdal *et al.*, 1985) e atualmente espécies de *Bifidobacterium* associadas exclusivamente a humanos foram utilizadas como marcadores de fontes humanas (Bonjoch *et al.*, 2004). Anaeróbios fecais compõem a maioria das bactérias fecais no trato gastrointestinal dos seres humanos e podem estar presentes em densidades 1.000 vezes mais elevadas do que o grupo de coliformes fecais, tornando esses organismos indicadores altamente sensíveis de poluição fecal (Fiksdal *et al.*, 1985; Howard, B. J., J. Klaas, S. J. Rubin, A. S. Weissfeld, 1987; Bonjoch *et al.*, 2004).

1.1.3.3 Enterococcus spp. e Escherichia coli

Enterococcus são bactérias gram-positivas, anaeróbicas facultativas e *Escherichia coli* são bactérias gram-negativas, anaeróbicas facultativas, comensais no trato intestinal. São utilizadas como bioindicadoras universais de poluição e largamente empregadas na avaliação da qualidade da água. Os tradicionais métodos de cultura baseiam-se na detecção destas bactérias para avaliar a qualidade da água, por ser mais fácil de realizar e menos oneroso. Porém com estes métodos, não é possível identificar se estas bactérias são de fontes humana ou animais (Sauer *et al.*, 2011). Além disso, estudos têm demonstrado a presença de vírus patogênicos associados a humanos na água, mesmo quando os níveis de *E. coli* apresentam-se baixo (Jiang *et al.*, 2001).

1.1.3.4 Methanobrevibacter smithii

Methanobrevibacter smithii é uma arqueobactéria anaeróbica e o principal metanogênio do trato gastrointestinal humano, tem sido encontrado de 10^7 a 10^{10} organismos $.g^{-1}$ em fezes (Harwood *et al.*, 2009). O uso do gene *nifH* de *M. smithii* para identificar poluição fecal associada a humanos, tem demonstrado ser bem sucedido em estudos com marcadores de fontes microbianas (Harwood *et al.*, 2009), pois ele tem um hospedeiro específico (o homem) comparado a outros marcadores de fontes microbianas (McQuaig *et al.*, 2009, 2012) e é frequentemente encontrado em esgoto.

1.1.3.5 *Faecalibacterium* spp.

Faecalibacterium são bactérias gram-negativas, anaeróbios obrigatórios, (DUNCAN *et al.*, 2002) são comensais no intestino humano e comumente isolados a partir de fezes (Suau *et al.*, 2001). Segundo Zheng e colaboradores (2009) que apresentaram o primeiro estudo de *Faecalibacterium* como um marcador de poluição, este marcador de fezes humanas é específico para o esgoto, confiável para detectar poluição fecal humana na água e representa um marcador confiável que pode ser utilizado sozinho ou em conjunto com outros marcadores para medir a qualidade da água.

1.1.3.6 Adenovírus

Adenovirus é uma vírus pertencente a família *Adenoviridae* muito frequentes e resistentes. A infecção por este vírus é por contaminação com detritos fecais (McQuaig *et al.*, 2009; Wolf *et al.*, 2010). Adenovirus tipos 40 e 41 são agentes etiológicos de gastroenterites virais. Essas viroses têm sido utilizadas para indicar poluição fecal humana em água (Jiang *et al.*, 2001; Pina *et al.*, 1998), por serem patógenos e informar diretamente um modelo de avaliação de risco para a saúde humana.

1.1.3.7 Polyomavírus humano (HPyV)

O Polyomavírus humano é um potencial oncogênico associado a humano (McQuaig *et al.*, 2009). Em contraste ao adenovirus, HPyV são geralmente não patogênicos e são excretados na urina de indivíduos saudáveis (Vanchiere *et al.*, 2005). O HPyV é um grupo de vírus que engloba mais de cem tipos diferentes. As espécies que avaliamos como alvo são os Polyomavírus JC e BK, ambas muito difundidas em esgoto (Bofill-Mas *et al.*, 2000). As duas espécies são geneticamente estáveis, distribuídas mundialmente e mantêm altas taxas de soropositividade em populações humanas (Stolt *et al.*, 2003). O uso dos marcadores desses vírus para

avaliar poluição por esgoto tem sido muito bem sucedido em laboratórios e estudo de campo (McQuaig *et al.*, 2009).

1.1.3.8 *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp.

Cryptosporidium e *Giardia* estão entre os principais protozoários parasitas de transmissão hídrica. Pela elevada persistência ambiental, representam um risco de aquisição destes agentes parasitários em águas balneáveis (Franco, 2007). Cistos de *Giardia* e oocistos de *Cryptosporidium* permanecem infectantes em rios por até seis meses numa temperatura de 20°C o que contribui para a ampla dispersão desses protozoários (Fayer *et al.*, 2000).

Giardia é um protozoário intestinal flagelar que parasita o intestino de mamíferos inclusive de humanos, muito encontrada em exames de fezes tanto na forma de cisto como na forma de trofozoita. A *Giardia duodenalis* é a única espécie encontrada em humanos (Franco, 2007).

Cryptosporidium é um protozoário de reconhecida importância como patógeno de veiculação hídrica (Franco, 2007). O homem é o principal hospedeiro do *Cryptosporidium hominis*, mas pode também ser parasitado por outras setes espécies (*C. hominis*, *C. parvum*, *C. meleagridis*, *C. felis*, *C. canis*, *C. suis* e *C. muris*). Segundo Morgan e colaboradores (2002), *C. parvum* e *C. hominis* são as espécies mais frequentemente encontradas em humanos, e sua prevalência varia em diferentes partes do mundo.

Segundo Franco (2007) com a finalidade de implementar e fortalecer a vigilância em saúde pública há uma clara necessidade de desenvolver , padronizar e otimizar métodos de detecção que possam ser aplicadas às amostras ambientais em situações adversas. Os surtos desses parasitos tem sido tem sido relados em países em desenvolvimento (Jothikumar *et al.*, 2008).

1.2 Metagenômica, marcadores moleculares e sua aplicação

No final da década de 1990, a metagenômica surgiu como uma ferramenta para estudar o material genético da comunidade microbiana presente em um determinado habitat, proporcionando novas tecnologias para pesquisar a riqueza microbiana e a diversidade genética ambiental (Tuffin *et al.*, 2009). Assim, tornou-se possível acessar diretamente os genomas dos organismos cultiváveis e não cultiváveis presentes em uma amostra ambiental, permitindo a descoberta de novos genes e posterior inferência de suas funções, além de avaliar a heterogeneidade do genoma e evolução no contexto ambiental. A capacidade de acessar sequências de DNA dos genomas microbianos oferece também uma alternativa interessante para explorar e melhorar a caracterização e detecção de diversos grupos de patógenos na água e de microrganismos presentes no solo com potenciais aplicações na biotecnologia (Handelsman *et al.*, 1998).

A metagenômica engloba uma variedade de tecnologias que são baseadas em (Cardoso *et al.*, 2012; Cuadrat, 2010):

- **Metagenômica funcional** - Construção de bibliotecas ou amplificação e sequenciamento do material genético total;
- **Análises baseadas na sequência** - extração e sequenciamento direto do DNA ambiental, utilizando técnicas de pirosequenciamento com grande potencial na identificação de novos genes.
- **Análise baseada na busca de marcadores moleculares** - Extração do DNA total a partir de amostras seguidas por amplificação por PCR de genes alvos.

Utilizando os marcadores moleculares para organismos específicos podemos buscar em amostras de DNA complexas (DNA ambiental ou DNA de humano contendo o microbioma associado) por estes alvos, através da técnica da PCR. Pela técnica de PCR, é possível identificar rapidamente os genes associados à poluição em amostras ambientais, assim, podemos potencialmente caracterizar comunidades microbianas a partir de um conjunto de ambientes diversos como:

água doce, sedimentos marinhos, oceanos, solos e comunidades associadas a um hospedeiro (Cardoso *et al.*, 2012).

Os marcadores moleculares usados para detectar poluição são genes de microorganismos introduzidos no ambiente através de atividades humanas relativamente recentes, portanto estão mais relacionados à contaminação ambiental (Takada *et al.*, 1997).

Os métodos independentes de cultivo permitem detectar mais facilmente os organismos indicadores de bactérias fecais do que os métodos tradicionais de cultura. Os métodos independentes de cultivo permitem acessar diretamente o genoma dos organismos, inclusive de organismos não cultiváveis sendo necessárias apenas células intactas, em vez de células cultiváveis que precisam ser recuperadas em meios selectivos. (Bower *et al.*, 2005)

1.3 Bioinformática

A bioinformática é um campo da ciência que emprega ferramentas computacionais no estudo de problemas e questões biológicas, abrangendo também as aplicações relacionadas à saúde humana (Verli, 2014).

As técnicas moleculares associadas às ferramentas da biologia computacional tem fornecido um suporte para avaliação das fontes de poluição além de inferir a relação filogenética entre os marcadores de poluição. Estudos de DNA ambiental geralmente resultam na produção de um grande volume de dados, gerados pelo sequenciamento requerendo uma alta capacidade das ferramentas de bioinformática para tratá-los. O tratamento de dados metagenômicos para posterior análise genética necessita de uma série de ferramentas da bioinformática dado que a abundância das sequências obtidas, especialmente com equipamentos de sequenciamento de nova geração, já não podem ser processadas manualmente (Cardoso *et al.*, 2012).

A criação de bases de dados biológicos com informações já processadas acelerou a investigação em vários campos da ciência (Borém & Santos, 2001). Os dados gerados pelo sequenciamento ficam assim disponibilizados publicamente

para diversas análises adicionais. Estão disponíveis, várias bases de dados voltados para pesquisas biológicas, como por exemplo: o *GenBank* - banco de dados de sequências genéticas do *NCBI - National Center for Biotechnology Information* , *MG-RAST - Metagenomics analysis server* (bases de dados metagenômico) , *Ribosomal - RDP Classifier II - Ribosomal database project* (banco de dados ribossomal) , *Kegg - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (banco de dados que integra informações genômicas, químicas e sistemática funcional) estão entre os bancos de dados utilizados em nosso trabalho *in silico*.

1.4 Filogenia molecular

A filogenia é utilizada para a classificação dos organismos atribuindo-lhes uma relação evolutiva, tornando-se possível inferir a sua origem. Esta inferência pode ser feita através de sequenciamento de ácidos nucleicos (genes) ou aminoácidos (proteínas). Contudo, quando se propõe investigar as relações entre diferentes espécies, análises de genes ribossomais são os mais utilizados, pois independente da espécie ou organismo, os indivíduos possuirão genes codificantes de RNA ribossômico (Verli, 2014).

Com a busca de genes e genomas de referência em bancos dados curados, podemos construir árvores filogenéticas que nos fornecerão a relação evolutiva entre os organismos de forma gráfica. As árvores filogenéticas expressam a similaridade, ancestralidade e os relacionamentos filogenéticos entre as espécies ou grupo de espécies (Viana, 2007). Com isto, após o sequenciamento, as sequências dos marcadores moleculares de poluição serão utilizadas em análises filogenéticas para identificar e confirmar a origem taxonômica dos microrganismos.

1.5 Contexto Histórico e caracterização da área de estudo

1.5.1 Complexo de Manguinhos

O Complexo de Manguinhos abrange uma região formada por 16 comunidades e há a estimativa de que aproximadamente 48.500 pessoas residam

no local (Lima & Bueno, 2010). Esta compreendida na região Hidrográfica RH-V Baía de Guanabara e traz em seu histórico os impactos ambientais causados pelo desmatamento e o crescimento desordenado.

Os rios do entorno do complexo de maguinhos encontram-se extremamente poluídos, reflexo de anos de degradação representando um grave risco à saúde pública.

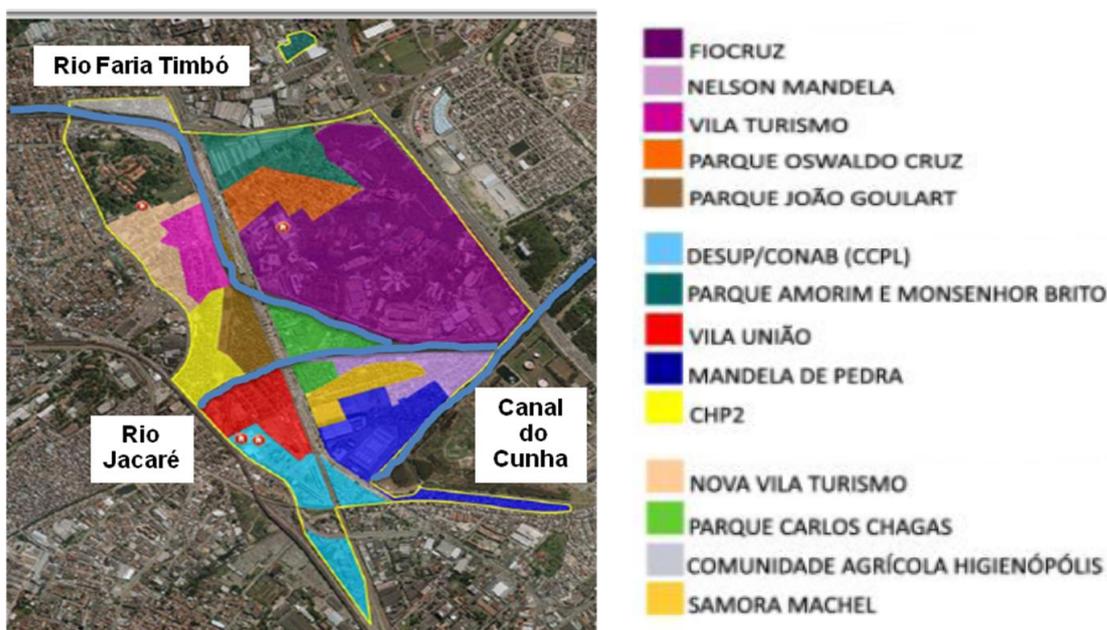


Figura 1: Mapa do Território de Manguinhos com delimitação das comunidades (microáreas). Fonte: Projeto Inquérito de Manguinhos, PDTSP-TEIAS.

1.5.2 Sub-bacia do Canal do Cunha

A Sub-bacia do canal do Cunha está localizada na primeira área industrial da cidade. Com uma extensão de 57,77 Km² de área, completamente descaracterizada, apresenta o canal, formado a partir da união dos canais de Benfica e Manguinhos, com a sua foz para a Baía da Guanabara.

O número de habitantes é de aproximadamente 825.000 pessoas, o que equivale a 14,1% da população da cidade do Rio de Janeiro. A área do entorno do canal do Cunha é atualmente caracterizada pelo alto grau de degradação ambiental e social (Pereira, 2012).

Já se sabe que a sub-bacia do canal do Cunha é um dos principais poluidores da Baía de Guanabara, pois coleta as águas dos rios que nascem na Serra dos Pretos Forros e no Maciço da Tijuca (rio Benfica, Jacaré, Faria-Timbó e Salgado) atravessando áreas densamente povoadas como: Cascadura, Piedade, Lins de Vasconcelos, Engenho de Dentro, Inhaúma, Maria da Graça, Manguinhos e São Cristóvão levando todos os resíduos domésticos e industriais gerados nestes bairros, sendo responsável pelo grande volume de lixo e esgoto na Baía de Guanabara. Além disso, sofre reflexo dos impactos ambientais causados pelo antigo aterro sanitário do Caju, a proximidade de refinarias e a intensa ocupação de suas margens (Amaral, 2006). A Tabela abaixo apresenta os rios da sub-bacia do Cunha que serão abordados neste estudo:

Tabela 1: Rios da sub-bacia do Cunha apresentados no trabalho

Curso d' água	Localização (bairro)	Nscente	Foz	Comprimento (Km)	Situação
Rio Faria-Timbó	Higienópolis Bonsucesso Manguinhos	Serra dos Pretos - Forros	Canal do Cunha	3,2	Extremamente poluído
Rio Jacaré	Jacarepaguá Lins dos Vasconcelos, Engenho Novo, Jacaré, Jacarezinho, Manguinhos	Morro do elefante	Canal do Cunha	8,3	Extremamente poluído
Canal do Cunha	Manguinhos	* Liga o rio Jacaré ao Canal do fundão	Baía de Guanabara	1,0	Extremamente poluído

Fonte: www.educacaopublica.rj.gov.br/oficinas/geologia/hidrografia_rj/14.html acessado em Dezembro de 2014.

O Rio Faria nasce na Serra dos Pretos-Forros, corta vários bairros do subúrbio carioca e nas proximidades do bairro de Inhaúma recebe as águas afluentes do também poluído Rio Timbó, formando assim o Rio Faria-Timbó vindo desaguar no canal do Cunha.

O rio Jacaré nasce no morro do Elefante, no maciço da Tijuca e atravessa a região onde se localiza a comunidade do Jacarezinho e os bairros Méier, Engenho

Novo e Triagem. Cortando diversos bairros e comunidades o rio chega ao canal do Cunha completamente poluído.

1.5.3 Atividades poluidoras e saneamento

Os bairros situados no entorno da sub-bacia do canal da Cunha, trazem em seu histórico a instalação de indústrias (farmacêuticas, petrolíferas, navais, entre outras), pólos comerciais, portos, além das instalações residenciais regulares e irregulares já citadas anteriormente.

A cidade do Rio de Janeiro foi a terceira do mundo a possuir esgotamento sanitário em meados de 1863 (CEDAE, 2010), porém não abrangia toda a região. Até hoje por falta de redes coletoras, uma boa parte do esgoto domiciliar gerado no município chega aos rios e conseqüentemente à Baía de Guanabara sem nenhum tipo de tratamento comprometendo a saúde ambiental e pública.

Entre os poluentes resultantes do esgoto estão: resíduos químicos, detergentes, organoclorados, lixiviados, nitratos que estão presentes no esgoto doméstico (Cipis *et al.*, 2003). Estas fontes poluidoras interferem na qualidade da água expondo os recursos hídricos a serem veículos de disseminação de doenças e, além disso, componentes químicos podem interferir na detecção de microrganismos alterando tanto a biodiversidade aquática quanto a detecção de microrganismo indicadores de poluição.

De acordo com a classificação do Sistema de Licenciamento Ambiental - SLAM, os municípios compreendidos na RH-V Baía de Guanabara, foram classificados com potencial poluidor muito alto, uma vez que possuem mais de 50 empreendimentos licenciados. Vale ressaltar que o SLAM classifica os empreendimentos até o potencial poluidor alto, no entanto, a classe muito alta foi adotado para este municípios (Pereira, 2012).

A seguir apresentamos um mapa do RH-V Baía de Guanabara, representado os grandes empreendimentos licenciado e o potencial poluidor de suas atividades.

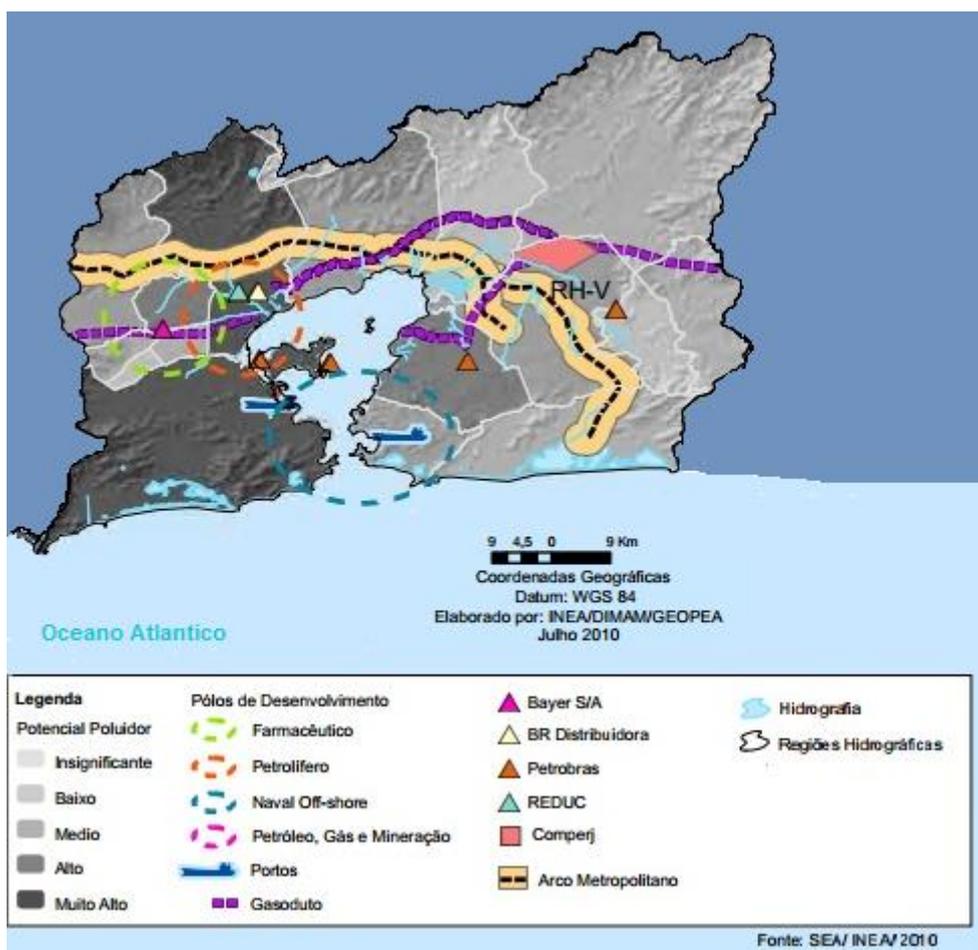


Figura 2: Grandes empreendimentos e o potencial poluidor das atividades licenciadas, RH-V Baía de Guanabara. Fonte: SEA/INEA 2010 (Bastos & Napoleão, 2010), modificado por Priscila Moura.

1.6 Justificativa

A escolha do Complexo de Manguinhos para a nossa pesquisa, é justificada, pois nesta região encontramos as sub-bacias mais degradadas do Rio de Janeiro. A avaliação da balneabilidade é atualmente feita por microbiologia clássica, onde se espera analisar quantitativamente a presença de *Escherichia coli* e coliformes totais. Assim é traçado um perfil para determinar se o recurso hídrico está balneável e conseqüentemente poluído ou não. Esta análise microbiológica fornece dados limitados apenas destes grupos de bactérias que são universalmente usadas como indicadores de poluição. A nossa proposta é avaliar por análises moleculares de forma qualitativa e abrangente, a presença de marcadores de fontes microbianas (16S rRNA, nifH, uidA, HadV, T-antigen, COWP e beta-giardin), representantes dos grupos de bactérias, vírus e protozoários que fornecem indícios de que um recurso hídrico está poluído por fontes humanas, ou seja, esgoto. Estes marcadores estão no grupo genes que têm sido utilizados como marcadores de poluição, por serem comumente detectados em amostras contaminadas por resíduos humanos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar poluição biológica em água balneável do Complexo de Manguinhos, com o uso de ferramentas moleculares e de bioinformática.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a presença de poluição antrópica através da técnica de PCR e iniciadores para genes marcadores de vírus, bactérias e protozoários, normalmente encontrados em águas contaminadas.

- Confirmar a taxonomia dos microrganismos poluentes detectados no Complexo de Manguinhos por meio de ferramentas de filogenia molecular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pesquisa *in silico* dos marcadores moleculares de poluição

Visando avaliar a presença dos marcadores moleculares selecionados para este estudo em um ambiente aquático, realizamos uma análise *in silico* (análises computacionais) com as sequências dos marcadores moleculares de poluição contra o metagenoma da Baía de Guanabara. Escolhemos este metagenoma, pois os rios avaliados em nosso estudo deságuam na Baía de Guanabara, sendo um ambiente ideal para nossa análise.

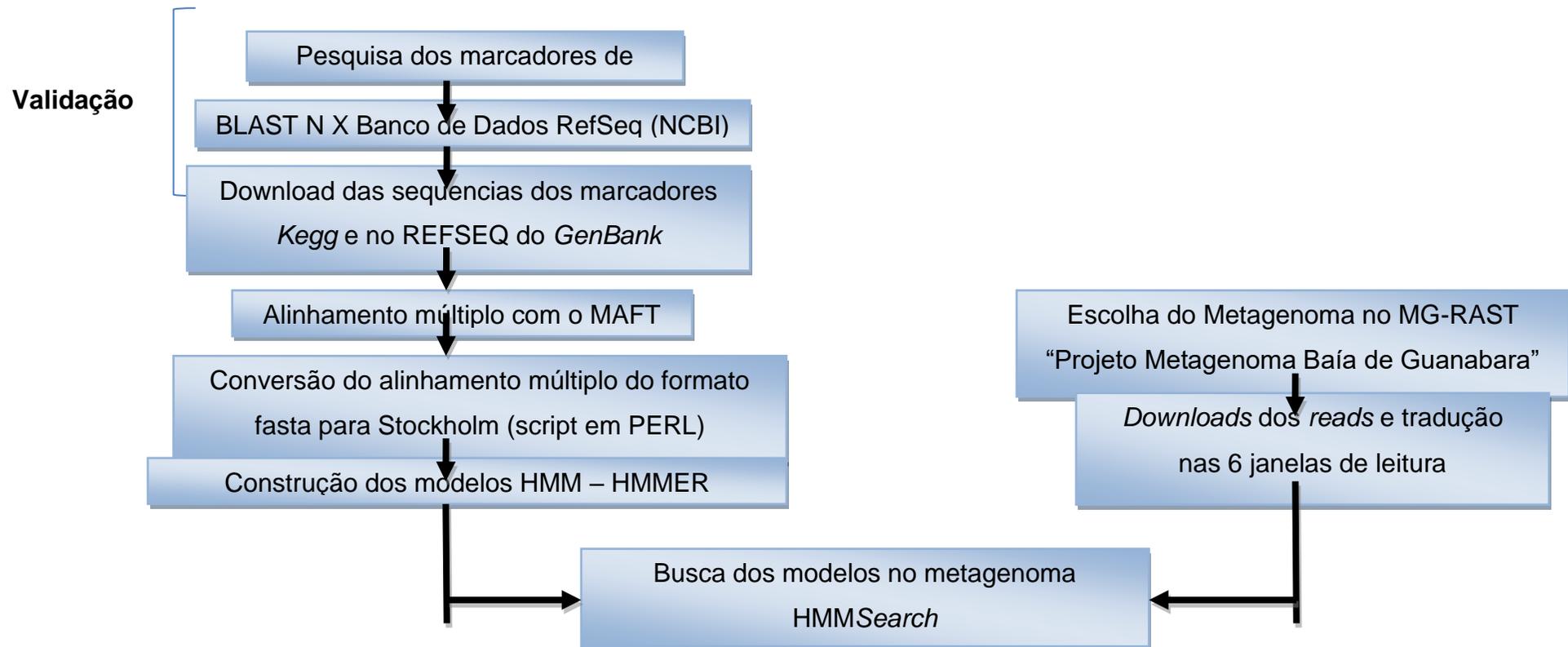
O metagenoma foi obtido no banco de dados MG-RAST – servidor de análises metagenômicas, “*Project Guanabara Bay Metagenome*” disponível em (<http://metagenomics.anl.gov/linkin.cgi?project=1929>).

As sequências dos marcadores moleculares e seus ortólogos foram obtidas nos banco de dados RefSeq no GenBank - banco de dados de sequências genéticas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e no KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* no KEGG ORTHOLOGY – grupo de ortólogos (<http://www.genome.jp/kegg/ko.html>),

As análises foram realizadas utilizando os seguintes programas:

- **Transeq** (Rice *et al.*, 2000) - os arquivos das sequências do metagenoma concatenados foram traduzidos nas 6 janelas de leitura, os códon traduzidos em 6 possibilidades: 3 da fita senso e 3 da fita anti-senso;
- **MAFFT** (versão 6.864B) (Kato *et al.*, 2005) – foi realizado o alinhamento múltiplo das sequências baixadas nas bases de dados;
- **Fasta2stockholm** – convertemos o alinhamento múltiplo para o formato stockholm para submeter ao HMM;
- **HMMER** – utilizamos o HMM build no programa HAMMER para gerar o arquivo no modelo oculto de markov. Confrontamos os arquivos HMM gerados, com o Metagenoma da Baía de Guanabara usando o HMMsearch.

O fluxograma abaixo apresenta esquematicamente as etapas metodológicas desenvolvidas.



3.2 Coleta das Amostras

Os pontos de coletas foram definidos dentro do projeto: "Condições Socioambientais da Comunidade de Manguinhos/RJ: destaque aos aspectos sanitários da Água e do Solo do Peridomicílio", quem vem sendo realizado desde 2013, onde são avaliadas as condições colimétricas e parasitológicas da água e do solo associado as residências próximas aos rios que cortam este território. As amostras de água foram coletadas em 28 e 29 de agosto de 2014 pelo Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental da Escola Nacional de saúde pública - ENSP. No total foram coletadas 8 amostras apresentadas abaixo de correlacionada com as comunidades do entorno.

Ponto 1 – Faria Timbó - Comunidade Agrícola Higienópolis

Ponto 2 – Faria Timbó – Comunidade Vila Turismo

Ponto 3 – Rio Jacaré – Comunidade Parque João Goulart

Ponto 4 – Faria Timbó - Comunidade Vila União

Ponto 5 – Faria Timbó - Comunidade Parque Carlos Chagas

Ponto 6 – Rio Jacaré - Comunidade Parque Carlos chagas

Ponto 7 – Canal do Cunha - Comunidade Nelson Mandela

Ponto 8 – Rio Jacaré - Comunidade Nelson Mandela

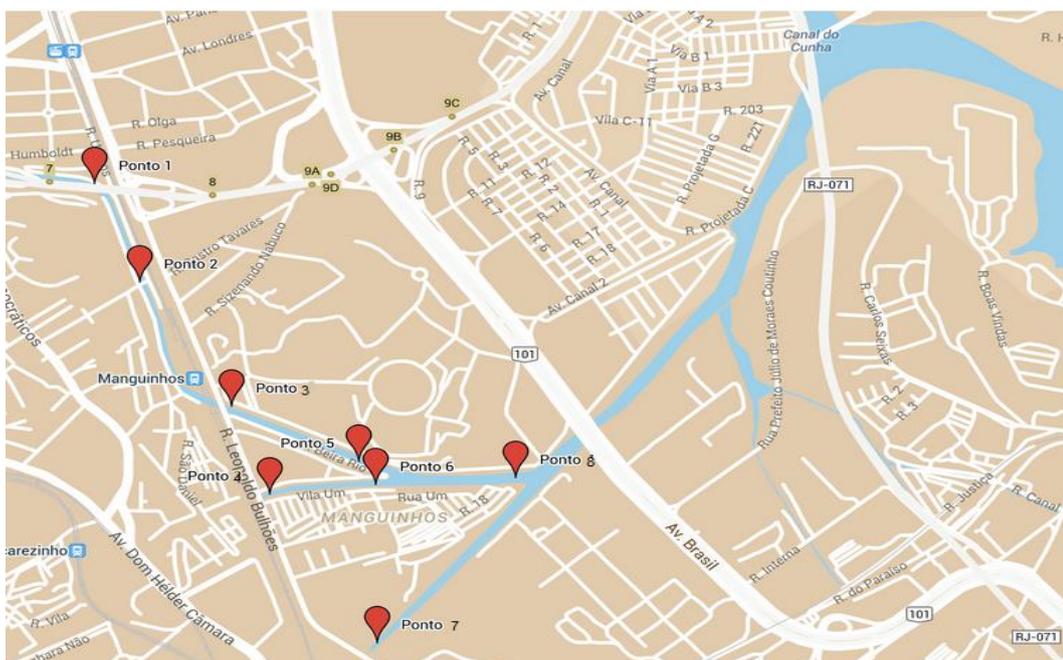


Figura 3: Pontos de coleta. As marcações em vermelho representam os pontos onde foram realizadas as coletas.

Foram coletas aproximadamente 500 ml de água, representando cada ponto amostral, em frasco devidamente esterilizado, sendo mantidas em gelo pré-filtrado e conduzidas imediatamente ao laboratório. Em seguida as amostras foram submetidas ao processo de filtração e extração de DNA.

3.3 Análises colimétricas

As análises colimétricas foram realizadas pelo departamento de Saneamento e Saúde Ambiental da Escola Nacional de Saúde Pública ENSP/FIOCRUZ.

Os níveis de coliformes totais (CT) e de *E. coli* foram realizadas pelo método da membrana filtrante descrito em *Standard Methods for the Examination of the Water and Wastewater* (Eaton *et.al*, 2005), após diferentes diluições e contagem de colônias. Para o isolamento dos microrganismos foi utilizada a metodologia descrita no Manual da Merck (2000), utilizando-se meio de cultura cromogênico indicador *Chromocult® Coliform Agar* (Cat. No. 1.10426.0100/500), onde as colônias foram diferenciadas por processo colorimétrico. Os resultados foram comparados aos valores de referência quanto aos níveis próprios e impróprios das águas de contato primário passíveis de uso para balneabilidade descritos na Resolução CONAMA No. 274/2000.

3.4 Extração de DNA metagenômico

As amostras foram submetidas ao processo de filtração a vácuo, onde foram utilizadas 3 membranas Millipore: 0,45 mm a fim de reter o material particulado em suspensão, 0,8 µm a fim de reter eucariotos e 0,22 µm a fim de reter procariotos. O mesmo volume de água (500 ml) foi filtrado nas 3 membranas e estas foram submetidas ao protocolo de extração do kit *Metagenome Isolation DNA* para água (Biotechnologies Epicentre, Madison, WI, EUA). O DNA foi extraído de acordo com as instruções do fabricante e sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1% contendo brometo de etídio (0,5µg mL⁻¹).

3.5 Controles positivos

Os controles positivos foram fornecidos de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 2: Controles positivos

Controles Positivos	
<i>Bacteroides</i> spp. - ATCC 43183 <i>Methanobrevibacter smithii</i> - ATCC 35061 <i>Escherichia coli</i> – ATCC 10536 <i>Enterococcus faecalis</i> - ATCC 51575	INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Polyomavírus humano	Laboratório de Imunologia e Imunogenética em Doenças Infecciosas do Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas
<i>Giardia duodenalis</i>	Coleção de Protozoários

Legenda: Os DNAs dos controles positivos listados foram fornecidos por institutos da FIOCRUZ.

Para a escolha das cepas de bactérias na vasta coleção disponibilizada pelo INCQS foi realizado um BLASTN para o alinhamento local entre as sequências dos marcadores moleculares e o genoma das cepas disponíveis no *GenBank*.

Não foi possível obter os controles positivos de *Bacteroides* associados a humanos, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium dentium* e *Faecalibacterium* e Adenovírus.

Os ensaios de PCR para os organismos que não obtivemos os controles positivos foram realizados apenas com as amostras coletadas (DNA de águas balneáveis do Complexo de Manguinhos).

3.6 Análises moleculares

A partir do DNA total extraído e dos controles positivos, realizamos a padronização dos ensaios moleculares através da amplificação por PCR.

Foram realizadas as reações da PCR com os 12 marcadores moleculares selecionados utilizando os 12 iniciadores previamente publicados, descritos na tabela a seguir.

Tabela 3: Iniciadores de PCR testados de bactérias.

Continuação na próxima página

Microrganismos	Iniciadores	Genes	Sequências	Bandas	Referências Bibliográficas
Bactérias					
<i>Bacteroides humanos</i>	HF183F Bac708R	16S rRNA	5'-ATCATGAGTTCACATGTCCG-3' 5'-CAATCGGAGTTCTTCGTG-3'	525 pb	(Harwood <i>et al.</i> , 2009), (McQuaig <i>et al.</i> , 2012), (Sauer <i>et al.</i> , 2011)
<i>Bacteroides spp.</i>	Hubac 566F Hubac 692R	16S rRNA	5'-GGGTTTAAAGGGAGCGTAGG-3' 5'-CTACACCACGAATTCCGCCT-3'	116 pb	(Layton <i>et al.</i> , 2006), (Sauer <i>et al.</i> , 2011)
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	Mnif-342f Mnif-363r	nifH	5'-AACAGAAAACCCAGTGAAGAG-3' 5'-ACGTAAAGGCACTGAAAAACC-3'	221 pb	(Sauer <i>et al.</i> , 2011), (Roslev & Bukh, 2011), (McQuaig <i>et al.</i> , 2009)
<i>Echerichia coli</i>	uidA298F uidA884R	uidA	5'-AATAATCAGGAAGTGATGGAGCA-3' 5'-CGACCAAAGCCAGTAAAGTAGAA-3'	500 pb	(Sauer <i>et al.</i> , 2011) (Bower <i>et al.</i> , 2005)
<i>Enterococcus faecalis</i>	M66-M107 M66-M107EFR	16S rRNA	5'-TCTTTTCCTCACTACGCTAAGTG-3' 5'-CCTCTCCACTGTAAGGTCAAATC-3'	401 pb	(Roslev <i>et al.</i> , 2011), (Soule <i>et al.</i> , 2006)
<i>Faecalibacterium</i>	HFB F HFB R	16S rRNA	5'-GCTTTCAAACCTGGTCG-3' 5'-GAAGAGAAAACGTATTTCTAC-3'	399 pb	(Roslev <i>et al.</i> , 2011), (Zheng <i>et al.</i> , 2009)
<i>Bifidobacterium dentium</i>	Bi-DEN 1 Bi-DEN 2	16S rRNA	5'-ATCCCGGGGGTTCGCCT-3' 5'-GAAGGGCTTGCTCCCGA-3'	387 pb	(Roslev <i>et al.</i> , 2011), (Bonjoch <i>et al.</i> , 2004)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Bi-ADO 1 Bi-ADO 2	16S rRNA	5'-CTCCAGTTGGATGCATGT-3' 5'-CGAAGGTTGCTCCAGT-3'	279 pb	(Roslev <i>et al.</i> , 2011), (Bonjoch <i>et al.</i> , 2004)

Tabela 3.1: Iniciadores testados de vírus e protozoários.

Microrganismos	Iniciadores	Genes	Sequências	Bandas	Referências Bibliográficas
Vírus					
Adenovírus	HAdVF HAdV R	HadV types 40,41	5'-GCCTGGGGAACAAGTTCAGA-3' 5' GCGTAAAGCGCACTTTGTAAG-3'	137 pb	(Wolf et.al., 2010)
Polyomavírus humano (HPyV)	SM2 F P6 R	T-antigen	5'-AGTCTTTAGGGTCTTCTACCTTT-3' 5'-GGTGCCAACCTATGGAACAG-3'	173 -176 pb	(McQuaig <i>et. al.</i> , 2009) (Harwood <i>et. al.</i> , 2009)
Protozoários					
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Cry-3 Cry-6 R	COWP	5'-GTCCTACTGGATTCACTCTAC-3' 5'CCGAATATGTAACACAITTTATCCGC-3'	722 -742 pb	(Ranucci <i>et al.</i> , 1993), (Cacciò & Pozio, 2001) (Zheng <i>et.al.</i> ,2009)
<i>Giardia</i> spp.	G7F G759R	beta-giardin	5'-AAGCCCGACGACCTCACCCGAGTGC-3' 5'-GAGCCGCCCTGGATCTTCGAGACGAC-3'	753 pb	(Zheng <i>et.al.</i> ,2009), (Cacciò <i>et. al.</i> , 2002)

Legenda: Iniciadores de PCR utilizados em trabalhos anteriores para a avaliação de poluição de água através de ensaios moleculares, visando propor novos marcadores de poluição.

Tabela 4: Protocolos das reações de PCR

Continuação na próxima página

PCR	Reações	Protocolos	Análises em gel de agarose	Referências
<i>E. coli</i> <i>Bacteroides</i> spp. <i>B.adolescentis</i> <i>B. dentium</i> <i>E. faecalis</i> <i>Faecalibacterium</i> spp. <i>Giardia</i> spp. <i>Cryptosporidium</i> spp.	50 µL	26,5 µL de água mili – Q; 10 µL de tampão 5X; 8 µL de cloreto de magnésio (25mM)*; (2 µL) 1µL de solução de cada iniciador (10mM)*; 2 µL de solução dNTP(10mM)*; 0,5 µL de TAQ polimerase (5U)*; 1 µL de DNA extraído.	<i>E. coli</i> - 2% <i>B. adolescentis</i> } 3% <i>B. dentium</i> } <i>Faecalibacterium</i> spp. } 1% <i>Giardia</i> spp . } <i>Cryptosporidium</i> spp. - 1,5%	(Bower <i>et al.</i> , 2005) (Layton <i>et al.</i> , 2006) (Bonjoch <i>et al.</i> , 2004) (Soule <i>et al.</i> , 2006) (Zheng <i>et al.</i> , 2009) (Cacciò & Pozio, 2001) (Cacciò <i>et al.</i> , 2002) (Ranucci <i>et al.</i> , 1993)

PCR	Reações	Protocolos	Análises	Referências
<i>Bacteroides</i> humanos <i>M. smithii</i>	25 µL	12,75 µL de água mili – Q; 5 µL de tampão 5X; 4 µL de cloreto de magnésio (25mM)*; (1 µL) 0,5 µL de solução de cada iniciador (10mM)*; 1 µL de solução dNTP (10 mM)*; 0,25 µL de TAQ polimerase (5U)*; 1 µL de DNA extraído	Gel de agarose a 2%	(Bower <i>et al.</i> , 2005) (McQuaig <i>et al.</i> , 2012) (Soule <i>et al.</i> , 2006) (Harwood <i>et al.</i> , 2009)
Adenovírus HPyV	50 µL	25,5 µL de água mili – Q; 10 µL de tampão 5X; 8 µL de cloreto de magnésio (25mM)*; (2 µL) 1µL de solução de cada iniciador (10mM)*; 2 µL de solução dNTP (10mM)*; 0,5 µL de TAQ polimerase (5U)*; 2 µL de DNA extraído	Gel de agarose a 2%, HPYV a 1,5%	(Wolf <i>et al.</i> , 2010) (Fong <i>et al.</i> , 2005) (McQuaig <i>et al.</i> , 2009) (Harwood <i>et al.</i> , 2009)

* Em parênteses são os valores das concentrações iniciais.

Legenda: Protocolos realizados de acordo com as instruções do Kit da Promega e seguindo orientações dos artigos referenciados.

Tabela 5: Ciclos de amplificação.

Continuação na próxima página

Microrganismos	Iniciadores	Ciclos	Referências
Bactérias			
<i>Bacteroides humanos</i>	HF183F Bac708R	5 minutos de desnaturação a 95°C, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos.	(Harwood <i>et al.</i> , 2009) Otimizado
<i>Bacteroides spp.</i>	Hubac 566F Hubac 692R	Ciclo em Touchdown: 5 minutos de desnaturação a 94°C, seguido de 10 ciclos com desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 65°C por 45 segundos (decrecendo 1° por ciclo), extensão a 72°C por 60 segundos. Segundo ciclo de 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos com e extensão final a 72°C por 10 minutos.	(Layton <i>et al.</i> , 2006) (Sauer <i>et al.</i> , 2011)
<i>M. smithii</i>	Mnif-342F Mnif-363R	5 minutos de desnaturação a 95°C, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 45 minutos, anelamento a 52.8°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 45 minutos e extensão final a 72°C por 5 minutos.	(McQuaig <i>et al.</i> , 2009) Otimizado
<i>E. coli</i>	uidA298F uidA884R	4 minutos de desnaturação a 95°C, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 6 minutos.	(Bower <i>et al.</i> , 2005)
<i>E. faecalis</i>	M66-M107 M66-M107R	2 minutos de desnaturação a 95°C, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 48°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 40 segundos e extensão final a 72°C por 2 minutos.	(Soule <i>et al.</i> , 2006)
<i>Faecalibacterium spp.</i>	HFB F HFB R	2 minutos de desnaturação a 95°C, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 7 minutos.	(Zheng <i>et al.</i> , 2009)

Microrganismos	Iniciadores	Ciclos	Referências
Bactérias			
<i>B. dentium</i>	Bi-DEN 1 Bi-DEN 2	5 minutos de desnaturação a 95°C, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos.	(Bonjoch <i>et al.</i> , 2004) Otimizado
<i>B. adolescentis</i>	Bi-ADO 1 Bi-ADO 2		
Vírus			
Adenovirus	HAdVF HAdV R	5 minutos de desnaturação a 95°C, seguido de 45 ciclos com desnaturação a 95°C por 15, anelamento a 59°C por 60 segundos, extensão a 72°C por 40 segundos e extensão final a 72°C por 6 minutos.	(McQuaig <i>et al.</i> , 2009)
HPyV	SM2 F P6 R	2 minutos de desnaturação a 94°C, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 20 segundos, anelamento a 55°C por 20 segundos, extensão a 72°C por 20 segundos e extensão final a 72°C por 2 minutos.	(McQuaig <i>et al.</i> , 2009) Otimizado
Protozoários			
<i>Cryptosporidium</i> spp.	Cry-3 Cry-6 R	3 minutos de desnaturação a 94.5°C, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 94.5 °C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 6 minutos.	(Cacciò & Pozio, 2001) Otimizado
<i>Giardia</i> spp.	G7F G759R	5 minutos de desnaturação a 94°C, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 65°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 60 segundos e extensão final a 72°C por 7 minutos.	(Cacciò <i>et al.</i> , 2002) Otimizado

Legenda: Descrição dos ciclos de PCR. Onde lê-se otimizado, usou os artigos referenciados como base mas foi otimizado a fim de melhorar os experimentos e reduzir a inespecificidade.

Os produtos gerados pelas reações da PCR foram submetidos à eletroforese em géis de agarose com a porcentagem específica para cada microorganismo (de acordo com o peso molecular) como descrito na Tabela 3, com tampão TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2mM, pH 8,5), corados com brometo de Etídio (1µg/ml), utilizando como padrão de peso molecular o marcador *O'GeneRuler 100 pb DNA Ladder* (Fermentas®). A visualização dos produtos amplificados foi realizada por exposição à luz UV em um Transiluminador BioAgency (Sistema EasyDoc 100).

3.7 Purificação dos produtos da PCR

Os produtos de PCR que apresentaram os fragmentos no tamanho esperado foram extraídos e purificados a partir do gel pelo Kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos que apresentaram inespecificidades, além dos fragmentos do tamanho esperado, tiveram os fragmentos de tamanho esperado extraídos para posterior purificação do gel através do mesmo *Kit*.

A visualização dos produtos purificados foi realizada seguindo o mesmo procedimento descrito à cima, para a visualização e confirmação dos produtos de PCR gerados.

3.8 Clonagem e extração de DNA plasmidial (mini-prep)

A fim de aumentar o número de cópias dos fragmentos gerados pelo PCR, foi realizada a clonagem dos produtos purificados. Foram escolhidos de 2 a 3 produtos purificados de cada marcador molecular de forma representativa, totalizando 24 amostras submetidas a clonagem, sendo ligadas ao vetor *pGEM®-T Easy* (Promega) seguindo o protocolo de acordo com as instruções do fabricante e posteriormente transformadas em células DH5α de *E. coli*, por choque térmico (Sambrook J, 2001). As bactérias foram semeadas pela técnica de esgotamento em placas de *petri* contendo, meio de levedura (LB) com antibiótico (ampicilina 100 mg/ml), X-gal 2% e IPTG (23,8 mg/ml), a fim de crescer apenas as bactérias que obtiveram coloração branca, indicando que não houve a expressão da β-galactosidase, facilitando assim, a identificação dos clones recombinantes.

De cada placa, oito clones positivos (contendo o inserto) foram selecionados e extraídos para um novo crescimento em placas de 96 poços com meio de levedura líquido e antibiótico (ampicilina 50ng/ml). As placas ficaram 18h em um agitador à 37°C com rotação de 200 rpm para o crescimento dos clones e posterior purificação por mini-preparação (Sambrook J, 2001). Para verificação do resultado final da purificação, 2 µl dos 12 poços (1 clone de cada marcador) do produto final da mini-preparação foram selecionados de cada placa (2 placas totalizando 24 poços) , e avaliados em gel de agarose seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente, para a visualização e confirmação dos produtos gerados.

3.9 Sequenciamento

Foi submetido ao sequenciamento, tanto o produto de PCR purificado, quanto o produto final da clonagem, ambos foram sequenciados utilizando o método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) com os iniciadores específicos de cada marcador descritos na tabela 2 em uma concentração de 3,2 pmol, no sequenciador capilar automático ABI - 3730 (Applied Biosystems) nas instalações do núcleo de sequenciamento PDTIS (IOC / FIOCRUZ , Brasil).

3.10 Análises das sequências

Os eletroferogramas foram processados e submetidos ao programa PHRED (Ewing *et al.*, 1998), que limpa as sequências avaliando a qualidade e a taxa de erro (sequências de baixa qualidade). Utilizamos o corte de qualidade PHRED 20 e o comprimento > 100 pares de base, onde a probabilidade de erro para cada base é de 1 em 100 com precisão de 99%;

As sequências de alta qualidade, PHRED 20, foram submetidas às análises de similaridade usando o BLASTN contra o banco de dados de nucleotídeos não redundante REFSEQ (Banco de dados de Sequências de Referência - versão 69.0) do NCBI versão 206.0 (Centro Nacional para Informação Biotecnológica) para o alinhamento local com as sequências de referência disponíveis no GenBank. Em

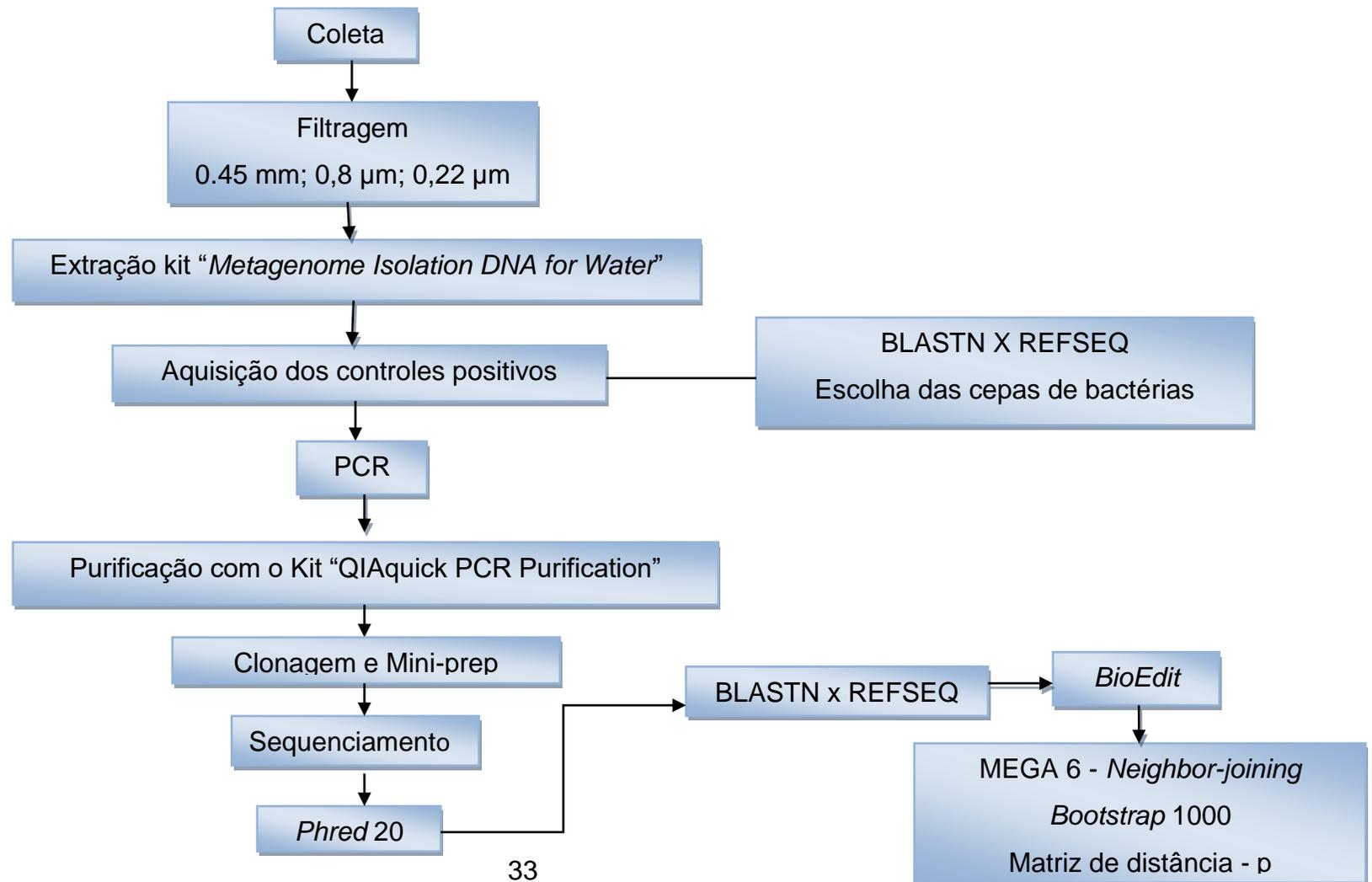
seguida as sequências foram alinhadas e editadas no programa *BioEdit* versão 7.2.5 (Hall, 1999).

3.11 Análises filogenéticas

Após o alinhamento, árvores foram geradas no programa MEGA versão 6 (Tamura *et al.*, 2013), através do algoritmo *Neighbor-joining*, a matriz de distância – p, pois as sequências não apresentaram polimorfismo e o grau de divergência foi inferior a 5%, número médio de diferenças par a par com análise de *bootstrap* em 1000 replicatas, *complete deletion*.

Das sequências selecionadas que passaram pela qualidade do PHRED 20, apresentaremos as árvores dos marcadores que possuem regiões conservadas em outros microrganismos ou no mesmo microrganismo, mas em espécies diferentes.

3.12 Fluxograma



4 RESULTADOS

4.1 Pesquisa *in silico* dos marcadores moleculares de poluição no metagenoma da Baía de Guanabara.

Foram encontradas 84 sequências dos marcadores moleculares de poluição, testados no metagenoma da Baía de Guanabara, que tem como total 247.805 sequências. Os marcadores foram distribuídos da seguinte forma *M. smithii* (25 sequências), *E. coli* (28 sequências), *Faecalibacterium* (21 sequências), *E. faecalis* (10 sequências) e outros (247.721 sequências que não são de interesse do nosso estudo). Dos 12 marcadores moleculares pesquisados, apenas 4 foram detectados no metagenoma da baía de Guanabara.

4.2 Avaliação da qualidade da água por análises colimétricas

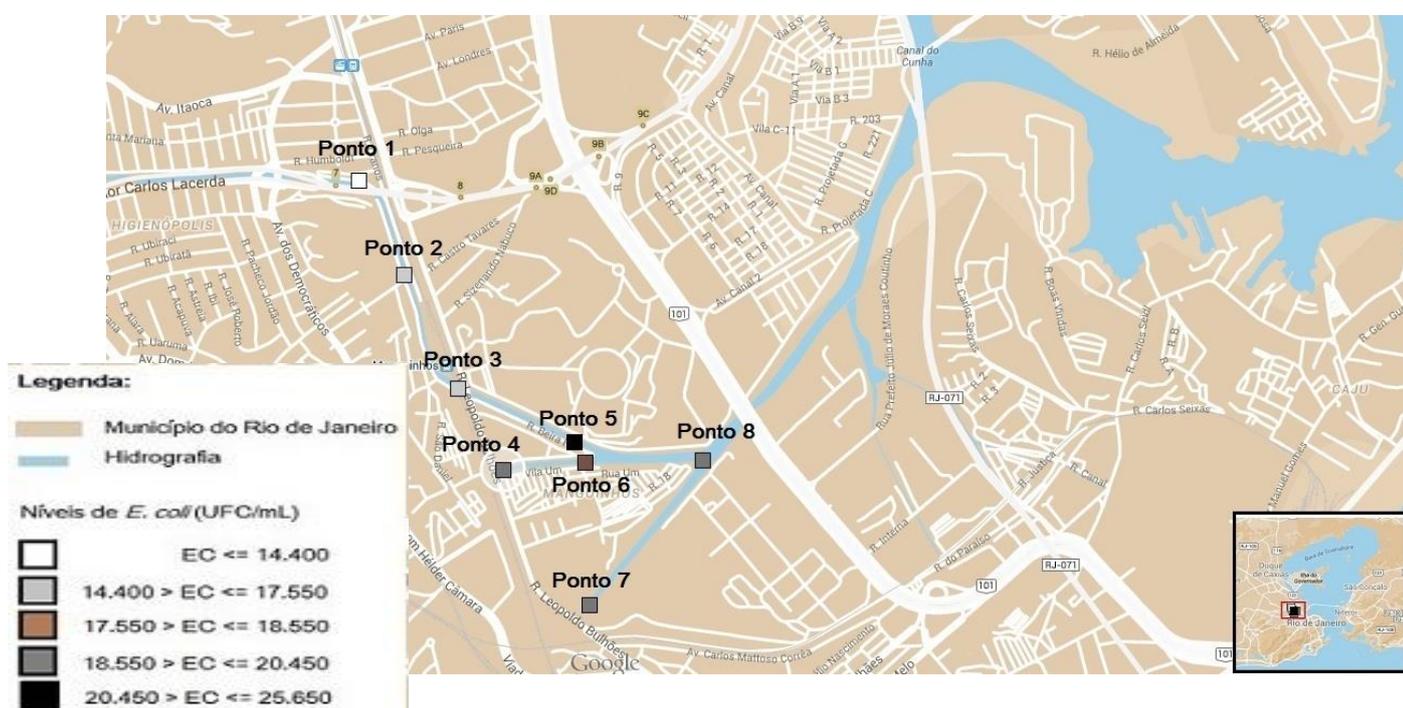


Figura 4: Mapa com a variação dos níveis de *Escherichia coli* por ponto amostral.

Todos os pontos amostrais encontram-se impróprios, excedendo o limite recomendado pela resolução CONAMA nr. 274 como satisfatório de 800 *E. coli* por 100 mililitros. Podemos observar que do ponto 1 ao 5 do rio Faria-Timbó a concentração de coliformes aumentou gradativamente tendo o ponto 5 com as concentrações mais elevadas de *E. coli*. Ao encontrar o rio Jacaré e as águas do Canal do Cunha houve uma diminuição na concentração de *E. coli*, pontos 7 e 8. Esta diminuição da concentração pode ser dada por estes rios receberem águas da Baía de Guanabara e da estação de tratamento da estação alegria o que dilui a água. Mesmo assim, todos os pontos amostrais encontram-se poluídos.

4.3 Extração de DNA

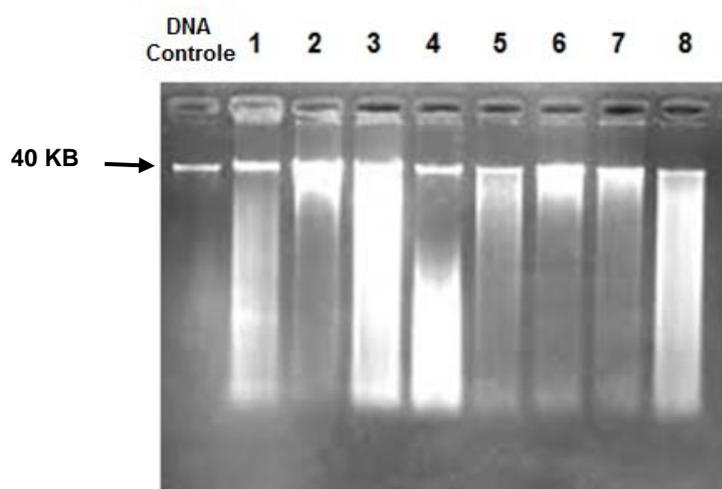


Figura 5: Gel de extração de DNA da água coletada no complexo de Manguinhos. DNA controle EPICENTRE com 100 ng e 40 KB. Amostras de 1 a 8 contendo 1µl do DNA ambiental.

As concentrações de DNA foram avaliadas usando o NanoDrop 2000 UV-Vis spectrophotometer da Thermo Scientific sendo:

- Amostra 1 com 727.4 ng/uL;
- Amostra 2 com 157.4 ng/uL;
- Amostra 3 com 269.2 ng/uL;
- Amostra 4 com 225.5 ng/uL;

- Amostra 5 com 89.8 ng/uL;
- Amostra 6 com 140.6 ng/uL;
- Amostra 7 com 119.8 ng/uL;
- Amostra 8 com 108.9 ng/uL.

4.4 Ensaios Moleculares

Os PCRs foram realizados de acordo com os protocolos descritos anteriormente e repetidos mais de uma vez a fim de padronizar os protocolos e confirmar os resultados. O marcador de peso molecular utilizado foi de 100 pares de base, a concentração dos géis está descrita na Tabela 4 e os controles negativos utilizados nos experimentos foram água. A seguir, apresentamos as fotos dos géis.

4.4.1 PCR de *Bacteroides* associados a Humanos primers HF183F/BAC708R

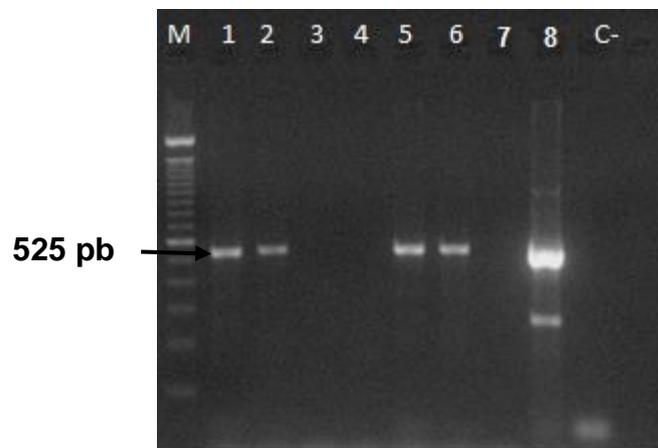


Figura 6: PCR *Bacteroides* associados a humanos.

Os pontos 1,2 e 5 do rio Faria-Timbó e os pontos 6 e 8 do rio Jacaré apresentaram –se positivos no PCR utilizando o marcador molecular 16S rRNA para *Bacteroides* associados a humanos. Os pontos 3 (rio Jacaré), 4 (rio Faria-Timbó) e 7 (Canal do Cunha) apresentaram-se negativos. O peso molecular esperado foi de 525 pares de base.

4.4.2 PCR de *Bacteroides* spp. primers HUBAC 566F/ 692R

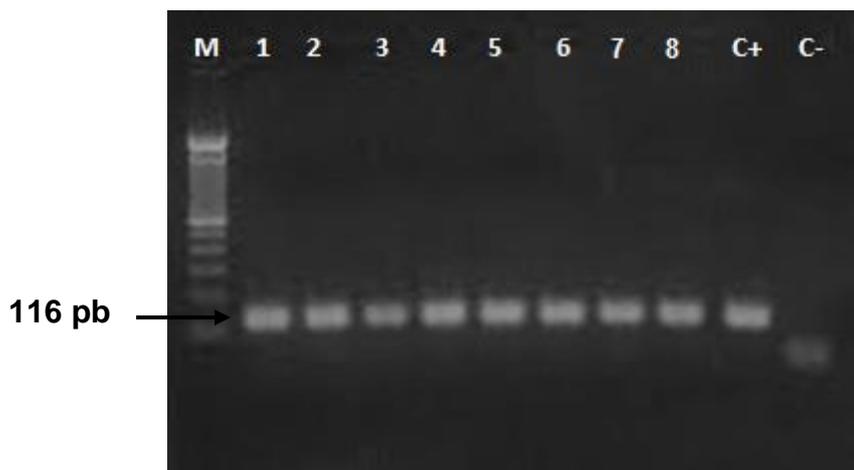


Figura 7: PCR *Bacteroides* spp.

Todos os pontos (pontos 1, 2, 4, 5 rio Faria-Timbó, pontos 3, 6 e 8 rio Jacaré e ponto 7 Canal do Cunha) apresentaram-se positivos no PCR utilizando o marcador molecular 16S rRNA para *Bacteroides* spp. .O peso molecular esperado foi de 116 pares de base.

4.4.3 PCR de *Methanobrevibacter smithii* primers nifH 342F/363R

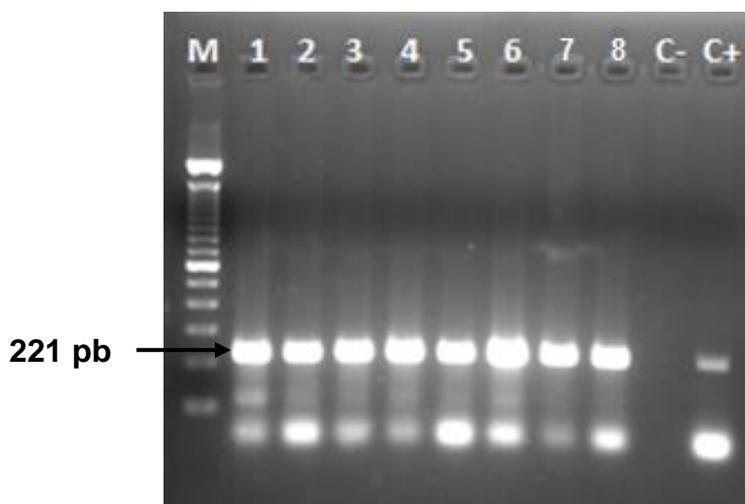


Figura 8: PCR *Methanobrevibacter smithii*.

O PCR foi positivo em todos os pontos avaliados (pontos 1, 2, 4, 5 rio Faria-Timbó, pontos 3, 6 e 8 rio Jacaré e ponto 7 Canal do Cunha), utilizando o marcador molecular nifH. O peso molecular esperado foi de 221 pares de base.

4.4.4 PCR de *Escherichia coli* primers uidA 298F/ uidA 884R

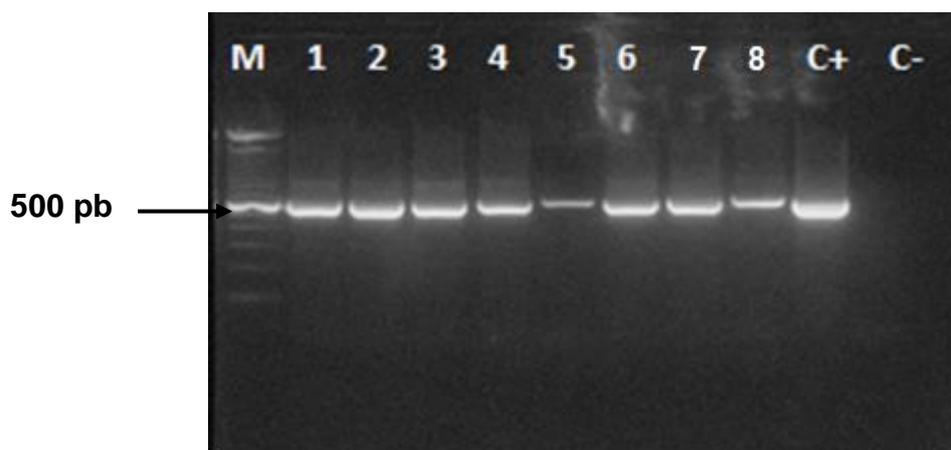


Figura 9: PCR *Escherichia coli*.

Todos os pontos apresentaram-se positivos (pontos 1, 2, 4, 5 rio Faria-Timbó, pontos 3, 6 e 8 rio Jacaré e ponto 7 Canal do Cunha), no PCR utilizando o marcador molecular uidA. O peso molecular esperado foi de 500 pares de base.

4.4.5 PCR *Enterococcus faecalis* primers M66-M107/M66-M107EFR

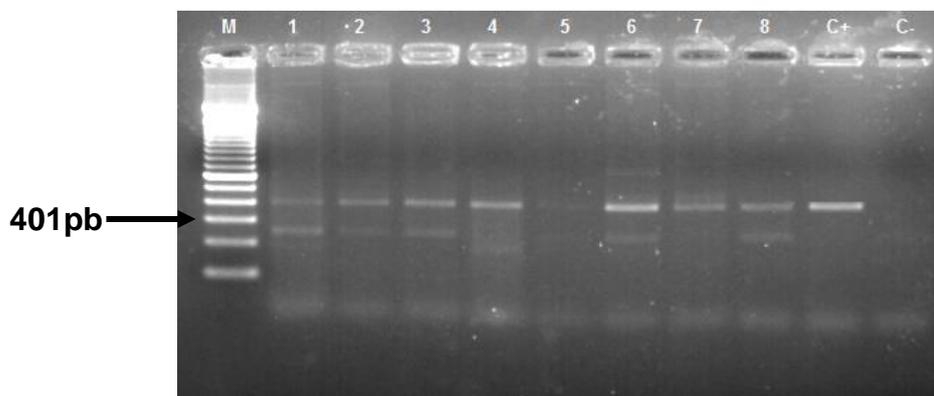


Figura 10: PCR *Enterococcus faecalis*.

Apenas o ponto 5 do rio Faria-timbó apresentou-se negativo ao PCR com o marcador molecular 16S rRNA para *E. faecalis*. Todos os outros pontos (pontos 1, 2, 4 rio Faria-Timbó, pontos 3, 6 e 8 rio Jacaré e ponto 7 Canal do Cunha) apresentaram-se positivos no PCR. O peso molecular esperado foi de 401 pares de base.

4.4.6 PCR de *Faecalibacterium* primers HFB F/HFB R

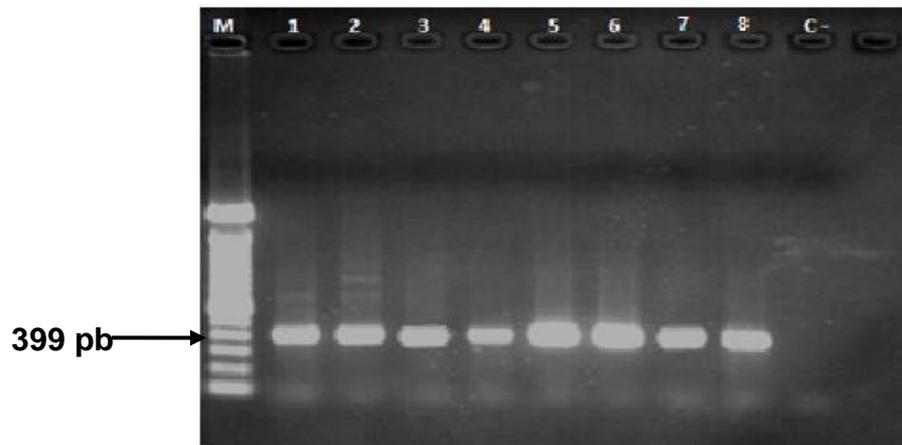


Figura 11: PCR *Faecalibacterium* spp.

O PCR apresentou-se positivo em todos os pontos (pontos 1, 2, 4, 5 rio Faria-Timbó, pontos 3, 6 e 8 rio Jacaré e ponto 7 Canal do Cunha), utilizando o marcador molecular 16S rRNA para *Faecalibacterium* spp.. O peso molecular esperado foi de 399 pares de base.

4.4.7 PCR de *Bifidobacterium dentium* primers Bi-DEN 1/Bi-DEN 2

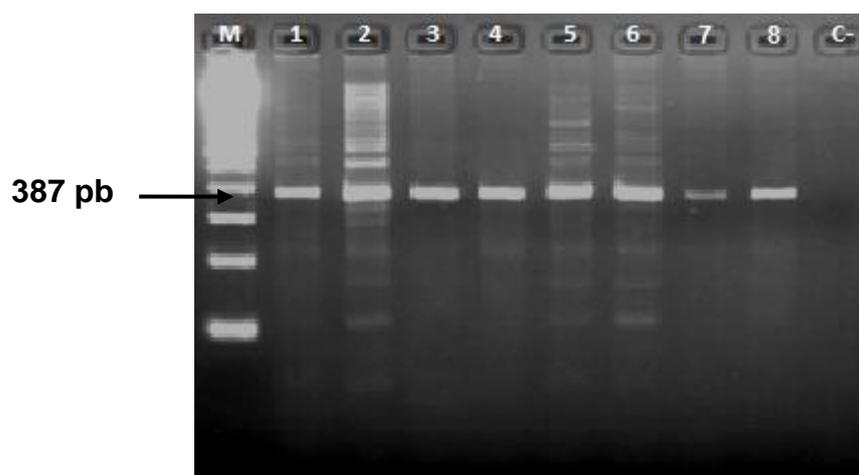


Figura 12: PCR *Bifidobacterium dentium*.

O PCR apresentou-se positivo em todos os pontos (pontos 1, 2, 4, 5 rio Faria-Timbó, pontos 3, 6 e 8 rio Jacaré e ponto 7 Canal do Cunha), utilizando o marcador molecular 16S rRNA para *B. dentium*. O peso molecular esperado foi de 387 pares de base.

4.4.8 PCR de *Bifidobacterium adolescentis* primers Bi-ADO 1/Bi-ADO 2

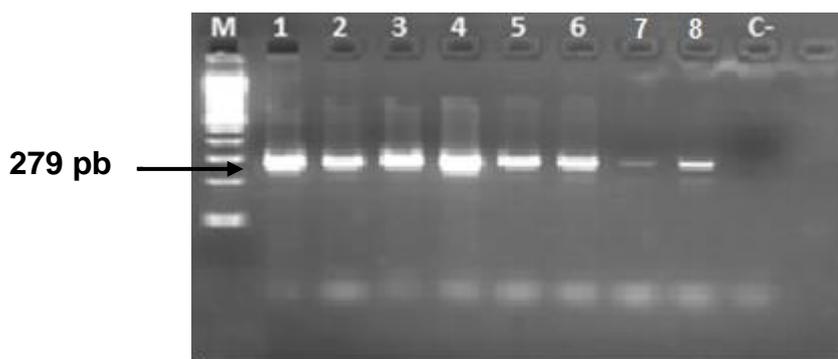


Figura 13: PCR *Bifidobacterium adolescentis*.

Todos os pontos apresentaram-se positivos (pontos 1, 2, 4, 5 rio Faria-Timbó, pontos 3, 6 e 8 rio Jacaré e ponto 7 Canal do Cunha) no PCR utilizando o marcador molecular 16S rRNA para *B. adolescentis*. O peso molecular esperado foi de 279 pares de base.

4.4.9 PCR de Adenovírus primers VTB1-HAdVF F/ VTB1-HAdVR

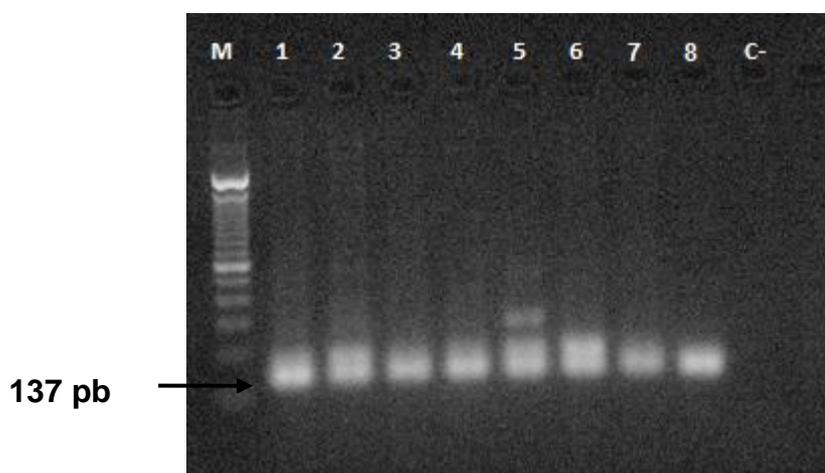


Figura 14: PCR de Adenovirus.

O PCR apresentou-se positivo em todos os pontos (pontos 1, 2, 4, 5 rio Faria-Timbó, pontos 3, 6 e 8 rio Jacaré e ponto 7 Canal do Cunha) utilizando o marcador molecular HadV. O peso molecular esperado foi de 137 pares de base.

4.4.10 PCR de HPyV primers SM2 F/P6 R

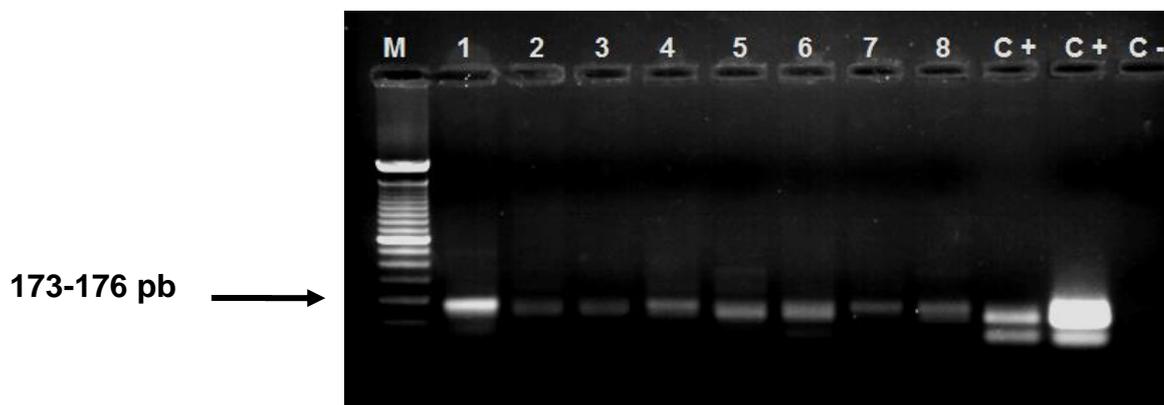


Figura 15: PCR HPyV.

O PCR apresentou-se positivo em todos os pontos (pontos 1, 2, 4, 5 rio Faria-Timbó, pontos 3, 6 e 8 rio Jacaré e ponto 7 Canal do Cunha), utilizando o marcador molecular T- antigen. O peso molecular esperado foi de 173 a 176 pares de base. A fim de reduzir a inespecificidade realizamos um *nested* PCR que tem sido recomendado por McQuaig e colaboradores (2012), na pesquisa HPyV associado a indicadores de bactérias fecais em amostras de água.

4.4.11 PCR de *Giardia* spp. primers G7F/G759R

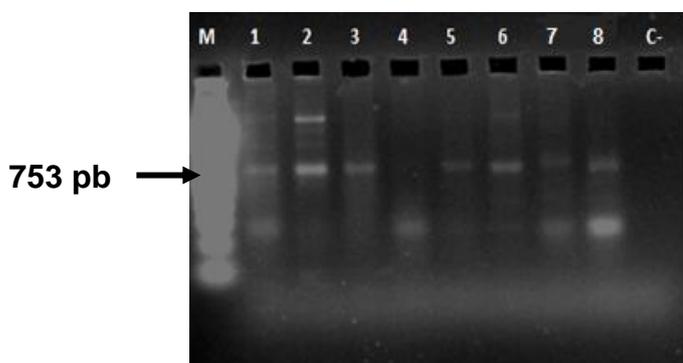


Figura 18: PCR do protocolo publicado de *Giardia* spp. sem controle positivo.

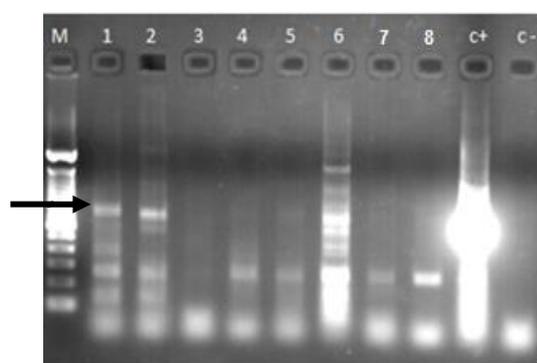


Figura 19: PCR protocolo otimizado de *Giardia* spp. com controle positivo.

Realizamos o PCR com diferentes protocolos. A figura 18 representa o PCR seguindo o protocolo previamente publicado, nesse momento, não tínhamos o controle positivo. O PCR apresentou-se positivo nos pontos 1, 2 e 5 do rio Faria-Timbó, pontos 3, 6 e 8 no rio Jacaré e ponto 7 no Canal do Cunha utilizando o marcador molecular beta- giardin e peso molecular esperado foi de 753 pares de base. A figura 19 representa o PCR otimizado aumentando o ciclo de anelamento a fim de reduzir a inespecificidade e já possuíamos o controle positivo para confirmar a amplificação. O PCR foi positivo nos pontos 1 e 2 do rio Faria-Timbó e 6 do rio Jacaré utilizando o marcador beta – giardin. Observamos que com a otimização do protocolo, alguns pontos amostrais que haviam apresentado bandas anteriormente, não mostraram – se positivos. Cortamos as bandas no tamanho esperado do PCR figuras 18 e 19, submetemos a purificação e posteriormente ao sequenciamento para confirmar a amplificação.

4.4.12 PCR *Cryptosporidium* spp. primers Cry-3/Cry-6R

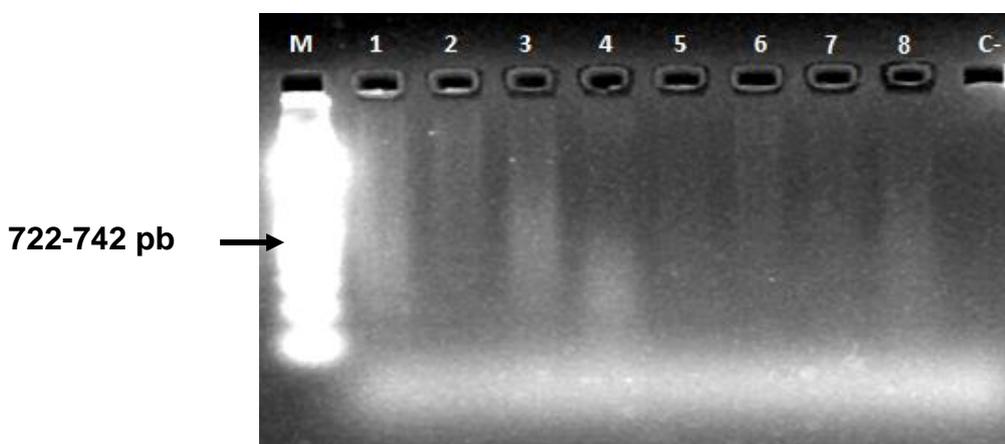


Figura 16: PCR *Cryptosporidium* spp.

O PCR apresentou-se negativo em todos os pontos amostrais utilizando o marcador molecular COWP. O peso molecular esperado foi de 722 a 742 pares de base. Realizamos o PCR com o protocolo previamente publicado e otimizado de acordo com a temperatura de anelamento e também com a quantidade de magnésio.

Como não obtivemos o controle positivo, não podemos afirmar se o PCR não funcionou ou se não há presença de *Cryptosporidium* spp. em nossos pontos amostrais.

Todas as bandas foram cortadas no tamanho esperado e submetidas à purificação a partir do gel ou no caso de PCRs com apenas bandas específicas, através da purificação diretamente do produto de PCR. Posteriormente os DNAs foram confirmados pelo sequenciamento, cujos resultados serão apresentados a seguir.

Tabela 6: Resultados da amplificação por PCR

Microrganismos	Pontos amostrais								
	1	2	3	4	5	6	7	8	C+
<i>Bacteroides humanos</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	A
<i>Bacteroides</i> spp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>Faecalibacterium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	A
<i>Bifidobacterium dentium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	A
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	A
Adenovírus	+	+	+	+	+	+	+	+	A
Polyomavírus Humano (HPyV)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Giardia</i> spp.	+	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>Cryptosporidium</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	A

Legenda: Amostras positivas no PCR (+); amostras negativas no PCR (-); amostras sem o controle positivo ou ausente (A).

4.5 Detecção dos marcadores moleculares por recurso hídrico

Foram testados 12 marcadores moleculares nos 3 recursos hídricos avaliados. O marcadores molecular para *Cryptosporidium spp.* foi negativo em todos os pontos amostrais.

Quadro 4: Presença dos marcadores moleculares no rio Faria-Timbó.

	Pontos			
	1	2	4	5
<i>Bacteroides humanos</i>	■	■	□	■
<i>Bacteroides spp.</i>	■	■	■	■
<i>M. smithii</i>	■	■	■	■
<i>E. coli</i>	■	■	■	■
<i>E. faecalis</i>	■	■	■	□
<i>Faecalibacterium spp.</i>	■	■	■	■
<i>B. adolescentis</i>	■	■	■	■
<i>B. dentium</i>	■	■	■	■
Adenovírus	■	■	■	■
HPyV	■	■	■	■
<i>Giardia spp.</i>	■	■	□	■
<i>Cryptosporidium spp.</i>	□	□	□	□

Legenda: Onde lê-se ■ , representa positividade e onde lê-se □ , representa negatividade. Os pontos 1 e 2 foram positivos para todos os marcadores com exceção do marcador para *Cryptosporidium spp.*. O ponto 4 foi negativo para *Bacteroides* associados a humanos, *Giardia spp.*, *Cryptosporidium spp.*, sendo positivo para os demais marcadores. O ponto 5 foi negativo para *E. faecalis* e *Cryptosporidium spp.*, sendo positivo para os demais marcadores.

Quadro 5: Presença dos marcadores moleculares no rio Jacaré.

	Pontos		
	3	6	8
<i>Bacteroides humanos</i>	□	■	■
<i>Bacteroides spp.</i>	■	■	■
<i>M. smithii</i>	■	■	■
<i>E. coli</i>	■	■	■
<i>E. faecalis</i>	■	■	■
<i>Faecalibacterium spp.</i>	■	■	■
<i>B. adolescentis</i>	■	■	■
<i>B. dentium</i>	■	■	■
Adenovírus	■	■	■
HPyV	■	■	■
<i>Giardia spp.</i>	■	■	■
<i>Cryptosporidium spp.</i>	□	□	□

Legenda: Onde lê-se ■ , representa positividade e onde lê-se □ , representa negatividade. O ponto 3 foi negativo para *Bacteroides* associados a humanos e *Cryptosporidium spp.*, sendo positivo para os demais marcadores. Os pontos 6 e 8 apresentaram-se positivos parar todos os marcadores com exceção para *Cryptosporidium spp.*.

Quadro 6: Presença dos marcadores moleculares no Canal do Cunha.

	Ponto
	7
<i>Bacteroides humanos</i>	
<i>Bacteroides spp.</i>	
<i>M. smithii</i>	
<i>E. coli</i>	
<i>E. faecalis</i>	
<i>Faecalibacterium spp.</i>	
<i>B. adolescentis</i>	
<i>B. dentium</i>	
Adenovírus	
HPyV	
<i>Giardia spp.</i>	
<i>Cryptosporidium spp.</i>	

Legenda: Onde lê-se  , representa positividade e onde lê-se  , representa negatividade. O ponto 7 foi negativo para *Bacteroides* associados a humanos, *E. faecalis* e *Cryptosporidium spp.*, sendo positivo para os demais marcadores.

4.6 Análises das sequências

As sequências geradas pelo sequenciamento foram submetidas ao PHRED acima do corte de qualidade 15 (menos estrigente) e 20 (mais estrigente). A fim de selecionar sequências de alta qualidade, escolhemos as sequências avaliadas pelo PHRED 20 para dar continuidade as análises, porém na tabela a seguir, apresentamos o resultado *best hit* da busca de similaridade das sequências PHRED 15 com sequências disponíveis no *Genbank*.

Tabela 7: Resultado do BLASTN entre as amostras sequenciadas contra o banco de dados REFSEQ do *Genbank*.

Microrganismos	Pontos amostrais							
	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Bacteroides humanos</i>	-	-	-	-	JH724132.1	JH724132.1	-	FJ512563.1
<i>Bacteroides spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	CP009685.1	CP009685.1	KJ081011.1	CP009685.1				
<i>M. smithii</i>	CP000678.1	DQ280378.1	CP000678.1	CP000678.1	DQ280378.1	CP000678.1	-	-
<i>B. adolescentis</i>	KF809884.1	KF809884.1	CP007443.1	KF809884.1	CP007443.1	CP007443.1	KF809884.1	KF809884.1
<i>B. dentium</i>	-	-	M58735.1	M58735.1	-	JF928023.1	-	-
<i>Faecalibacterium spp.</i>	-	-	-	-	-	-		-
Adenovírus	KJ425121.1	-	KF840515.1	KF840515.1	KJ425121.1	KF840515.1	KF840515.1	KJ425121.1
<i>Giardia spp.</i>	-	KF963547.1	KF963547.1		JF422718.1	KF963547.1	-	-

Legenda: A primeira coluna representa os microrganismos avaliados. A primeira linha horizontal representa os pontos amostrais. Onde lê-se (-) representa as amostras cujo o sequenciamento não apresentou sequências de qualidade. Onde lê-se ████████, representa amostras que não foram sequenciadas. Os resultados descritos na tabela, são os *access number* dos microrganismos de referência do *RefSeq* os quais as nossas sequências coincidiram. O e-value foi de 2e-04, 100 % de identidade, o melhor *hit*.

4.7 Alinhamento local pelo BLASTN no REFSEQ

O alinhamento local foi realizado apenas com as sequências que passaram pelo corte de qualidade PHRED 20. São elas: *Bacteroides* associados a humanos, *E. coli*, *B. adolescentis*, *Giardia* spp.

4.7.1 BLASTN *Bacteroides* associados a humanos

Bacteroides dorei CL02T12C06 supercont1.11, whole genome shotgun sequence
Sequence ID: [ref|NZ_JH724142.1](#)|Length: 87224|Number of Matches: 1
Range 1: 82138 to 82444|[GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match
Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
568 bits (307)	2e-157	307/307 (100%)	0/307 (0%)	Plus/Plus
Query 1	AAAGTACATGCAAACGGGTATGCATACCCGACTTTATTCCTTTATAAAAGAAGTTTACAA	60		
Sbjct 82138	AAAGTACATGCAAACGGGTATGCATACCCGACTTTATTCCTTTATAAAAGAAGTTTACAA	82197		
Query 61	CCCATAGGGCAGTCATCCTTACGCTACTTGGCTGGTTCAGGCCATCGCCATTGACCAA	120		
Sbjct 82198	CCCATAGGGCAGTCATCCTTACGCTACTTGGCTGGTTCAGGCCATCGCCATTGACCAA	82257		
Query 121	TATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGACCGTGTCTCAGTTCCAATGTGGGGGA	180		
Sbjct 82258	TATTCCTCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGACCGTGTCTCAGTTCCAATGTGGGGGA	82317		
Query 181	CCTTCCTCTCAGAACCCCTATCCATCGTTGACTAGGTGGGCCGTTACCCCGCCTACTATC	240		
Sbjct 82318	CCTTCCTCTCAGAACCCCTATCCATCGTTGACTAGGTGGGCCGTTACCCCGCCTACTATC	82377		
Query 241	TAATGGAACGCATCCCCATCGTCTACCGGAAAATACCTTTAATCATGCGGACATGTGAAC	300		
Sbjct 82378	TAATGGAACGCATCCCCATCGTCTACCGGAAAATACCTTTAATCATGCGGACATGTGAAC	82437		
Query 301	TCATGAT 307			
Sbjct 82438	TCATGAT 82444			

Figura 17: Alinhamento local das sequências geradas de *Bacteroides* associados a humanos, com as sequências disponíveis na base de dados REFSEQ do NCBI.

4.7.2 BLASTN *Escherichia coli*

Escherichia coli 148 contig0017, whole genome shotgun sequence
 Sequence ID: [ref|NZ_AYJX01000017.1](#)|Length: 65256|Number of Matches: 1
 Range 1: 12840 to 13423|[GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
	1057 bits (572)	0.0	579/584 (99%)	0/584 (0%)	Plus/Plus
Query 2					
Sbjct 12840					
Query 62					
Sbjct 12900					
Query 122					
Sbjct 12960					
Query 182					
Sbjct 13020					
Query 242					
Sbjct 13080					
Query 302					
Sbjct 13140					
Query 362					
Sbjct 13200					
Query 422					
Sbjct 13260					
Query 482					
Sbjct 13320					
Query 542					
Sbjct 13380					

Figura 18: Alinhamento local das seqüências geradas de *Escherichia coli*, com as seqüências disponíveis na base de dados REFSEQ do NCBI.

4.7.3 BLASTN *Bifidobacterium adolescentis*

Bifidobacterium adolescentis L2-32 Scfld0234, whole genome shotgun sequence
 Sequence ID: [ref|NZ_DS264454.1|](#) Length: 994221 Number of Matches: 1
 Range 1: 59589 to 59867 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match
 Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
486 bits(263)	4e-133	274/279 (98%)	2/279 (0%)	Plus/Minus

```

Query 1 CTCCAGTTGGATGCATGTCCTTCTGGGAAAGATTCATCGGTATGGGATGGGGTCGCGTCC 60
      |||
Sbjct 59867 CTCCAGTTGGATGCATGTCCTTCTGGGAAAGATTCATCGGTATGGGATGGGGTCGCGTCC 59808
Query 61 TATCAGCTTGATGGCGGGGTAACGGCCACCATGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG 120
      |||
Sbjct 59807 TATCAGCTTGATGGCGGGGTAACGGCCACCATGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAG 59748
Query 121 GGCGACCGGCCACATTGGGACTGAGCTTTGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG 180
      |||
Sbjct 59747 GGCGACCGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG 59688
Query 181 GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGCGGGATGACGGCCTT 240
      |||
Sbjct 59687 GAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGCGGGATGACGGCCTT 59628
Query 241 CGGGTTGTAAACCGCTTTTGACTGGGAGCAA-CC-TTCG 277
      |||
Sbjct 59627 CGGGTTGTAAACCGCTTTTGACTGGGAGCAAAGCCCTTCG 59589
  
```

Figura 19: Alinhamento local das sequências geradas de *Bifidobacterium adolescentis*, com as sequências disponíveis na base de dados REFSEQ do NCBI.

4.7.4 BLASTN de *Giardia* spp.

Giardia lamblia ATCC 50803 SC_603, whole genome shotgun sequence
 Sequence ID: [ref|NW_002477095.1](#)|Length: 208878Number of Matches: 1
 Range 1: 172958 to 173710[GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1238 bits(670)	0.0	715/753 (95%)	0/753 (0%)	Plus/Minus
Query 34	AAGCCCGACGACCTCACCCGAGTGGCACCAGACGGCGGTCAAGCTCAGCAACATGTAC			93
Sbjct 173710	AAGCCCGACGACCTCACCCGAGTGGCACCAGACGGCGGTCAAGCTCAGCAACATGAAC			173651
Query 94	CAGCGCGCCAGCAGGTTCCACGACAAGATGGAGAACGAGATCGAGGTCGCCCGCGTCGAC			153
Sbjct 173650	CAGCGCGTCAGCAGGTTCCACGACAAGATGGAGAACGAGATCGAGGTCGCCCGCGTCGAC			173591
Query 154	GACGACACGCGCGTGAAGATGATCAAGGACGCCATCGCRCACCTCGACAGRCTCATCCAG			213
Sbjct 173590	GACGACACGCGCGTGAAGATGATCAAGGACGCCATCGCACACCTCGACAGGCTCATCCAG			173531
Query 214	ACRGAGTCGAGGAAGCGCCAGGCTCGTTCGAGGACATCCGCGAGGARGTCAAGAAGTCY			273
Sbjct 173530	ACGGAGTCGAGGAAGCGCCAGGCTCGTTCGAGGACATCCGCGAGGAGGTCAAGAAGTCC			173471
Query 274	GCCGACAACATGTACCTRACGATCAAGGAGGAGATCGACACCATGGCYGCAAACCTCCGC			333
Sbjct 173470	GCCGACAACATGTACCTAACGATCAAGGAGGAGATCGACACCATGGCTGCAAACCTCCGC			173411
Query 334	AAGTCYCTYGCKGAGATGGGCGACACRCTCAACAACGTYGAGACRAATCTCCAGAACCAG			393
Sbjct 173410	AAGTCCCTTGCGGAGATGGGCGACACACTCAACAACGTTGAGACAAATCTCCAGAACCAG			173351
Query 394	ATCGCCATCCAYAACGACGCCATCGCRGCTCAGGAAGGAGGCCCTCAAGAGCCTGAAC			453
Sbjct 173350	ATCGCCATCCATAACGACGCCATCGCGGCTCTCAGGAAGGAGGCCCTCAAGAGCCTGAAC			173291
Query 454	GAYCTCGAGACRGGCATYGCCACGGAGAACGCMGARAGGAAGAAGATGTAYGACCAGCTC			513
Sbjct 173290	GATCTCGAGACGGGCATTGCCACGGAGAACGAGAAAGGAAGAAGATGTACGACCAGCTC			173231
Query 514	AACGAGAARGTCGCAGAGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCGSATCGAGARGGAGACGATC			573
Sbjct 173230	AACGAGAAGGTTCGCAGAGGGCTTCGCCCGCATCTCCGCGSATCGAGAAAGGAGACGATC			173171
Query 574	GCCCGCGAGAGGGCCGTYAGYGCYGCCACGACAGARGCSCTCACAACACGAAGCTCGTC			633
Sbjct 173170	GCCCGCGAGAGGGCCGTTAGCGCTGCCACGACAGAAGCGCTCACAACACGAAGCTCGTC			173111
Query 634	GAGAAGTGGCTCAACGAGCAGCTCGAGAAGCTCGCCTCAGAGATCCGCGCCATCCAGGAG			693
Sbjct 173110	GAGAAGTGGCTCAACGAGCAGCTCGAGAAGCTCGCCTCGGAGATCCGCGCTATCCAGGAG			173051

```

Query 694      GAGATCGACCGCGAGAAGGCAGAACGCAAGGAGGCAGAGGACAAGATCGTCAACACTC 753
                |||
Sbjct 173050    GAGATCGACCGCGAGAAGGCCGAAACGCAAGGAGGCAGAGGACAAGATCGTCAACTCTC 172991

Query 754      GAGGACGTCTCTCAAAGATCCAGGGCGGCCTC 786
                |||
Sbjct 172990    GAGGACGTCTCTCGAAGATCCAGGGCGGCCTC 172958

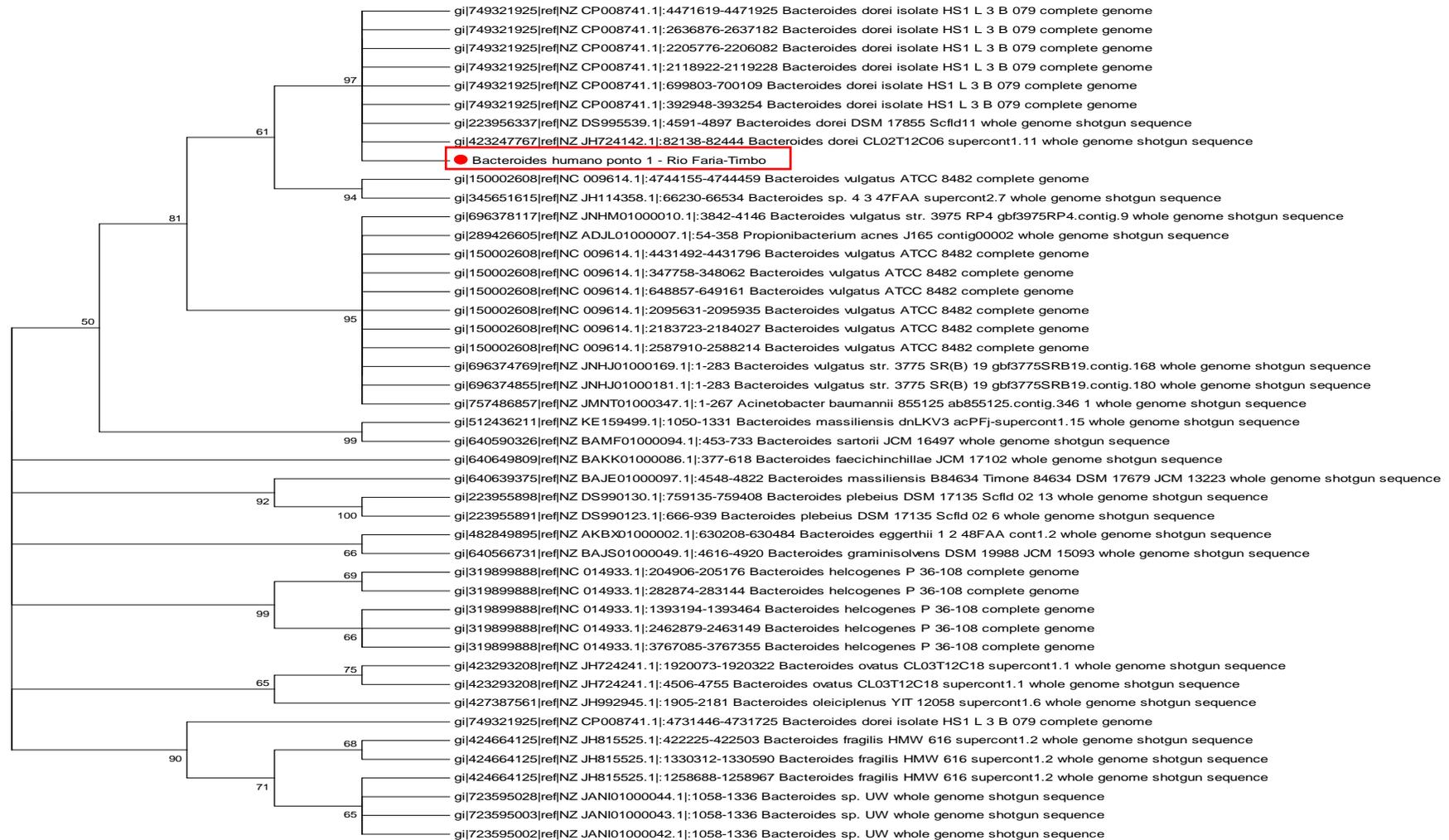
```

Figura 20: Alinhamento local das sequências geradas de *Giardia* spp., com as sequências disponíveis na base de dados REFSEQ do NCBI.

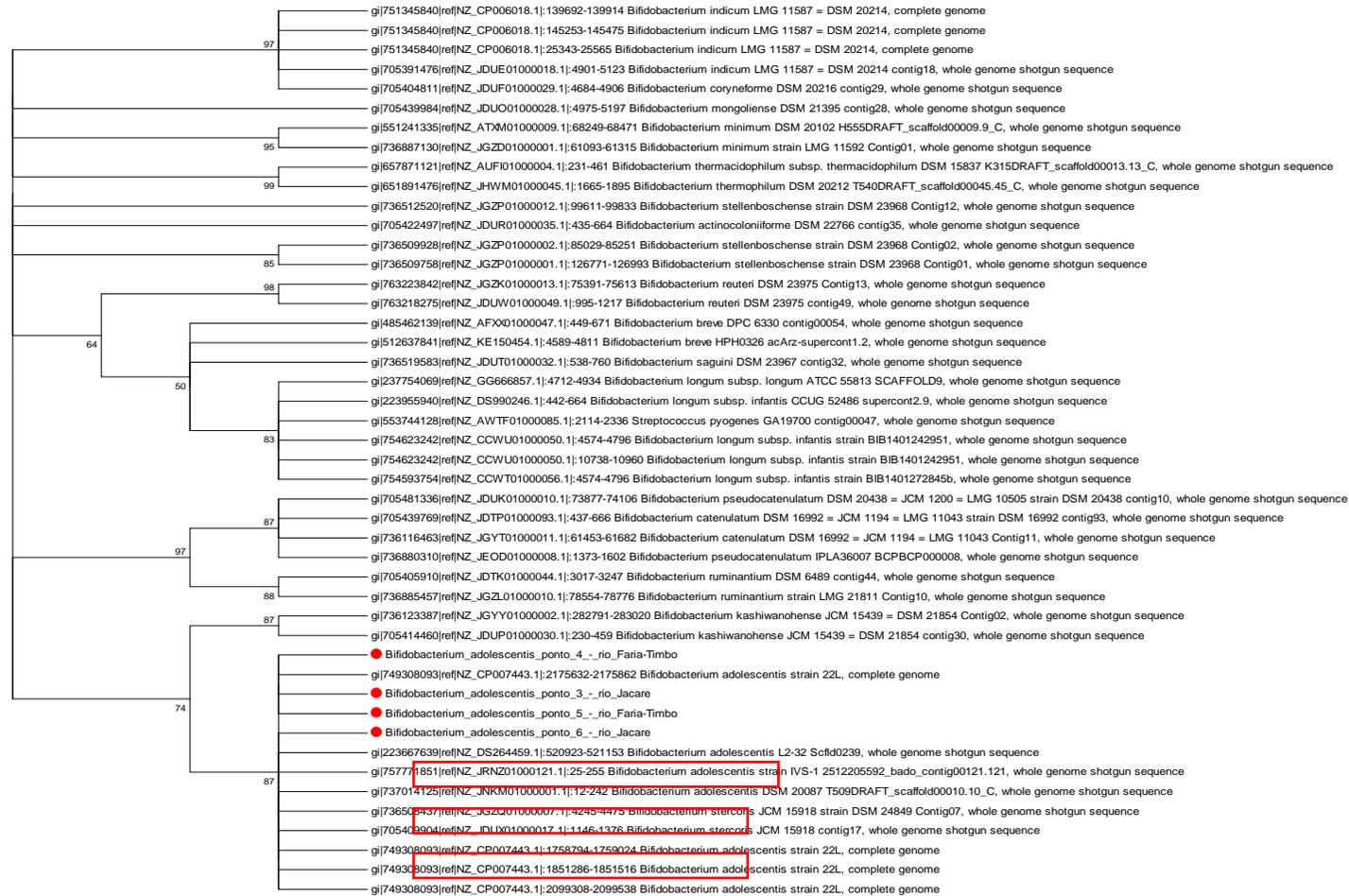
4.8 Árvores

As árvores foram geradas a fim de mostrar que nossas amostras coincidiam com o grupo de microrganismos pesquisados. Escolhemos apresentar as árvores com o algoritmo *Neighbor-Joining*, pois demonstrou um suporte estatístico melhor em relação a outros algoritmos. Foram geradas apenas as árvores de *Bacteroides* associados a humanos e *B. adolescentis*, pois apresentaram sequências de alta qualidade.

4.8.1 Árvore *Bacteroides* associados a humanos



4.8.2 Árvore *Bifidobacterium adolescentis*



5 DISCUSSÃO

A avaliação da qualidade da água vem sendo realizada de acordo com os padrões colimétricos estipulados (CONAMA nr. 274), quantificando a presença de *E. coli* e coliformes totais, ambos organismos cultiváveis em laboratório. No entanto há uma série de organismos associados à poluição, (inclusive organismos não cultiváveis) que podem ser encontrados em ambientes aquáticos contaminados por esgoto. Além disso, os métodos de cultura tradicionais têm suas limitações como o longo período de incubação, interação com outros microrganismos, baixa precisão e sensibilidade, onde os métodos moleculares demonstram ser mais rápidos e precisos na detecção de coliformes (Park *et al.*, 2011).

De acordo com Fatemeh e colaboradores (2014), técnicas moleculares são metodologias precisas, rápidas e sensíveis para o estudo de patógenos específicos de bactérias e estas técnicas podem ser utilizadas precisamente para analisar água. Com a extração de DNA metagenômico, a utilização de marcadores moleculares para pesquisa de alvos específicos e a validação através de sequenciamento e análises filogenéticas podemos avaliar a presença de poluidores de forma mais abrangente.

A avaliação da presença de uma série de marcadores moleculares associados à poluição antrópica (por serem comensais ou patógenos humanos), vem sendo descritos e sugeridos para a avaliação de poluição fecal humana em recursos hídricos (Harwood *et al.*, 2009). Com isso um amplo conjunto de potenciais novos marcadores, bem como um levantamento sanitário abrangente, deve ser feito para ajudar e contribuir na identificação de fontes de contaminação fecal (Griffith *et al.*, 2009).

A alta densidade de população humana e a disposição de esgoto não tratado sugere ser a principal fonte que contribui com as altas concentrações de indicadores de bactérias fecais em amostras de águas (Kishinhi *et al.*, 2013). A presença de microrganismos de origem fecal em águas indica poluição fecal e possível associação com patógenos entéricos (Sinigalliano *et al.*, 2010). A avaliação

da água pela quantificação de indicadores de bactérias (atualmente utilizada) não oferecem informação sobre a fonte de poluição que pode estar degradando a água (Stoeckel & Harwood, 2007). Bactérias associadas a humanos como *Bacteroides* humanos, *M. smithii*, *B. adolescentis* tem sido utilizadas como marcadores de fontes microbianas, pois possibilitam predizer poluição por fontes fecais humanas.

A poluição por fonte fecal humana é particularmente perigoso para a saúde pública, pois é conhecida por conter uma alta taxa de patógenos incluindo viroses, que são humano específicas (Harwood *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2008) e estes patógenos têm sido detectados mesmo quando os indicadores de bactérias cultiváveis não excedem os padrões recomendados (Jiang *et al.*, 2001; Lipp *et al.*, 2001).

Miagostovich e colaboradores (2014), avaliaram a qualidade da água em uma região de fronteira entre a mata atlântica e áreas urbanas e demonstrou que a detecção do vírus é uma ferramenta útil para o caracterização de contaminação humana, revelando a falta de medidas de proteção ambiental, tais como tratamento adequado da água de esgoto, que é realizado atualmente em pequena escala. A capacidade de detectar partículas virais infecciosas em água e em outras amostras ambientais é de grande importância para predizer os riscos de saúde pública (Ko *et al.*, 2003).

Países em desenvolvimento, como o Brasil, ainda não estabeleceram um padrão para determinar o risco de infecção viral a partir de água do ambiente destinado ao consumo ou fins recreativos na legislação atual (Miagostovich *et al.*, 2014). Estudos como o de Miagostovich e colaboradores (2014) confirmam a possibilidade de se utilizar a detecção de vírus entéricos como marcadores alternativos de contaminação fecal humano em corpos d'água e indica que a disseminação de vírus patogênicos está ocorrendo mesmo em áreas de proteção ambiental. Estes mesmos autores afirmam que a aplicabilidade da detecção viral pode apoiar os estudos de avaliação de impacto ambiental, contribuindo com soluções eficazes para a prevenção e controle de doenças relacionadas com a água em áreas com diferentes graus de ocupação humana e perturbação ambiental.

No nível de protozoários, ainda na pesquisa de patógenos fecais em amostra de água, os protozoários sempre representaram riscos à saúde pública, sendo *Cryptosporidium* spp. e *Giardia* spp. alguns dos principais protozoários de transmissão hídrica, pela persistência ambiental e resistência a cloração constituindo riscos de aquisição destes agentes parasitários em águas balneáveis (Franco, 2007). Em água, ambos são pesquisados cientificamente e já foram encontrados em diversas amostras como em mananciais, rios, águas tratadas e esgotos parcialmente tratados e sem tratamento (Newman *et al.*, 1993).

Giardia spp. e *Cryptosporidium* spp. podem ser usados como parte de metodologias para o monitoramento da qualidade da água focados em entender a dinâmica de carreamento de patógenos fecais em águas balneáveis e para avaliar se com a mitigação de fontes fecais diminuiria a carga de patógenos nos cursos d'água de uma jusante (Miller *et al.*, 2005).

Neste contexto, avaliou-se poluição, usando um conjunto de marcadores de fontes microbianas, por ensaios moleculares e filogenia molecular, que têm sido pesquisados como potenciais marcadores de poluição biológica em água balneável, assim como a busca destes marcadores no metagenoma da Baía de Guanabara disponível na base de dados *MG-RAST*.

Além disso, foram realizados em colaboração com o Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP) - FIOCRUZ, ensaios colimétricos rotineiramente utilizados para avaliar a baneabilidade da água.

Neste estudo, identificamos no metagenoma da Baía de Guanabara apenas os marcadores moleculares de bactérias. O marcador mais encontrado foi o uidA de *E. coli* com 28 sequências encontradas, seguido de nifH de *M. smithii* com 25 sequências, 16S rRNA de *Faecalibacterium* spp. com 21 sequências encontradas e 16S rRNA de *E. faecalis* com 10 sequências encontradas. Não foi possível identificar os marcadores 16S rRNA de bactérias do gênero *Bacteroides* spp. e *Bifidobacterium* spp. além dos vírus e dos protozoários que propomos. De acordo com Morgan e colaboradores (2007), a relativa abundância de organismos varia significativamente dependendo da extração de DNA e protocolo de sequenciamento

utilizado. Gregoracci e colaboradores (2012) ainda descrevem que a presença limitada de fósforo nas amostras de água da Baía de Guanabara sugere uma restrição de nutrientes que afeta a comunidade microbiana a nível metagenômico. De acordo com Gregoracci e colaboradores (2012), no metagenoma da Baía de Guanabara a maioria das sequências recuperadas pertencem ao domínio Bacteria, sendo o domínio Archaea correspondente a menos de 1% do total e apenas 1% das sequências corresponderam a vírus e eucariotos. Os resultados encontrados por Gregoracci e colaboradores (2012) explicam em parte a não detecção dos marcadores de vírus e eucariotos descritos no presente trabalho. A escolha dos pontos amostrais feita pelos autores descritos podem ter sido um fator limitante na detecção dos poluentes, pois os pontos não caracterizaram bem o perfil da Baía de Guanabara. Foram escolhidos três pontos com as seguintes localizações: um ponto amostral externo, com influência de águas marinhas e menor influência antrópica, um ponto intermediário no meio da Baía sujeito a influência de águas costeiras e marinhas e apenas um ponto amostral próximo a margens, sofrendo impacto de atividades antrópicas. Dos 12 marcadores moleculares testados por PCR, apenas 4 foram encontrados no metagenoma da Baía de Guanabara por análises *in silico*. Isto sugere que o Metagenoma disponível na base de dados não é capaz de representar toda a biodiversidade de poluentes

Nos ensaios colimétricos, os níveis de *E. coli* foram avaliados nos rios Faria-Timbó, Jacaré e Canal do Cunha, ambos pertencentes ao Complexo de Maguinhos. Os dados avaliados foram comparados com os padrões recomendados pelo Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) disposto para águas balneáveis. A resolução CONAMA nr. 274 tem aceito 800 *E. coli* por 100 mililitros de forma satisfatória e considera imprópria, quando não atenderem aos critérios estabelecidos para águas próprias e a amostragem apresentar-se superior a 2000 *E. coli* por 100 mililitros. Os níveis encontrados a partir deste estudo excederam o padrão recomendado em todos os pontos amostrais (figura 5). Embora todos os pontos apresentarem níveis muito acima do recomendado, o ponto 1 no rio Faria timbó, apresentou-se com os menores níveis de *E. coli* comparados aos demais pontos amostrais e o ponto 5 também no rio Faria-Timbó, apresentou-se com os níveis mais altos de *E. coli* do que os demais pontos avaliados, representados na figura 5. Apesar do ponto 5 mostrar-se com o nível mais elevado de *E. coli*, é possível

observar no ponto 8 que encontra-se num local de junção dos rios, que houve variação de diluição das amostras representado por níveis de *E. coli* um pouco mais baixo neste ponto.

Os níveis de *E. coli* de nossas amostras variaram no entorno de 14.400 a 25.650 UFC/100 ml de *E. coli*. No trabalho de Griffith e colaboradores (2009), foram encontrados em praias da Califórnia com influencia de esgoto concentrações no entorno de 580 a > 200.000 UFC/100 ml. Na pesquisa realizada por Bower e colaboradores (2005), que incluiu a pesquisa de *E. coli* nos rios que desaguam no lago Michigan foram encontradas concentrações de 11.500 a 20.000 UFC/100 ml nos pontos de coleta dos rios Milwaukee e Menomonee, >210.224 UFC/100 ml no rio Kinnickinnic e de 3.370 a 5.500 UFC/100 ml no canal que desagua no porto. Estes rios recebem esgoto e as altas concentrações de *E. coli* corroboram com os resultados encontrados nos rios do Complexo de Manguinhos avaliados. Adicionalmente, o estudo realizado por Amaral e Martins (2012), que avaliou a qualidade sanitária da água nas praias da Baía de Guanabara, encontrou em 53% (17/32) das coletas, um nível de *E. coli* 10 vezes maior ao considerado satisfatório no CONAMA 274. Nesta mesma resolução citada anteriormente, recomenda-se a pesquisa de organismos patogênicos em balneários sistematicamente impróprios. Tendo em vista esta recomendação e a proposta de nosso trabalho, os ensaios moleculares confirmaram que todos os pontos estudados encontram-se poluídos, mesmo com as variações dos níveis de *E. coli* apontadas pelas análises colimétricas, onde em alguns pontos amostrais, a água apresentou-se em diluições maiores do que em outros pontos.

Nos ensaios moleculares, os iniciadores específicos para *E. coli* gene uidA, *M. smithii* gene nifH, *Bacteroides* spp. e *Bacteroides* associados a humanos, *E. faecalis*, *Faecalibacterium* spp., *B. adolescentis* e *B. dentium* ambos gene 16S rRNA, Adenovírus tipo Hadv, HPyV gene T-antigen, *Giardia* spp. gene beta-giardin e *Cryptosporidium* spp. gene COWP, foram usados neste estudo como marcadores de fontes microbianas de poluição. O gene COWP usado como marcador para *Cryptosporidium* spp. não amplificou nos ensaios de PCR com as amostras do rios. Não podemos afirmar se de fato não há presença destes organismos em nossos pontos amostrais ou se os iniciadores não funcionaram, pois não conseguimos os

DNAs controles destes microrganismos para dar esta confirmação. O método de extração de DNA pode ter sido um fator limitante pois o oocisto de *Cryptosporidium* é difícil de se romper sendo necessário o uso de *beads* para romper as paredes dos Oocistos mecanicamente. Alguns estudos encontraram sazonalidade na detecção de *Cryptosporidium* em amostras de água (Fayer *et al.*, 2002; Tsushima *et al.*, 2003) enquanto outros não (Robertson & Gjerde, 2001), esta variabilidade de resultados pode acontecer devido a diferentes fatores ambientais ou diferenças no desenho experimental (Miller *et al.*, 2005). Em seu estudo Miller e colaboradores (2005) relatam que *Cryptosporidium* e *Giardia* foram detectadas mais frequentemente em estações chuvosas e que a explicação para esta sazonalidade observada é de que Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia* entram primariamente em sistemas ribeirinhos via escoamento terrestre durante eventos de tempestade.

Todos os demais PCRs com os iniciadores dos marcadores moleculares testados, foram positivos em nossas amostras, com exceção dos pontos 3 (no rio Jacaré), 4 (no rio Faria-Timbó) e 7 (canal do Cunha) para *Bacteroides* associados a humanos, ponto 5 (no Rio Faria-Timbó) para *E. faecalis* e ponto 4 (no rio Faria-Timbó) para *Giardia* spp. O que nos leva a supor que essa negatividade pode ter sido derivada da variação do potencial fecal ou pela presença de compostos industriais oriundos de atividades poluidoras presentes no entorno como descreve Amaral e Martins (2012), podendo haver inibidores que não foram retirados no protocolo de purificação do DNA, apesar da extração ter sido bem sucedida.

Sauer e colaboradores 2011 detectaram em seu estudo em um complexo de rios na área metropolitana de Milwaukee, que a relação da presença de marcadores para *Bacteroides* associados a humanos e *Bacteroides* spp. é variável. *Bacteroides* spp, que é derivado de fontes humanas e não humanas mede poluição fecal total. *Bacteroides* humanos têm sido encontrados em rios em altas concentrações e sugere a predominância de fontes humanas como fator de poluição.

Adenovírus e HPyV foram detectados em todos os pontos amostrais nos três recursos hídricos. A presença de adenovirose em amostras de água vem sendo correlacionadas com HPyV e *Bacteroides* associados a humanos. Vírus tem sido correlacionados a indicadores de bactérias fecais, pois as bactérias tem se mostrado

os principais hospedeiros dos vírus em ambientes aquáticos (Wong *et al.*, 2012) ambos apresentam-se nestes ambientes em grande abundância. A presença de HPyV e adenovírus é diretamente associado ao risco a saúde humana, HPyV é excretados na urina, adenovírus nas fezes e apenas uma pequena porcentagem da população excretam estas viroses (Jiang *et al.*, 2007), o que confirma a presença de contaminação por esgoto.

MacQuaig (2006), pesquisou poluição fecal derivada de humanos em águas ambientais usando PCR baseado em HPyV com o mesmo marcador utilizado em nosso estudo (T- antígeno), detectou que todas as amostras que haviam influência de resíduos humanos foram positivas para HPyV e que em amostras de água de baixo impacto (recebendo nenhum impacto humano conhecido) o marcador T-antígeno não foi detectado. Isto Corrobora os nossos resultados onde os iniciadores para o marcador T-antígeno amplificou em todas as amostras (figura 16), ressaltando que todas as nossas amostras recebem esgoto.

De acordo com Harwood e colaboradores (2009) marcadores moleculares de *Bacteroides* associados a humanos por ensaios de PCR podem ser detectados em amostras de esgoto mais diluídas do que HPyV e *M. smithii* tendo portanto, a relevância mais imediata a níveis regulatórios de concentração de indicadores de bactérias. No entanto, em nosso estudo o marcador 16S rRNA para *Bacteroides* humanos não foi detectado em todas as amostras (figura 7) sendo o PCR positivo em 5 das 8 amostras (pontos 1, 2 e 5 Faria-Timbó; pontos 6 e 8 Jacaré) Já o marcador nifH para *M. smithii* (figura 9) e T-antígeno para HPyV (figura 16) foram positivos em todos os PCRs. Em contraste, o marcador 16S rRNA para *Bacteroides* spp. foi amplificado em todos os pontos amostrais. O autor (Harwood *et al.*, 2009) sugere também que por HPyV e *M. smithii* serem mais humanos específicos que *Bacteroides* Humanos, eles devem ser incluídos no conjunto de marcadores de fontes microbianas para avaliação da qualidade de águas.

Segundo McQuaig (2012), os marcadores 16S rRNA para *Bacteroides* e nifH para *M. smithii* ambos marcadores de esgoto humano e adenoviroses, tem sido rotineiramente detectadas tanto por PCR quanto por qPCR, em amostras de água de praias que atendem ao padrão recomendado de indicadores de bactérias fecais

segundo a legislação vigente. A abordagem de se utilizar indicadores de bactérias fecais juntamente com marcadores de fontes microbianas (marcadores moleculares de poluição) demonstraram que o esgoto humano é pelo menos parcialmente responsável pela degradação da qualidade da água. O uso dos marcadores de fontes microbianas resulta numa avaliação mais definitiva da qualidade da água para a balneabilidade e os riscos associados à saúde humana do que as concentrações de indicadores de bactérias fecais sozinhos podem fornecer. Este mesmo autor revela que *M. smithii* é onipresente em esgoto, demonstrado no trabalho de Harwood e colaboradores (2009) que detectou o marcador nifH em 10^{-3} e 10^{-4} diluições de esgoto na Flórida. Assim, *M. smithii* e adenovírus tiveram os maiores percentuais de resultados em ambas as praias avaliadas por McQuaig e colaboradores 2012.

A presença de Adenovírus representa diretamente risco à saúde humana. Porém, em alguns caso ele pode não ser detectado porque é excretado pela urina de apenas uma parcela da população (Jiang *et al.*, 2001). A falta de detecção de adenovírus não elimina o risco de patógenos em uma amostra, sendo recomendado sempre uma avaliação com outros marcadores de fontes microbiana para uma avaliação mais conclusiva (McQuaig *et al.*, 2012).

A correlação da detecção de adenovírus e HPyV em amostras de águas balneáveis sugere risco a saúde pública. (McQuaig *et al.*, 2012)

De acordo com Griffithi (2009), entre os métodos não quantitativos, os marcadores moleculares 16S rRNA para *Bacteroides* associados a humanos e *Enterococcus* são um dos mais confiáveis para identificação de material fecal humano. Apesar disto, em nosso trabalho estes marcadores não foram detectados em todas as amostras.

A detecção de *E. coli* e de *Enterococcus* representa a avaliação de indicadores de poluição fecal, comumente utilizados. O gene uidA como marcador molecular de *E. coli* associado a humanos, foi eficiente em todas as amostras avaliadas (Figura 10) corroborando com o trabalho de Griffith e colaboradores (2009), que avaliou novos métodos e indicadores para avaliar a qualidade da água, que detectou o gene uidA em todas as amostras avaliadas.

Faecalibacterium spp., *B. adolescentis* e *B. dentium*, não são comumente utilizados como indicadores de poluição biológica, mas por seus marcadores indicarem poluição de fontes humana por estarem presentes no intestino, foi utilizado por Bonjoch e colaboradores (2004), Zheng e colaboradores 2009 e Roslev e colaboradores (2011) na pesquisa de poluição por esgoto em águas. Estes estudos demonstraram a prevalência destes marcadores em águas contaminadas corroborando com nossos resultados (Figuras 12, 13 e 14).

Foram geradas árvores para *Bacteroides* associados a humanos e *B. adolescentis*. Na árvore de *Bacteroides* associados a humanos observou-se que a amostra do ponto 1 rio Faria-Timbó (subitem 4.8.1) agrupou com *Bootstrap* 97 com as sequências de referência de *Bacteroides dorei*. A literatura (Bakir *et al.*, 2006) descreve que a espécie *Bacteroides dorei* é encontrada em fezes humanas, o que corrobora o resultado obtido. É importante destacar que a amostra não agrupou com *Bacteroides vulgatus*, um microrganismo encontrado no cólon e não detectado em fezes, corroborando também o resultado obtido. Os demais clados também corroboram o resultado, uma vez que agruparam as demais espécies de *Bacteroides* representadas no trabalho. Como exemplo, a literatura descreve que *Bacteroides* spp. é encontrado tanto em animais como em humanos e *Bacteroides helcogenes* que é encontrado em fezes de porco (Pati *et al.*, 2011).

Na árvore de *B. adolescetis*, observa-se que as amostras dos pontos 3, 4, 5 e 6 agruparam apenas com as sequências de referências de *B. adolescentis* (subitem 4.8.2) e *B. stercoris*, que é sinônimo de *B. adolescentes*, com o *bootstrap* de 87, confirmando que as sequencias geradas, são os alvos esperados. Os demais clados também corroboram o resultado, uma vez que agruparam as demais espécies de *Bifidobacterium* representadas no trabalho. Como exemplo, a literatura descreve que *B. longum* uma bactéria do ácido láctico, encontrado no trato intestinal e na vagina de humanos (Schell *et al.*, 2002) e *B. dentium* associado à cárie humana (Ventura *et al.*, 2009).

Para os marcadores que são espécies específicos, como uidA de *E. coli* e beta-giardin de *Giardia*, apresentamos os resultados do alinhamento local pelo BLASTN com sequências de referência do REFSEQ (item 4.7.2 e 4.7.4) e

alinhamentos múltiplos pelo clustalW, visualizados no BioEdit que encontra-se disponível em anexo (Anexo 8.1).

É importante ressaltar que o nosso objetivo não foi estritamente à pesquisa de organismos patogênicos e sim a presença de marcadores de poluição biológica. Assim, foram levantados os principais marcadores moleculares que têm sido utilizados para este devido fim em água e os reunimos num único trabalho, visando padronizar um protocolo mais preciso e abrangente. Utilizamos as ferramentas de bioinformática para validar os resultados do PCR e analisar *in silico* a presença destes marcadores de poluição em metagenomas publicados em bancos de dados.

O uso de marcadores moleculares originários de diferentes grupos taxonômicos como bactérias, vírus e protozoários tem se mostrado promissor, tal como evidenciado neste estudo pelos resultados encontrados.

Para todos os marcadores moleculares utilizados no presente estudo, um estudo epidemiológico é recomendado para avaliar os riscos à saúde humana associado com a presença ou ausência dos marcadores para definir mais precisamente a utilidade de cada ensaio (McQuaig *et al.*, 2012)

Assim como sugerido por Bower e colaboradores (2005) precisamos de estudos que correlacionem organismos marcadores de poluição com doenças relacionadas às práticas banáveis.

6 CONCLUSÕES

Os marcadores moleculares escolhidos apresentaram sensibilidade capaz de detectar microrganismos considerados poluidores biológicos em ambientes aquáticos.

A abordagem de se utilizar marcadores dos grupos taxonômicos de bactérias, vírus e protozoários possibilitou observar a biodiversidade parcial de poluentes biológicos que podem ser encontrados em ambientes poluídos por ação antrópica.

A avaliação *in silico* do metagenoma da Baía de Guanabara não foi capaz de representar toda a biodiversidade de poluentes possivelmente detectáveis.

A extração de DNA metagenômico, atrelado às técnicas moleculares forneceu uma avaliação específica e de rápida detecção de poluentes na água. As análises *in silico* validaram os ensaios moleculares para *Bacteroides* humanos, *E. coli*, *M. smithii*, *B. adolescentis*, *B. dentium*, Adenovírus e *Giardia* spp. demonstrando que os fragmentos gerados, confirmaram o esperado. Os resultados obtidos evidenciam a relação dos marcadores moleculares com os organismos associados à humanos, comprovando poluição biológica de origem antrópica, principalmente por disposição de esgoto.

Os resultados obtidos a partir das análises colimétricas e moleculares indicam uma potencial preocupação com a saúde pública a respeito com a contaminação microbiológica da água. Altos níveis de indicadores de bactérias fecais foram observados em todos os rios avaliados.

Este trabalho foi capaz de avaliar qualitativamente poluição biológica em água usando marcadores moleculares para vírus, bactérias e protozoários num único estudo.

7 PERSPECTIVAS

Neste estudo foi possível observar que a extração é um fator limitante nas metodologias empregadas, sendo recomendada uma análise metagenômica da Baía de Guanabara com pontos mais representativos e melhoramento no método de extração de DNA. Neste mesmo contexto, recomendamos a extração de DNA separadamente a partir das 3 membranas (0,45 μm , 0,8 μm , 0,22 μm) a fim de comparar os resultados obtidos de cada uma, avaliando quais marcadores serão possíveis de se detectar indiscriminadamente.

Metodologia para a extração de DNA de protozoários (incluindo *beads*) e de vírus RNA (utilizando membranas carregadas) devem ser incluídas a metodologia empregada ou ser realizada separadamente para uma melhor detecção de protozoários e vírus entéricos.

A inclusão de marcadores para vírus de RNA, é interessante pois há vários vírus entéricos encontrados na água que representam riscos a saúde pública, como Norovírus, Rotavírus e Enterovírus.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaral LCP do. Degradação Ambiental e Perspectivas de Saúde: um olhar retrospectivo sobre a sub-bacia hidrográfica do canal do Cunha. Fundação Oswaldo Cruz; 2006.
- Amaral LS, Martins AS. Monitoramento de Parasitos e Coliformes como Parâmetros de Avaliação Sanitária de Areia e Água de Praias da Baía de Guanabara. [Rio de Janeiro, Brasil]: Fundação Oswaldo Cruz; 2012.
- Bakir MA, Sakamoto M, Kitahara M, Matsumoto M, Benno Y. *Bacteroides dorei* sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56:1639–43.
- Bastos J, Napoleão P. O Estado do Ambiente. Indicadores Ambientais do Rio de Janeiro 2010. SEA/INEA, editor. Rio de Janeiro; 2010.
- Bofill-Mas S, Pina S, Girones R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(1):238–45.
- Bonjoch X, Ballesté E, Blanch AR, Balleste E. Multiplex PCR with 16S rRNA Gene-Targeted Primers of *Bifidobacterium* spp . To Identify Sources of Fecal Pollution. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(5).
- Bower PA, Scopel CO, Jensen ET, Depas MM, McLellan SL. Detection of Genetic Markers of Fecal Indicator Bacteria in Lake Michigan and Determination of Their Relationship to *Escherichia coli* Densities Using Standard Microbiological Methods. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(12):8305–13.
- Brasil. CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE-CONAMA -Resolução nr. 274/2000. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil; 2001. p. 70–1.
- Brasil. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA - Resolução nr. 357/2005. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil; 2005. p. 576–7.
- Brasil. CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE - CONAMA - Resolução nr. 396/2008. Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil; 2008. p. 1–

13.

- Brasil. Ministério da Saúde - Portaria nr. 2.914/2011. Brasília; 2011.
- Cacciò S, Pozio E. Molecular identification of food-borne and water-borne protozoa. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2001;32 Suppl 2:156–8.
- Cacciò SM, De Giacomo M, Pozio E. Sequence analysis of the β -giardin gene and development of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay to genotype *Giardia duodenalis* cysts from human faecal samples. *Int J Parasitol*. 2002;32(8):1023–30.
- Cardoso A, Coutinho F, Silveira S, Ignacio B, Vieira R, Salloto G, et al. Metagenomics in polluted aquatic environments. *Water Pollut*. 2012. p. 89–104.
- Carrillo M, Estrada E, Hazen TC. Survival and enumeration of the fecal indicators *Bifidobacterium adolescentis* and *Escherichia coli* in a tropical rain forest watershed. *Appl Environ Microbiol*. 1985;50(2):468–76.
- CEDAE. história do tratamento de esgoto no Rio de Janeiro. 2010.
- Cipis M, Martini LF, Aguiar L, Scharf R. Como cuidar de nossa água. III série. Coleção entenda e aprenda. Bei. São Paulo; 2003.
- Committee on Indicators for Waterborne NRC (US). Indicators for Waterborne Pathogens. National Academies Press (US); 2004.
- Cuadrat R. Exploração da diversidade de policetídeo sintases (PKS) ambientais. [Rio de Janeiro, Brasil]: Fundação Oswaldo Cruz; 2010.
- Duncan SH, Hold GL, Harmsen HJM, Stewart CS, Flint HJ. Growth requirements and fermentation products of *Fusobacterium prausnitzii*, and a proposal to reclassify it as *Faecalibacterium prausnitzii* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002 Nov;52(Pt 6):2141–6.
- EPA. Improved Enumeration Methods for the Recreational Water Quality Indicators: Enterococci and *Escherichia coli*. Test. 2000;49.
- Ewing B, Hillier L, Wendl MC, Green P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res*. 1998;8(3):175–85.
- Fatemeh D, Reza ZM, Mohammad A, Salomeh K, Reza AG, Hossein S, et al. Rapid detection of coliforms in drinking water of Arak city using multiplex PCR method

- in comparison with the standard method of culture (Most Probably Number). *Asian Pac J Trop Biomed.* 2014;4(5):404–9.
- Fayer R, Morgan U, Upton SJ. Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Int J Parasitol.* 2000;30(12-13):1305–22.
- Fayer R, Trout JM, Lewis EJ, Xiao L, Lal A, Jenkins MC, et al. Temporal variability of *Cryptosporidium* in the Chesapeake Bay. *Parasitol Res.* 2002;88(11):998–1003.
- Fiksdal L, Maki JS, LaCroix SJ, Staley JT. Survival and detection of *Bacteroides* spp., prospective indicator bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1985;49(1):148–50.
- Fong T, Griffin DW, Lipp EK. Molecular Assays for Targeting Human and Bovine Enteric Viruses in Coastal Waters and Their Application for Library-Independent Source Tracking Molecular Assays for Targeting Human and Bovine Enteric Viruses in Coastal Waters and Their Application for Lib. 2005;
- Franco R. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública Waterborne Protozoa: relevance in public health. *Rev Panam Infectol.* 2007;9(4):36–43.
- Gilbert J a, Dupont CL. Microbial metagenomics: beyond the genome. *Ann Rev Mar Sci.* 2011;3:347–71.
- Gregoracci GB, Nascimento JR, Cabral AS, Paranhos R, Valentin JL, Thompson CC, et al. Structuring of Bacterioplankton Diversity in a Large Tropical Bay. Gilbert JA, editor. *PLoS One.* 2012;7(2):e31408.
- Griffith JF, Cao Y, McGee CD, Weisberg SB. Evaluation of rapid methods and novel indicators for assessing microbiological beach water quality. *Water Res.* 2009;43(19):4900–7.
- Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 4195-98. 1999;
- Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem Biol.* 1998;
- Harwood VJ, Brownell M, Wang S, Lepo J, Ellender RD, Ajidahun A, et al. Validation and field testing of library-independent microbial source tracking methods in the Gulf of Mexico. *Water Res.* 2009;43(19):4812–9.

- Harwood VJ, Levine AD, Scott TM, Chivukula V, Lukasik J, Farrah SR, et al. Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(6):3163–70.
- Howard, B. J., J. Klaas, S. J. Rubin, A. S. Weissfeld and RCT. *Clinical and pathogenic microbiology.* Mosby Co. Saint Louis, Mo.; 1987.
- Jiang S, Noble R, Chu W. Human adenoviruses and coliphages in urban runoff-impacted coastal waters of Southern California. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(1):179–84.
- Jiang SC, Chu W, Olson BH, He J-W, Choi S, Zhang J, et al. Microbial source tracking in a small southern California urban watershed indicates wild animals and growth as the source of fecal bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007;76(4):927–34.
- Jothikumar N, da Silva a J, Moura I, Qvarnstrom Y, Hill VR. Detection and differentiation of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* by dual TaqMan assays. *J Med Microbiol.* 2008;57(Pt 9):1099–105.
- Katoh K, Kuma K, Toh H, Miyata T. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(2):511–8.
- Kishinhi SS, Tchounwou PB, Farah IO. Molecular Approach to Microbiological Examination of Water Quality in the Grand Bay National Estuarine Research Reserve (NERR) in Mississippi, USA. *Environ Health Insights.* 2013;7:33–41.
- Ko G, Cromeans TL, Sobsey MD. Detection of infectious adenovirus in cell culture by mRNA reverse transcription-PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(12):7377–84.
- Layton A, McKay L, Williams D, Garrett V, Gentry R, Saylor G. Development of *Bacteroides* 16S rRNA gene TaqMan-based real-time PCR assays for estimation of total, human, and bovine fecal pollution in water. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(6):4214–24.
- Lee D-Y, Lauder H, Cruwys H, Falletta P, Beaudette LA. Development and application of an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR for detection of wastewater bacterial pathogens. *Sci Total Environ.* 2008;398(1-3):203–11.
- Lima CM, Bueno LB. Território , Participação Popular e Saúde : Manguinhos em

debate. Rio de Janeiro, Brasil: ENSP/Fiocruz; 2010.

- Lipp EK, Farrah SA, Rose JB. Assessment and impact of microbial fecal pollution and human enteric pathogens in a coastal community. *Mar Pollut Bull.* 2001;42(4):286–93.
- McQuaig S, Griffith J, Harwood VJ. Association of fecal indicator bacteria with human viruses and microbial source tracking markers at coastal beaches impacted by nonpoint source pollution. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(18):6423–32.
- McQuaig SM, Scott TM, Lukasik JO, Paul JH, Harwood VJ. Quantification of human polyomaviruses JC Virus and BK Virus by TaqMan quantitative PCR and comparison to other water quality indicators in water and fecal samples. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(11):3379–88.
- Miagostovich MP, Guimarães FR, Vieira CB, Fumian TM, da Gama NP, Victoria M, et al. Assessment of water quality in a border region between the Atlantic forest and an urbanised area in Rio de Janeiro, Brazil. *Food Environ Virol.* 2014;6(2):110–5.
- Miller WA, Atwill ER, Gardner IA, Miller MA, Fritz HM, Hedrick RP, et al. Clams (*Corbicula fluminea*) as bioindicators of fecal contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in freshwater ecosystems in California. *Int J Parasitol.* 2005;35(6):673–84.
- Morgan UM, Constantine CC, Forbes DA, Thompson RC. Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using rDNA sequencing and direct PCR analysis. *J Parasitol.* 1997;83(5):825–30.
- Newman RD, Wuhib T, Lima AA, Guerrant RL, Sears CL. Environmental sources of *Cryptosporidium* in an urban slum in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1993;49(2):270–5.
- Park SH, Hanning I, Jarquin R, Moore P, Donoghue DJ, Donoghue AM, et al. Multiplex PCR assay for the detection and quantification of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* serotypes in water samples. *FEMS Microbiol Lett.* The Oxford University Press; 2011;316(1):7–15.
- Pati A, Gronow S, Zeytun A, Lapidus A, Nolan M, Hammon N, et al. Complete genome sequence of *Bacteroides helcogenes* type strain (P 36-108). *Stand*

Genomic Sci. 2011;4(1):45–53.

Pereira FC de S. Análise da disposição do material dragado no Canal do Fundão e no Canal do Cunha – Rio de Janeiro / RJ. Universidade do Estado do Rio de Janeiro; 2012.

Pina S, Puig M, Lucena F, Jofre J, Girones R. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(9):3376–82.

Ranucci L, Müller HM, La Rosa G, Reckmann I, Morales M a, Spano F, et al. Characterization and immunolocalization of a *Cryptosporidium* protein containing repeated amino acid motifs. *Infect Immun.* 1993;61(6):2347–56.

Rice P, Longden I, Bleasby A. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* 2000;16(6):276–7.

Robertson LJ, Gjerde B. Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in raw waters in Norway. *Scand J Public Health.* 2001;29(3):200–7.

Roslev P, Bukh AS. State of the art molecular markers for fecal pollution source tracking in water. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;89(5):1341–55.

Sambrook J DR. *Molecular Cloning: A laboratory manual.* 3rd ed. New York: PCSH, Laboratory; 2001.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463–7.

Sauer EP, Vandewalle JL, Bootsma MJ, McLellan SL. Detection of the human specific *Bacteroides* genetic marker provides evidence of widespread sewage contamination of stormwater in the urban environment. *Water Res. Elsevier Ltd;* 2011;45(14):4081–91.

Schell MA, Karmirantzou M, Snel B, Vilanova D, Berger B, Pessi G, et al. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(22):14422–7.

Sidhu JPS, Ahmed W, Gernjak W, Aryal R, McCarthy D, Palmer A, et al. Sewage pollution in urban stormwater runoff as evident from the widespread presence of multiple microbial and chemical source tracking markers. *Sci Total Environ. Elsevier B.V.;* 2013;463-464:488–96.

- Singh J, Behal A, Singla N, Joshi A, Birbian N, Singh S, et al. Metagenomics: Concept, methodology, ecological inference and recent advances. *Biotechnol J*. 2009;4:480–94.
- Sinigalliano CD, Fleisher JM, Gidley ML, Solo-Gabriele HM, Shibata T, Plano LRW, et al. Traditional and molecular analyses for fecal indicator bacteria in non-point source subtropical recreational marine waters. *Water Res*. 2010;44(13):3763–72.
- Soule M, Kuhn E, Loge F, Gay J, Call DR. Using DNA Microarrays To Identify Library-Independent Markers for Bacterial Source Tracking Using DNA Microarrays To Identify Library-Independent Markers for Bacterial Source Tracking. 2006;
- Stoeckel DM, Harwood VJ. Performance, design, and analysis in microbial source tracking studies. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(8):2405–15.
- Stolt A, Sasnauskas K, Koskela P, Lehtinen M, Dillner J. Seroepidemiology of the human polyomaviruses. *J Gen Virol*. 2003;84(Pt 6):1499–504.
- Suau A, Rochet V, Sghir A, Gramet G, Brewaeys S, Sutren M, et al. *Fusobacterium prausnitzii* and related species represent a dominant group within the human fecal flora. *Syst Appl Microbiol*. 2001;24(1):139–45.
- Takada H, Satoh F, Bothner MH, Tripp BW, Johnson CG, Farrington JW. Anthropogenic Molecular Markers: Tools to Identify the Sources and Transport Pathways of Pollutants. *ACS Symp Ser*. 1997;671:178–95.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*. 2013;30(12):2725–9.
- Tsushima Y, Karanis P, Kamada T, Makala L, Xuan X, Tohya Y, et al. Seasonal change in the number of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water samples from the rivers in Hokkaido, Japan, detected by the ferric sulfate flocculation method. *J Vet Med Sci*. 2003;65(1):121–3.
- Tuffin M, Anderson D, Heath C, Cowan D a. Metagenomic gene discovery: how far have we moved into novel sequence space? *Biotechnol J*. 2009;4(12):1671–83.
- Vanchiere JA, Nicome RK, Greer JM, Demmler GJ, Butel JS. Frequent detection of polyomaviruses in stool samples from hospitalized children. *J Infect Dis*.

2005;192(4):658–64.

Ventura M, Turróni F, Zomer A, Foroni E, Giubellini V, Bottacini F, et al. The *Bifidobacterium dentium* Bd1 genome sequence reflects its genetic adaptation to the human oral cavity. *PLoS Genet.* 2009;5(12):e1000785.

Verli H. *Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular.* Porto Alegre; 2014.

Viana GVR. *Técnicas para Construção de Árvores Filogenéticas.* 2007;175.

Wexler HM. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(4):593–621.

Wolf S, Hewitt J, Greening GE. Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(5):1388–94.

Wong K, Fong T-T, Bibby K, Molina M. Application of enteric viruses for fecal pollution source tracking in environmental waters. *Environ Int.* Elsevier B.V.; 2012;45:151–64.

Zheng G, Yampara-Iquise H, Jones JE, Andrew Carson C. Development of *Faecalibacterium* 16S rRNA gene marker for identification of human faeces. *J Appl Microbiol.* 2009;106(2):634–41.

	3	444	444	444	455	555	555	556	666	666	66	777	777	777	788	888	888	889	999	999	999	000	000	000	011	111	111	
	9	012	345	678	901	234	567	890	123	456	89	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	
#Bacteroides humano ponto 1 - Rio Faria-Timbo	C	CTT	TAT	AAA	AGA	AGT	TTA	CAA	CCC	ATA	GG	CAG	TCA	TCC	TTC	ACG	CTA	CTT	GGC	TGG	TTC	AGG	CCA	TCG	CCC	ATT	GAC	
#gi 482849895 Bacteroides_eggerthii	.	.CGA	.TC	...	T..	
#gi 512436211 Bacteroides_massiliensis	G..TC	G..	
#gi 640590326 Bacteroides_sartorii	G..TC	G..	
#gi 640566731 Bacteroides_graminisolvens	.	.C.A	.TC	...	T..
#gi 640649809 Bacteroides_faecichinchillae	.	.CATC	
#gi 640639375 Bacteroides_massiliensis	.	.CG	T..	...	AA	.CTA	.TC	...	T..
#gi 427387561 Bacteroides_oleiciplenus	.	.CATC	
#gi 319899888 Bacteroides_helcogenes	.	.C.TC	
#gi 319899888 Bacteroides_helcogenes	.	.C.TC	
#gi 319899888 Bacteroides_helcogenes	.	.C.TC	C..	
#gi 319899888 Bacteroides_helcogenes	.	.C.TC	C..	
#gi 319899888 Bacteroides_helcogenes	.	.C.TC	C..	
#gi 223955898 Bacteroides_plebeius	.	.C.	T..	G..	.A	.CTA	.TC	...	T..	
#gi 223955891 Bacteroides_plebeius	.	.C.	T..	G..	.A	.CTA	.TC	...	T..	
#gi 424664125 Bacteroides_fragilis	.	TAATC	G..	
#gi 424664125 Bacteroides_fragilis	.	TAATC	G..	
#gi 424664125 Bacteroides_fragilis	.	TAATC	G..	
#gi 423293208 Bacteroides_ovatus	.	.CAT	G..	
#gi 423293208 Bacteroides_ovatus	.	.CAG.	A.	.CTTC	G..	
#gi 723595028 Bacteroides_sp.	.	TAATC	G..	
#gi 723595003 Bacteroides_sp.	.	TAATC	G..	
#gi 723595002 Bacteroides_sp.	.	TAATC	G..	

	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111
	112	222	222	222	333	333	333	344	444	444	445	555	555	555	666	666	666	677	777	777	778	888	888	888	999	999	
#Bacteroides humano ponto 1 - Rio Faria-Timbo	CAA	TAT	TCC	TCA	CTG	CTG	CCT	CCC	GTA	GGA	GTT	TGG	ACC	GTG	TCT	CAG	TTC	CAA	TGT	GGG	GGA	CCT	TCC	TCT	CAG	AAC	
#gi 423247767 Bacteroides_dorei	
#gi 223956337 Bacteroides_dorei	
#gi 749321925 Bacteroides_dorei	
#gi 749321925 Bacteroides_dorei	
#gi 749321925 Bacteroides_dorei	
#gi 749321925 Bacteroides_dorei	
#gi 749321925 Bacteroides_dorei	
#gi 749321925 Bacteroides_dorei	
#gi 289426605 Propionibacterium_acnes	
#gi 150002608 Bacteroides_vulgatus	
#gi 150002608 Bacteroides_vulgatus	
#gi 150002608 Bacteroides_vulgatus	
#gi 150002608 Bacteroides_vulgatus	
#gi 150002608 Bacteroides_vulgatus	
#gi 150002608 Bacteroides_vulgatus	


```

#gi|297496835|gb|HM221273.1|_Escherichia_coli ... .T. ... .C. ...
#gi|297496833|gb|HM221272.1|_Escherichia_coli .T. ... .T. .A ...
#gi|297496831|gb|HM221271.1|_Escherichia_coli ... .C. ... .A ...
#gi|297496805|gb|HM221258.1|_Escherichia_coli ... .C. ... .A ...
#gi|297496807|gb|HM221259.1|_Escherichia_coli ... .A ...
#gi|297496811|gb|HM221261.1|_Escherichia_coli ... .A ...
#gi|297496813|gb|HM221262.1|_Escherichia_coli ... .A ...
#gi|297496815|gb|HM221263.1|_Escherichia_coli ... .C. ... .A ...
#gi|297496817|gb|HM221264.1|_Escherichia_coli .T. ... .A .G ...
#gi|297496819|gb|HM221265.1|_Escherichia_coli ... .C. ... .A ...
#gi|297496821|gb|HM221266.1|_Escherichia_coli .T. ... .A ...
#gi|297496823|gb|HM221267.1|_Escherichia_coli ... .A ...
#gi|297496825|gb|HM221268.1|_Escherichia_coli .T. ... .A ...
#gi|297496827|gb|HM221269.1|_Escherichia_coli ... .T. ... .C. ... .A ...
#gi|297496829|gb|HM221270.1|_Escherichia_coli .T. ... .T. .A ...
#gi|297496803|gb|HM221257.1|_Escherichia_coli ... .T. ... .C. ... .A ...
#gi|297496801|gb|HM221256.1|_Escherichia_coli .T. ... .A ...
#gi|297496799|gb|HM221255.1|_Escherichia_coli .T. ... .A ...
#gi|297496797|gb|HM221254.1|_Escherichia_coli ... .T. ... .T. ... .C. ... .A ...
#gi|297496795|gb|HM221253.1|_Escherichia_coli .T. ... .A .G ...
#gi|297496791|gb|HM221251.1|_Escherichia_coli .T. ... .A .G ...
#gi|297496793|gb|HM221252.1|_Escherichia_coli ... .A ...
#gi|297496789|gb|HM221250.1|_Escherichia_coli ... .A ...
#gi|297496787|gb|HM221249.1|_Escherichia_coli ... .A ...
#gi|297496765|gb|HM221238.1|_Escherichia_coli ... .A ...
#gi|297496767|gb|HM221239.1|_Escherichia_coli .T. ... .A .G ...
#gi|297496769|gb|HM221240.1|_Escherichia_coli ... .T. ... .C. ...
#gi|297496771|gb|HM221241.1|_Escherichia_coli ... .A ...
#gi|297496783|gb|HM221247.1|_Escherichia_coli .T. ... .A ...
#gi|297496781|gb|HM221246.1|_Escherichia_coli .T. ... .A ...
#gi|297496777|gb|HM221244.1|_Escherichia_coli ... .A ...
#gi|297496773|gb|HM221242.1|_Escherichia_coli ... .C. ... .A ...
#gi|134289906|gb|EF141497.1|_Escherichia_coli .T. ... .A ...
#gi|134289904|gb|EF141496.1|_Escherichia_coli .T. ... .A ...
#gi|134289902|gb|EF141495.1|_Escherichia_coli .T. ... .A ...
#gi|134289900|gb|EF141494.1|_Escherichia_coli .T. ... .A ...

```

```

#gi|297496785|gb|HM221248.1|_Escherichia_coli ... .T. ... .C. ... ..A ...
#gi|134289912|gb|EF141500.1|_Escherichia_coli .T. ... ..A ...
#gi|134289910|gb|EF141499.1|_Escherichia_coli ... ..A ...
#gi|134289908|gb|EF141498.1|_Escherichia_coli .T. ... ..A ...
#gi|134289908|gb|EF141498.1|_Escherichia_coli .T. ... ..A ...
#gi|134289906|gb|EF141497.1|_Escherichia_coli .T. ... ..A ...
#gi|134289904|gb|EF141496.1|_Escherichia_coli .T. ... ..A ...
#gi|134289902|gb|EF141495.1|_Escherichia_coli .T. ... ..A ...
#gi|134289900|gb|EF141494.1|_Escherichia_coli .T. ... ..A ...
#gi|134289898|gb|EF141493.1|_Escherichia_coli .T. ... ..A ...
#gi|134289896|gb|EF141492.1|_Escherichia_coli .T. ... ..A ...
#gi|134289894|gb|EF141491.1|_Escherichia_coli .T. ... ..A ...
#gi|134289892|gb|EF141490.1|_Escherichia_coli .T. ... ..A ...
#gi|134289890|gb|EF141489.1|_Escherichia_coli ... ..A ...
#gi|134289888|gb|EF141488.1|_Escherichia_coli ... ..A ...
#gi|380861347|gb|JQ068090.1|_Escherichia_coli ... ..A ...
#gi|380861345|gb|JQ068089.1|_Escherichia_coli ... ..A ...
#gi|380861343|gb|JQ068088.1|_Escherichia_coli ... .T. ... ..A ...
#gi|380861341|gb|JQ068087.1|_Escherichia_coli ... .T. ... ..A ...
#gi|380861339|gb|JQ068086.1|_Escherichia_coli ... ..A ...
#gi|380861337|gb|JQ068085.1|_Escherichia_coli .T. ... ..A ...
#gi|380861335|gb|JQ068084.1|_Escherichia_coli .T. ... ..A ..G ...
#gi|380861333|gb|JQ068083.1|_Escherichia_coli ... ..A ...
#gi|380861331|gb|JQ068082.1|_Escherichia_coli ... ..A ...
#gi|380861329|gb|JQ068081.1|_Escherichia_coli ... ..A ...
#gi|134289932|gb|EF141510.1|_Escherichia_coli ... .T. ... .C. ... ..A ...
#gi|134289930|gb|EF141509.1|_Escherichia_coli ... .T. ... .C. ... ..A ...
#gi|134289928|gb|EF141508.1|_Escherichia_coli ... .T. ... .C. ... ..A ...
#gi|134289926|gb|EF141507.1|_Escherichia_coli ... .T. ... .C. ... ..A ...
#gi|134289924|gb|EF141506.1|_Escherichia_coli ... .T. ... .C. ... ..A ...
#gi|134289922|gb|EF141505.1|_Escherichia_coli ... .T. ... .C. ... ..A ...
#gi|134289920|gb|EF141504.1|_Escherichia_coli ... .T. ... .C. ... ..A ...
#gi|134289918|gb|EF141503.1|_Escherichia_coli ... .T. ... .C. ... ..A ...
#gi|134289916|gb|EF141502.1|_Escherichia_coli ... .T. ... .C. ... ..A ...
#gi|134289914|gb|EF141501.1|_Escherichia_coli .T. ... ..A ...

```



```

#gi|297496831|gb|HM221271.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496805|gb|HM221258.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496807|gb|HM221259.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496811|gb|HM221261.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496813|gb|HM221262.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496815|gb|HM221263.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496817|gb|HM221264.1|_Escherichia_coli ...T.
#gi|297496819|gb|HM221265.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496821|gb|HM221266.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496823|gb|HM221267.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496825|gb|HM221268.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496827|gb|HM221269.1|_Escherichia_coli ...T. ...A.
#gi|297496829|gb|HM221270.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496803|gb|HM221257.1|_Escherichia_coli ...T. ...A.
#gi|297496801|gb|HM221256.1|_Escherichia_coli ...G.
#gi|297496799|gb|HM221255.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496797|gb|HM221254.1|_Escherichia_coli ...T. ...A.
#gi|297496795|gb|HM221253.1|_Escherichia_coli ...T.
#gi|297496791|gb|HM221251.1|_Escherichia_coli ...T.
#gi|297496793|gb|HM221252.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496789|gb|HM221250.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496787|gb|HM221249.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496765|gb|HM221238.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496767|gb|HM221239.1|_Escherichia_coli ...T.
#gi|297496769|gb|HM221240.1|_Escherichia_coli ...A. ...A
#gi|297496771|gb|HM221241.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496783|gb|HM221247.1|_Escherichia_coli ...T.
#gi|297496781|gb|HM221246.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496777|gb|HM221244.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496773|gb|HM221242.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496785|gb|HM221248.1|_Escherichia_coli ...T. ...A.
#gi|134289912|gb|EF141500.1|_Escherichia_coli ...
#gi|134289910|gb|EF141499.1|_Escherichia_coli ...
#gi|134289908|gb|EF141498.1|_Escherichia_coli ...
#gi|134289906|gb|EF141497.1|_Escherichia_coli ...

```

```

#gi|134289904|gb|EF141496.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|134289902|gb|EF141495.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|134289900|gb|EF141494.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|134289898|gb|EF141493.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|134289896|gb|EF141492.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|134289894|gb|EF141491.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|134289892|gb|EF141490.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|134289890|gb|EF141489.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|134289888|gb|EF141488.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|380861347|gb|JQ068090.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|380861345|gb|JQ068089.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|380861343|gb|JQ068088.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|380861341|gb|JQ068087.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|380861339|gb|JQ068086.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|380861337|gb|JQ068085.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|380861335|gb|JQ068084.1|_Escherichia_coli ... ..T...
#gi|380861333|gb|JQ068083.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|380861331|gb|JQ068082.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|380861329|gb|JQ068081.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|134289932|gb|EF141510.1|_Escherichia_coli ... ..T...A...
#gi|134289930|gb|EF141509.1|_Escherichia_coli ... ..T...A...
#gi|134289928|gb|EF141508.1|_Escherichia_coli ... ..T...A...
#gi|134289926|gb|EF141507.1|_Escherichia_coli ... ..A...
#gi|134289924|gb|EF141506.1|_Escherichia_coli ... ..T...A...
#gi|134289922|gb|EF141505.1|_Escherichia_coli ... ..T...A...
#gi|134289920|gb|EF141504.1|_Escherichia_coli ... ..T...A...
#gi|134289918|gb|EF141503.1|_Escherichia_coli ... ..G...T...A...
#gi|134289916|gb|EF141502.1|_Escherichia_coli ... ..A...
#gi|134289914|gb|EF141501.1|_Escherichia_coli ... ..A...

```



```

#gi|297496831|gb|HM221271.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496805|gb|HM221258.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496807|gb|HM221259.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496811|gb|HM221261.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496813|gb|HM221262.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496815|gb|HM221263.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496817|gb|HM221264.1|_Escherichia_coli ... .. .A. .A. ... .. .G. ... ..
#gi|297496819|gb|HM221265.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496821|gb|HM221266.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496823|gb|HM221267.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496825|gb|HM221268.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496827|gb|HM221269.1|_Escherichia_coli ... .. G.. .A. ... .. .G. ... ..
#gi|297496829|gb|HM221270.1|_Escherichia_coli ... .. .A. .A. ... ..
#gi|297496803|gb|HM221257.1|_Escherichia_coli ... .. .A. ... ..
#gi|297496801|gb|HM221256.1|_Escherichia_coli ... .. .A .A. .A. ... .. .G. ... ..
#gi|297496799|gb|HM221255.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496797|gb|HM221254.1|_Escherichia_coli ... .. .A. ... .. .A. ... ..
#gi|297496795|gb|HM221253.1|_Escherichia_coli ... .. .A. .A. ... .. .G. ... ..
#gi|297496791|gb|HM221251.1|_Escherichia_coli ... .. .A. .A. ... .. .G. ... ..
#gi|297496793|gb|HM221252.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496789|gb|HM221250.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496787|gb|HM221249.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496765|gb|HM221238.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496767|gb|HM221239.1|_Escherichia_coli ... .. .A. .A. ... .. .G. ... ..
#gi|297496769|gb|HM221240.1|_Escherichia_coli ... .. .A. ... ..
#gi|297496771|gb|HM221241.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496783|gb|HM221247.1|_Escherichia_coli ... .. .A. ... ..
#gi|297496781|gb|HM221246.1|_Escherichia_coli ... .. .A. .A. ... .. .G. ... ..
#gi|297496777|gb|HM221244.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496773|gb|HM221242.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496785|gb|HM221248.1|_Escherichia_coli ... .. G.. .A. ... ..
#gi|134289912|gb|EF141500.1|_Escherichia_coli ... .. .A. .A. ... .. .G. ... ..
#gi|134289910|gb|EF141499.1|_Escherichia_coli ... .. .A. .A. ... ..
#gi|134289908|gb|EF141498.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|134289906|gb|EF141497.1|_Escherichia_coli ... .. .A. .A. ... .. .G. ... ..

```

#gi|134289904|gb|EF141496.1|_Escherichia_coliA. .A.G. ...
#gi|134289902|gb|EF141495.1|_Escherichia_coliA. .A.G. ...
#gi|134289900|gb|EF141494.1|_Escherichia_coli ...
#gi|134289898|gb|EF141493.1|_Escherichia_coli ...
#gi|134289896|gb|EF141492.1|_Escherichia_coli ...
#gi|134289894|gb|EF141491.1|_Escherichia_coli ...
#gi|134289892|gb|EF141490.1|_Escherichia_coli ...
#gi|134289890|gb|EF141489.1|_Escherichia_coli ...
#gi|134289888|gb|EF141488.1|_Escherichia_coli ...
#gi|380861347|gb|JQ068090.1|_Escherichia_coli ...
#gi|380861345|gb|JQ068089.1|_Escherichia_coli ...
#gi|380861343|gb|JQ068088.1|_Escherichia_coli ...
#gi|380861341|gb|JQ068087.1|_Escherichia_coli ...
#gi|380861339|gb|JQ068086.1|_Escherichia_coli ...
#gi|380861337|gb|JQ068085.1|_Escherichia_coliA. .A.G. ...
#gi|380861335|gb|JQ068084.1|_Escherichia_coliA. .A.G. ...
#gi|380861333|gb|JQ068083.1|_Escherichia_coli ...
#gi|380861331|gb|JQ068082.1|_Escherichia_coli ...
#gi|380861329|gb|JQ068081.1|_Escherichia_coli ...
#gi|134289932|gb|EF141510.1|_Escherichia_coli ... G. .A. ...
#gi|134289930|gb|EF141509.1|_Escherichia_coli ... G. .A. ...
#gi|134289928|gb|EF141508.1|_Escherichia_coliA. ...
#gi|134289926|gb|EF141507.1|_Escherichia_coliA. ...
#gi|134289924|gb|EF141506.1|_Escherichia_coliA.A. ...
#gi|134289922|gb|EF141505.1|_Escherichia_coliA. ...
#gi|134289920|gb|EF141504.1|_Escherichia_coliA. ...
#gi|134289918|gb|EF141503.1|_Escherichia_coliA. ...
#gi|134289916|gb|EF141502.1|_Escherichia_coliA. ...
#gi|134289914|gb|EF141501.1|_Escherichia_coliA. .A.G. ...

```

33 333 333 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444 444
999 999 999 000 000 000 011 111 111 112 222 222 222 333
123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012
#Escherichia_coli_ponto_1_-_rio_Faria-Timbo GCA CTA GCG GGA CTT TGC AAG TGG TGA ATC CGC ACC TCT GGC
#Escherichia_coli_ponto_1_-_rio_Faria-Timbo ... ..
#Escherichia_coli_ponto_2_-_rio_Faria-Timbo ... ..
#Escherichia_coli_ponto_3_-_rio_Jacare ... .C. ... ..
#Escherichia_coli_ponto_3_-_rio_Jacare ... .C. ... ..
#Escherichia_coli_ponto_8_-_rio_Jacare ... ..
#Escherichia_coli_ponto_4_-_rio_Faria-Timbo ... ..
#gi|380861367|gb|JQ068100.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|380861369|gb|JQ068101.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|380861365|gb|JQ068099.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|380861363|gb|JQ068098.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|380861349|gb|JQ068091.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|380861351|gb|JQ068092.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|380861353|gb|JQ068093.1|_Escherichia_coli .T. .C. ... .. .A. ... ..
#gi|380861355|gb|JQ068094.1|_Escherichia_coli .. ... ..
#gi|380861357|gb|JQ068095.1|_Escherichia_coli .T. .C. ... .. .C. ... ..
#gi|380861359|gb|JQ068096.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|380861361|gb|JQ068097.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496859|gb|HM221285.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496857|gb|HM221284.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496855|gb|HM221283.1|_Escherichia_coli ... .C. ... .. .A. ... ..
#gi|297496853|gb|HM221282.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496851|gb|HM221281.1|_Escherichia_coli ... .C. ... ..
#gi|297496849|gb|HM221280.1|_Escherichia_coli .T. .C. ... .. .A. ... ..
#gi|297496847|gb|HM221279.1|_Escherichia_coli ... .C. ... .. .A. ... ..
#gi|297496845|gb|HM221278.1|_Escherichia_coli ... .CT ... ..
#gi|297496843|gb|HM221277.1|_Escherichia_coli ... .C. ... ..
#gi|297496841|gb|HM221276.1|_Escherichia_coli ... .C. ... ..
#gi|297496839|gb|HM221275.1|_Escherichia_coli ... .C. ... .. .A. ... ..
#gi|297496837|gb|HM221274.1|_Escherichia_coli ... ..
#gi|297496835|gb|HM221273.1|_Escherichia_coli ... .C. ... ..
#gi|297496833|gb|HM221272.1|_Escherichia_coli ... .C. ... ..

```

#gi|297496831|gb|HM221271.1|_Escherichia_coliC. ...
#gi|297496805|gb|HM221258.1|_Escherichia_coliC. ...
#gi|297496807|gb|HM221259.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496811|gb|HM221261.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496813|gb|HM221262.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496815|gb|HM221263.1|_Escherichia_coliC. ...
#gi|297496817|gb|HM221264.1|_Escherichia_coli .T. .C.C. ...
#gi|297496819|gb|HM221265.1|_Escherichia_coliC. ...
#gi|297496821|gb|HM221266.1|_Escherichia_coliC. ...
#gi|297496823|gb|HM221267.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496825|gb|HM221268.1|_Escherichia_coliC. ...
#gi|297496827|gb|HM221269.1|_Escherichia_coliCT ...
#gi|297496829|gb|HM221270.1|_Escherichia_coliC. ...
#gi|297496803|gb|HM221257.1|_Escherichia_coliC.A. ...
#gi|297496801|gb|HM221256.1|_Escherichia_coli .T. .C. ...
#gi|297496799|gb|HM221255.1|_Escherichia_coliC. ...
#gi|297496797|gb|HM221254.1|_Escherichia_coliC.A. ...
#gi|297496795|gb|HM221253.1|_Escherichia_coli .T. .C.A. ...
#gi|297496791|gb|HM221251.1|_Escherichia_coli .T. .C.C. ...
#gi|297496793|gb|HM221252.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496789|gb|HM221250.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496787|gb|HM221249.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496765|gb|HM221238.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496767|gb|HM221239.1|_Escherichia_coli .T. .C.A. ...
#gi|297496769|gb|HM221240.1|_Escherichia_coliC. ...
#gi|297496771|gb|HM221241.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496783|gb|HM221247.1|_Escherichia_coliC. ...
#gi|297496781|gb|HM221246.1|_Escherichia_coli .T. .C. ...
#gi|297496777|gb|HM221244.1|_Escherichia_coli ...
#gi|297496773|gb|HM221242.1|_Escherichia_coliC. ...
#gi|297496785|gb|HM221248.1|_Escherichia_coliC.A. ...
#gi|134289912|gb|EF141500.1|_Escherichia_coliC. ...
#gi|134289910|gb|EF141499.1|_Escherichia_coliC. ...
#gi|134289908|gb|EF141498.1|_Escherichia_coliC. ...
#gi|134289906|gb|EF141497.1|_Escherichia_coli .T. .C. ...

#gi|134289900|gb|EF141494.1|_Escherichia_coliC.
#gi|134289898|gb|EF141493.1|_Escherichia_coliC.
#gi|134289896|gb|EF141492.1|_Escherichia_coliC.
#gi|134289894|gb|EF141491.1|_Escherichia_coliC.
#gi|134289892|gb|EF141490.1|_Escherichia_coliC.
#gi|134289890|gb|EF141489.1|_Escherichia_coli
#gi|134289888|gb|EF141488.1|_Escherichia_coli
#gi|380861347|gb|JQ068090.1|_Escherichia_coli
#gi|380861345|gb|JQ068089.1|_Escherichia_coli
#gi|380861343|gb|JQ068088.1|_Escherichia_coli
#gi|380861341|gb|JQ068087.1|_Escherichia_coli
#gi|380861339|gb|JQ068086.1|_Escherichia_coli
#gi|380861337|gb|JQ068085.1|_Escherichia_coli .T. .C.
#gi|380861335|gb|JQ068084.1|_Escherichia_coli .T. .C.C.
#gi|380861333|gb|JQ068083.1|_Escherichia_coli
#gi|380861331|gb|JQ068082.1|_Escherichia_coli
#gi|380861329|gb|JQ068081.1|_Escherichia_coli
#gi|134289932|gb|EF141510.1|_Escherichia_coliC.A.
#gi|134289930|gb|EF141509.1|_Escherichia_coliC.A.
#gi|134289928|gb|EF141508.1|_Escherichia_coliC.A.
#gi|134289926|gb|EF141507.1|_Escherichia_coliC.
#gi|134289924|gb|EF141506.1|_Escherichia_coliC.A.
#gi|134289922|gb|EF141505.1|_Escherichia_coliC.A.
#gi|134289920|gb|EF141504.1|_Escherichia_coliC.A.
#gi|134289918|gb|EF141503.1|_Escherichia_coliC.
#gi|134289916|gb|EF141502.1|_Escherichia_coliC.A.
#gi|134289914|gb|EF141501.1|_Escherichia_coliC.

9.1.3 Alinhamento *Bifidobacterium adolescentis*

	455	555	555	556	666	666	666	777	777	777	788	888	888	889	999	999	999	000	000	000	011	111	111	112	222	255
	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	423
#B_adolescentis_ponto_4_-_rio_Faria-Timbo	GGG	GTC	GCG	TCC	TAT	CAG	CTT	GAT	GGC	GGG	GTA	ACG	GCC	CAC	CAT	GGC	TTC	GAC	CGT	TAG	CCG	GCC	TGA	GAG	GGC	GCC
#B_adolescentis_ponto_3_-_rio_Jacare	G.G
#B_adolescentis_ponto_5_-_rio_Faria-Timbo	G.G
#B_adolescentis_ponto_6_-_rio_Jacare	G.G
#gi 223667639 ref NZ_DS264459.1 B_adolescentis	G.G
#gi 757771851 ref NZ_JRNZ01000121.1 B_adolescentis	G.G
#gi 737014125 ref NZ_JNKM01000001.1 B_adolescentis	G.G
#gi 736508437 ref NZ_JGZQ01000007.1 B_stercoris	G.G
#gi 705409904 ref NZ_JDUX01000017.1 B_stercoris	G.G
#gi 749308093 ref NZ_CP007443.1 Bi_adolescentis	G.G
#gi 749308093 ref NZ_CP007443.1 B_adolescentis	G.G
#gi 749308093 ref NZ_CP007443.1 B_adolescentis	G.G
#gi 749308093 ref NZ_CP007443.1 B_adolescentis	G.G
#gi 736123387 ref NZ_JGYY01000002.1 B_kashiwanohense	G.G
#gi 705414460 ref NZ_JDUP01000030.1 B_kashiwanohense	G.G
#gi 551241335 ref NZ_ATXM01000009.1 B_minimumT	..TA	G.G
#gi 736887130 ref NZ_JGZD01000001.1 B_minimumT	..TA	G.G
#gi 485462139 ref NZ_AFXX01000047.1 B_breve	G.G
#gi 512637841 ref NZ_KE150454.1 B_breve	G.G
#gi 657871121 ref NZ_AUFI01004.1 B_thermacidophilumTG	..GA	G.G
#gi 651891476 ref NZ_JHWM01000045.1 B_thermophilumTG	..GA	G.G
#gi 705405910 ref NZ_JDTK01000044.1 B_ruminantiumG	..A	..TCGA	..C	..A	...	G.G
#gi 736885457 ref NZ_JGZL01000010.1 B_ruminantiumG	..A	..TCGA	..C	..A	...	G.G
#gi 736519583 ref NZ_JDUT01000032.1 B_saguiniCG	G.G
#gi 736512520 ref NZ_JGZP01012.1 B_stellenboschenseC	..TG	..TT	..G	G.G
#gi 736509928 ref NZ_JGZP010002.1 B_stellenboschenseT	..T	..TT	..GA	G.G
#gi 705404811 ref NZ_JDUF01000029.1 B_coryneformeT	..TG	..TT	..A	G.G
#gi 705391476 ref NZ_JDUE01000018.1 B_indicumT	..TG	..TT	..A	G.G
#gi 751345840 ref NZ_CP006018.1 B_indicumT	..TG	..TT	..A	G.G

```

#gi|223955940|ref|NZ_DS990246.1|B_longum      ... ..C ... ..G. ... ..G.G ... ..
#gi|763223842|ref|NZ_JGZK0100013.1|B_reuteri ... ..C ... ..G ... ..G. ... ..T ... G.G ... ..
#gi|763218275|ref|NZ_JDUW010049.1|B_reuteri ... ..C ... ..G ... ..G. ... ..T ... G.G ... ..
#gi|553744128|ref|NZ_AWT010085.1|S_pyogenes ... ..C ... ..G. ... ..G.G ... ..
#gi|754623242|ref|NZ_CCWU01050.1|B_longum ... ..C ... ..G. ... ..G.G ... ..
#gi|754623242|ref|NZ_CCWU01000050.1|B_longum ... ..C ... ..G. ... ..G.G ... ..
#gi|754593754|ref|NZ_CCWT01000056.1|B_longum ... ..C ... ..G. ... ..G.G ... ..
#gi|736880310|B_pseudocatenulatum ... ..G.A .TC ... ..GA .C. .A. ... G.G ... ..
#gi|736509758|B_stellenboschense ... ..T. .T. .T. .G .T. .G ... ..A ... ..G.G ... ..
#gi|736116463|ref|NZ_JGYT011.1|B_catenulatum ... ..G.A .TC ... ..GA .C. .A. ... G.G ... ..
#gi|705481336|B_pseudocatenulatum ... ..G.A .TC ... ..GA .C. .A. ... G.G ... ..
#gi|705439984|ref|NZ_JDU1028.1|B_mongoliense ... ..T. .T ... ..G .A. ... ..A ... ..G.G ... ..T ...
#gi|705439769|ref|NZ_JDTP093.1|B_catenulatum ... ..G.A .TC ... ..GA .C. .A. ... G.G ... ..
#gi|705422497|B_actinocoloniiiforme ... ..T. .T ... ..G .T. ... T. .A ... ..G.G ... ..T ...

111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 111 122 222 222 222 222 222 222 222 222 222
555 555 666 666 666 677 777 777 778 888 888 888 999 999 999 900 000 000 001 111 111 111 222 222 222 233
456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901

#B_adolescentis_ponto_4_-_rio_Faria-Timbo CAG ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT GGG GAA TAT TGC ACA ATG GGC GCA AGC CTG ATG CAG CGA CGC CGC GTG CGG GAT
#B_adolescentis_ponto_3_-_rio_Jacare ... ..
#B_adolescentis_ponto_5_-_rio_Faria-Timbo ... ..
#B_adolescentis_ponto_6_-_rio_Jacare ... ..
#gi|223667639|ref|NZ_DS26459.1|B_adolescentis... ..
#gi|757771851|ref|NZ_JRNZ121.1|B_adolescentis... ..
#gi|737014125|ref|NZ_JNKM011.1|B_adolescentis... ..
#gi|736508437|ref|NZ_JGZQ010007.1|B_stercoris ... ..
#gi|705409904|ref|NZ_JDUX0100017.1|Bstercoris... ..
#gi|749308093|ref|NZ_CP07443.1|B_adolescentis... ..
#gi|749308093|ref|NZ_CP7443.1|B_adolescentis ... ..
#gi|749308093|ref|NZ_CP7443.1|B_adolescentis ... ..
#gi|749308093|ref|NZ_CP07443.1|B_adolescentis... ..
#gi|736123387|B_kashiwanohense ... ..
#gi|705414460|ref|NZ_JUP13.1|B_kashiwanohense... ..
#gi|551241335|ref|NZ_ATXM01000009.1|B_minimum... ..A. ... ..
#gi|736887130|ref|NZ_JGZD01000001.1|B_minimum ... ..A. ... ..

```

#gi|485462139|ref|NZ_AFX01000047.1|B_breve A.. ...
 #gi|512637841|ref|NZ_KE150454.1|B_breve A.. ...
 #gi|657871121|B_thermacidophilum
 #gi|651891476|B_thermophilum
 #gi|705405910|B_ruminantium
 #gi|736885457|B_ruminantium
 #gi|736519583|ref|NZ_JDUT01032.1|B_saguini A.. ...
 #gi|736512520|ref|B_stellenboschense
 #gi|736509928|B_stellenboschense
 #gi|705404811|ref|NZ_JDUF029.1|B_coryneforme... .. A.
 #gi|705391476|ref|NZ_JDUE01018.1|B_indicum A.
 #gi|751345840|ref|NZ_CP006018.1|B_indicum A.
 #gi|751345840|ref|NZ_CP006018.1|B_indicum A.
 #gi|751345840|ref|NZ_CP006018.1|B_indicum A.
 #gi|237754069|ref|NZ_GG666857.1|B_longum A.. ...
 #gi|223955940|ref|NZ_DS990246.1|B_longum A.. ...
 #gi|763223842|ref|NZ_JGZK010013.1|B_reuteri
 #gi|763218275|ref|NZ_JDUW010049.1|B_reuteri
 #gi|553744128|ref|NZ_AWTF01085.1|S_pyogenes A.. ...
 #gi|754623242|ref|NZ_CCWU0100050.1|B_longum A.. ...
 #gi|754623242|ref|NZ_CCWU0100050.1|B_longum A.. ...
 #gi|754593754|ref|NZ_CCWT0100056.1|B_longum A.. ...
 #gi|736880310|B_pseudocatenulatum
 #gi|736509758|B_stellenboschense
 #gi|736116463|ref|NZ_JGYT111.1|B_catenulatum... ..
 #gi|705481336|B_pseudocatenulatum
 #gi|705439984|ref|NZ_JDU0128.1|B_mongoliense... .. A.
 #gi|705439769|ref|NZ_JDTP093.1|B_catenulatum... ..
 #gi|705422497|B_actinocoloniiforme


```

#gi|156193901|gb|EU014382.1|Giardia_intestinalis .. ... .T. ... .. .A. ... ..
#gi|18389199|gb|AY072725.1|Giardia_intestinalis .. ... .T. ... ..
#gi|262385407|gb|FJ971435.1|Giardia_intestinalis T. ... ..
#gi|262385501|gb|FJ971482.1|Giardia_intestinalis .. ... ..
#gi|156193919|gb|EU014391.1|Giardia_intestinalis .. ... .T. ... .. .A. ... ..
#gi|262385497|gb|FJ971480.1|Giardia_intestinalis .. ... ..

22 222 222 223 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 333 3]
99 999 999 990 000 000 000 111 111 111 122 222 222 223 333 333 333 444 444 444 455 555 555 556 666 666 6]
01 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 789 012 345 678 901 234 567 890 123 456 7]

#Giardia_spp_ponto_1_F_-_Faria-Timbo GA AGT CTG CCG ACA ACA TGT ACC TGA CGA TCA AGG AGG AGA TCG ACA CCA TGG CCG CAA ACT TCC GCA AGT CTC TCG C
#Giardia_spp_ponto_1_R_-_Faria-Timbo .. ... .C. ... .. .A. ... .. .T. ... .. .C. .T. .
#gi|18389201|gb|AY072727.1|Giardia_intestinalis .. ... ..
#gi|18389209|gb|AY072726.1|Giardia_intestinalis .. ... ..
#gi|325651623|dbj|AB61875.1|Giardia_intestinalis .. ... .. .T. .
#gi|322227371|gb|HQ179587.1|Giardia_intestinalis .. ... .. .T. .
#gi|156193921|gb|EU014392.1|Giardia_intestinalis .. ... .. .T. .
#gi|322227369|gb|HQ179586.1|Giardia_intestinalis .. ... .. .T. .
#gi|262385467|gb|FJ971465.1|Giardia_intestinalis .. ... ..
#gi|262385459|gb|FJ971461.1|Giardia_intestinalis .. ... ..
#gi|262385465|gb|FJ971464.1|Giardia_intestinalis .. ... ..
#gi|262385403|gb|FJ971433.1|Giardia_intestinalis .. ... ..
#gi|262385401|gb|FJ971432.1|Giardia_intestinalis .. ... ..
#gi|262385395|gb|FJ971429.1|Giardia_intestinalis .. ... ..
#gi|262385389|gb|FJ971426.1|Giardia_intestinalis .. ... ..
#gi|156193915|gb|EU014389.1|Giardia_intestinalis .. ... .. .T. .
#gi|156193901|gb|EU014382.1|Giardia_intestinalis .. ... .. .T. .
#gi|18389199|gb|AY072725.1|Giardia_intestinalis .. ... .. .T. ... .. .T. .
#gi|262385407|gb|FJ971435.1|Giardia_intestinalis .. ... ..
#gi|262385501|gb|FJ971482.1|Giardia_intestinalis .. ... .. .T. .
#gi|156193919|gb|EU014391.1|Giardia_intestinalis .. ... .. .T. .
#gi|262385497|gb|FJ971480.1|Giardia_intestinalis .. ... .. .T. .

```