MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO – UFMT
FACULDADE DE ARQUITETURA, ENGENHARIA E TECNOLOGIA – FAET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS HÍDRICOS – PPGRH

ROSSEAN GOLIN

CARACTERIZAÇÃO GÊNICA DE LINHAGENS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DA ÁGUA DO RIO CUIABÁ, MATO GROSSO.

Cuiabá – Mato Grosso

2015

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO – UFMT
FACULDADE DE ARQUITETURA, ENGENHARIA E TECNOLOGIA – FAET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS HÍDRICOS – PPGRH

ROSSEAN GOLIN

CARACTERIZAÇÃO GÊNICA DE LINHAGENS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DA ÁGUA DO RIO CUIABÁ, MATO GROSSO.

Dissertação de Mestrado em Recursos Hídricos para obtenção do título de Mestre em Recursos Hídricos Universidade Federal de Mato Grosso, Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos, Faculdades de Arquitetura, Engenharia e Tecnologia.

Orientadora: Profª. Dr.ª Zoraidy Marques de Lima

Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Beraldo de Morais

Cuiabá – Mato Grosso

2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

ROSSEAN GOLIN

TÍTULO: "CARACTERIZAÇÃO GÊNICA DE LINNHAGENS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DA ÁGUA DO RIO CUIABÁ, MATO GROSSO".

BANCA EXAMINADORA

Dissertação de Mestrado em Recursos Hídricos para obtenção do título de Mestre em Recursos Hídricos Universidade Federal de Mato Grosso, Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos, Faculdades de Arquitetura, Engenharia e Tecnologia.

_____

Prof. Dra. Zoraidy Marques de Lima
Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental/FAET-UFMT

_____

Prof. Dr. Eduardo Beraldo de Morais
Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental/FAET-UFMT

_____

Prof. Dra. Danila Soares Caixeta
Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental/FAET-UFMT

_____

Profª. Drª. Oscarina Viana de Sousa
Instituto de Ciências do Mar /UFC

Conceito:_____

Cuiabá-MT, 23 de Novembro de 2015

DEDICATÓRIA

A Deus, por instruir-me com sabedoria e discernimento perante as provas encontradas neste caminho, ajudando-me a encontrar forças suficientes para não sucumbir neste percurso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais uma vitória alcançada na minha vida;

Á Profª. Drª. Zoraidy Marques de Lima por acreditar em mim, pela orientação, confiança, amizade, incentivo e pelos momentos de muito aprendizado.

Á Prof. Dr. Eduardo Beraldo de Morais, por estar ao meu lado me auxiliando com muito carinho, pela amizade, apoio e confiança.

Aos professores que compõe a banca examinadora pelas contribuições;

Aos professores Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos pelos ensinamentos;

A todos do LAMSA/DESA, Sr. Wilsinho, Bruno Ramos Brum, Suzy Darley e Leiliane Silva do Nascimento pela ajuda nos momentos que eu não sabia nem por onde começar;

Aos meus colegas de curso que compartilharam das mesmas angústias, dificuldades e desafios;

Aos meus familiares, meus filhos, e meu neto Caio Henrique que me apoiaram durante o período de realização do mestrado e estão sempre no meu coração e pensamento;

Ao projeto temático de pesquisa “Rede de Monitoramento do impacto do uso da terra sobre os sistemas aquáticos em Bacias Hidrográficas da Região Centro-Oeste – Definição de Indicadores de integridade ambiental” (REMISA/UFMT/ 190/CAP/2011).

Enfim, agradeço a todos que contribuíram na realização desse sonho!

EPÍGRAFE

"Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim escolher entre rir ou chorar,
ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no cominho incerto da vida,
que o mais importante é o decidir."
Cora Coralina

RESUMO

O crescimento populacional associado ao processo de urbanização não planejado têm impactado os corpos hídricos com cargas poluidoras que podem incorporar uma enorme quantidade de agentes transmissores de doenças. Na bacia hidrográfica do Alto Paraguai encontra-se o Rio Cuiabá, que é um dos seus mais importantes formadores, e está em situação de deterioração na qualidade da água, com múltiplas implicações sociais, ambientais, econômicas e, sobretudo, na saúde pública. A *Escherichia coli* é um indicador de contaminação fecal nos corpos d'água advindo dos efluentes e esse trabalho objetivou identificar a diversidade gênica da *E. coli* na água do Rio Cuiabá entre os municípios de Cuiabá e Várzea Grande no Estado de Mato Grosso. Ocorreram três coletas no período de estiagem e três coletas no período de chuvas. Amostras de água foram coletadas em seção transversal do rio, na margem esquerda (1/6 – Ponto P1), no canal principal (1/2 – Ponto P2) e na margem direita (5/6 – Ponto P3). 299 culturas de *E. coli* foram isoladas do cultivo positivo em substrato cromogênico e fluorogênico (Colilert®), cultivadas em caldo nutriente e congeladas à temperatura de -20°C. Posteriormente 84,6% das cepas foram ativadas em TSB para extração e amplificação do DNA utilizando a técnica PCR. Os dados foram analisados pelo método de ligação média não ponderada de agrupamento aos pares e as distâncias genéticas foram obtidas pelo complemento aritmético do coeficiente de similaridade de Jaccard. O número de *E. coli* nas amostras de água coletadas durante a estação seca foi menor do que a densidade encontrada durante a estação chuvosa. A maior densidade pode ser atribuída em parte, ao escoamento superficial gerado a partir de eventos de chuva que transportam um elevado número de bactérias de vários pontos e fontes difusas para o leito do rio. Os produtos de amplificação da PCR das *E. coli* isoladas das amostras de água da margem esquerda (P1) do Rio Cuiabá apresentaram 97,22% de cepas similares apresentando menor diversidade gênica com 30,61% quando comparados os três pontos de coleta. Possivelmente a contaminação dessa margem esteja relacionada com efluentes domésticos corroborando com a elevada similaridade bacteriana. Os produtos de amplificação da PCR para os isolados de *E. coli* da margem direita (P3) geraram 98,21% de cepas similares e, entre os três pontos amostrais, esta margem apresentou maior diversidade gênica (36,73%). Esta maior diversidade pode estar relacionada com afluentes receptores de contaminantes, além de atividades agrícolas, criação de gado e suínos, existentes à montante do ponto de coleta no Rio Cuiabá. O canal principal do Rio Cuiabá no Ponto Amostral P2 apresentou um valor mediano de diversidade gênica (32,65%) em relação às margens. Mesmo com uma alta similaridade gênica (97,23%) entre as 253 cepas bacterianas do Rio Cuiabá ativadas houve uma variedade de cepas dissimilares, sugerindo serem possíveis *E. coli* com genes de virulência ou mesmo *E. coli* patogênicas. Estabelecendo assim, um aumento potencial na ameaça de risco para a saúde das populações se as eficiências de tratamento e controle de lançamento de efluentes domésticos, industriais e até mesmo poluições difusas, não possuírem uma adequada e contínua gestão.

Palavra Chave: PCR. Qualidade de Água. Poluição Fecal. Águas Superficiais. Recursos Hídricos.

ABSTRACT

Population growth and unplanned urbanization process have impacted water bodies with pollutant loads which can incorporate an enormous amount of disease agents. In the Upper Paraguay River Basin is the Cuiabá River, which is one of its most important affluent and is in deteriorating situation in water quality, with social, environmental, and economic implications, especially on public health. *Escherichia coli* is an indicator of faecal contamination in water bodies and this work aimed to identify the genetic diversity of *E. coli* in the water of Cuiabá River between the cities of Cuiabá and Várzea Grande in the State of Mato Grosso. Three sampling were performed in dry season and three sampling during the rainy season. Water samples were collected left bank (1/6 - point P1), main channel (1/2 - point P2) and right bank (5/6 - point P3) of the total width of the river. 299 *E. coli* strains were isolated by positive chromogenic and fluorogenic culture substrate (Colilert®), grown in nutrient broth and frozen at -20 ° C. Later, 84.6% of the strains were activated in TSB for DNA extraction and amplification using the PCR technique. Data were analyzed by average connection method unweighted grouping in pairs and genetic distances were calculated using arithmetic complement of the Jaccard similarity coefficient. The number of *E. coli* in water samples collected during the dry season was lower than the density found during the rainy season. The greater density can be attributed in part to runoff due rain events which carry a high number of bacteria to from several sources to the river. The amplification products of PCR of *E. coli* isolated from water samples on the left bank (P1) of the Cuiabá River showed 97.22% of similar strains having less genetic diversity with 30.61% when comparing the three sampling points. Possibly contamination of this margin is related to domestic effluents corroborating the high bacterial similarity. The PCR amplification products for *E. coli* isolates from the right bank (P3) generated 98.21% of similar strains and, among the three sampling points, this margin showed higher genetic diversity (36.73%). This greater diversity may be related to affluent receivers of contaminants, as well as agricultural activities, pigs and cattle breeding and pigs, existing upstream of the sampling point in Rio Cuiabá. The main channel of the Cuiaba River in the sampling point P2 had a median value of genetic diversity (32.65%) compared to banks. Even with a high genetic similarity (97.23%) among the 253 bacterial strains activated from the Cuiabá River there was a variety of dissimilar strains, suggesting are possible *E. coli* virulence genes or even pathogenic *E. coli.* Thus establishing a potential increase in the risk to the health of population if the efficiencies treatment and launch control domestic sewage, industrial and even diffuse pollution, do not have adequate and ongoing management.

Keyword: PCR; Water quality; Fecal pollution; Surface water; Water Resources.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização da área de estudo do presente trabalho 32

Figura 2 - Estação Hidrométrica do Porto em Cuiabá/MT. 33

Figura 3 - Método de Igual Incremento de Largura 34

Figura 4 - Representação esquemática da metodologia 36

Figura 5 – Dendrogramas de similaridade genotípica do Ponto Amostral P1. 46

Figura 6 – Dendrogramas de similaridade genotípica do Ponto Amostral P1 47

Figura 7 - Diversidade gênica por NESTED-PCR, de todas as 72 cepas de *E. coli*. 49

Figura 8 – Dendrograma de similaridade genotípica do Ponto Amostral P2. 51

Figura 9 - Dendrogramas de similaridade genotípica do Ponto Amostral P2. 51

Figura 10 – Dendrogramas de similaridade genotípica do Ponto Amostral P2. 52

Figura 11 - Diversidade gênica por Nested-PCR, de todas as 69 cepas de *E. coli*..... 55

Figura 12 – Dendrogramas de similaridade genotípica do Ponto Amostral P3. 56

Figura 13 – Dendrograma de similaridade genotípica do Ponto Amostral P3. 57

Figura 14 – Dendrogramas de similaridade genotípica do Ponto Amostral P3. 58

Figura 15 - Diversidade gênica por Nested-PCR, de todas as 111 cepas de *E. coli*..... 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação numérica das linhagens de *E. coli* isoladas e ativadas do Rio Cuiabá-MT. 42

Tabela 2- Isolados de *E. coli* do Rio Cuiabá-MT submetidos a análise genotípica. 45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BOX-PCR:	Elemento Repetitivo encontrado no Genoma Bacteriano
CO_2:	Dióxido de Carbono
CONAMA:	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAEC:	*Escherichia coli* difusamente aderente
DESA:	Departamento Engenharia Sanitária Ambiental
DGGE:	Electroforese em gel de gradiente desnaturante
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
E. coli:	*Escherichia coli*
EAEC:	*Escherichia coli* enteroagregativa
EHEC:	*Escherichia coli* enterohemorrágica
EIEC:	*Escherichia coli* enteroinvasiva
EMBRAPA:	Empresa Brasileira de pesquisa Agropecuária
EPEC:	*Escherichia coli* enteropatogênica
ERIC:	Enterobacterial Repetitive Intergênic Consensus (Sequências repetitivas intergênicas de enterobactérias)
ETAR:	Estação de tratamento de águas residuais
ETE	Estação de tratamento de esgoto
ETEC:	*Escherichia coli* enterotoxigênica
ExPEC:	*Escherichia coli* patogênica extraintestinal
G/C:	Guanina/ Citosina
g:	Grama
H_2:	Gás hidrogênio
IIL:	Igual Incremento de Largura
InPEC:	*Escherichia coli* patogênica intestinal
ITU:	Infecção do trato urinário
Kb:	Kilobase
L:	Litro
LABIOMA:	Laboratório de Biologia Molecular
$MgCl_2$:	Cloreto de magnésio
mL:	Mililitro

MNEC:	*Escherichia coli associada a Meningite Neonatal*
NCBI	Nacional Center for Biotechnology Information
nPCR:	Nested-PCR
pb:	Pares de base
PCR:	Polymerase chain reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
REP:	Repetitive Extragenic Palindromic (Sequências repetitivas palindrómicas extragênicas)
RFLP:	Restriction fragment length polymorphism (Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição)
rpm:	Rotação por minuto
rRNA:	Ácido Ribonucleico ribossomal
SDS:	Dodecil sulfato de sódio
TAE:	Tris-Acetato-EDTA
TBE:	Tris Boric EDTA
TSB:	*Tryptic soy broth* (caldo de tripticaseína de soja)
UFMT:	Universidade Federal de Mato Grosso
UPEC:	*Escherichia coli* uropatogênica
UPGMA:	*Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages*
UV:	Ultravioleta
VGs:	Genes de virulência
VNTR:	Variable number tandem repeat (número variável de frequências repetidas)
WHO:	*World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)
μL:	Microlitro
μm:	Micrômetro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO 14

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17

1.1 EFLUENTES E RECURSOS HÍDRICOS 17

1.2 BACIA DO RIO CUIABÁ 20

1.3 Escherichia coli 21

1.3.1 Classificação de *Escherichia coli* 23

1.4 DIVERSIDADE MICROBIANA 24

1.4.1 RNA Ribossômico 16S 25

1.4.2 Técnicas de Análise de DNA 26

1.4.3 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) 27

2 MATERIAL E MÉTODOS 31

2.1 LOCALIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO 31

2.2 PONTOS DE COLETA E METODOLOGIA DE AMOSTRAGEM 32

2.3 PERÍODO AMOSTRAL 34

2.4 CULTIVO E ISOLAMENTO DAS CULTURAS DE *Escherichia coli* 34

2.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS CONVENCIONAIS 35

2.6 ANÁLISES MOLECULARES 35

2.6.1 Extração de DNA dos isolados de *E. coli* 36

2.6.2 Amplificação dos fragmentos dos genes 16S rDNA 37

2.6.3 Caracterização genotípica da *E. coli* por Nested – PCR 38

2.7 ANÁLISES DOS DADOS 39

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 41

3.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS 41

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO 42

3.3 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES 16S rDNA 43

3.4 AMPLIFICAÇÃO DO NESTED-PCR 43

3.5 DIVERSIDADE GÊNICA DOS ISOLADOS *E. COLI* 44

3.5.1 Diversidade gênica da *E. coli* na água do Rio Cuiabá - Ponto Amostral P1 45

3.5.2 Diversidade gênica da *E. coli* na água do Rio Cuiabá - Ponto Amostral P2 50

3.5.3 Diversidade gênica da *E. coli* na água do Rio Cuiabá - Ponto Amostral P3 56

CONCLUSÃO 65

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 66

APÊNDICE A 75

APÊNDICE B 79

ANEXO 80

INTRODUÇÃO

O crescimento populacional associado ao processo de urbanização não planejado têm impactado os corpos hídricos com cargas poluidoras. Um corpo d'água que recebe efluentes domésticos e industriais pode incorporar uma enorme quantidade de agentes transmissores de doenças que são veiculadas pela água.

A determinação da presença de patógenos bacterianos ou indicadores de contaminação fecal em águas é importante para que se avalie e garanta segurança da saúde pública em termos de saneamento, sendo necessário para isso que se adotem estratégias que sejam de controle realmente eficaz.

A realidade brasileira quanto à coleta e tratamento de efluentes é precária ocasionando aos gestores públicos ônus financeiros em outros setores atrelados a ausência de saneamento básico adequado.

Os efluentes lançados nos corpos hídricos carregam uma variedade de poluentes e os mais representativos são matéria orgânica, nutrientes, organismos patogênicos, material em suspensão, metais pesados e materiais orgânicos tóxicos.

O tratamento dos efluentes remove a maioria dos patogênicos, porém esse sistema é deficiente e muitos microrganismos são lançados nos corpos d'água receptores. Normas vigentes no país estabelecem critérios de avaliação referente à qualidade da água e nível de contaminação por meio de indicadores microbiológicos clássicos como coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*.

A bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) é considerada o melhor indicador de contaminação fecal por ser exclusivamente do trato intestinal do homem e de animais homeotérmicos. Devido a sua versatilidade é capaz de sobreviver em vários ambientes naturais captando energia de várias fontes. A *E. coli* possui uma grande variedade gênica podendo ser linhagens comensais ou patogênicas. As patogênicas podem causar diarreias, infecções urinárias, colite hemorrágica, meningite neonatal e até septicemia.

Novos conhecimentos têm sido adquiridos mediante o desenvolvimento tecnológico principalmente nas áreas de Ciências Biológicas e Bioinformática resultando em técnicas inovadoras para caracterização gênica de *E. coli* em águas superficiais. A técnica da PCR (Reação de Polimerização em Cadeia) é uma ferramenta molecular utilizada na análise da

diversidade microbiana e no estudo de bactérias patogênicas por ser uma técnica rápida, específica, sensível e precisa.

A área deste estudo situa-se na Bacia do Rio Cuiabá, que é parte da Bacia do Rio Paraguai, e a ocupação urbana é predominante nessa bacia. Os usos preponderantes da água dessa bacia são o abastecimento público e rural, à irrigação, geração de energia e diluição de efluentes industriais e domésticos.

O Rio Cuiabá é divisor das cidades de Cuiabá e Várzea Grande, que apresentam uma urbanização intensa, resultando em perdas da vegetação e das matas ciliares do rio e seus principais tributários. Este rio não tem mantido suas características naturais, devido a recepção de efluentes pontuais e difusos, dificultando seu processo de autodepuração e, assim, contribuindo com poluição e degradação das águas na Região Pantaneira.

Essa contaminação representa uma preocupação constante dos órgãos de saúde e meio ambiente devido aos riscos da utilização da água contaminada para fins recreacionais, irrigação, aquicultura e captação para consumo humano. Se os efluentes não forem adequadamente tratados, representam um risco significativo de ocorrência de doenças transmitidas pela bactéria *E. coli*, pois esta possui uma gama de linhagens que podem possuir genes patogênicos e ainda gerar novas doenças devido a sua diversidade gênica.

Linhagens de *E. coli* isoladas de doenças intestinais, com base em dados epidemiológicos, características fenotípicas, características clínicas da doença e fatores de virulência específicos possibilitaram separação em seis grupos principais diferentes. Destes, enterotoxigênica (ETEC, ou seja, O148), enterohemorrágica (EHEC, ou seja, O157) e sorotipos enteroinvasivos (EIEC, ou seja, O124) são de grande importância e pode ser transmitido pelo meio da água contaminada.

Considerando a relevância do tema e as ações antrópicas que afetam a Bacia Hidrográfica do Rio Cuiabá, esse trabalho analisou o padrão genético das *E. coli* isoladas da água em uma seção transversal do Rio Cuiabá, e a similaridade entre os isolados de *E. coli* da água nos pontos amostrais. As análises feitas neste trabalho por meio da técnica da PCR levou ao objetivo maior de caracterização gênica das cepas de *Escherichia coli* isoladas de água do Rio Cuiabá em área urbana no município de Cuiabá–MT.

Certo que a contaminação fecal nas águas superficiais representa um risco principalmente à saúde humana e que o processo para a redução dos efluentes in natura é

essencial, o resultado deste trabalho oferece novas informações sobre as fontes de contaminação contribuintes do rio, o que serve como subsidio para ações coordenadas de gestão dos recursos hídricos.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 EFLUENTES E RECURSOS HÍDRICOS

A qualidade e a quantidade dos corpos d´água sofrem alterações em decorrência de causas naturais ou antrópicas. Flutuações sazonais e, outras com ciclos de médio e longo prazo, são algumas causas naturais (SALATI et al., 1999, LIMA, 2009). O desmatamento, a mineração, a mudança do uso do solo, os projetos de irrigação, a construção de barragens, o abastecimento, assim como o despejo de material residual que é proveniente de fontes orgânicas e inorgânicas, resultantes de atividades causadas pelos seres humanos alteram o balanço hídrico em escala local e regional.

Fonte pontual e fonte difusa são modalidades relacionadas com as variedades de poluentes lançados nos corpos d'água. Fonte pontual esta relacionada com resíduos domésticos e industriais que são coletados por meio de um sistema de rede ou canais levando o esgoto a um simples ponto de lançamento em um corpo receptor (VON SPERLING, 1996). Geralmente, nos períodos de chuva há escoamento em áreas urbanas e ou agrícolas atingindo concentrações elevadas de poluentes, resultando em múltiplos pontos de descarga, caracterizando, assim as fontes difusas.

As fontes pontuais e difusas são compostas por poluentes como material orgânico que causa a deficiência de oxigênio nos corpos d'água; nutrientes, que provocam o excessivo crescimento de algas nos lagos, reservatórios, rios e mares; os organismos patogênicos; material em suspensão; metais pesados; material orgânico tóxico e calor (DAVIS et al., 1998).

O crescimento populacional associado ao processo de urbanização não planejado têm impactado os corpos hídricos com cargas poluidoras. Um corpo d'água que recebe efluentes domésticos e industriais pode incorporar uma enorme quantidade de agentes transmissores de doenças que são veiculadas pela água (VON SPERLING, 1996; CUNHA et al., 2010). Uma vez que uma quantidade significativa de poluição fecal frequentemente vem de fontes difusas, a variedade de patógenos na água degrada sua qualidade, principalmente no que se refere ao abastecimento doméstico, refletindo diretamente na saúde da população (RITTER et al., 2002; CASAREZ; PILLAIB; DI GIOVANNIA, 2007; CARLOS et al., 2012).

De acordo com dados de World Health Organization (WHO, 2014), mundialmente 2,5 bilhões de pessoas não têm acesso a saneamento básico. Uma das principais causas de doenças entéricas, veiculadas pela água e responsável pela morte de mais de 600 000 crianças por ano, é a contaminação fecal das águas. No entanto, conforme o Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento *(*SNIS, 2013), 48,6% dos brasileiros têm seus esgotos coletados e, de todo o material coletado, 39% são tratados. Em Mato Grosso, apenas 17,72% do esgoto gerado é coletado e desses apenas 23,85% são tratados.

No relatório anual elaborado pela Agência Municipal de Regulação de Água e Esgotamento Sanitário de Cuiabá-MT (AMAES) consta que o esgoto produzido por 73% da população da Capital não é tratado e vai parar nos rios, córregos ou são coletados por fossas inadequadas. Aponta ainda que apenas 41,24% do esgoto é coletado, o que corresponde apenas 27% da população cuiabana. Destes coletados, somente 64,72% é tratado, o restante devolvido a rede fluvial da cidade. Esse descarte do esgoto "in natura" aos córregos e rios, que em Cuiabá viraram verdadeiros esgotos a céu aberto, apresentam risco a saúde da população e ao meio ambiente (TRATABRASIL, 2014).

O Estado de Mato Grosso é banhado por três grandes bacias hidrográficas: Paraguai, Amazônica e Tocantis-Araguaia (SEMA, 2009) e as cargas poluidoras lançadas nesses corpos d´água tem resultado em alterações negativas na qualidade da água.

A determinação da presença de patógenos bacterianos ou indicadores de contaminação fecal em águas é importante para que se avalie e garanta segurança da saúde pública em termos de saneamento, sendo necessário para isso que se adotem estratégias que sejam de controle realmente eficaz (DOMBEK et al., 2000; GODINHO et al., 2010; CANAL, 2010; KUMARASWAMY et al., 2014).

A Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), de nº 357/2005 (BRASIL, 2005) estabelece como indicador de poluição aquática o grupo de coliformes termotolerantes que, além de estarem presentes em fezes humanas e de animais homeotérmicos, podem ser encontrados em solos, plantas ou outras matrizes ambientais que tenham sido contaminadas por material fecal. Também rege que a bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*) poderá ser determinada em substituição ao parâmetro de coliformes termotolerantes de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

Essa substituição sobrevém do fato de que a bactéria *E. coli* é exclusivamente do trato intestinal de animais homeotérmicos, estando sempre presente em densidades elevadas nas

fezes (10^6- 10^9 células em 1 grama de material fecal), sendo raramente encontrada na água ou solo que não tenham recebido contaminação fecal (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004, CETESB, 2009; GODINHO, 2010; STOPPE et al., 2014).

A contaminação dos corpos d´água pela bactéria *E. coli* por meio dos efluentes possui um grau elevado de interesse e conhecimento para gestão de recursos hídricos, podendo ser ela causadora de várias doenças como diarreia em adultos e crianças, meningite neonatal e até septicemia levando a óbito o infectado (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; CABRAL, 2010; BRASIL, 2011; SCHUROFF et al., 2014).

Pesquisas têm averiguado a presença de *E. coli* patogênicas em estações de tratamento de água (ETAs), sendo uma ameaça à saúde pública (HUANG et al., 2012; SCHUROFF et al., 2014). Os lodos gerados nos decantadores das ETAs são potencialmente tóxicos para plantas, seres humanos e organismos aquáticos e seu descarte em rios altera consideravelmente as características da água do corpo receptor.

Outros estudos monitoram a contaminação, por bactérias de origem fecal, das águas de praias (McLELLAN, 2004; SIGLER; PASSUTTI, 2006; OLIVEIRA et al., 2012). Águas de córregos e rios são também analisadas para verificar o tipo de contaminação por meio de *E. coli* isoladas e comparadas com *E. coli* de bovinos, aves e fontes humanas e seus diferentes tipos filogenéticos (BUCHAN; ALBER; HODSON, 2001; BORGES;VECHIA; CORÇÃO, 2003; ORSI et al., 2007b; CARLOS et al., 2010; GOTO; YAN, 2011).

A busca frequente dos cientistas para descrever o sequenciamento dos genes dos seres vivos, procurando identificar genes responsáveis por características fenotípicas normais ou patogênicas igualmente tem gerado novos conhecimento na área da genética (SILVA, 2000).

Estudos têm investigado os microrganismos que causam doenças por veiculação hídrica para melhorar o monitoramento de indicadores de poluição fecal e facilitar o desenvolvimento de estratégias na mitigação da poluição microbiana (SIGLER; PASUTTI; 2006; CARLOS et al., 2012). Análises das águas residuais hospitalares mostraram que podem conter microrganismos patogênicos e até mesmo bactérias resistentes a antibióticos, se não for devidamente tratada antes da descarrega em corpos d'água, como rios, lagos e mar (RESENDE et al., 2009; FUENTEFRIA; FERREIRA; CORÇÃO, 2011). Amostras de águas de esgoto são analisadas, usando métodos convencionais e moleculares, com a finalidade de detectar microrganismos patogênicos (NASCIMENTO; VAN DER SANDER, 2007; KUMARASWAMY et al., 2014).

A biologia molecular tem instigado novas técnicas no estudo de microrganismos, possibilitando identificação de grupos filogenéticos, determinação da variação espacial e temporal de espécies, conhecimento em relação ao funcionamento e atividades das comunidades microbianas diretamente em amostras coletadas no ambiente sem a necessidade de cultivo. Nos últimos anos, as técnicas de biologia molecular estão continuamente sendo refinadas com a finalidade de serem padronizadas e tornarem aplicáveis a uma diversidade de matrizes, aumentando sua sensibilidade, e reduzindo o tempo e os passos necessários no processo analítico (GIRONES et al., 2010).

Métodos moleculares são utilizados no auxilio de rastreamento e controle de agentes patogênicos em sua origem no ambiente (MOHAPATRA; BROERSMA; MAZUMDER, 2007), na avaliação da qualidade microbiológica de alimentos (GARCIA et al., 2008) e água (CUNHA et al., 2008; GOTO; YAN, 2011); na averiguação da eficiência de remoção de microrganismos, tanto das estações de tratamento de água de consumo (HUANG et al., 2012; MAHEUX et al., 2014) como no tratamento de águas residuais (KORZENIEWSKA; HARNISZ, 2012; KUMARASWAMY et al., 2014).

1.2 BACIA DO RIO CUIABÁ

A Bacia do Rio Cuiabá tem ocupação predominantemente urbana com 91% dos habitantes residindo em cidades. No Médio Cuiabá a população urbana ainda é mais significativa, representando 96% do contingente instalado naquele compartimento. Destaca-se que a maior expressão está relacionada às populações urbanas das cidades de Cuiabá e Várzea Grande, juntas representando 90% do total de habitantes. O Alto Cuiabá, onde estão inseridos os municípios de Planalto da Serra, Nova Brasilândia e Chapada dos Guimarães, possui uma equidade entre população rural e urbana, mas o total é pouco representativo (BARRETO, 2013).

A Baixada Cuiabana abrange os municípios de Cuiabá, Várzea Grande, Nossa Senhora do Livramento e Santo Antônio do Leverger, compreendendo uma área de depressão que fica entre as partes mais altas do planalto e o início da planície inundável (LIMA, E. 2001)

No trecho até a Estação do Porto, área de estudo, os principais afluentes do rio Cuiabá pela margem direita são: Rio Cuiabá da Larga, Córrego Cuiabazinho, Ribeirão Salobro, Rio

Quebó Grande, Rio Quebozinho, Ribeirão Chiqueirão, Ribeirão Grande, Rio Jangada, Ribeirão Espinheiro, Rio Pari; pela margem esquerda são: Rio Cuiabá do Bonito, Ribeirão Água Fina, Córrego São José, Ribeirão Marzagão, Rio Manso, Rio Roncador, Ribeirão Caiana, Rio Taquara, Rio Machado, Rio Bandeira e Ribeirão do Lipa (BARRETO, 2013).

De acordo com Lima (2001), as cidades de Cuiabá e Várzea Grande apresentaram uma urbanização intensa, resultando em perdas da vegetação e das matas ciliares ao longo do Rio Cuiabá e seus principais tributários. À montante da seção de coleta estão localizadas pequenas chácaras, com criações de porcos e animais silvestres e ainda com áreas destinadas à plantação de hortaliças que utilizam adubos e outros tipos de fertilizantes. Barreto (2013) afirma que existem empreendimentos de piscicultura além de uma indústria de bebidas. Lima, Z. (2009) comenta que a comunidade Passagem da Conceição situada na margem direita do Rio Cuiabá no município de Várzea Grande, distando 10 km a montante da área central é comum atividades agrícolas, pastoris, de lazer, mineração e também lançamentos pontuais de resíduos líquidos.

No Rio Cuiabá muitas cargas poluidoras são dispostas advindas principalmente de esgoto doméstico e a preocupação, tanto para a saúde pública como a ambiental, tem gerado vários estudos. Barreto (2013) realizou um levantamento qualitativo e quantitativo da água do Rio Cuiabá no Posto Hidrométrico do Porto, este localizado entre os municípios de Cuiabá e Várzea Grande no Estado de Mato Grosso Esse trabalho é continuidade com caracterização gênica das *E. coli* isoladas das águas em um trecho no perímetro urbano de Cuiabá-MT.

1.3 Escherichia coli

A espécie *E. coli* foi descrita pela primeira vez em 1885 por Theodor Escherich, um pediatra alemão, que mencionou a alta prevalência dessa bactéria na microbiota normal de indivíduos saudáveis, bem como o seu potencial de causar doenças quando presente em ambientes intestinais e extraintestinais (KUHNERT; BOERLIN; FREY, 2000; ROBINS-BROWNE; HARTLAND, 2002). Essa bactéria é de grande importância, pois está diretamente relacionada a doenças de veiculação hídrica e por ser a espécie de maior abundância em seu habitat natural que é o trato intestinal dos seres humanos e de outros animais de sangue quente

(DONNENBERG; WHITTAM, 2001; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; LIMA, 2009; MASTERS et al., 2011).

Da família *Enterobacteriaceae,* o gênero *Escherichia* é representado por sete espécies: *Escherichia adecarboxylata, Escherichia albertii, Escherichia blattae, Escherichia coli, Escherichia fergusonii, Escherichia hermanii, Escherichia marmotae* e *Escherichia vulneris* (CAMPOS E TRABULSI, 1999; HUYS et al., 2003; SOUZA, 2006, LIU et al., 2015).

Escherichia coli são bactérias que se apresentam sob a forma de bastonetes retos de 1,1 a 1,5 µm de diâmetro x 2,0 a 6,0 µm de comprimento, podem viver isoladas ou aos pares e possuem flagelo peritríquio (VIEIRA, 2004; GODINHO et al., 2010). Essas bactérias são Gram-negativas e não esporogênicas, São oxidase-negativa, capazes de fermentar glicose e outros carboidratos com a produção de piruvato que em seguida é transformado em ácidos láctico, acético e fórmico, sendo que as *E. coli* aeróbias transformam o acido fórmico em dióxido de carbono (CO_2) e hidrogênio (H_2). A maioria das cepas de *E. coli* fermentam a lactose e algumas delas são causadoras de doenças intestinais e extraintestinais (CAMPOS; TRABULSI, 1999; VIEIRA, 2004; MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004; CABRAL, 2010).

Por outro lado, sobreviver em uma variedade de ambientes naturais, solo, areia, sedimentos, águas, é a capacidade que possui a *E. coli* (GOTO; YAN, 2011) por meio de sua versatilidade em adquirir energia, requerendo, simplesmente, fontes de carbono, nitrogênio, além de fósforo, enxofre e pequenas quantidades de outros elementos (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). Essa bactéria pode ainda crescer, tanto em condições aeróbias como anaeróbias, e em uma variedade de flutuações ambientais, tais como, temperatura e umidade, promovendo assim, o caráter de melhor indicador e da exclusividade fecal (ISHII; SADOWSKI, 2008).

A maioria das estirpes dessa espécie é simbionte e inofensiva, porém há várias linhagens de *E. coli* que podem causar uma variedade de doenças em animais e seres humanos (DONNENBERG; WHITTAM, 2001). Os reservatórios mais comuns das bactérias *E. coli* patogênicas são os ruminantes, suínos, cabras, cães, gatos e seres humanos (NATARO; KAPER, 1998; ORSI et al., 2007a).

Nenhuma outra espécie bacteriana é tão versátil em sua patogenicidade como a *E. coli* (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004). Ela é a bactéria mais estudada na microbiologia tanto bioquímica, como geneticamente, e os estudos atuais ainda continuam sendo importantes,

como exemplo, a produção em larga escala de proteínas recombinantes (DONNENBERG; WHITTAM, 2001; GODINHO, 2010).

A variedade genética entre as estirpes é muito grande (KUHNERT; BOERLIN; FREY, 2000). Uma determinada linhagem de *E. coli* pode possuir milhares de genes que estão ausentes em outras linhagens (ISHII; SADOWSKI, 2008), e duas linhagens pode ter somente 50% de genes em comum (ALBERTS et al., 2010), mas um único gene é insuficiente para converter *E. coli* comensais em *E. coli* patogênica (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Mesmo contendo genes comuns a todas as estirpes, existem sequências de DNA que estão em apenas determinadas estirpes, e a versatilidade do genoma de E. *coli* é atribuída principalmente pelos plasmídeos de virulência e ilhas genômicas ou ilhas de patogenicidade de localização cromossomal. Estes contêm sequências que contribuem para a virulência da *E. coli* (DONNENBERG; WHITAM, 2001; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

1.3.1 Classificação de *Escherichia coli*

As *E. coli* patogênicas, com base nos fatores de virulência e sintomas clínicos, são classificadas como *E. coli* patogênica intestinal (InPEC) e extraintestinal (ExPEC). As cepas InPEC causam diarréias leves e graves em adultos e crianças e são denominadas conforme a patogenicidade: *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC), *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) , *Escherichia coli* difusamente aderente (DAEC) e *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) causadora de diarréia aquosa inicial que pode progredir em colite hemorrágica e pode provocar anemia, trombocitopenia e insuficiência renal aguda potencialmente perigosa (PUPO et al., 1997; TRABULSI; ALTERTHUM, 2004; HAMELIN et al., 2007).

As cepas que causam doenças extraintestinais (ExPEC) são: *Escherichia coli* uropatogênica (UPEC) que causam infecções do trato urinário (ITU) principalmente em mulheres, e *Escherichia coli* meningite associada (MNEC) que causa meningite neonatal e septicemia (NATARO; KAPER, 1998; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). Orsi et al. (2008), além classificação citada, também considera a EHEC como uma linhagem que causa enfermidades extra-intestinais.

Outra classificação de *E. coli* em grupos que têm um modo semelhante de patogenia e causam formas clinicamente similares de doença são os 4 grupos filogenéticos denominados de grupos A, B1, B2 e D (SELANDER et al., 1986; HERZER et al., 1990; ORSI et al., 2007a, 2008). Comumente, as cepas comensais são colocados nos grupos filogenéticos A e B1 e a cepas ExPEC no grupo B2 e, em menor extensão, o grupo D. As cepas InPEC são geralmente atribuídas aos grupos A, B1 e D (PUPO et al., 1997; ORSI et al., 2007a).

Os subgrupos A_0, A_1, B1, $B2_2$, $B2_3$, D_1 e D_2 da *E. coli* foram propostos por Escobar-Páramo et al. (2004) que utilizaram as combinações dos marcadores genéticos para que o poder discriminativo das análises pudesse ser melhorado quando a amostra fosse composta por vários isolados (STOPPE et al., 2014).

Para um conhecimento amplo da contaminação que afeta os diversos usos da água, principalmente aquele que requer maior índice de qualidade que é o abastecimento doméstico, há uma necessidade de monitoramento das populações de *E. coli* no seu habitat secundário, bem como novos métodos para identificação das fontes de poluição bacteriana (SIGLER; PASUTTI, 2006). Somando a outros microrganismos patogênicos lançados pelos efluentes, as doenças causadas pela bactéria *E. coli* tem refletido diretamente no nível de saúde tanto dos seres humanos como dos animais. Com isso, a tecnologia na área de pesquisa biológica evoluiu gerando novos estudos e métodos moleculares mais aprofundados, que associados ao ambiente têm contribuído para uma melhor compreensão da diversidade microbiana.

1.4 DIVERSIDADE MICROBIANA

Os microrganismos possuem uma diversidade extraordinária de estrutura e modos de vida. Podem ser procariontes (bactérias) ou eucariontes (protozoários, algas e fungos), aeróbicos ou anaeróbicos, e são encontrados em todos os ambientes terrestres, marinhos e no ar (MALAJOVICH 2012).

Rauch e Bar-Yam (2004) comentam que a diversidade dentro de espécies também é distribuída de forma desigual. Concentra em subpopulações pequenas e bem misturadas, devido à distinção genética que possui uma escala livre na lei de distribuição de energia. A diversidade genética dentro de uma espécie é conservada pelo fator importante de sobrevivência em decorrência de mudanças ambientais e doença. Portanto, a necessidade de

conhecer a diversidade microbiana é fundamental para o entendimento da relação entre os parâmetros ambientais e o funcionamento dos ecossistemas.

Considerando a importância da bactéria *E. coli* e sua diversidade patogênica, na quantificação para a avaliação da qualidade da água, é necessário que os resultados sejam rápidos. No entanto, os métodos convencionais, tais como a cultura com enriquecimento e testes bioquímicos, usados para quantificar *E. coli* pode exigir 18-96 horas para obtenção dos resultados. Além, da variação rápida das *E. coli* em curto período de tempo no ambiente, os métodos convencionais não conseguem quantificar microrganismos que estão deteriorados, ou que tenham entrado em estado viável, mas não cultivável (VBNC), principalmente devido a estresse (ROSADO; DUARTE, 2002; KHAN et al., 2007; LIU et al., 2008).

Há uma tendência de adoção de novas técnicas nas pesquisas em microbiologia ambiental para se avaliar a presença de microrganismos patogênicos em diversos ambientes, tornando essas ferramentas importantes para a detecção mais rápida e precisa de espécies bacterianas (KHAN et al., 2007). Além disso, o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular tem contribuído para o aperfeiçoamento das análises, frente à necessidade de conhecer melhor os mecanismos de remoção dos microrganismos patogênicos, particularmente as bactérias, visto serem estes agentes de enfermidades (GODINHO et al., 2010).

1.4.1 RNA Ribossômico 16S

Com o desenvolvimento das técnicas em biologia molecular foi possível responder questões sobre a real diversidade dos microrganismos para análise da comunidade microbiana em diversas amostras. Um método de identificação bacteriana foi desenvolvido com os estudos da década de 1980 sobre os genes ribossomais utilizando regiões codificantes como 5S, 16S e 23S rRNA (CLARRIDGE, 2004; KORZENIEWSKA; HARNISZ, 2012).

As técnicas moleculares desenvolvidas se baseiam na aplicação de biomarcadores, que são moléculas que possuem regiões altamente conservadas entre os diferentes organismos e outras regiões variáveis, específicas para grupos ou indivíduos. A sequência de 16S rRNA é considerada a “impressão digital” de um organismo, por ser parte integrante do ribossomo e responsável pela síntese de proteínas que está presente em todas as células. O RNAr 16S

apresenta 1.542 bases, sendo 568 posições conservadas e 974 posições variáveis. O gene 16S rRNA também é designado 16S rDNA (CLARRIDGE, 2004; GODINHO, 2010).

Nas décadas de 70 e 80 já havia estudos para melhor entender o papel funcional do 16S rRNA (BROSIUS et al., 1978; LANE et al., 1985). A comparação das sequências de rRNA é uma ferramenta poderosa para deduzir relações filogenéticas e evolutivas entre as bactérias (WEISBURG et al, 1991).

Nos últimos anos essa ferramenta tem sido muito utilizada em pesquisa onde há necessidade de detectar microrganismos em águas superficiais para avaliar a abundância microbiana e a diversidade de bactérias (LIMA, 2009), para a detecção de coliformes totais em água de poços para consumo (MAHEUX et al., 2014), para verificar se o tratamento de águas residuais está eficiente (ANASTASI et al., 2012; KUMARASWAMY et al., 2014), e se os efluentes hospitalares e domésticos carregam bactérias patogênicas (KORZENIEWSKA; HARNISZ, 2012). A determinação das fontes de poluição fecal nas águas ambientais, que associa determinados microrganismos fecais com hospedeiro correspondente, utiliza também regiões do gene de 16S rRNA como instrumento para sua investigação(HARWOOD et al., 2014).

1.4.2 Técnicas de Análise de DNA

Para conhecer regiões codificantes existem diversas técnicas para extração de DNA a partir de amostras ambientais, entretanto, nenhum método é universalmente aplicável, já que cada tipo de amostra, devido à sua própria natureza, requer a otimização de um método próprio (ZHOU; BRUNS; TIEDJE, 1996; KUHNERT; BOERLIN; FREY, 2000; HARWOOD et al., 2014).

A extração de DNA puro, de boa qualidade, é pré-requisito para qualquer análise molecular. Para o isolamento do DNA genômico bacteriano existem vários métodos disponíveis, sendo estes: Extração Orgânica que consiste na separação do DNA da célula a partir da lise celular com SDS (dodecil sulfato de sódio); a Extração com Fenol-clorofórmio, que separa DNA e proteínas, seguida de precipitação com álcool; e Extração Térmica, em que a solução contendo as células bacterianas é submetida a choques térmicos para a lise celular e liberação do material genético.

Há várias técnicas para a análise do DNA extraído de microrganismos, algumas delas são: PFGE - eletroforese em gel de campo pulsado, FISH - Hibridação fluorescente *in situ*, RFLP - Fragmento de Restrição de Polimorfismo, DGGE - Electroforese em Gel de Gradiente Desnaturante, DNA Microarray e PCR - Reação de Polimerização em Cadeia (CASAREZ et al, 2007; GODINHO, 2010; MACEDO; LOPES; DAMALO, 2011).

Essas técnicas têm permitido a detecção de microrganismos que envolvem a saúde pública. A detecção específica e quantificação de agentes patogênicos bacterianos apresentam várias vantagens sobre os métodos convencionais: elevada sensibilidade e especificidade, velocidade, facilidade de automatização e de normalização (GIRONES et al., 2010).

A característica genotípica de um microrganismo é um componente específico do genoma que pode ser detectado por sonda ou amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (BROWNELL, 2006; LIU et al., 2008).

1.4.3 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

Com o desenvolvimento de tecnologias moleculares o monitoramento direto de patógenos tem desfrutado de uma aplicação mais ampla. A técnica da PCR (Reação de Polimerização em Cadeia) que foi desenvolvida por Mullis em 1985, tem oferecido um nível de complexidade nas pesquisas em engenharia genética e biologia molecular (MACEDO; LOPES; DAMALO, 2011).

PCR é uma técnica que se baseia na amplificação exponencial seletiva, utilizando a enzima polimerase termoestável, de uma quantidade reduzida de DNA de uma única célula (TOZE, 1999). Devido à rapidez, especificidade, sensibilidade, precisão e a capacidade para detectar pequenas quantidades de ácido nucléico em uma amostra, a técnica da PCR é uma das ferramentas moleculares mais utilizadas para análise da diversidade microbiana em diversas amostras cultivadas ou amostras retiradas diretamente do ambiente (solo, sedimento e água) e no estudo dos diversos grupos de microrganismos patogênicos (TOZE, 1999; GIRONES et al., 2010).

A técnica PCR consiste em três fases: desnaturação do DNA molde (a 95ºC), ligação dos iniciadores (a 54ºC) e polimerização do DNA (a 72ºC). Neste processo, o fragmento de DNA de interesse é replicado várias vezes pela enzima DNA polimerase que copia o DNA da

fita molde. A partir de um iniciador, um pequeno segmento de DNA, cujas bases pareiam com as da fita molde, funcionando como um "iniciador" para as cópias de DNA a serem reproduzidas. Geralmente a temperatura de anelamento varia entre 45-60°C, dependendo do iniciador específico, pois uma temperatura errada durante essa etapa pode resultar dos iniciadores não se ligarem ao DNA molde como um todo ou ligarem de forma aleatória. A enzima responsável por esta polimerização é a "DNA polimerase termoestável" (Taq), que foi isolada a partir da bactéria termofílica *Thermus aquaticus* habitante de locais com elevadas temperaturas. É essencial que a enzima usada seja estável ao calor, uma vez que os ciclos da PCR atingem temperaturas entre 64ºC e 95ºC. Para executar este ciclo usa-se um termociclador, que faz variar de forma rigorosa o tempo e a temperatura ao longo do processo. Normalmente são repetidos cerca de 30 ciclos dependendo do primer utilizado e do objetivo a ser alcançado, este ciclo demora apenas algumas horas (TOZE, 1999; EMBRAPA, 2007; MACEDO; LOPES; DAMALO, 2011; RAHMAN et al., 2013).

Existem variações da PCR utilizadas na análise da diversidade genética de microrganismos. Essas variações se baseiam em sequências repetitivas utilizadas na escolha de oligonucleotídeos e de três famílias de elementos repetitivos que têm sido largamente usadas para este tipo de análise. Sendo elas: REP (Sequência de elemento Repetitivo Extragênico palíndromo), de 30-40 pb (pares de base); ERIC (Enterobacteriano repetitivo em sequência de consenso intergênico), de 124-127 pb e o elemento BOX de 154 pb (RADEMAKER; LOUWS; de BRUIJN, 1998).

Os elementos de BOX foram originalmente descobertos em *Streptococcus pneumoniae* consistindo em três regiões: *boxA, boxB, e boxC*, que são 59, 45, e 50 pares de bases de comprimento, respectivamente (LEE e WONG, 2009). A reação BOX-PCR utiliza iniciadores com sequências repetitivas altamente conservadas, caracteriza genótipos por meio de sequência intergênica repetitiva, permite analisar um número significativo de indivíduos de uma comunidade, produz perfis genotípicos definidos e gera padrões de banda complexos e reforçados (de BRUIJN, 1992; RADEMAKER; LOUWS; de BRUIJN, 1998; LIMA, 2009).

Uma outra variação da PCR, conhecida como nested PCR (nPCR), usa dois conjuntos de oligonucleotídeos iniciadores em reações subsequentes, cujo produto de amplificação da primeira reação é utilizado como molde para a segunda. A nPCR reduz as contaminações em produtos devido à amplificação de locais de ligação de iniciadores inesperados. Dois

conjuntos de iniciadores são utilizados em duas corridas sucessivas de PCR, o segundo conjunto destina-se a amplificar um alvo secundário dentro do primeiro produto de execução. Isto é bem sucedida, mas requer um conhecimento mais profundo das sequências envolvidas (RAHMAN et al., 2013).

As técnicas de PCR, usando sondas e iniciadores específicos, com um alto nível de sensibilidade e especificidade, são ferramentas econômicas e rápidas que geram informações significativas sobre a presença, quantidade e distribuição de patógenos em água e alimentos (GIRONES et al., 2010).

A técnica da PCR triplex simples e rápida, baseada em uma combinação de três *loci* (*Chua, yjaA, e TspE4.C2*), foi desenvolvida por Clermont, Bonacorsi e Bingen (2000), possibilitou formar agrupamento filogenético de *E. coli*. Devido à sua simplicidade e rapidez, essa técnica tem sido amplamente utilizada na diferenciação de comunidades ecológicas (ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2004, 2006; CARLOS et al., 2010), na propensão para causar doenças (ORSI et al., 2007a), e no rastreamento de origem fecal (ORSI et al., 2007b, 2008; HARWOOD et al., 2014).

A variabilidade genética entre as estirpes de *E. coli* associadas com a determinação do grupo filogenético e o potencial de patogenicidade das estirpes foram avaliados, por Orsi et al. (2007b), em dois reservatórios responsáveis pelo abastecimento de água potável e de uso recreativo. Por meio das técnicas de BOX-, ERIC- e REP-PCR, os autores, averiguaram que as cepas isoladas dos dois reservatórios foram derivadas de populações distintas e que possuíam um elevado grau de variabilidade genética.

A PCR pode ser utilizada para a avaliação e distribuição de grupos filogenéticos em águas de rios. Orsi et al. (2008) avaliaram amostras de água de dois rios e encontraram grupos filogenéticos de *E. coli* associados a sorotipos patogênicos em ambos. Já a abundância e diversidade microbiana de um rio em seu perímetro urbano foram avaliadas por Lima (2009) por meio de uma abordagem polifásica que possibilitou testar indicadores para as diferentes fontes poluidoras. O autor utilizou a técnica BOX-PCR e detectou diferença entre a diversidade de Eubactérias e maiores índices de diversidade observados entre as bactérias heterotróficas Gram positivas e esporogênicas.

Godinho (2010) investigou a ocorrência de bactérias patogênicas em um sistema de tratamento de esgotos, utilizando a técnica da PCR e o resultado encontrado para *E. coli* em reações da PCR foi de 83,3% nos três pontos analisados. Carlos et al. (2012) ao analisarem

cepas de *Escherichia coli* de três reservatórios, dois rios e uma estação de tratamento de esgoto, utilizando a técnica de BOX-PCR, verificaram que estes sistemas de água continham fontes mistas de contaminação fecal e 95% das estirpes de *E. coli* presentes no esgoto foram de seres humanos.

Genes de virulência conhecidos (VGs) associados com cepas de *Escherichia coli* InPEC e ExPEC foram comparados em amostras de água de três estuários, quatro rios e treze riachos por Masters et al (2011) com a finalidade de indicar a qualidade da água. Os autores analisaram as amostras por meio PCR Multiplex e concluíram que alguns VGs eram específicos para a estação chuvosa e alguns foram específicos para os tipos de água sugerindo sua associação com contaminação fecal localizada.

Na literatura, além dos trabalhos citados, encontram-se vários outros estudos relacionados com *E. coli* utilizando métodos moleculares. A técnica da PCR é a principal ferramenta utilizada, com oligonucleotídeos específicos, para detectar, avaliar e monitorar patogenicidade de *E. coli* na averiguação da qualidade microbiológica dos ambientes aquáticos (DOMBEK et al., 2000; BORGES;VECHIA; CORÇÃO, 2003; McLELLAN, 2004; BROWNELL, 2006; LIU et al., 2008; GOTO; YAN, 2011; OLIVEIRA et al., 2012; ANASTASI et al., 2012; KUMARASWAMY et al., 2014).

2 MATERIAL E MÉTODOS

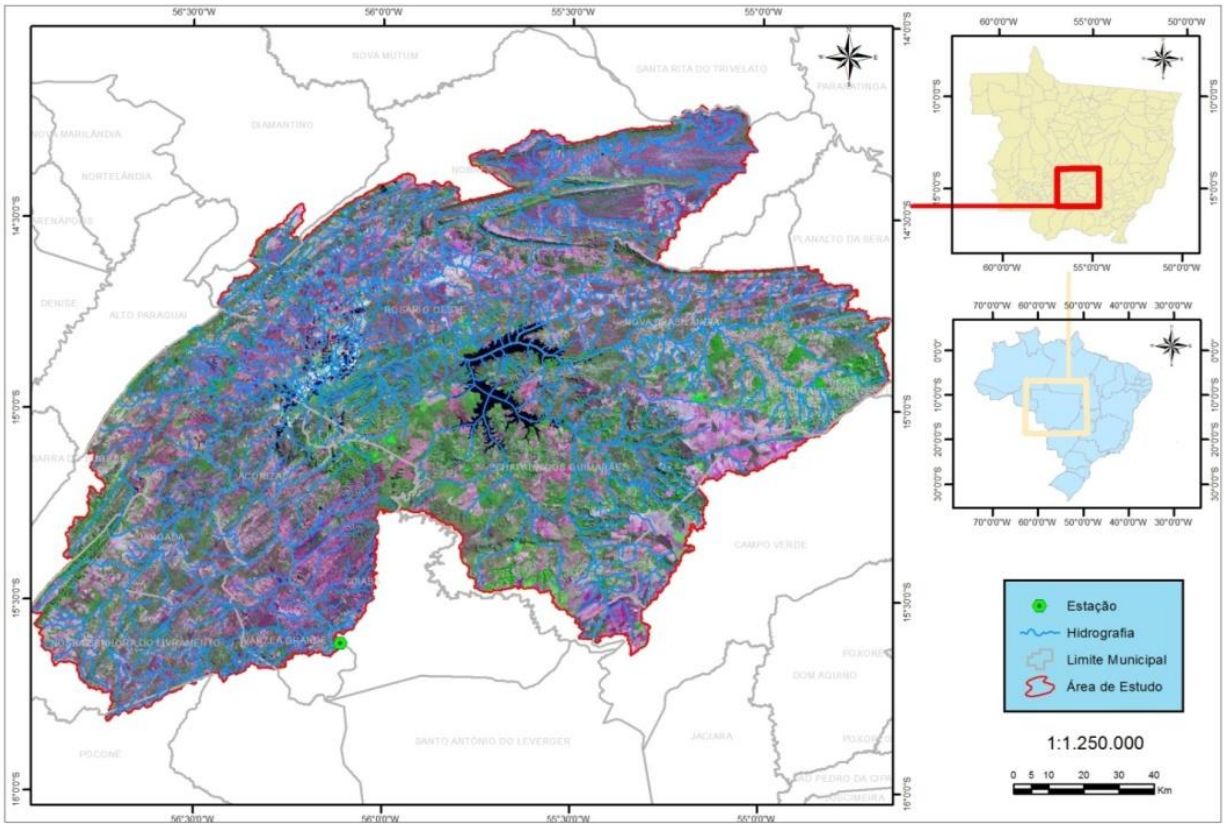
2.1 LOCALIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

Este estudo foi realizado em uma área entre os municípios de Cuiabá e Várzea Grande no Estado de Mato Grosso.

A área da Bacia do Rio Cuiabá que contribui para a seção de estudo (FIGURA 1) está situada entre os paralelos 14°12’ e 15°70’S e os meridianos 54°40’ e 56°56’W que se localiza ao norte dessa Bacia e tem seu exutório limitado pela seção de medição da Estação Fluviométrica do Porto, entre os municípios de Cuiabá e Várzea Grande.

As nascentes do Rio Cuiabá (Alto Cuiabá) localizam-se na Serra Azul que faz parte da Província Serrana, com altitudes que atingem 500 m chegando a 130 m no local de seção do estudo, comportando-se neste trecho como um rio de planalto, extremamente controlado pela estrutura geológica, resultando no aparecimento de diversas corredeiras. O trecho Médio Cuiabá está inserido na “Depressão Cuiabana”, com solos Litólicos com a cobertura vegetal predominante de Cerrado, com mata de galeria (BARRETO, 2013).

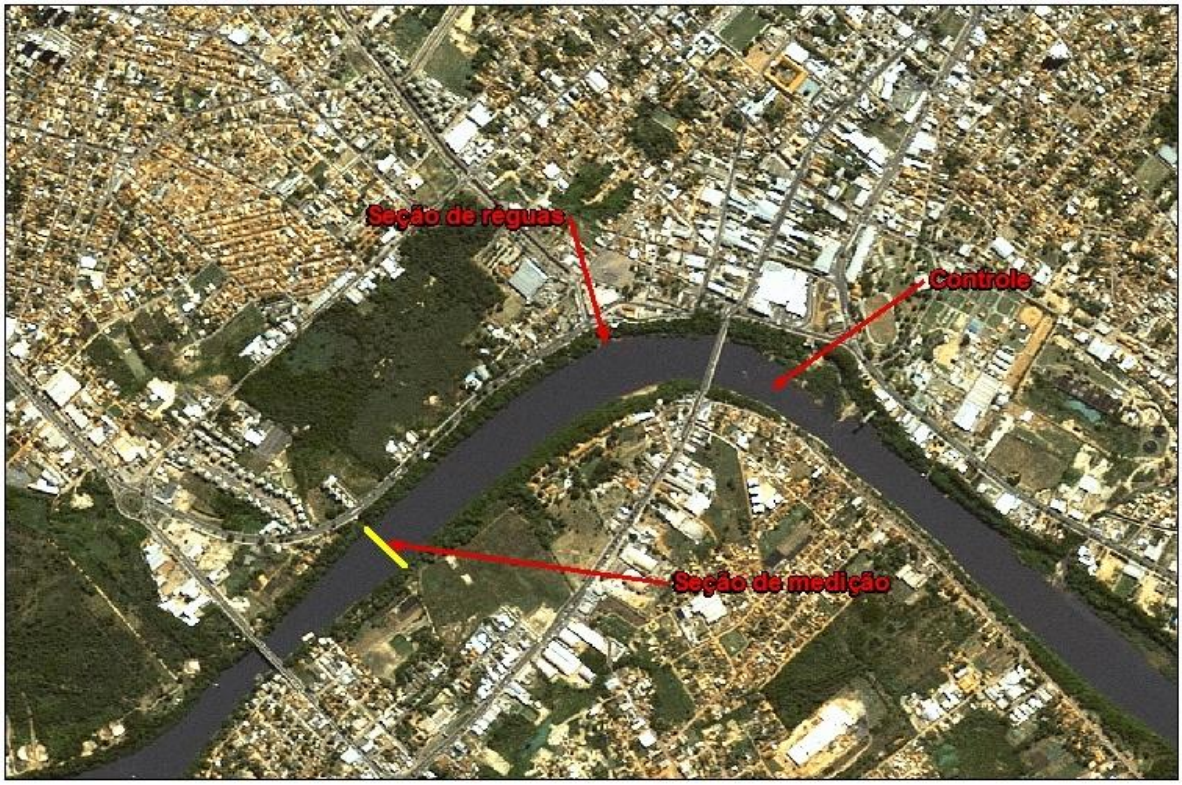
Figura 1 - Localização da área de estudo do presente trabalho (BARRETO, 2013).



2.2 PONTOS DE COLETA E METODOLOGIA DE AMOSTRAGEM

Todas as coletas de água foram realizadas no posto fluviométrico do Porto, no Rio Cuiabá, localizado no município de Cuiabá-MT, sob as coordenadas geográficas 15° 36’ 56” S e 56° 06’ 31” W (FIGURA 2).

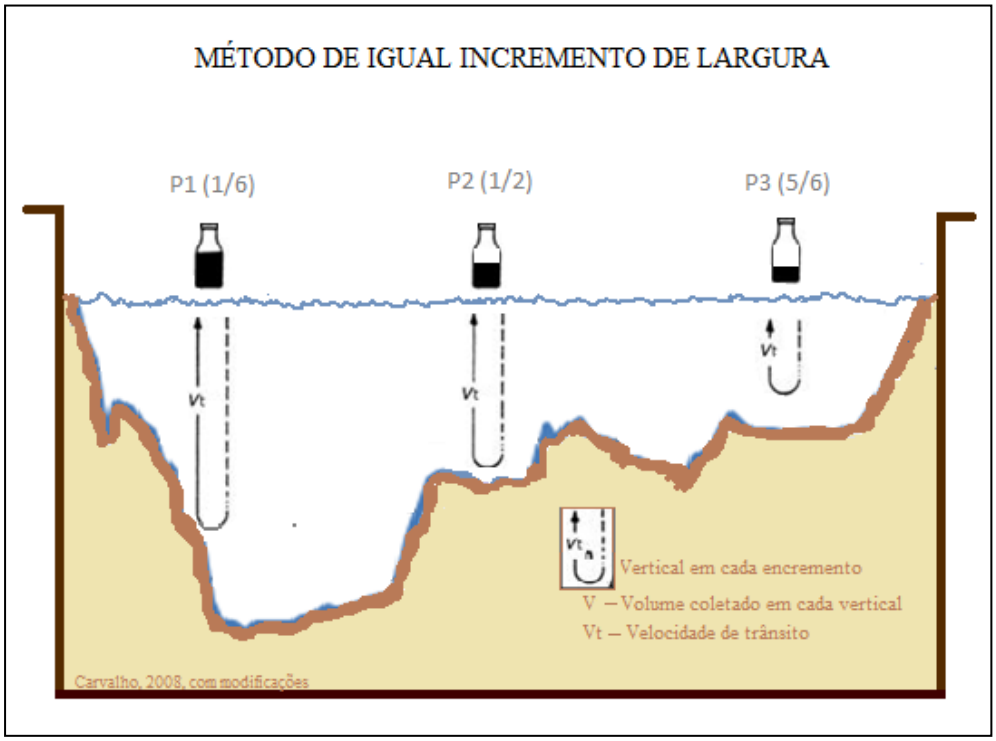
Figura 2 - Estação Hidrométrica do Porto em Cuiabá/MT, Imagem Spot 2010 (SEMA/MT).



A Estação do Porto é um trecho retilíneo ou levemente sinuoso, com boa estabilidade das margens, possui talvegue único e regular, controle de escoamento natural, possui curva a montante e a jusante do estirão de medição e é um local adequado para medições de nível de água, vazão e descarga sólida. A seção de medição da área de estudo possui boa estabilidade das margens com presença de pedras e seu leito é relativamente estável. O local apresentou boas condições para realizar as medições e encontra-se aproximadamente a 720 m a montante da seção de réguas e 1300 m a montante do controle da seção (BARRETO, 2013).

As coletas de amostras de água foram feitas em três pontos da seção transversal do rio, a 1/6 (P1-margem esquerda), 1/2 (P2-Canal principal) e 5/6 (P3-margem direita) da largura total do rio na seção e utilizou-se o Método de Igual Incremento de Largura (IIL), Figura 3 (CARVALHO, 2008). A coleta de amostras foi realizada com o amostrador integrador USDH-59, no qual foi acoplada uma garrafa de vidro (500 mL) onde a amostra entra lentamente, durante a descida e subida do amostrador, em toda vertical amostrada, sendo P1com velocidade de 0,52 m/s, P2 com 0,47 m/s e P3 com 0,36 m/s (BARRETO, 2013).

Figura 3 - Método de Igual Incremento de Largura (IIL, CARVALHO, 2008), volume de amostra proporcional à vazão na vertical. Vt – volume de trânsito em cada incremento (igual). V – volume coletado em cada vertical



2.3 PERÍODO AMOSTRAL

As coletas foram realizadas em três campanhas amostrais na estiagem no período de agosto/2012, setembro/2012 e outubro/2012 e três campanhas na época de chuva no período de dezembro/2012, janeiro/2013 e fevereiro/2013.

2.4 CULTIVO E ISOLAMENTO DAS CULTURAS DE *Escherichia coli*

As análises da água foram realizadas no Laboratório do Departamento Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA/UFMT).

As culturas positivas de *E. coli* utilizadas foram provenientes da análise de colimetria pelo técnica de substrato cromogênico-fluorogênico (Colilert IDEXX®), confirmadas com luz ultravioleta de comprimento de onda 366 nm, produzindo intensa fluorescência azul na cartela aluminizada.

Escolheu-se, aleatoriamente, 20% dos poços positivos destas cartelas de culturas de *E.coli* com diluição entre 10^0 e 10^{-1}. Alíquotas de 100 μL das culturas foram cultivadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura Caldo Nutriente (MERCK®) e foram incubadas por 24h em estufa com temperatura de 35ºC. Após o cultivo das cepas, alíquotas de 1 mL foram transferidas para microtubos (2 mL) e acrescidas 1 mL de glicerina 80% para congelamento a temperatura de -20°C e submissão a extração de DNA.

2.5 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS CONVENCIONAIS

As cepas de *E. coli* foram ativadas, a partir dos microtubos conservados anteriormente em temperatura adequada, em tubo de ensaio contendo 3 mL de caldo TSB (Tryptone Soya Broth, HIMEDIA®) com fungicida Cycloheximide O 1810-1G (SIGMA-ALDRICH®) e incubadas em estufa de cultura a 35°C (APHA, 2012) por 24h.

As cepas que apresentaram crescimento foram plaqueadas em meio de cultura Agar MacConkey M081 (HIMEDIA®) com fungicida Cycloheximide O 1810-1G (SIGMA-ALDRICH®), utilizando a técnica de esgotamento em estrias e incubadas a 35°C. Em 24h, o crescimento das colônias nas placas foi observado macroscopicamente.

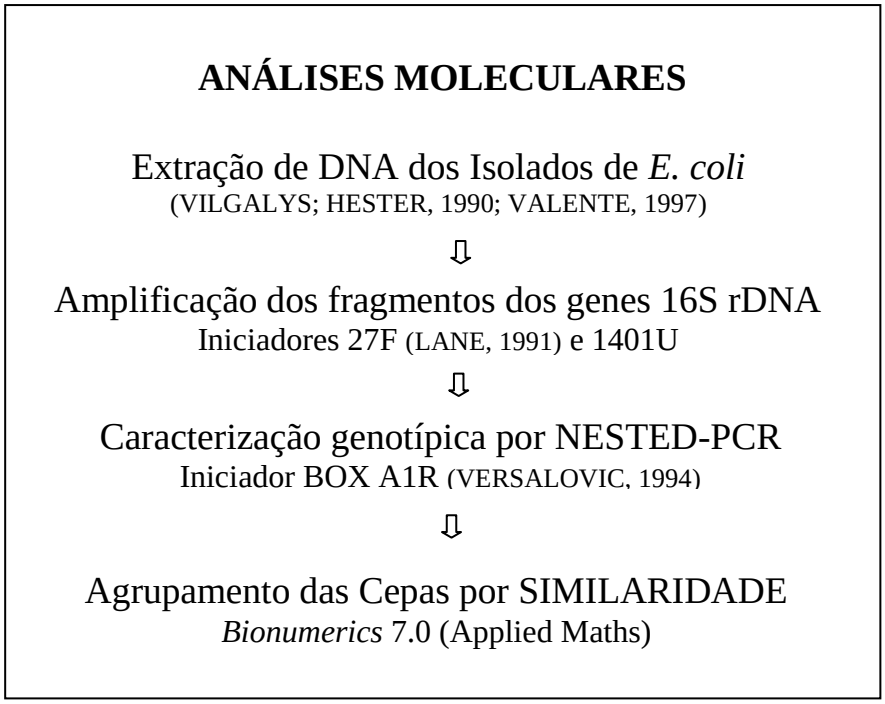
Em seguida, para análises das características morfotintoriais foi feita coloração de Gram. Os esfregaços foram observadas em microscópio óptico e objetiva de 100X (Mod.CX40RF100, Olympus Optical) para confirmação da pureza da cultura bacteriana e características da forma e parede celular.

Após confirmação da pureza das cepas foi retirada de cada placa, com auxílio da alça de platina, uma colônia e semeada em tubo de ensaio contendo 3 mL de Caldo EC ((HIMEDIA®) com Nistatina (0,1 g por 0,5 L). Seguida de incubação à temperatura de 35°C para posterior extração de DNA.

2.6 ANÁLISES MOLECULARES

Para a caracterização gênica das cepas de *Escherichia coli*, foram realizadas etapas de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 4.

Figura 4 - Representação esquemática da metodologia das análises microbiológicas moleculares.



2.6.1 Extração de DNA dos isolados de *E. coli*

O DNA das cepas de *E. coli*, deste trabalho, foi extraído com o protocolo do fenol-cloroformio-álcool iso-amílico (VALENTE 1997, modificado de VILGALYS; HESTER, 1990).

As culturas bacterianas foram transferidas para microtubos com capacidade de 2 mL e concentradas por centrifugação (10.000 rpm, 5ºC por 15 minutos) e o sobrenadante descartado. O concentrado de células foi ressuspenso em 1,0 mL de água ultra pura estéril para lavagem do material novamente centrifugado nas condições anteriormente citadas. Depois de descartar o sobrenadante adicionou-se 500 µL de tampão de extração (tampão fosfato de sódio-120 mM), logo em seguida, foram colocados no FastPrep®-24 (MP BIOMEDICALS) com speed 5 a 30 segundos. Esse material foi colocado em banho-maria a 65 °C por 60 minutos para lise completa das células.

Decorrido o tempo acrescentou-se 500 µL da soluçãode fenol-cloroformio-álcool iso-amílico (25:24:1) e após agitação foi feita centrifugação (12.000 rpm, 5ºC por 3 minutos).

Coletou-se 400 μL do sobrenadante para outros microtubos. O DNA foi precipitado com 400 μL de álcool isopropílico e posteriormente centrifugado (15.000 rpm, 5ºC por 10 minutos).

O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 50 μL de Etanol 70%, agitado e centrifugado (14.000 rpm, 5ºC por 10 minutos). A secagem do Etanol foi feita em estufa de secagem (80ºC) e o DNA foi ressuspenso em 50 μL de água ultra pura estéril (VALENTE 1997, modificado de VILGALYS; HESTER, 1990).

A eficiência de todas as extrações foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% e Solução tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5 X. Em cada *slot* aplicou-se 5 μL de cada DNA extraído juntamente com 0,5 μL de tampão de corrida (*gel loading buffer* - Invitrogen®), sendo a corrida de 80 V, 100 mA em 45 minutos. Após o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 μg/mL) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) por 15 minutos e colocado em água destilada para diluição do brometo. O gel foi visualizado em transluminador UV (254 nm) e fotografado usando o sistema de foto documentação L-PIX HE (Loccus®).

2.6.2 Amplificação dos fragmentos dos genes 16S rDNA

Amplificação dos fragmentos dos genes 16S rDNA foi determinada após vários testes com os isolados de *E. coli* utilizando a técnica BOX-PCR, no qual não se obteve resultados satisfatórios gerando bandas incapazes de produzirem dados suficientes para a análise estatística.

Neste estudo, foram testadas várias quantidades em μL de DNA, entre 0,5 e 2,0 μL, e várias diluições (10^0 a 10^{-2}) para verificar quanto de DNA seria necessário para obtenção de um melhor produto da PCR. Conforme a concentração de DNA aplicado na reação da PCR pode-se obter resultado não esperado, como DNA insuficiente para gerar produtos da PCR, ou alta concentração de DNA produzindo bandas inespecíficas. Os resultados dos testes apontaram para utilização de 2 μL de DNA dos isolados gerando melhor qualidade das bandas específicas sendo empregado para todos os isolados para otimização da técnica.

Os fragmentos das regiões variáveis V6 a V8 do gene 16S do rDNA, extraído das culturas bacterianas de *E. coli* isoladas em amostras de água, foram amplificados em um termociclador (T100™ Thermal Cycler, BIO RAD®) utilizando o par de iniciadores universais 27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') (LANE, 1991) e 1401U (5'-

CGGTGTGTACAAGGCCC - 3') para o domínio Bacteria. Estes iniciadores flanqueiam uma região de aproximadamente 500 bases entre os nucleotídeos 968 e 1401 do gene que codifica o 16S de *Escherichia coli* incluindo as regiões variáveis mencionadas (BROSIUS et al., 1978).

Para a preparação da técnica da PCR 16S rDNA foram utilizados 12,5 μL de GoTaq® Green Master Mix, da Promega Corporation, 2X (50 units/mL de Taq DNA Polymerase, 400μM de cada dNTP: dATP, dGTP, dCTP e dTTP, 3mM de MgCl2) de acordo com as recomendações do fabricante, 2μL de DNA e 9,5 μL de água ultra pura estéril. O volume final da reação foi de 25 μL. Em todas as reações de PCR foi testado o controle negativo.

As condições de amplificação do DNA pela reação da PCR 16S rDNA foi desenvolvida em 35 ciclos, com as seguintes etapas: 1) desnaturação inicial com 95°C em 5 minutos; 2) desnaturação com 95°C em 30s; 3) alinhamento com 55°C em 30s; 4) extensão final com 72°C em 7 minutos (VERSALOVIC et al.,1994; ORSI et al., 2007b).

Os produtos finais da PCR 16S rDNA foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e Solução tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 0,5 X por 5 horas a 45 volts. O padrão de peso molecular utilizado foi de 1Kb (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). O gel foi corado com brometo de etídio (0,5μg/mL), visualizado em transluminador UV (254 nm) e fotografado usando o sistema de foto documentação L-PIX HE (Loccus®).

2.6.3 Caracterização genotípica da *E. coli* por Nested – PCR

As estirpes selecionadas foram caracterizadas genotipicamente por meio de Nested-PCR utilizando o iniciador BOX A1R. Os produtos da amplificação dos genes 16S rDNA, das *E. coli* isoladas da água do Rio Cuiabá, foram empregados como padrão na reação Nested-PCR para melhorar a especificidade e a eficiência da reação. O segmento genômico é amplificado primeiro de forma abrangente e em seguida a amplificação da sequência-alvo (TOZE, 1999; GIRONES, 2010).

A técnica da Nested-PCR utilizou o KIT GoTaq® Green Master Mix da Promega Corporation de acordo com as recomendações do fabricante. Foram utilizados 12,5μL de GoTaq® Green Master Mix, 2X (50 units/mL de Taq DNA Polymerase, 400μM de cada dNTP: dATP, dGTP, dCTP e dTTP, 3mM de MgCl2), 1μL do produto da PCR do 16S rDNA

e 10,5 μL de água ultra pura estéril. O volume final da reação foi de 25 μL e um controle negativo foi incluído. O iniciador utilizado foi o BOXA1R (5' - CTACGGCAAGGCGACGCTGACTGACG - 3') (VERSALOVIC et al., 1994) e as condições de corrida no Termociclador (Biocycler) foram as seguintes: 1) desnaturação inicial a 94°C por 7minutos; 2) desnaturação, hibridação e extensão em 35 ciclos: 94°C por 1minutos, 53ºC por 1minuto e 65°C por 1minuto e 3) extensão final a 65ºC por 16mim.

Os produtos de amplificação da Nested-PCR foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Invitrogen®) em Solução Tampão TAE 0,5 X, 60 Volts por 5 horas. Como marcador de peso molecular foi utilizado o Ladder 100 pb (Promega®). Após a eletroforese, o gel foi corado por 20 min com brometo de etídio (0,5 μg/mL), descorado por 10 min em água (SAMBROOK et al., 1989) e observado em um transluminador UV (254nm). Todos os géis foram fotografados usando o sistema de foto documentação L-PIX HE (Loccus®).

2.7 ANÁLISES DOS DADOS

As análises dos perfis PCR visando o gene 16S rDNA foram realizadas por intermédio da análise de agrupamento e construção de dendrogramas para verificar similaridade entre os isolados de *Escherichia coli*. O aplicativo utilizado foi o *Bionumerics* 7.0 (*Applied Maths*; Licença: 135140117978559, 24/02/2014).

A partir da matriz de dissimilaridade (distância de Linkage) e posterior agrupamento pelo método da ligação média não ponderada de agrupamento aos pares (UPGMA), foi determinado o percentual de similaridade entre os isolados de cada coleta. As distâncias genéticas foram obtidas pelo complemento aritmético do coeficiente de similaridade de Jaccard (JACCARD, 1908).

O método UPGMA (Método da ligação média não ponderada de agrupamento aos pares) utiliza as médias aritméticas (não ponderadas) das medidas de dissimilaridade, o que evita caracterizar a dissimilaridade por valores extremos entre os objetos considerados. A construção dos dendrogramas é estabelecida pelos modelos ajustados de menor dissimilaridade. Como método hierárquico, agrupa os genótipos por um processo que se repete em vários níveis, do vizinho mais próximo, do vizinho mais distante, das médias

aritméticas não ponderadas, até que seja estabelecido o dendrograma. Perfis com 70% de similaridade nos dendrogramas, ponderando uma tolerância de 1% foram considerados semelhantes (WAYNE et al., 1987; STACKEBRANDT et al., 2002; LIMA, 2009; CANAL, 2010).

As imagens foram eletronicamente rearranjadas para uma melhor visualização e comparação dos perfis dos produtos resultantes da reação Nested-PCR (BOX A1R), sendo a similaridade entre as amostras determinada por matrizes binárias de presença e ausência para cada um dos pontos de análise, em função da posição que as bandas ocupavam no gel (KOZDRKOJ; Van ESLSAS, 2001).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

O crescimento obtido pelas cepas ativadas, em meio de cultura específico foi de 84,6%, sendo todas puras e Gram negativas em forma de bastonetes, característica apresentada pelas bactérias *E. coli* (VIEIRA, 2004; GODINHO et al., 2010).

O total de cepas ativadas deste trabalho foi próximo do resultado de 91,1% de ativação alcançado por Oliveira et al. (2012) que também isolou *E. coli* a partir de análise de colimetria pela técnica de substrato cromogênico-fluorogênico (Colilert IDEXX®), de águas de praias permanentes de um reservatório em Tocantins.

As cepas foram identificadas com numeração de 1 até 300, observando que o número 35 não existe. Das 299 cepas de *E. coli* isoladas durante o processo de manutenção, 46 isolados não responderam positivamente no que se refere a ativação desses microrganismos. Isso acontece, possivelmente por serem mais sensíveis e não resistirem à temperatura muito baixa, ou as células poderiam estar danificadas não sendo detectadas nos meios de culturas utilizados (GIRONES et al., 2010). As 253 cepas de *E. coli* que foram ativadas estão relacionadas na Tabela 01.

Tabela 1 - Identificação numérica das linhagens de *E. coli* isoladas e ativadas do Rio Cuiabá-MT.

Identificação Numérica das linhagens de *E. coli* Ativadas	
PONTO P1	
COLETA I	18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 31, 33, 34
COLETA II	55
COLETA III	95, 97, 101, 102, 103, 104, 105, 107, 112
COLETA IV	151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167
COLETA V	199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211,212, 213, 214, 215
COLETA VI	252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266
PONTO P2	
COLETA I	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17
COLETA II	54
COLETA III	117, 118, 121, 122, 126, 128, 129, 132
COLETA IV	168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181
COLETA V	216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232
COLETA VI	267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 281
PONTO P3	
COLETA I	36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53
COLETA II	56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 82, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 93
COLETA III	133, 134, 135, 136, 139, 142, 143, 145, 149, 150
COLETA IV	182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198
COLETA V	233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251
COLETA VI	283, 284, 285, 286, 287, 289, 290, 291, 292, 294, 295, 296, 298, 300

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

O método de extração de DNA utilizado foi eficiente para 100% das cepas isoladas e ativadas. Os produtos de DNA genômico foram considerados de boa qualidade quando visualizados no gel de agarose e produziram bandas únicas de DNA, validando o procedimento de extração. Este resultado é similar ao obtido por Oliveira et al. (2012) com cepas de *E. coli* isoladas das águas de praias permanentes de um reservatório em Tocantins.

Godinho (2010) investigou a ocorrência de bactérias patogênicas, entre elas a *E. coli*, em um sistema de tratamento de esgotos e o método utilizado para a extração de DNA foi o mesmo deste trabalho, porém com algumas modificações térmicas. Os resultados do autor para a extração de DNA foi 100% com obtenção de bandas com maior intensidade e definição.

3.3 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES 16S rDNA

Os produtos de amplificação (PCR), visando o 16S rDNA foram satisfatórios em 99,6% de todos os DNAs extraídos a partir dos isolados.

A cepa 38 da Coleta I do Ponto Amostral P3 foi a única que não apresentou banda visível na amplificação do produto de PCR 16S rDNA, apesar da confirmação positiva do produto de extração do DNA bacteriano, porém este produto foi utilizado como molde para a reação Nested-PCR.

O uso do marcador de peso molecular 1kb (INVITROGEN®) possibilitou observar que os produtos da PCR 16S rDNA (APÊNDICE B) possuíam fragmentos entre 1000 a 1650 pares de base (pb), especificamente 1374 pb. Khan et al. (2007) utilizaram iniciadores universais derivados das regiões conservadas do gene 16S rRNA em reação de PCR de bactérias *E. coli* e na amplificação obtiveram fragmentos de 1402 pb.

3.4 AMPLIFICAÇÃO DO NESTED-PCR

O nPCR utilizando o iniciador BOX A1R resultou em 100% de produtos das 253 *E. coli* isoladas de amostras de água do Rio Cuiabá. Resultado semelhante foi obtido por Sigler e Pasutti (2006) ao analisarem água e sedimento de duas praias, utilizando o iniciador BOX A1R alcançando 100% de produtos da amplificação de PCR das cepas isoladas. Masters et al. (2011) analisaram amostras de águas salobras e doces por meio de PCR Multiplex, alcançando 95% de produtos da PCR de Genes de Virulência.

Carlos et al. (2012) analisaram fontes de contaminação fecal humana pela técnica de rastreamento de origem bacteriana em corpos d'água, os produtos da amplificação por BOX-PCR resultaram em 99,1% de *E. coli*. Portanto, os produtos de amplificação obtidos neste estudo estão dentro do padrão esperado.

A amplificação do produto da extração de DNA da cepa 38 utilizando iniciadores universais (16S rDNA) não foi visualizado porém o produto da reação de amplificação foi utilizado na reação nPCR, com iniciador BOX A1R e apresentou resultado positivo.

O uso do marcador de peso molecular 100pb (PROMEGA®) possibilitou observar que os produtos da nPCR possuíam fragmentos entre 1300 a 1500 pb. Orsi et al. (2007b) analisaram a variabilidade genética da *E. coli* em dois reservatórios de água de recreação e obtiveram por meio de BOX-PCR, tipagem molecular com bandas variando entre 298-4000 pb, enquanto que, usando ERIC e REP-PCR os fragmentos foram de 220-5000 pb. Canal (2010) utilizou para análise de similaridade de isolados de *E. coli* de água de uma Lagoa, pela técnica ERIC-PCR, apenas fragmentos acima de 200 pb e menores que 1600 pb por apresentarem melhor resolução. Os fragmentos observados neste trabalho se encontram na faixa utilizada em pesquisas referenciando a *E. coli*.

Importante ressaltar que as imagens possibilitam apenas a visualização do padrão de distribuição das bandas geradas a partir dos fragmentos de DNA amplificados e seus respectivos pesos moleculares. A partir das imagens de amplificação dos isolados observa-se que a maioria dos isolados possui distribuição de bandas semelhantes, sugerindo similaridade entre 97% dos isolados.

3.5 DIVERSIDADE GÊNICA DOS ISOLADOS *E. COLI*

As impressões digitais de DNA dos isolados por Nested-PCR (BOX A1R) foram agrupadas de várias formas gerando dendrogramas com a finalidade de escolher entre as análises qual representaria melhor a diversidade gênica dos pontos amostrais.

Considerando o objetivo deste trabalho e os resultados da análise da similaridade dos dendrogramas dos três pontos amostrais (P1, P2 e P3) com sete cepas com menor similaridade, optou-se em apresentar os resultados e discussão, considerando todas as coletas de cada ponto amostral.

Na Tabela 2 estão quantificadas as cepas de *E. coli* isoladas de água nos três pontos amostrais com suas coletas específicas. Nos dendrogramas os agrupamentos foram especificados com letras gregas (α, β, γ, δ, ε, λ, θ e ρ) para diferenciação. A letra ‘n’ que acompanha a numeração das cepas representa a reação nPCR.

Tabela 2- Isolados de *E. coli* do Rio Cuiabá-MT submetidos a análise genotípica.

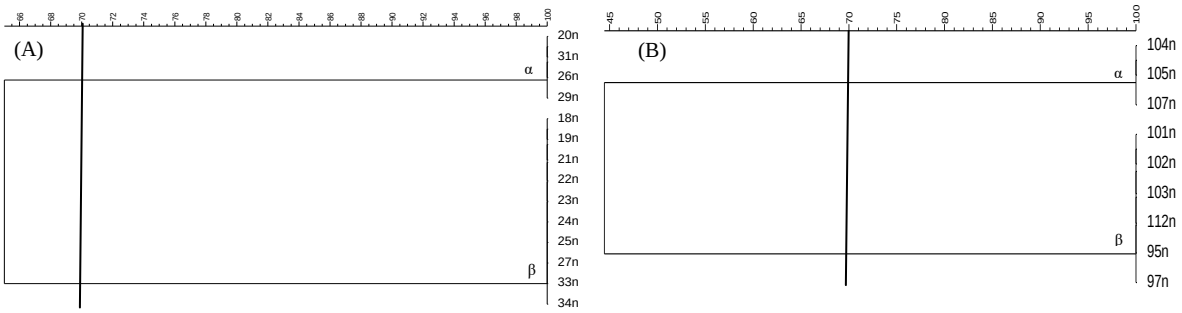
PONTOS	Coleta	Nº cepas Isoladas	Nº cepas Ativadas	PCR (27F, 1401U)	Nested –PCR (BOX A1R)
P1	I	17	14	14	14
	II	1	1	1	1
	III	19	9	9	9
	IV	17	16	16	16
	V	17	17	17	17
	VI	15	15	15	15
P2	I	17	17	17	17
	II	1	1	1	1
	III	19	8	8	8
	IV	14	14	14	14
	V	17	17	17	17
	VI	16	12	12	12
P3	I	18	18	17	18
	II	39	34	34	34
	III	18	10	10	10
	IV	17	17	17	17
	V	19	19	19	19
	VI	18	14	14	14
Total		299	253	252	253

3.5.1 Diversidade gênica da *E. coli* na água do Rio Cuiabá - Ponto Amostral P1

A análise de similaridade entre as *E. coli* do Ponto Amostral P1 (FIGURA 5A) mostrou, na Coleta I, que os 14 produtos de amplificação do DNA, geraram dois agrupamentos (4 e 10 cepas, respectivamente) com similaridade igual a 100% entre as cepas de cada grupo, sendo que estes possuem similaridade de 65,01% entre si. Na Coleta II apenas uma cepa (55) foi isolada, não sendo possível a construção do dendrograma desta coleta.

Na Coleta III o dendrograma (FIGURA 5B) apresentou dois agrupamentos com 100% de similaridade (3 e 6 cepas, respectivamente entre as cepas de cada grupo). Esses dois grupos mostraram 44,45% de similaridade entre si.

Figura 5 – Dendrogramas do percentual de similaridade genotípica, entre as cepas *E. coli* isoladas da água do Ponto Amostral P1 do Rio Cuiabá-MT, obtidos por Nested-PCR. Figura 5A - Coleta I (Agrupamentos α e β). Figura 5B - Coleta III (Agrupamentos α e β). A linha vertical indica 70% de similaridade.

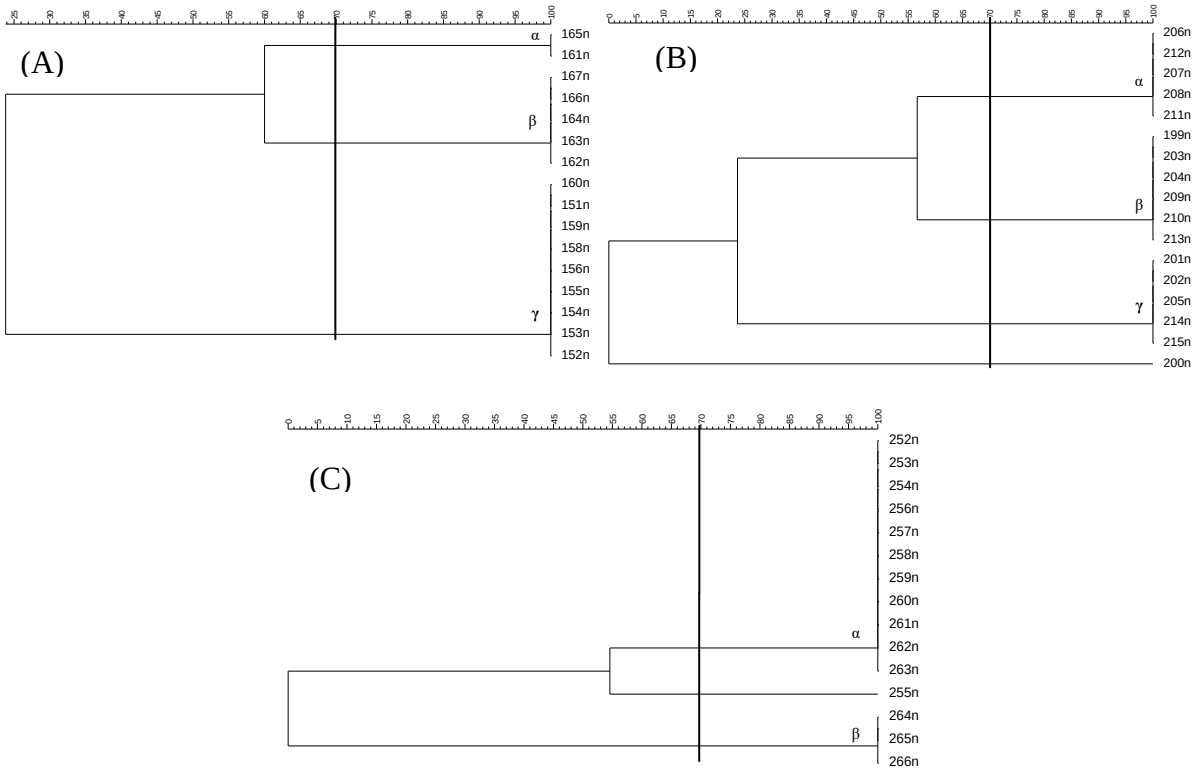


As 16 cepas da Coleta IV (FIGURA 6A), formaram três agrupamentos (2, 5 e 9 cepas, respectivamente) com 100% de similaridade entre as cepas de cada grupo. Observa-se na Figura 6A que o grupo alfa (α) foi 60% similar com o grupo beta (β) e o grupo gama (γ) foi 23,82% similar aos outros dois grupos.

Observou-se, no dendrograma da Coleta V (FIGURA 6B), que a cepa 200 mostrou ser dissimilar das outras cepas dessa coleta. As outras 16 cepas reuniram em três agrupamentos (5, 6 e 5 cepas, respectivamente) com 100% de similaridade entre as cepas de cada grupo. O grupo alfa (α) foi 56,67% similar com o grupo beta (β) e o grupo gama (γ) foi 23,64% similar aos outros dois grupos.

Já na Coleta VI com 15 cepas, a análise do dendrograma (FIGURA 6C) identificou três cepas (264, 265 e 266) com 100% de similaridade entre si. Entretanto, esse grupo α foi dissimilar do outro grupo (β) formado por 11 cepas. A cepa 255 mostrou ser similar apenas 54,56% do grupo α.

Figura 6 – Dendrogramas do percentual de similaridade genotípica, entre as cepas *E. coli* isoladas da água do Ponto Amostral P1 do Rio Cuiabá-MT, obtidos por Nested-PCR. Figura 6A - Coleta IV (Agrupamentos α, β e γ). Figura 6B - Coleta V (Agrupamentos α, β e γ). Figura 6C - Coleta VI (Agrupamentos α e β). A linha vertical indica 70% de similaridade.



Os produtos de amplificação da PCR de *E. coli* do Ponto Amostral P1 reuniram-se em 12 agrupamentos com 100% de similaridade entre as cepas de cada grupo, 01 cepa (255) com similaridade menor que 70% e uma cepa (200) dissimilar, totalizando 15 genótipos diferentes (considerando a cepa 55). Ponderando os agrupamentos desse ponto observou-se que todos os grupos apresentaram similaridade < 70% em relação a outro.

Considerando as análises de cada coleta do Ponto Amostral P1 (FIGURA 5 e 6) alcançou 97,22% de cepas similares. Ponderando que a variedade genotípica desse ponto foi de 30,61%, em relação à diversidade dos pontos P2 e P3, e conhecendo que acima do local de coleta, deste estudo, situa-se dois córregos, Mané Pinto e Ribeirão do Lipa, que são receptores de efluentes dos bairros populacionais em seu entorno (LIMA, 2001). Como as cepas foram altamente semelhantes e a diversidade gênica foi menor, supõe-se que, durante todos os meses de coletas, as fontes de poluição permaneceram as mesmas.

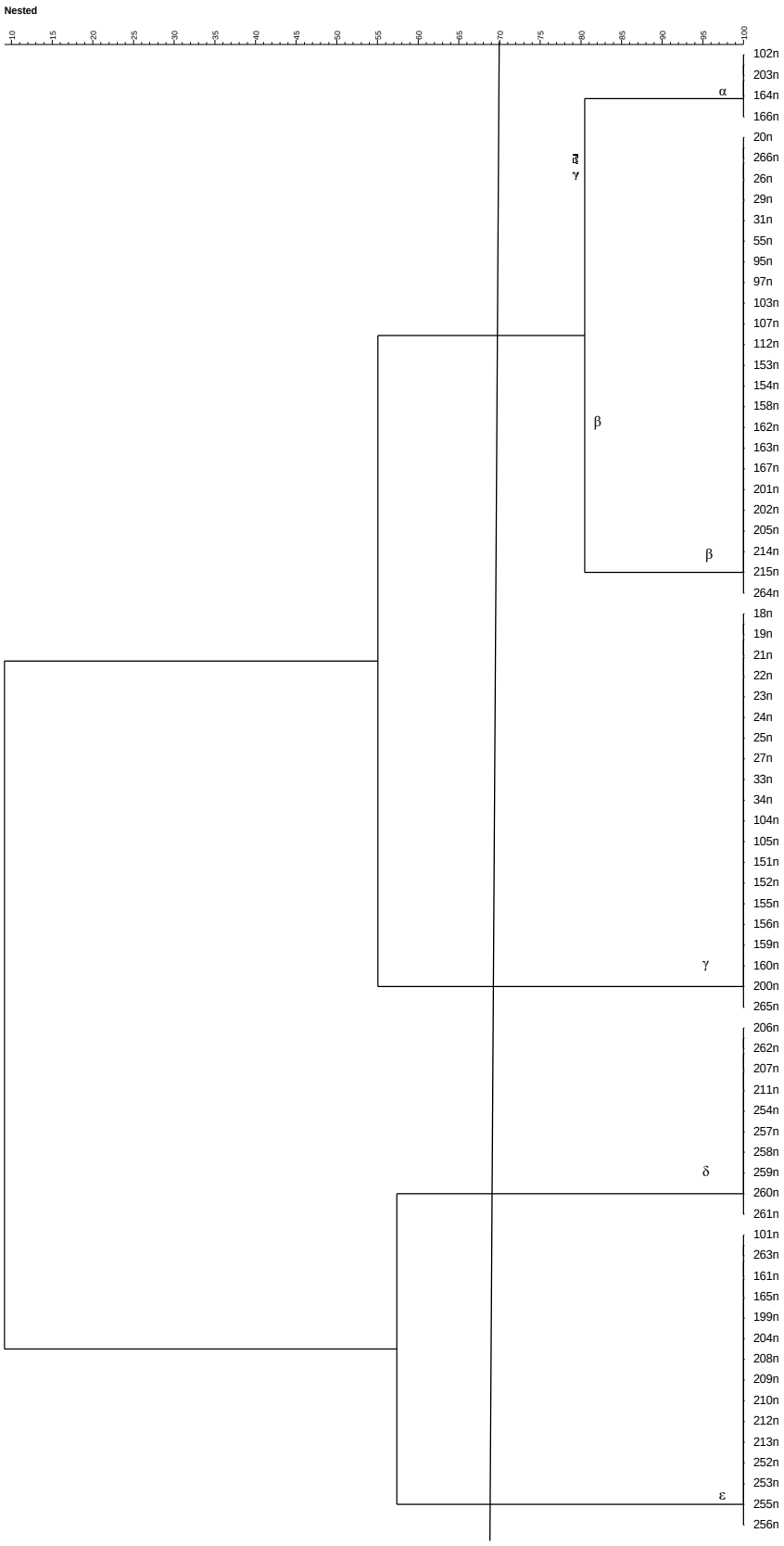
O Ponto P1 é a margem esquerda do Rio Cuiabá onde se encontra a cidade com mesmo nome. O local onde foi feita a coleta possui, conforme Barreto (2013), uma

profundidade mediana de 7,98 m com vazão média correspondente de 163,73 m^3/s e com velocidade média de 0,52 m/s. Dos três pontos amostrais esse é onde a profundidade e a vazão se encontram com maiores valores. Como o Rio Cuiabá tem sido largamente utilizado para a diluição dos efluentes domésticos gerados nas microbacias urbanas, provavelmente houve uma maior diluição dos esgotos lançados desse lado da margem.

Todas as cepas bacterianas das seis coletas realizadas no Ponto Amostral P1 foram analisadas em conjunto (FIGURA 7). Neste dendrograma foi possível a comparação da única cepa (55) da Coleta II.

A análise das perfil genético das 72 cepas de *E. coli* do Ponto P1 (FIGURA 7) mostrou que todas as cepas se alinharam em cinco agrupamentos (4, 23, 20, 10 e 15) com 100% de similaridade entre as cepas de cada grupo. O grupo α e o grupo β são 80,48% similares entre si, sendo possível considerá-los semelhantes. Observou-se, também que os agrupamentos delta (δ) e épsilon (ε) mostraram pouca similaridade (9,13%) com os outros agrupamentos.

Figura 7 - Diversidade gênica, por NESTED-PCR, de todas as 72 cepas de *E. coli* isoladas da água do Rio Cuiabá-MT, referente as seis coletas do Ponto Amostral P1. Agrupamentos α, β, γ, δ e ε. A linha vertical indica 70% similaridade.



A *E. coli* tem a capacidade de sobreviver em diversos ambientes e isso contribui para a sua ampla diversidade genética, geralmente melhorando a capacidade de adaptação da espécie e resistência às alterações ambientais (GOTO; YAN, 2011). De acordo com os dados de Barreto (2013), o pH da água do Ponto Amostral P1 foi ligeiramente ácido em todas as coletas e a temperatura da água foi menor quando relacionada à temperatura dos pontos P2 e P3, com uma variação térmica de até 3,4°C. Portanto, supõe-se que as cepas dissimilares podem ser de *E. coli* mais resistentes a variações de pH e temperatura, provavelmente contendo genes de patogenicidade.

Carlos et al. (2012) ao analisarem cepas de *E. coli*, em águas de três reservatórios, dois rios e uma estação de tratamento de esgoto, observaram que esses sistemas de água estavam afetados por fontes mistas de contaminação fecal e averiguaram que as águas residuárias analisadas possuíam 95% de cepas de *E. coli* de origem humana.

Na margem esquerda do Rio Cuiabá encontra-se vários aglomerados populacionais (Lima, 2001; Lima, 2009) e, como a similaridade das cepas *E. coli* da água do Ponto Amostral P1 foi elevada, pode-se atribuir a contaminação de origem humana.

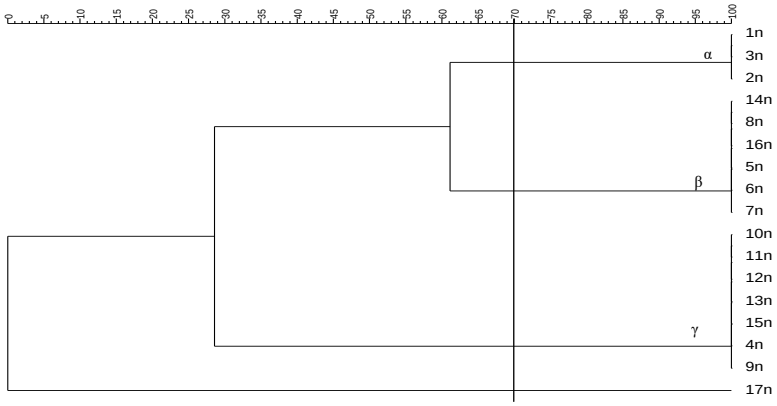
Na Figura 7, observou-se que o grupo δ possui apenas cepas da Coleta V e da Coleta VI que corresponde às coletas na estação de chuva, sendo provavelmente cepas decorrentes do escoamento superficial intenso nessa época, podendo ser atribuídas a animais e aves silvestres. Goto e Yan (2011) comentam que o solo pode ser um importante contribuinte de *E. coli* para águas superficiais e subterrâneas em certas condições.

3.5.2 Diversidade gênica da *E. coli* na água do Rio Cuiabá - Ponto Amostral P2

Os dendrogramas gerados pelas impressões digitais dos isolados de *E. coli* de água do Ponto Amostral P2, em cada coleta, estão dispostos nas Figuras 12, 13 e 14.

Na Coleta I do Ponto Amostral P2, a análise de similaridade entre as *E. coli*, apresentadas no dendrograma (FIGURA 8), apresentou os produtos de nPCR em três agrupamentos (3, 6 e 7 cepas, respectivamente) com 100% de similaridade entre as cepas de cada grupo. O grupo γ mostrou ser 28,58% similar com os outros dois grupos. Observou-se que a cepa 17 foi dissimilar de todas as cepas dessa coleta. Na Coleta II apenas uma cepa (54) foi isolada, não sendo possível a construção do dendrograma dessa coleta.

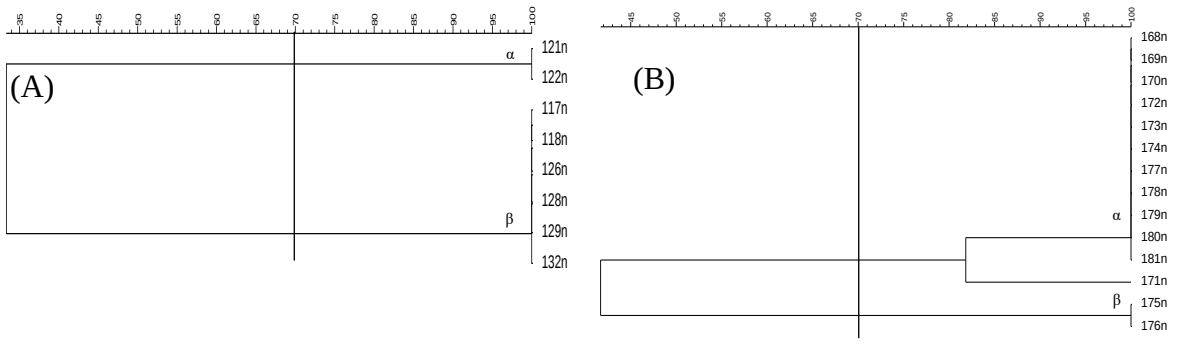
Figura 8 – Dendrograma do percentual de similaridade genotípica entre as cepas *E. coli* isoladas da água do Rio Cuiabá-MT, da Coleta I do Ponto Amostral P2, obtidos por NESTED-PCR. Agrupamentos α, β e γ. A linha vertical indica 70% de similaridade.



Na Coleta III, a análise de similaridade observada no dendrograma (FIGURA 9A) evidenciou que os produtos de nPCR reuniram em dois agrupamentos (2 e 6 cepas, respectivamente) com 100% de similaridade entre as cepas de cada grupo. Notou-se que há pouca similaridade (33,33%) entre esses dois grupos.

Observou-se na Coleta IV (FIGURA 9B), que os produtos de nPCR das 13 cepas similares estavam dispostas em 2 agrupamentos (11 e 2 cepas, respectivamente) com 100% de similaridade entre as cepas de cada grupo. Foi encontrada uma similaridade de 41,68% entre os grupos α e β. Isoladamente a cepa 171 apresentou similaridade de 81,83% com o grupo α, portanto mostrou-se semelhante a todas as cepas deste agrupamento.

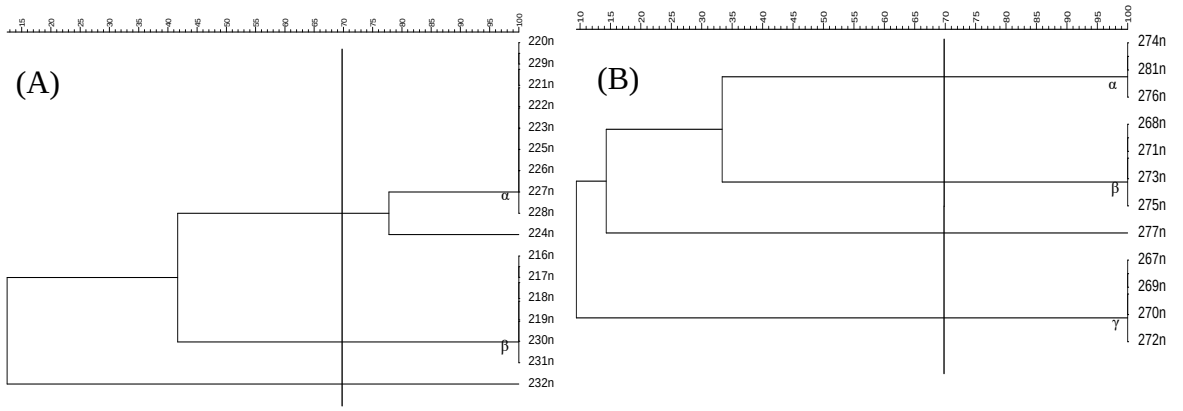
Figura 9 - Dendrogramas do percentual de similaridade genotípica, entre as cepas *E. coli* isoladas da água do Ponto Amostral P2 do Rio Cuiabá-MT, obtidos por Nested-PCR. Figura 9A - Coleta III (Agrupamentos α e β). Figura 9B - Coleta IV (Agrupamentos α e β). A linha vertical indica 70% de similaridade.



Os 17 isolados de *E. coli* da Coleta V (FIGURA 10A) apresentaram produtos da nPCR reunidos em dois agrupamentos (9 e 6 cepas, respectivamente) de cepas com 100% de similaridade entre as cepas de cada grupo. A cepa 224 apresentou similaridade de 77,79% com o grupo α, portanto semelhante a esse agrupamento. Já a cepa 232 foi a mais divergente com similaridade de 12,50% em relação às outras cepas desta coleta.

Na Coleta VI (FIGURA 10B) foram observados, entre os produtos da nPCR das 12 cepas, três agrupamentos (3, 4 e 4 cepas, respectivamente) com 100% de similaridade entre as cepas de cada grupo. Apenas uma cepa (277) mostrou similaridade de 14,29% com os grupos α e β. O Grupo γ apresentou pouca similaridade (9,38%) com as outras cepas desta coleta.

Figura 10 – Dendrogramas do percentual de similaridade genotípica, entre as cepas *E. coli* isoladas da água do Ponto Amostral P2 do Rio Cuiabá-MT, obtidos por Nested-PCR. Figura 10A - Coleta V (Agrupamentos α e β). Figura 10B - Coleta VI (Agrupamentos α, β e γ). A linha vertical indica 70% de similaridade.



O Ponto Amostral P2 obteve 12 agrupamentos com 100% de similaridade entre as cepas de cada grupo, 02 cepas (171 e 224) com similaridade maior que 70%, duas cepas (232 e 277) com similaridade menor que 70% e uma cepa (17) dissimilar. Cada agrupamento com 100% de similaridade foi considerado genótipo único, e nesse Ponto P2 os genótipos diferentes da *E. coli* das coletas analisadas individualmente totalizaram dezesseis (considerando a cepa 54).

O Ponto Amostral P2, na seção de coleta, é o canal principal do Rio Cuiabá, e foi averiguada uma profundidade média em 4,39 m, com vazão média 106,60 m^3/s e com velocidade 0,47 m/s (BARRETO, 2013). A profundidade do canal do rio, velocidade da

corrente, sedimentos em suspensão, são características físicas que interferem no transporte de material (TUNDISI; TUNDISI, 2008).

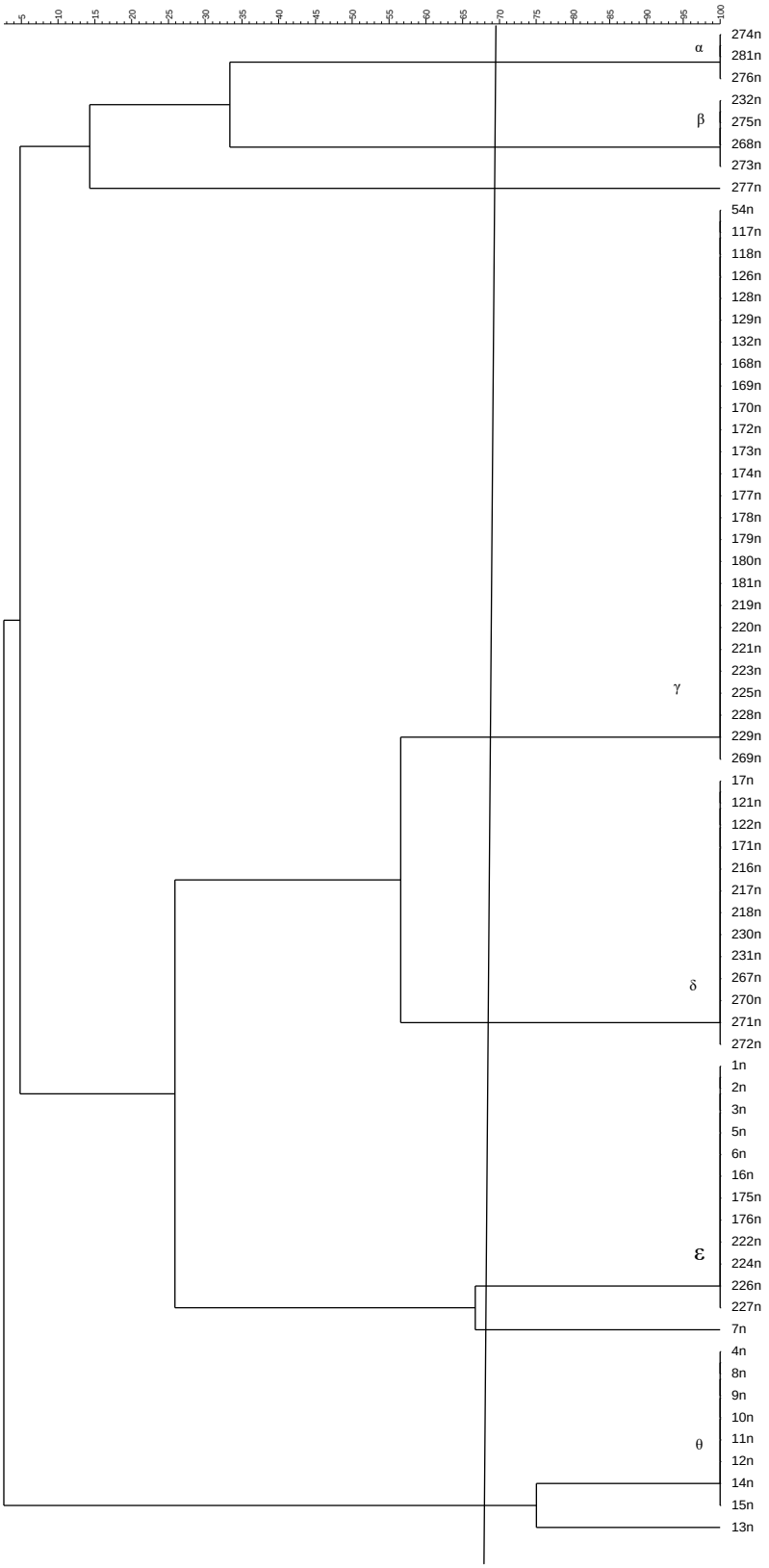
A quantificação dos agrupamentos dos produtos de nPCR das *E. coli* da água do Ponto P2 foi a mesma do Ponto P1 (12), porém, no Ponto P2, o total de cepas é menor que no Ponto P1 e a diversidade gênica (32,62%) foi mais elevada. Possivelmente, essa diferença pode ser advinda de corredeiras a montante da seção de estudo e, geralmente, o canal do rio recebe influência das margens. O Canal Principal do Rio Cuiabá possui uma velocidade considerável e por ser um local onde não há deposição de sedimentos (BARRETO, 2013), pode-se considerar que o canal é um transportador de bactérias aderidas ao sedimento em suspensão.

Todas as cepas de *E. coli* das seis coletas de água, realizadas no Ponto Amostral P2, foram analisadas em conjunto (FIGURA 11). Neste dendrograma foi possível a comparação da única cepa (54) da Coleta II.

As análises das impressões digitais das 69 cepas do Ponto P2 mostraram seis agrupamentos (3, 4, 26, 13, 12 e 8, respectivamente) com 100% de similaridade entre as cepas de cada grupo. O dendrograma apresentou uma cepa (13) com similaridade maior que 70% e duas cepas (7, 277) com similaridade menor que 70%. Todos os agrupamentos mostraram similaridade < 70% entre si.

Na FIGURA 11 o grupo α foi formado por apenas três cepas (274,276 e 281) que aparecem na Coleta VI (FIGURA 10B) reunidas em um mesmo grupo confirmando serem cepas diferenciadas. Já, o grupo teta (θ) só possui cepas da Coleta I, evidenciando uma similaridade bem menor (2,6%) em relação aos outros grupos.

Figura 11 - Diversidade gênica, por Nested-PCR, de todas as 69 cepas de *E. coli* isoladas da água do Rio Cuiabá-MT, referente as seis coletas do Ponto P2. Agrupamentos α, β, γ, δ, ε e θ. A linha vertical indica 70% similaridade.



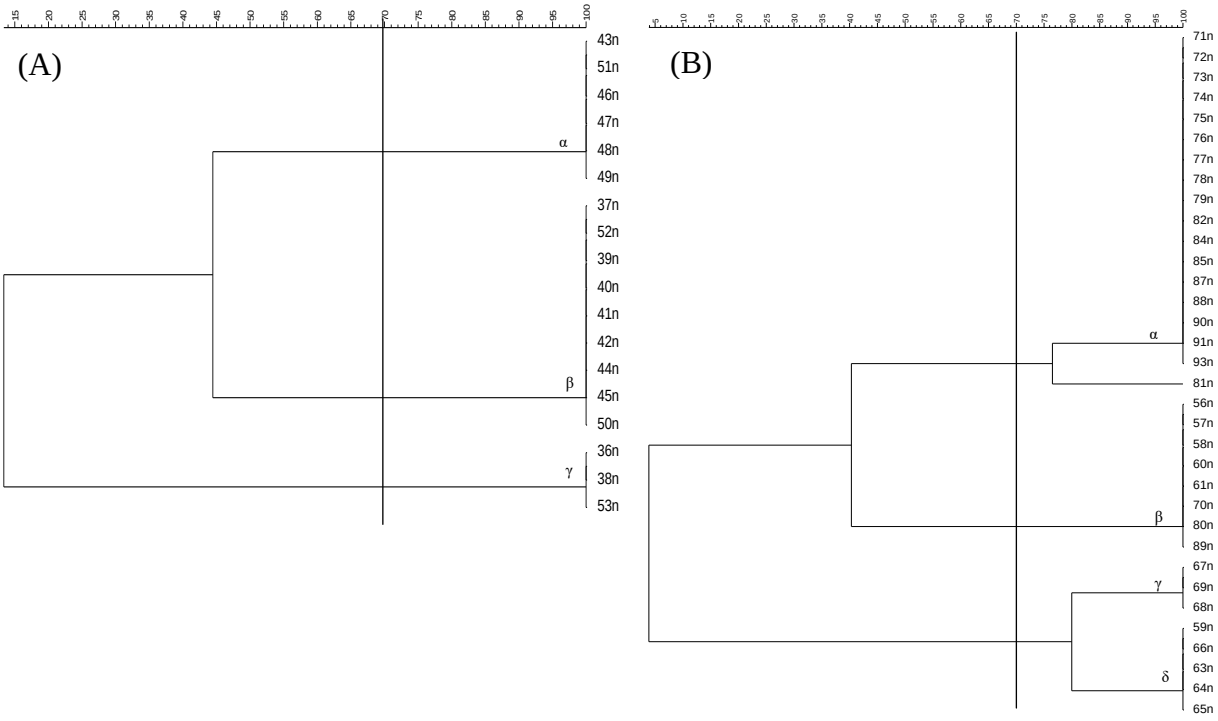
3.5.3 Diversidade gênica da *E. coli* na água do Rio Cuiabá - Ponto Amostral P3

Os dendrogramas gerados pelas impressões digitais dos isolados bacterianos do Ponto Amostral P3, em cada coleta, estão dispostos nas Figuras 12, 13 e 14.

Na Coleta I, Figura 12A, os produtos de nPCR das dezoito cepas analisadas formaram três agrupamentos (6, 9 e 3 cepas, respectivamente) com 100% de similaridade entre as cepas de cada grupo. Sendo que os três agrupamentos possuem similaridade < 70% entre eles. O grupo γ apresentou apenas 13,35% de similaridade em relação aos outros grupos.

Na análise de similaridade dos produtos de nPCR das *E. coli* referentes à Coleta II (FIGURA 12B) observou-se quatro agrupamentos (17, 8, 3 e 5 cepas, respectivamente) com 100% de similaridade. Os grupos γ e δ possuem elevada similaridade (80%) entre si, podendo considerá-los semelhantes. Esses dois grupos possuem baixa similaridade (3,85%) com os grupos α e β (40,31% entre si). A cepa 81 não pertencente a qualquer dos grupos mostrou semelhança com o grupo α, com 76,5% de similaridade.

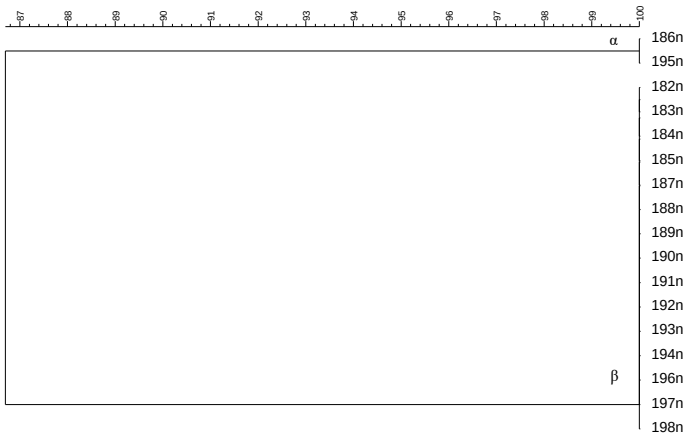
Figura 12 – Dendrogramas do percentual de similaridade genotípica, entre as cepas *E. coli* isoladas da água do Ponto Amostral P3 do Rio Cuiabá-MT, obtidos por Nested-PCR. Figura 12A - Coleta I (Agrupamentos α, β e γ). Figura 12B - Coleta IV (Agrupamentos α, β, γ e δ). A linha vertical indica 70% de similaridade.



Os produtos de amplificação da nPCR das 10 cepas de *E. coli*, referente à Coleta III, geraram um dendrograma com 100% de similaridade entre as cepas.

Na Coleta IV (FIGURA 13B) os produtos da amplificação de nPCR das 17 cepas formaram dois agrupamentos (2 e 15 cepas, respectivamente) com 100% de similaridade entre as cepas de cada grupo. Esses dois grupos α e β evidenciaram semelhança entre si com 86,69% de similaridade.

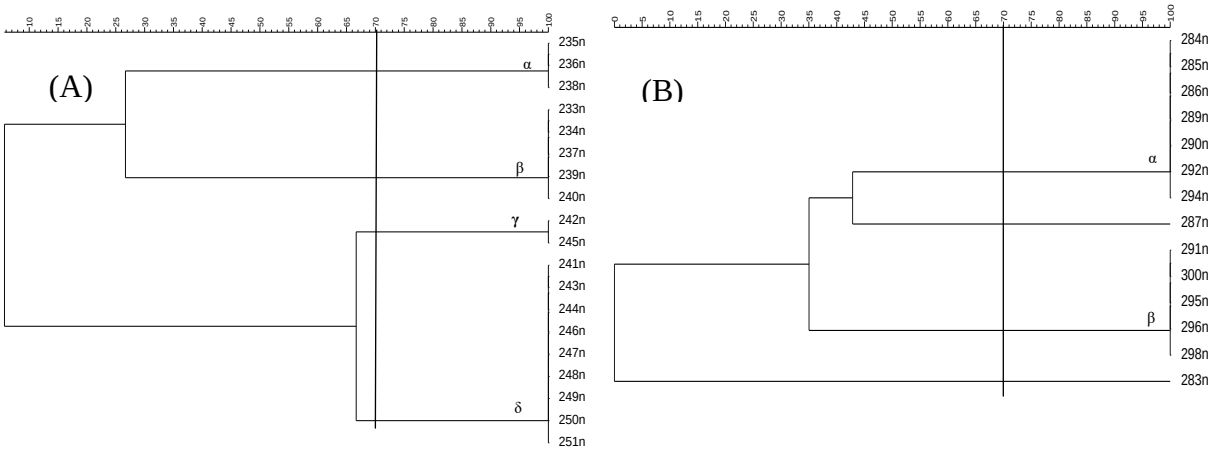
Figura 13 – Dendrograma do percentual de similaridade genotípica, entre as cepas *E. coli* isoladas da água do Ponto Amostral P3 do Rio Cuiabá-MT, obtidos por Nested-PCR. Coleta IV (Agrupamentos α e β).



Quatro agrupamentos (3, 5, 2 e 9 cepas, respectivamente) com 100% de similaridade entre as cepas de cada grupo foram formados com os produtos de nPCR das 19 cepas da Coleta V (FIGURA 14A). Todos os agrupamentos mostraram similaridade < 70% entre si, sendo que os grupos α e β (26,67%, entre si) apresentaram pouca similaridade (5,69%) com os grupos γ e δ (66,68%, entre si).

Conforme o dendrograma (FIGURA 14B) da Coleta VI, dos produtos de nPCR das 14 cepas, 12 exibiram 100% de similaridade em dois agrupamentos (7 e 5 cepas, respectivamente), que entre si, apresentaram 35% de similaridade. A cepa 287 apresentou similaridade inferior a 70%, com 42,86% em relação ao grupo α, já a cepa 283 foi totalmente dissimilar a todas as outras cepas dessa coleta.

Figura 14 – Dendrogramas do percentual de similaridade genotípica, entre as cepas *E. coli* isoladas da água do Ponto Amostral P3 do Rio Cuiabá-MT, obtidos por Nested-PCR. Figura 14A - Coleta V (Agrupamentos α, β, γ e δ). Figura 14B - Coleta VI (Agrupamentos α e β). A linha vertical indica 70% de similaridade.



As análises dos produtos da amplificação de nPCR das *E. coli* coletadas, nas águas do Rio Cuiabá, no Ponto Amostral P3 geraram 16 agrupamentos com 100% de similaridade entre as cepas de cada grupo. Também, 01 cepa (81) com similaridade maior que 70%, 01 cepa (287) com similaridade menor que 70% e uma cepa (283) dissimilar. Desse resultado os genótipos diferenciados totalizaram em 18.

A maior quantidade de agrupamentos observada neste Ponto Amostral P3 pode estar relacionada aos receptores de poluições pontual e difusa. O Ponto Amostral P3 está localizado à margem direita do Rio Cuiabá onde está situada a cidade de Várzea Grande e, acima da seção de estudo, onde o Rio Pari e os Córregos Guarita e Embaúval são afluentes do Rio Cuiabá por essa margem e condutores de efluentes (LIMA, 2001).

Entre os três pontos amostrais, o Ponto P3 apresentou maior diversidade gênica. A montante do Rio Cuiabá, além de possuir afluentes receptores de contaminantes, existe atividades agrícolas, além de criação de gado e suínos, que podem estar relacionadas a uma maior diversidade entre as bactérias *E. coli.*

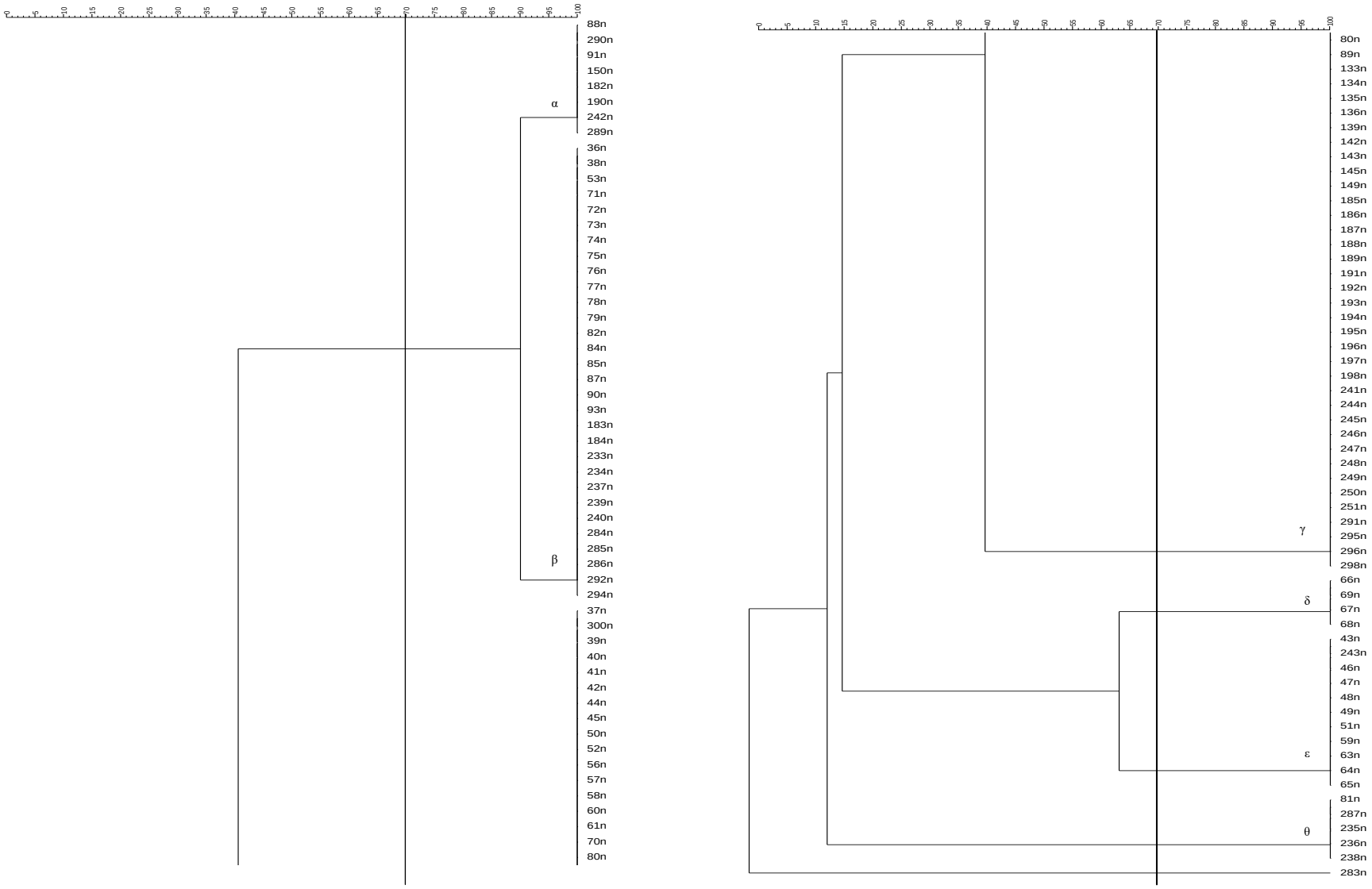
A margem direita do Rio Cuiabá apresentou 2,97 m de profundidade média, com velocidade média de 0,36 m/s e vazão média de 45,56 m^3/s (BARRETO, 2013). Por se tratar de um ambiente mais raso, recebe mais luz e consequentemente aquecimento. A temperatura possui um papel muito importante no meio aquático, uma vez que o controle dos parâmetros físicos e químicos tem sua influência na microbiota aquática (ESTEVES, 2011).

Conforme Barreto (2013), o potencial hidrogeniônico (pH) do ponto P3 foi maior em quase todas as coletas (ANEXO). Von Sperling (1996) afirma que a elevação dos valores de pH podem estar relacionadas a alta produtividade de algas, normalmente resultante do aporte significativo de matéria orgânica e nutrientes. Godinho (2010) afirma que alterações, principalmente do pH e OD, quando associados, podem contribuir para o aumento ou a diminuição dos valores quantitativos das bactérias. A maior diversidade gênica de *E. coli* encontrada no Ponto Amostral P3 pode estar relacionada ao crescimento de bactérias com melhor resistência às variações do ambiente.

A Figura 15 representa o dendrograma produzido pelos produtos de nPCR de todas *E. coli* das seis coletas realizadas no Ponto Amostral P3. Totalizaram 112 cepas e a análise das impressões digitais mostrou uma homogeneidade, gerando seis agrupamentos (08, 30, 53, 04, 11 e 05, respectivamente) com 100% de similaridade entre as cepas de cada grupo.

Os grupos α e β (FIGURA 15) evidenciaram semelhança com 90,05% de similaridade entre si. O grupo δ possui apenas cepas da Coleta II desse ponto e mostrou similaridade de 63,66% como o grupo ε, já o grupo θ manifestou baixa similaridade (13,42%) em relação a todos outros grupos. A cepa 283 foi a única a ser dissimilar nessa análise, observando que essa cepa também foi dissimilar na análise individual da Coleta VI.

Figura 15 - Diversidade gênica, por Nested-PCR, de todas as 111 cepas de *E. coli* isoladas da água do Rio Cuiabá-MT, referente as seis coletas do Ponto Amostral P3. Agrupamentos α, β, γ, δ, ε e θ. A linha vertical indica 70% similaridade



Cada Ponto Amostral, P1, P2 e P3, obteveram respectivamente, 02, 03 e 02 cepas com similaridade <70% e 97,23% das cepas foram similares. Goto e Yan (2011) alcançaram 64% de cepas similares em solo e água de bacias hidrográficas do Havaí. Casarez, Pillaib e Di Giovannia (2007) obtiveram 68,5% de cepas similares em dois lagos centrais no Texas. Diferente de Anastasi et al. (2012) que em suas amostras ambientais (lagoas, praias e riachos) obtiveram 40% de impressões digitais idênticas. A quantificação de cepas similares deste trabalho é elevada e sugere que as fontes poluidoras podem ser as mesmas no período de coleta.

Kumaraswamy et al. (2014) estudaram a presença e diversidade de agentes patogênicos em estação de tratamento de águas residuais (ETAR) em três estágios diferentes de tratamento e identificaram 21 diferentes agentes patogênicos, entre eles *E. coli*, *Enterococcus* sp, e *Salmonella* spp. Segundo os autores, patógenos podem efetivamente multiplicar e aumentar em número, nas diferentes etapas de estações de tratamento de águas residuais, como lodos ativados e tanques de armazenamento pós-tratados. Korzenieswska e Harnisz (2012) analisaram efluentes hospitalares e águas residuais municipais após vários estágios de purificação identificando *Enterobacteriaceae*, principalmente *E. coli e Klebsiella pneumoniae*. Mesmo sabendo que as taxas de remoção durante os processos de tratamento estavam perto de 99%, encontraram um número bastante elevado dessas bactérias na saída ETAR.

Anastasi et al. (2012) analisaram águas ambientais num raio de 20 km no entorno de quatro ETEs e observaram que 56% dos isolados ambientais de *E. coli* foram idênticos às estirpes encontradas nos efluentes finais das ETEs. Também observaram que 95% possuíam genes de virulência associados à InPEC ou UPEC e foram encontrados em uma variedade de locais dentro das áreas amostradas, sugerindo que eles podem ter derivado de efluentes das ETEs e de outras fontes difusas. Oliveira et al. (2012) detectaram *E. coli*, inclusive EPEC e ETEC, em águas de praias situadas em áreas urbanas, perto de descarga de efluentes.

Neste estudo foram analisadas 253 cepas e identificou-se 19,37% de genótipos únicos. Goto e Yan (2011) isolaram *E. coli* de água e de solo de várias bacias hidrográficas no Havaí e observaram diversidade genotípica global elevada de 35,5% genótipos originais. Essa diversidade genotípica encontrada no Rio Cuiabá sugere, conforme os autores anteriormente citados, a possibilidade de serem provenientes de esgotos in natura, de efluentes difusos e até mesmo de ETEs que não possuem tratamento adequado.

O dendrograma gerado pelos produtos de nPCR de todos os 253 isolados bacterianos (APÊNDICE A) apresentou oito agrupamentos (29, 25, 14, 10, 66, 03, 101 e 04, respectivamente) com similaridade 100% entre as cepas de cada grupo. O último grupo com quatro cepas (274, 276, 281 e 283) demonstrou ser 50% similar com a cepa 277. Ressaltando que essas cinco cepas apresentaram baixíssima similaridade (0,9%) em relação aos outros grupos e são unicamente da Coleta VI, ocorrida no evento de chuva.

Observando a similaridade das *E. coli* (APÊNDICE A) entre os pontos amostrais e suas coletas é possível sugerir que os pontos de poluição são os mesmos durante o período das coletas. Observou-se ainda nesta análise, que existem grupos distintos, como o α, β e γ que não possuem cepas da Coleta III e mostraram apenas 15,47% de similaridade com os outros grupos.

Barreto (2013) mediu a vazão das coletas deste estudo e obteve uma média nas ultimas três coletas de 509, 22 m^3/s, enquanto nas três primeiras coletas, estação de estiagem, a média da vazão foi de 140,2 m^3/s. Como esperado o número de *E. coli* nas amostras de água coletadas durante a estação seca foi 20,57% menor do que o número encontrado durante a estação chuvosa, que foi de 141 cepas.

Masters et al. (2011) também encontraram menores valores de *E. coli*, nas amostras de águas salobra e doce de estuários, rios e riachos, durante a estação seca do que aqueles encontrados na estação de cheia. Essa ocorrência é em grande parte devido ao escoamento gerado a partir de eventos de chuva que transportam um elevado número de bactérias de vários pontos e fontes difusas para o leito do rio. Os autores também encontraram Genes de Virulência exclusivos na estação das chuvas, indicando sua associação com o escoamento de águas pluviais. A diversidade gênica, neste trabalho, no período de chuva foi 18,36% maior que no período de estiagem.

Sabendo que o aumento das bactérias e suas atividades metabólicas estão relacionados com o consumo de OD, observou-se, neste trabalho, que houve um aumento de isolados a partir da Coleta IV. A queda nos valores de OD não está somente relacionada com as *E. coli* mas também ao aporte de materiais pela drenagem neste período de chuvas. Em conformidade com Cunha et al. (2010), altos índices pluviométricos podem interferir na qualidade dos corpos d'água devido ao carreamento de microrganismos do solo para a água, ocorrendo uma possível contaminação de forma mais intensa com um aumento da contagem, tanto de coliformes totais quanto de coliformes termotolerantes.

De acordo com Tundisi e Tundisi (2008), a concentração de oxigênio dissolvido (OD) na água pode sofrer drástica redução quando aumenta consideravelmente a concentração de material em suspensão na água, devido a intensas precipitações e escoamento superficial para os rios. Os valores de OD foram menores nos três pontos nas duas ultimas coletas, onde os valores da precipitação e dos sedimentos em suspensão foram bem maiores que nas outras coletas.

Na Coleta I também houve um valor expressivo de isolados de *E. coli*, provavelmente, por ser período de estiagem, que não houve precipitação dentro de 24 h e a vazão foi a menor de todas as coletas. De acordo com Cunha (2010), nos períodos de seca, é possível que os efluentes se tornem menos diluídos, aumentando assim o nível de contaminação.

A cepa 283, da Coleta VI, foi considerada atípica por ser dissimilar a todas as outras cepas. Em todos os tipos de análises de similaridade efetuadas com os pontos amostrais esta cepa demonstrou dissimilaridade, exceto na análise de todas as cepas, portanto há uma necessidade de estudos específicos para averiguação de possível patogenicidade.

Cepas patogênicas de *E. coli* em amostras ambientais são pouco estudadas, mas é admissível a presença dessas estirpes em esgotos domésticos, ainda que em baixas concentrações, ocasionando infecções em animais e seres humanos. Godinho (2010) comenta que há necessidade de estudos dessas baixas concentrações, devido alguns sorotipos de *E. coli* possuírem baixa dose infectante, como por exemplo, a EHEC que apenas 10 a 100 células são suficientes para causar infecção.

Os rios são capazes de controlar sua poluição por meio da autodepuração que ocorre longitudinalmente. Possivelmente, o Rio Cuiabá não esteja mantendo suas características naturais, prejudicadas por receber efluentes domésticos como também receber efluentes industriais a jusante da área de estudo conforme Lima (2001), dificultando seu processo de autodepuração e, assim, contribuindo com poluição, degradando as águas da Região Pantaneira.

A detecção de *E. coli* na água indica a presença de agentes patogênicos que é um risco potencial para a saúde pública. Para uma gestão eficaz dos corpos d'água é importante identificação das fontes de contaminação fecal (CARLOS et al., 2012). A dinâmica das populações de *E. coli* em ambientes secundários podem ser caracterizadas por ferramentas que são potencialmente valiosas para avaliar as mudanças na composição da população,

identificando vetores de poluição e caracterização de transporte *E. coli* (SIGLER; PASUTTI, 2006).

As técnicas moleculares, especificamente métodos baseados em PCR, provê ferramentas analíticas sensíveis, rápidas e quantitativas para estudos de patógenos (GIRONES et al., 2010). Maheux et al. (2014) avaliaram a qualidade microbiológica de água de poços para consumo na região da cidade de Québec, utilizando métodos baseados em cultura e moleculares. Os autores averiguaram que a análise molecular baseada em 16S rDNA foi a mais sensível e pode ser usada em combinação com um ensaio molecular de *Escherichia coli* para avaliar a qualidade água potável. Neste trabalho foi utilizada a técnica Nested-PCR (BOX A1R) para a análise da diversidade genética de isolados de água de *E. coli* do Rio Cuiabá. Essa técnica mostrou ser eficiente no empenho de alcançar o objetivo proposto, portanto esta técnica pode ser útil no planejamento de estratégias de controle bacteriano, na implementação, manutenção e avaliação da qualidade das águas.

CONCLUSÃO

A técnica de PCR auxiliou na discriminação de bactérias *E. coli*, isoladas da água do Rio Cuiabá, geneticamente relacionadas, confirmando um alto grau de similaridade e uma diversidade considerável, proveniente do uso e ocupação do solo nesta bacia hidrográfica. A técnica se mostrou uma ferramenta útil na caracterização de fontes de contaminação fecal;

As amplificações da PCR visando o 16S rDNA, utilizando o iniciador BOX A1R, foram 100% positivas para os isolados bacterianos;

Considerando os resultados obtidos a partir da análise e similaridade gênica das *E. coli* isoladas da água de uma seção no perímetro urbano do Rio Cuiabá foi possível confirmar que 97,23% das cepas isoladas foram similares apresentando o mesmo padrão gênico;

As cepas dissimilares de *E. coli* encontradas nos três pontos amostrais totalizaram 2,77%. De acordo com estudos anteriores as cepas dissimilares podem conter variações genéticas, possivelmente patogênicas;

O fator sazonalidade influenciou na diversidade gênica das *E. coli*. No período de chuva a diversidade foi maior 18,36% que no período de estiagem, confirmando a contribuição dos materiais alóctones;

A cepa 283 foi dissimilar a todas as outras cepas, necessitando de melhor investigação;

Os resultados confirmam que ações antrópicas acarretam perturbações e alterações na qualidade da água superficial por meio de lançamentos de efluentes pontuais e difusos, possibilitando diversidade gênica nas espécies de *E. coli*;

Anteriormente foi mostrado que as populações de *E. coli* ambientais são mantidas por uma entrada constante de material fecal de várias fontes, tais como ruminantes, suínos, cabras, cães, gatos e seres humanos, possíveis reservatórios de *E. coli* patogênicas. Neste estudo, algumas cepas de *E. coli*, principalmente aquelas dissimilares e diferenciadas, podem possuir genes de virulência ou sejam estirpes patogênicas. Portanto, uma avaliação mais específica quanto à patogenicidade de *E. coli* nas águas do Rio Cuiabá são necessárias e recomendáveis, com a finalidade de assegurar melhor gestão da saúde pública.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. Traduzido Ana Letícia de Sousa Vanz *et al*., 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

ANASTASI, E. M.; MATTHEWS, B.; STRATTON, H. M.; KATOULIA, M. Pathogenic *Escherichia coli* Found in Sewage Treatment Plants and Environmental Waters. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 78, n. 16, p. 5536–5541, 2012.

APHA – **American Public Health Association**, AWWA – American Water Works Association, WPCF - Water Pollution Control Federation. Standard Methods. 22.ed., Ed APHA: Washington, 2012.

BARRETO, C. J. F. **Estudo Qualitativo E Quantitativo Da Água Do Rio Cuiabá Na Seção Hidrométrica Do Porto**. 2013. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos), Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2013.

BORGES, L. G.A.; VECHIA, V. D.; CORÇÃO, G. Characterisation and genetic diversity via REP-PCR of *Escherichia coli* isolates from polluted waters in southern Brazil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, p. 173-180, 2003.

BRASIL. Ministério de Estado da Saúde. Portaria 2.914, de 12 de dezembro de 2011: Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Urbano e Meio Ambiente. CONAMA. Resolução n. 357 de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.53, de 18 de março de 2005, Seção 1, páginas 58-63.

BROSIUS, J.; PALMER, M. L.; KENNEDY, P. J.; NOLLER, H. F. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli* (recombinant plasmids/DNA sequence analysis/rrnB cistron). **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 75, n.10, p. 4801-4805, 1978.

BROWNELL, MIRIAM J**., Use of BOX-PCR Subtyping of *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. to Determine the Source of Microbial Contamination at a Florida Beach.** 2006. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Departamento de Biologia, Faculdade de Artes e Ciências, Universidade da Flórida do Sul, Estados Unidos, 2006.

BUCHAN, A.; ALBER, M.; HODSON, R. E. Strain-specific differentiation of environmental *Escherichia coli* isolates via denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of the 16S-23S intergenic spacer region **FEMS Microbiology Ecology,** v. 35, p. 313-321, 2001.

CABRAL, J. P. S. Water Microbiology. Bacterial Pathogens and Water**.** Review **. International Journal of Environmental Research and Public Health,** v. 7, p. 3657-3703, 2010.

CAMPOS, L.C. TRABULSI, L.R.1999. **Microbiologia**. Atheneu. 3.ed. p. 215 – 228.

CANAL, NATÁLIA. **Caracterização De Resistência A Antimicrobianos E Diversidade Genética Em *Escherichia coli* Isolada De Amostra De Água Da Lagoa Dos Patos, RS.** 2010. 88f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente), Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CARLOS, C.; ALEXANDRINO, F.; STOPPE, N. C.; SATO, M. I. Z.; OTTOBONI, LAURA M. M. Use of *Escherichia coli* BOX-PCR fingerprints to identify sources of fecal contamination of water bodies in the State of São Paulo, Brazil. **Journal of Environmental Management**. v. 93, p. 38-43, 2012.

CARLOS C.; PIRES M.M.; STOPPE N.C.; HACHICH E.M., SATO M.Z.; GOMES T. A. T.; AMARAL L.A.; OTTOBONI L. M. M. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and application in the identification of the major animal source of fecal contamination **BMC Microbiology,** v. 10, n. 161, 2010.

CARVALHO, N. O. **Hidrossedimentologia Prática**. 2° Edição Revisada e Ampliada, Rio de Janeiro/RJ: Interciência, 2008. 600p.

CASAREZ, E. A.; PILLAIB, S. D.; DI GIOVANNIA, G. D. Genotype diversity of *Escherichia coli* isolates in natural waters determined by PFGE and ERIC-PCR. **Water Research,** v. 41, p. 3643-3648, 2007.

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA gene sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews,** v. 17, n. 04, p. 840-862, 2004.

CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied end Environmental Microbiology,** v. 66, n. 10, p. 4555 – 4558, 2000.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. Significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimentos e metodologias analíticas e de amostragem. **Série Relatórios**. São Paulo: CETESB, 2009, 44 p.

CUNHA, A. H.; TARTLER, N.; SANTOS, R. B.; FORTUNA, J. L. Análise microbiológica da água do Rio Itanhém em Teixeira de Freitas-BA. **Revista Biociências, Universidade de Taubaté**. v. 16, n. 2, p. 86-93, 2010.

DE BRUIJN F. J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of Rhizobium meliloti isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 7, p. 2180-2187, 1992.

DAVIS, M. L.; CORNWELL, D. A. **Introduction to environmental engineering**. 3.ed. Boston, WCB McGraw-Hill. 1998.

DOMBEK, P. E.; JOHNSON, L. K.; ZIMMERLEY, S. T.; SADOWSKY, M. J. Use of Repetitive DNA Sequences and the PCR To Differentiate *Escherichia coli* Isolates from Human and Animal Sources. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n. 6, p. 2572–2577, 2000.

DONNENBERG, M. S.; WHITTAM, T. S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 107 n. 05, 2001.

EMBRAPA. Oliveira, M. C. S. et al. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia da polimerase (recurso eletrônico). **Embrapa Pecuária Sudeste**, São Carlos, 2007.

ESCOBAR-PÁRAMO P.; GRENET K.; LEMENAC'H A.; RODE L.; SALGADO E.; AMORIN C.; GOURIOU S.; PICARD B.; RAHIMY C.; ANDREMONT A. Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates **Applied and Environmental Microbiology,** v.70, p. 5698-5700, 2004.

FUENTEFRIA, D. B.; FERREIRA, A. E.; CORÇÃO, G. Antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa from hospital wastewater and superficial water: Are they genetically related? **Journal of Environmental Management**, v. 92, p. 250-255, 2011.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011. 286p.

GARCIA, P. M., ARCURI, E. F., BRITO, M. A. V. P., LANGE, C. C., BRITO, J. R. F., CERQUEIRA, M. M. O. P. Detecção de *Escherichia coli* O157:H7 inoculada experimentalmente em Amostras de leite cru POR Método convencional e PCR multiplex. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 5, p. 1241-1249. 2008.

GIRONES, R.; FERRÚS, M. A.; ALONSO, J. L.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; CALGUA, B.; CORRÊA, A. A.; HUNDESA, A.; CARRATALA, A.; BOFILL-MAS, S. Molecular detection of pathogens in water - The pros and cons of molecular techniques. **Water Research**, v. 44, p 4325-4339, 2010.

GODINHO, V. M. **Investigação De Bactérias Patogênicas Por Técnicas Moleculares Em Um Sistema De Tratamento De Esgotos Composto Por Reator Uasb E Lagoas De Polimento.** 2010**.** 182f. Tese (Doutorado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos), Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

GOTO, D. K.; YAN, T. Genotypic Diversity of *Escherichia coli* in the Water and Soil of Tropical Watersheds in Hawaii. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 12, p. 3988–3997, 2011.

HAMELIN, C.; BRUANT, G.; EL-SHAARAWI, A.; HILL, S; EDGE, T. A.; FAIRBROTHER, J.; HAREL, J.; MAYNARD, C.; MASSON, L.; BROUSSEAU, R. Occurrence of Virulence and Antimicrobial Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates from Different Aquatic Ecosystems within the St. Clair River and Detroit River Areas. **Applied Environmental Microbiology,** v. 73, n. 2, p. 477-484, 2007.

HARWOOD, V. J.; STALEY, C.; BADGLEY, B. D.; BORGES, K.; KORAJKIC, A. Microbial source tracking markers for detection of fecal contamination in environmental waters: relationships between pathogens and human health outcomes. **FEMS Microbiology Reviews**, v.38, p. 1-40, 2014.

HERZER, P. J.; INOUYE, S.; INOUYE, M.; WHITTAM, T. S. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. **Journal Bacteriology,** v. 172, n. 11, p. 6175 - 6181, 1990.

HUANG, S. W.; HSU, B. M.; SU, Y. J.; JI, D. D.; LIN, W. C.; CHEN, J. L.; SHIH, F. C.; KAO, P. M.; CHIU, Y. C. Ocorrência de genes *Escherichia coli* diarreiogênicas em água bruta de estações de tratamento de água. . **Environmental Science Pollution Research**, v. 19, n. 7, p. 2776-2783, 2012.

HUYS G., CNOCKAERT, M., MICHAEL JANDA, J., SWINGS, J. *Escherichia albertii* sp. nov., a diarrhoeagenic species isolated from stool specimens of Bangladeshi children. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v. 53, p. 807–810, 2003.

ISHII, S., SADOWSKY, M.J. *Escherichia coli* in the environment : implications for water quality and human health. **Microbes and Environments,** v. 23, p. 101-108, 2008.

JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Société Vaudense des Sciences Naturelles**, v. 44, p. 223-270, 1908.

KHAN, I. U. H.; GANNON,V.; KENT, R.; KONING, W.; LAPEN, D. R.; MILLER, J.; NEUMANN, N.; PHILLIPS,R.; ROBERTSON, W.; TOPP, E.; BOCHOVE, E. V.; EDGE, T. A. Development of a rapid quantitative PCR assay for direct detection and quantification of culturable and non-culturable *Escherichia coli* from agriculture watersheds. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p. 480-488, 2007.

KAPER, J. B., NATARO, J. P., MOBLEY, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology,** v. 2, p. 123-140, 2004.

KORZENIEWSKA, E.; HARNISZ, M. Culture-Dependent and Culture-Independent Methods in Evaluation of Emission of Enterobacteriaceae from Sewage to the Air and Surface Water. **Water Air Soil Pollut,** v. 223, p. 4039-4046, 2012.

KOZDRKOJ, J.; VAN ELSAS, J. D.; Structural diversity of microbial communities in arable soils of a heavily industrialised area determined by PCR-DGGE fingerprinting and FAME profiling. **Applied Soil Ecology**, v.17, p.31-42, 2001.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and environment. **FEMS Microbiology Reviews.** v. 24, p.107-117, 2000.

KUMARASWAMY, R ; AMHA, Y. M.; ANWAR, M. Z.; HENSCHEL, A.; RODRÍGUEZ, J.; AHMAD, F. Molecular Analysis for Screening Human Bacterial Pathogens in Municipal Wastewater Treatment and Reuse. **Environmental Science Technology**, v. 48, p. 1161-11619, 2014.

LANE, D. J.; PACE, B.; OLSEN, G.J.; STAHL, D. A.; SOGIN, M. L.; PACE, N. R. Evolution Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses (reverse transcriptase/dideoxynudeotide). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, p. 6955-6959. 1985.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. *In* STACKEBRANDT, E., GOODFELLOW. M. (Eds.). **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**. New York (Wiley), p. 115–148, 1991.

LEE A.; WONG, E. Optimization and the Robustness of BOX A1R PCR for DNA Fingerprinting Using Trout Lake *E. coli* Isolates. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology**, v. 13, p. 104-113, 2009.

LIMA, E. B. N. R. **Modelagem Integrada para Gestão da Qualidade da Água da Bacia do Rio Cuiabá**. 2001. 184f. Tese (Doutorado em Ciências em Engenharia Civil), Programa de Pós-Graduação de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2001.

LIMA, Z. M. **Variabilidade e Diversidade Genética de Comunidades Microbianas em Amostras de Água no Perímetro Urbano do Rio Cuiabá, Mato Grosso**. 2009. 198f. Tese (doutorado em Microbiologia), Instituto De Microbiologia Professor Paulo De Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

LIU, S.; JIN, D.;LAN, R.;WANG, Y.; MENG, Q.; DAÍ, P.; LU, S.;HU, S.; XU, J. Marmotae *Escherichia* sp. nov., isoladas de fezes de Marmota himalayana. **International Jounal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 65, p. 2130-2134, Julho, 2015.

LIU, Y.; GILCHRIST, A.; JING ZHANG, J.; LI, X. F. Detection of Viable but Nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 Bacteria in Drinking Water and River Water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1502-1507, 2008.

MACEDO, J. N. A.; LOPES, J. L. S.; DAMALO, J. C. P. **Técnicas de Biologia Molecular e Clonagem.** v. 4, Brasília-DF: W Educacional Editora e Cursos Ltda, 2011(Caderno).

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

MAHEUX, A. F.; BOUDREAU, D. K.; BISSON, MARC-ANTOINE; DION-DUPONT, V.; BOUCHARD, S.; NKURANGA, M.; BERGERON, M. G.; RODRIGUEZ, M. J. Molecular Method for Detection of Total Coliforms in Drinking Water Samples**. Applied and Environmental Microbiology.** v. 80, n. 14**,** p. 4074-4084, 2014.

MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia 2011**. Rio de Janeiro: Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2012.

MASTERS, N.; WIEGAND, A.; AHMED, W.; KATOULI, M. *Escherichia coli* virulence genes profile of surface Waters as an indicator of water quality. **Water Research**, v. 45, p. 6321-6333, 2011.

McLELLAN, S. L. Genetic Diversity of *Escherichia coli* Isolated from Urban Rivers and Beach Water. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4658-4665, 2004.

MOHAPATRA, B. R.; BROERSMA, K.; MAZUMDER, A. Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. **FEMS Microbiological Lett**, v.277, p. 98-106, 2007.

NASCIMENTO, A. M.; VAN DER SAND, S. T. O uso de PCR na detecção de *Escherichia coli* enterotoxigênica em amostras de água de esgoto. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 2, p. 181-188, 2007.

NATARO, J. P., KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews,** v. 11, p. 142 e 201, 1998.

OLIVEIRA, K. W. ; GOMES, F. C. O.; GUILHERME BENKO, G.; PIMENTA, R. S.; MAGALHÃES. P. P.; MENDES, E. N.; MORAIS, P. B. Antimicrobial resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from bathing waters of the Lajeado reservoir in Tocantins, Brazil. **Revista Ambiente & Água** - An Interdisciplinary Journal of Applied science: v. 7, n. 2, 2012.

ORSI, R. H.; STOPPE, N. C.; SATO, M. I. Z.; GOMES, T. A. T.; PRADO, P. I.; MANFIO, G. P.; OTTOBONI, L. M. M. Genetic variability and pathogenicity potential of *Escherichia coli* isolated from recreational water reservoirs. **Research in Microbiology**. v. 158, p. 420-427, 2007.

ORSI, R. H.; STOPPE, N. C.; SATO, M. I. Z.; PRADO, P. I.; OTTOBONI, L. M. M.; Identification of *Escherichia coli* from groups A, B1, B2 and D in drinking water in Brazil. **Journal of Water and Health**, v. 5, p. 2, 2007.

ORSI, R. H.; STOPPE, N. C.; SATO, M. I. Z.; PRADO, P. I.; OTTOBONI, L. M. M.; Phylogenetic group distribution among *Escherichia coli* isolated from rivers in São Paulo State, Brazil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1573-1577, 2008.

PUPO, G. M.; KARAOLIS, D. K. R.; LAN, R.; REEVES, P. R. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 7, p. 2685-2692, 1997.

RAHMAN M.T., UDDIN M.S., SULTANA R., MOUE A., SETU M. Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. **Anwer Khan Modern Medical College Journal**, v.4, n. 1, 2013.

RAUCH, E. M., BAR-YAM, Y. Theory predicts the uneven distribution of genetic diversity within species. **Nature,** v. 43, p. 449-452, 2004.

RADEMAKER, J. L. W.; LOUWS, F. J.; DE BRUIJN, F. J. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprint. **Molecular Microbial Ecology Manual,** v. 3.4.3, p.1-27, 1998.

RESENDE, A. C. B.; SOARES, R. B. A.; SANTOS, D. B.; MONTALVÃO, E. R.; CARMO FILHO, J. R. Detection of antimicrobial-resistant gram-negative bactéria in hospital effluents and in the sewage treatment station of Goiânia, Brazil. **O Mundo da Saúde,** São Paulo, v. 33, n. 4, p. 385-391, 2009.

RITTER, L.; SOLOMON, K.; SIBLEY P.; HALL, K.; KEEN, P.; MATTU, G.; LINTON, B. Sources, Pathways, and Relative Risks of Contaminants in Surface Water and Groundwater:

A Perspective Prepared For The Walkerton Inquiry. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 65, p. 1-142, 2002.

ROBINS-BROWNE, R. M., HARTLAND, E. L. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. **Jounal of Gastroenterology e Hepatology**. v. 17, p. 467-475, 2002.

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

SALATI, E. et al. Água e o Desenvolvimento Sustentável. In: REBOUÇAS, A. C.; BRAGA, B.; TUNDISI, J. G. (org.). **Águas Doces no Brasil: Capital Ecológico, uso e conservação**. São Paulo: Editora Escrituras. 1999. Cap. 2.

SAMBROOK J.; FRITSCH E.F.; MANIATIS T. In: Molecular Cloning - A Laboratory Manual. **Transfer of DNA from agarose gels to solid supports**, v. 2, p. 934-935. 1989.

SCHUROFF, P. A.; BURGOS,T. N.; LIMA, N.R.; LOPES, A. M.; PELAYO, J.S. Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli*,potencialmente patogênicas oriundas de estação de tratamento de água. **Arquivos de Ciências da Saúde,** v. 21, n. 3, p. 93-98, 2014.

SELANDER, R. K.; KORHONEN, T. K.; VAISANEN-RHEN, V.; WILLIAMS, P. H.; PATTISON; P. E.; CAUGANT, D. A. Genetic relationships and clonal structure of strains of *Escherichia coli* causing neonatal septicemia and meningitis. **Infection Immunity**, v. 52, n. 1, p. 213–222, 1986.

SEMA. Mato Grosso. **Plano Estadual de Recursos Hídricos**. / SEMA – Secretaria de Estado do Meio Ambiente. Cuiabá: KCM Editora, 2009.

SIGLER, V.; PASUTTI, L. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to differentiate *Escherichia coli* populations in secondary environments. **Environmental Microbiology,** 2006.

SILVA, L. H. P. CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E BIOTECNOLOGIA: realidades e virtualidades. **São Paulo em Perspectiva**, v. 14, n. 3, 2000.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES SOBRE SANEAMENTO (SNIS 2013). **Sistema de Coleta de Dados. Coleta de Água e Esgotos.**

SOUSA, C. P. *Escherichia coli* as a specialized bacterial pathogen. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 6, n. 2, p. 341-352, 2006.

STACKEBRANDT, E.; FREDERIKSEN, W.; GARRITY, G. M.; GRIMONT, P. A. D. ; KAMPFER, P.; MAIDEN, M.C.J.; NESME, X.; ROSSELLO-MORA, R.; SWINGS, J.; TRUPER, H. G.; VAUTERIN, L.; WARD; A. C.; WHITMAN, W. B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v.52, p. 1043-1047, 2002.

STOPPE N. C.; SILVA, J. S.; TORRES, T. T.; CARLOS, C.; HACHICH, E. M.; SATO, M. I. Z.; SARAIVA, A. M.; OTTOBONI, L M. M. Clustering of water bodies in unpolluted and polluted environments based on phylogroup abundance using a simple interaction database. **Genetics and Molecular Biology.** v**.** 37, n. 4, p. 694-701, 2014.

TOZE, S. PCR and The Detection of Microbial Pathogens In Water And Wastewater. Review. **Water Research,** v. 33, n. 17, p. 3545-3556, 1999.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4.ed. Editora Atheneu, 2004. 718 p.

TRATABRASIL, 2014. CAB não trata 73% do esgoto de Cuiabá. **Instituto Trata Brasil** Disponível em: < http://www.tratabrasil.org.br/cab-nao-trata-73-do-esgoto-de-cuiaba> Acesso em 09/01/2015.

TUNDISI, J. G; MATSUMURA-TUNDISI, T. **Limnologia**. São Paulo: Oficina de Textos, 2008. 631p.

VALENTE, P.; GOUVEIA, F. C.; LEMOS, G. A.; PIMENTEL,D.; ENDONÇAHAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. PCR-amplified ITS length variation within the yeast genus Metschnikowia. **Journal General Applied Microbiology**, v. 43, p. 179-181, 1997.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJIN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic Fingerprint of Bacteria Using Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction**. Methods in Molecular and Cellular Biology**. v. 5, p. 25-40, 1994.

VIEIRA, R. H. S. F.; RODRIGUES, D. P.; BARRETO, N. S. E.; SOUSA, O. V.; TÔRRES, R. C. O.; RIBEIRO, R. V.; SAKER-SAMPAIO, S.; NASCIMENTO, S. M. M. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática.** São Paulo: Livraria Varela, 2003. p. 125-139.

VILGALYS, R.; HESTER, M. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from Several Cryptococcus species. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 8, p. 4238-4246, 1990.

VON SPERLING, M.. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. In **Princípios do tratamento Biológico de águas residuárias**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2013. 211p.

WAYNE, L. G.; BRENNER, D. J.; COWELL, R. R.; GRIMONT, P. A. D.; KANDLER, O.; KRICHEVSKY, L., MOORE, L. H.; MOORE, C.; MURRAY, R. G. E.; STACKEBRANDT, E.; STARR, M.P.; TRUPPER, H.G. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic and Bacteriology**, v. 37, p. 463-464. 1987.

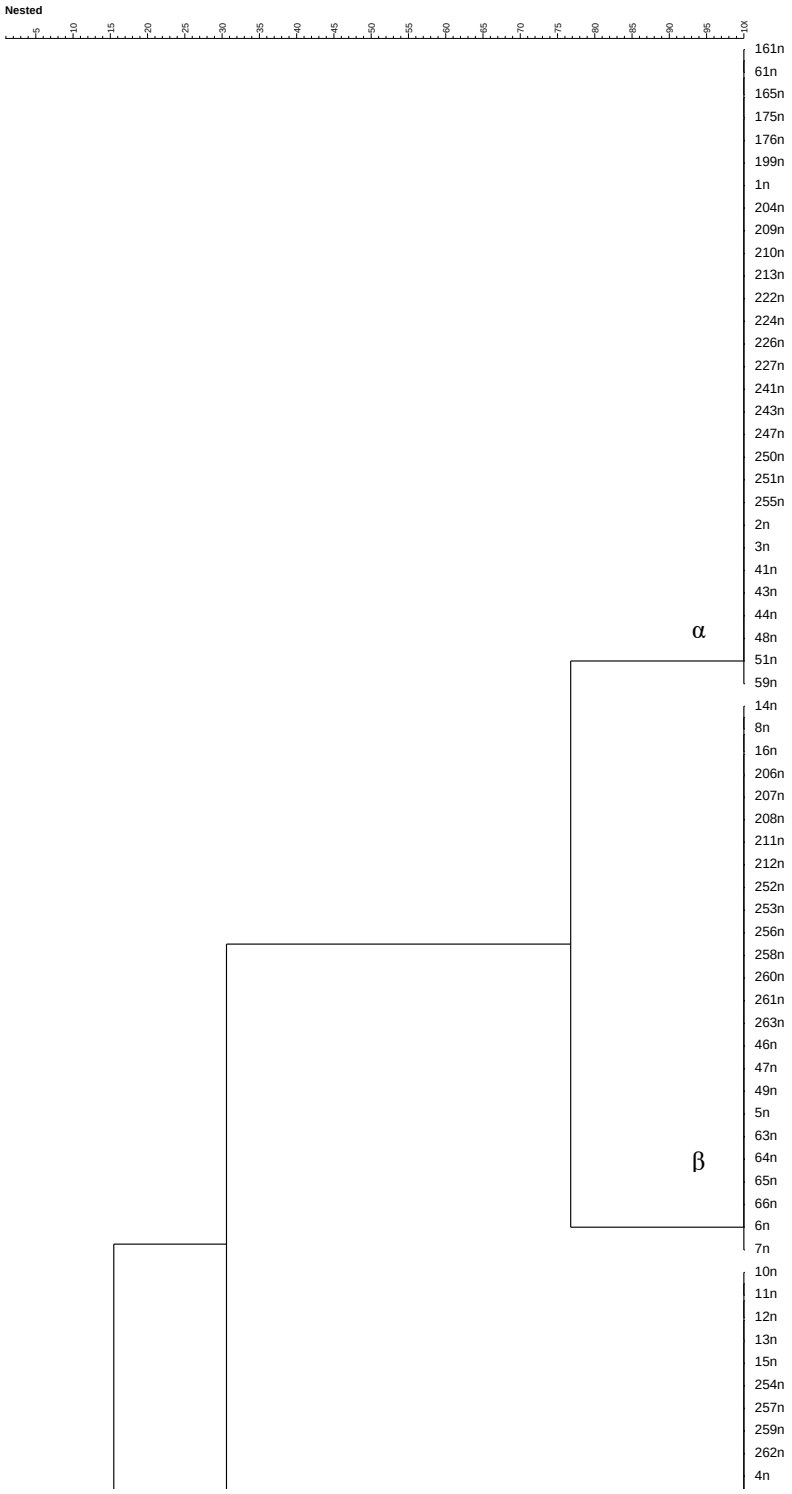
WEISBURG, W. G.; SUSAN M. BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703. 1991.

WHO WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO, 2014). **Water supply, sanitation and hygiene development**. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/healthcare_waste/en/> Acesso em: 28/02/2015.

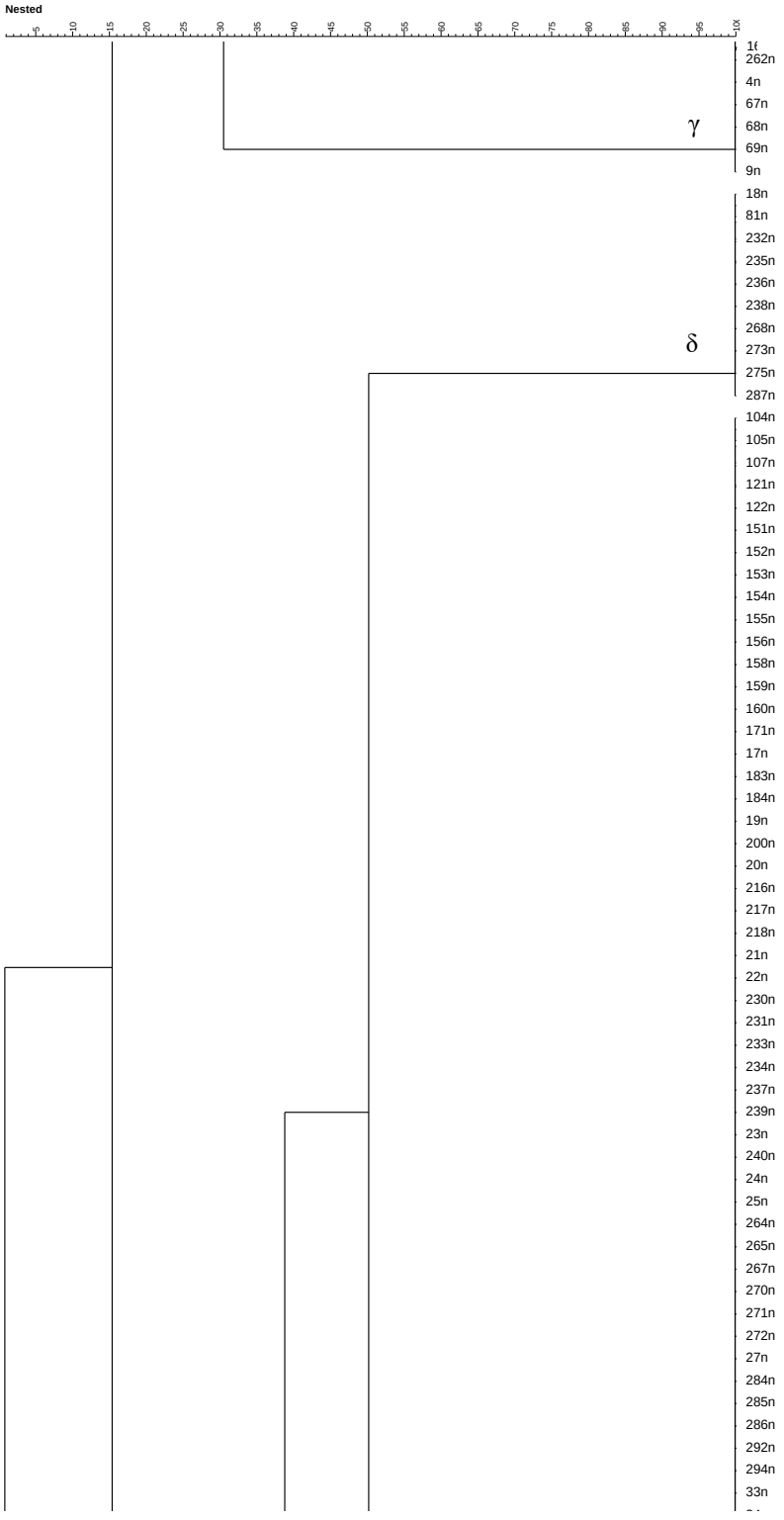
ZHOU, J.; BRUNS, M. A.; TIEDJE, J. M. DNA Recovery From Soils of Diverse Composition. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 316-322, 1996.

APÊNDICE A

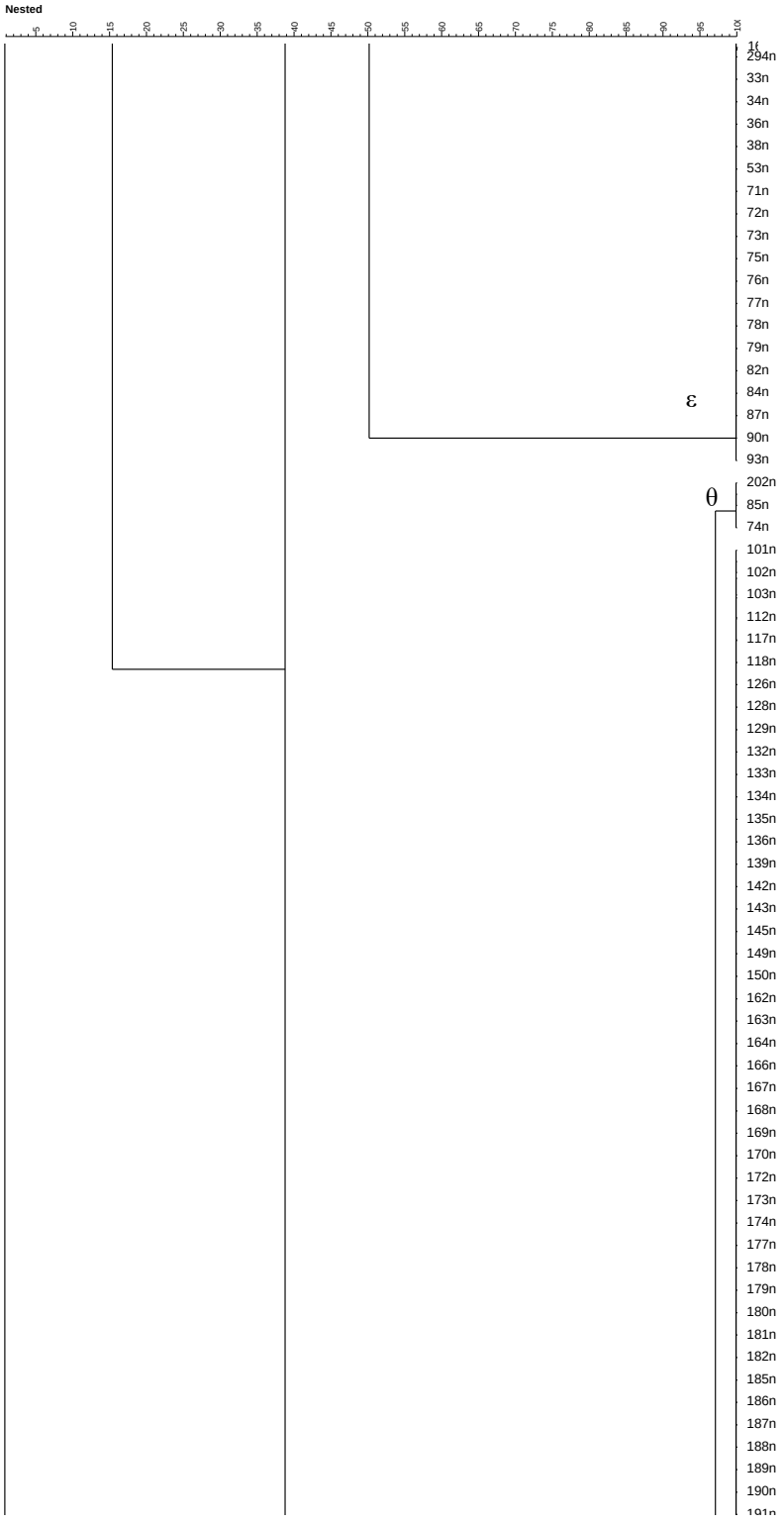
Diversidade gênica, por PCR – 16S, de todas as 253 cepas de *E. coli* isoladas da água do Rio Cuiabá-MT, referente as seis coletas dos Pontos Amostrais P1, P2 e P3. Agrupamentos α, β, γ, δ, ε, θ, λ e ρ. Cepas similares Porcentagem ≥ 70%.



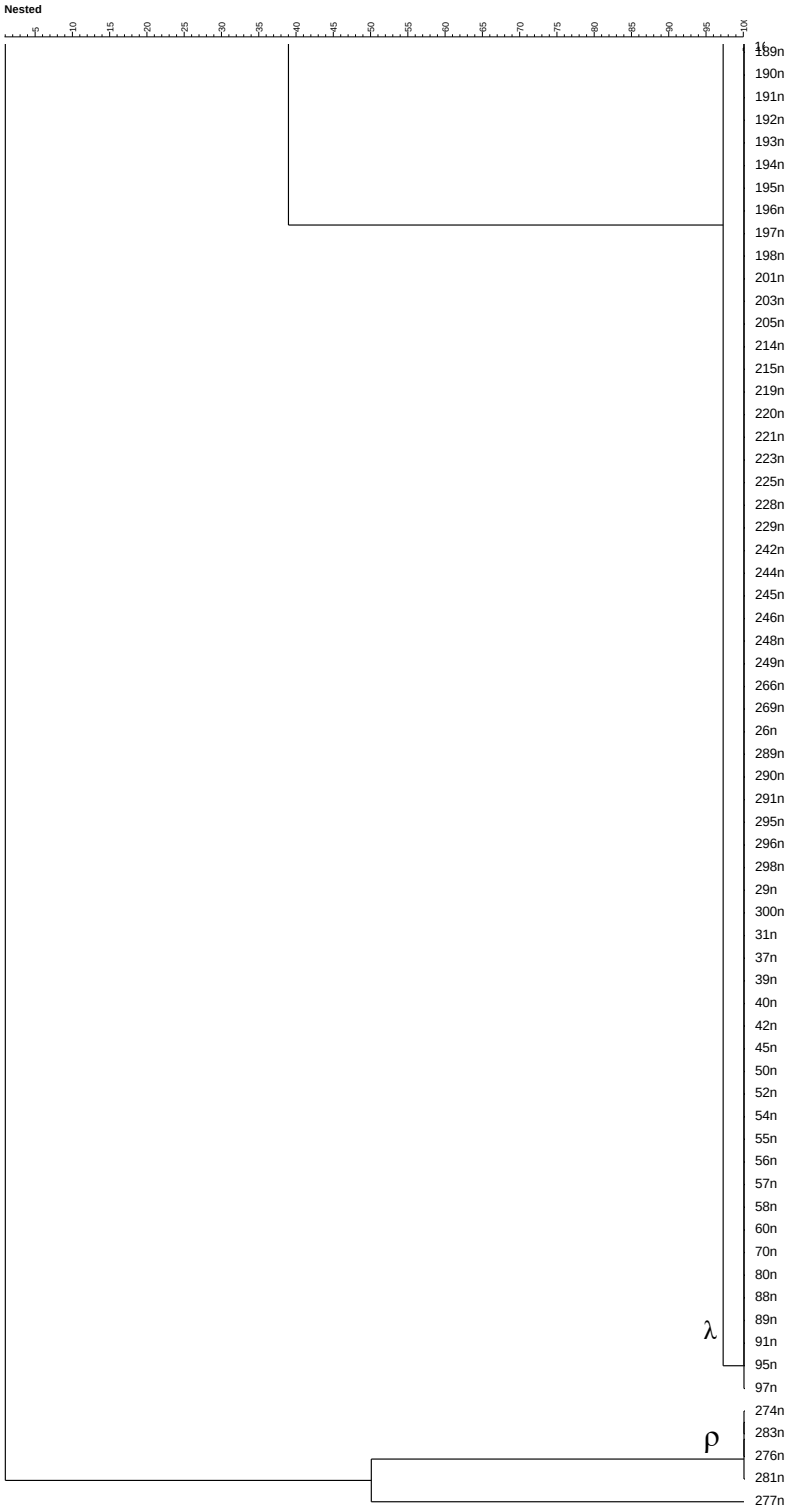
Continuação - Diversidade gênica, por PCR – 16S, de todas as 253 cepas de *E. coli* isoladas da água do Rio Cuiabá-MT, referente as seis coletas dos Pontos Amostrais P1, P2 e P3. Agrupamentos α, β, γ, δ, ε, θ, λ e ρ. Cepas similares Porcentagem ≥ 70%.



Continuação - Diversidade gênica, por PCR – 16S, de todas as 253 cepas de *E. coli* isoladas da água do Rio Cuiabá-MT, referente as seis coletas dos Pontos Amostrais P1, P2 e P3. Agrupamentos α, β, γ, δ, ε, θ, λ e ρ. Cepas similares Porcentagem ≥ 70%.

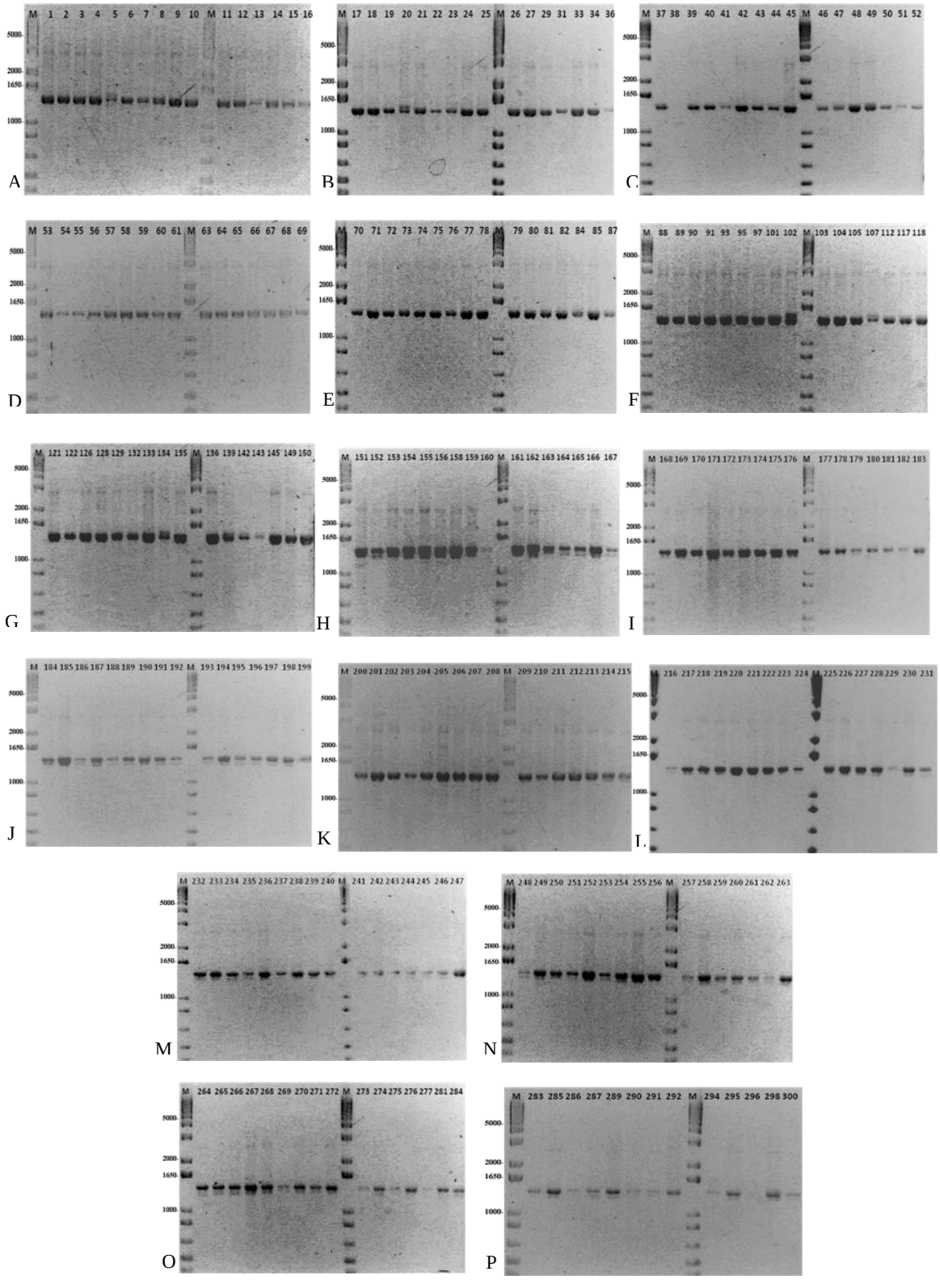


Continuação - Diversidade gênica, por PCR – 16S, de todas as 253 cepas de *E. coli* isoladas da água do Rio Cuiabá-MT, referente as seis coletas dos Pontos Amostrais P1, P2 e P3. Agrupamentos α, β, γ, δ, ε, θ, λ e ρ. Cepas similares Porcentagem ≥ 70%.



APÊNDICE B

Amplificação dos Produtos da PCR 16s rDNA dos 252 Isolados de *E. Coli* dos Pontos Amostrais P1 (B, D, F, H, J, K, N, O) , P2 (A, D, F, G, I, L, M, O) e P3 (B, C, D, E, F, G, I, J, M, N, O, P). M = Marcador de peso molecular 1Kb. Cepas do Ponto P1= 18 a 34, 55, 95 a 112, 151 a 167, 199 a 215, 252 a 266. Cepas do Ponto P2 = 1 a 17, 54, 117 a 132, 168 a 181, 216 a 232, 267 a 281. Cepas do Ponto P3 = 36 a 53, 56 a 93,133 a 150, 182 a 198, 233 a 251, 283 a 300.



ANEXO

Resultados Analíticos da Qualidade da Água do Rio Cuiabá-MT, nos pontos amostrais 1/6 (P1-margem esquerda), 1/2 (P2-Canal principal) e 5/6 (P3-margem direita). Fonte: Barreto (2013).

Data e Largura	Posição	Hora da coleta	Temperatura (°C)		Prof. (m)	Chuva 24h(mm)	pH	O.D. (mg/L)	Condut. (µS/cm²)	Microbiologia(NMP/100mL)		DBO (mg/L)	Nitrato (mg/L)	Nitrogênio Total	Fósforo Total	Turbidez (NTU)	Cor Verd.	Solidos Tot.(mg/L)
			Água	Ar						Coli Total	*E. coli*							
17/8/12 L = 138 m	1/6	11:42	27,11	34	7,74	0,00	6,64	7,64	61	>2419	7270	1,27	0,2	11,1	0,06	15,1	14,0	95,0
	1/2	12:05	27,24	33	3,01		7,33	7,90	58	>2419	81640	1,17	0,3	9,5	0,06	10,1	14,0	89,5
	5/6	12:40	27,33	35	2,20		7,45	7,47	61	>2419	10462	0,47	1,0	10,0	0,07	11,3	14,6	177,0
27/9/12 L = 140 m	1/6	11:40	26,2	29	7,88	6,75	6,30	5,11	68	135	10	0,78	0,1	0,2	0,20	11,1	29,9	59,5
	1/2	12:15	27,5	29	3,21		6,67	4,93	72	31	10	0,73	0,1	0,3	0,24	9,94	26,6	59,5
	5/6	13:00	27,6	32	2,19		5,26	4,68	61	1539	399	0,81	0,1	0,2	0,19	10,2	28,2	55,0
23/10/12 L = 138 m	1/6	11:33	30,2	32	7,78	0,00	6,61	5,23	55	>2419	2419	0,69	0,1	0,7	0,15	12,6	26,5	71,0
	1/2	12:30	30,3	38	3,15		7,20	4,90	63	24192	1986	0,88	0,4	1,1	0,17	13,5	24,8	69,0
	5/6	13:21	32,2	36	2,31		7,54	5,60	54	19863	1203	0,67	0,5	1,2	0,15	12,9	24,1	70,0
11/12/12 L = 144 m	1/6	11:10	31,6	32	7,68	8,95	6,80	5,01	62	6893	689	0,1	0,2	0,2	0,38	63,4	28,9	146,0
	1/2	11:50	33,4	37	3,67		7,14	5,45	58	9804	345	0,3	0,1	0,4	0,36	63,1	34,0	136,0
	5/6	12:20	35,0	35	2,73		7,33	5,09	70	19863	616	0,5	0,1	0,5	0,37	68,1	103	143,5
23/01/13 L = 152 m	1/6	12:20	29,2	30	8,22	32,15	6,31	4,22	46	>24191,7	910	0,91	<0,1	0,6	0,49	115	99,3	211,8
	1/2	13:00	30,7	31	5,84		6,37	4,1	43	>24191,7	728	0,89	0,1	1,4	0,45	105	48,3	217,3
	5/6	13:30	30,9	32	4,89		6,79	3,99	42	>24191,7	650	0,62	0,1	0,3	0,52	108	48,7	195,0
26/02/13 L = 147 m	1/6	11:07	30,7	33	9,18	15,65	6,53	3,61	55	2495	387	0,44	<0,1	0,1	0,07	34,2	69,2	87,5
	1/2	11:40	30,6	35	5,10		6,93	4,05	65	11199	548	0,41	0,1	0,4	0,10	31,9	26,9	84,5
	5/6	12:15	32,9	36	4,10		7,11	4,20	52	8664	1191	0,51	0,1	0,6	0,10	37,1	31	90,0

*Resultados em vermelho estão fora dos limites recomendados pela Resolução CONAMA n° 357/2005 para rios de Classe 2.