

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
CAMPUS CUITÉ

RANDSON NORMAN SANTOS DE SOUZA

UTILIZAÇÃO DO DGGE PARA ANÁLISE INICIAL DE
COMPONENTES MICROBIOLÓGICOS PRESENTES NA ÁGUA
DO AÇUDE VÁRZEA GRANDE NA CIDADE DE PICUÍ - PB.

CUITÉ-PB
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CAMPUS DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE EDUCAÇÃO
COORDENAÇÃO DO CURSO DE BIOLOGIA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO (TCC)

RANDSON NORMAN SANTOS DE SOUZA

UTILIZAÇÃO DO DGGE PARA ANÁLISE INICIAL DE
COMPONENTES MICROBIOLÓGICOS PRESENTES NA ÁGUA
DO AÇUDE VÁRZEA GRANDE NA CIDADE DE PICUÍ - PB.

Apresentação:

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado a Coordenação de Curso da Universidade Federal de Campina Grande como pré-requisito parcial para a obtenção do diploma de graduação em Licenciatura em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Genética de Microrganismos
Linha de Pesquisa: Engenharia Genética e Microbiologia

CUITÉ-PB
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

S729u Souza, Randson Norman Santos de.

Utilização do DGGE para análise inicial de componentes microbiológicos presentes na água do açude Várzea Grande na cidade de Picuí - PB. / Randson Norman Santos de Souza. – Cuité: CES, 2015.

65 fl.

Monografia (Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2015.

Orientador: Igor Luiz Vieira de Lima Santos.

1. Água - análise. 2. Microbiologia - água. 3. DGGE. I. Título.

CDU 628.1

TERMO DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO ELABORADO POR:

Randson Norman Santos de Souza

BANCA EXAMINADORA

Aprovada em: ____/____/____.

1 (Membro 1) Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos
Universidade Federal Campina Grande-UFCG-CES
Orientador

2 (Membro 2) Prof. Dr. Marcus José Conceição Lopes
Universidade Federal de Campina Grande-UFCG-CES

3 (Membro 3) Prof. Dr. Luiz Sodré Neto
Universidade Federal de Campina Grande-UFCG-CES

ATA DE DEFESA ESCANEADA

“Esse trabalho é dedicado a toda minha família em especial aos meus pais: Roberta Silva, Normelito Pereira, minhas irmãs: Noely Rayane e Normélia Raissa e meus avós amados; Guia Silva e Júlio Souza, que sem vocês nada disso seria possível de se tornar realidade”. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu Senhor Deus que sempre me ajudou e me fortaleceu nos momentos de fraqueza, e quando eu pensei em desistir, Ele me mostrou que os planos dele são maiores que minhas vontades. E sem Ele, em primeiro lugar, nada disso se tornaria realidade e possível.

Aos meus pais que sempre se esforçaram em me ajudar em tudo, sempre me deram apoio e força para continuar. Com seus ensinamentos, suas broncas, sua confiança em mim nunca me deixaram cair, e quando eu os caía me ajudavam a levantar e seguir em frente, é grato imensamente de todo coração a eles e toda a minha família que sempre me apoiou nessa minha caminhada.

As minhas amigas Danielle Lima, Talita Kelly e Hévila Morgana que sempre me incentivaram, me ajudaram e me fortaleceram em meio a todas as adversidades, tanto na minha vida acadêmica, como na minha vida pessoal. “GRATIDÃO” esse é o sentimento que tenho por vocês, e as amo verdadeiramente.

Os meus amigos/irmãos; Carlos Willian, Rafael Oliveira que diante toda a minha caminhada e momentos, estiveram comigo me auxiliando nos momentos mais difíceis da minha vida, o qual tem um enorme carinho, respeito e admiração por eles.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos que me recebeu positivamente e me orientou com paciência, esforço e dedicação o qual sem ele não teria como concluir essa etapa da minha vida acadêmica.

Ao Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicado da UFRPE, pela a assistência e colaboração na realização de minha pesquisa.

A todos os professores do CES os quais me ajudaram a construir minha vida profissional acadêmica durante esses meus anos de graduação.

Enfim, aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para mais essa minha realização, fica o sentimento de gratidão.

“Não tentes ser homem bem sucedido, tenta antes ser um homem de valor”.
Albert Einstein

“Deus disse: de maneira alguma te deixarei, nunca, jamais te abandonarei”.
Hebreus 13:5

“Educação é aquilo que a maior parte das pessoas recebe, muitos transmitem e poucos possuem”.
Karl Klaus

RESUMO

Diversas técnicas moleculares para análises microbiológicas têm sido desenvolvidas recentemente, e isto, tem propiciado a aquisição em grandes quantidades de informações genéticas sobre os microrganismos presentes em determinado ambiente, principalmente facilitado com o uso de marcadores moleculares de sequência de DNA. Concomitantemente com o desenvolvimento de técnicas baseadas em cultivo microbiológico estas técnicas da biologia molecular passaram a ser consideradas como principal alvo de estudo de determinados ramos da biologia experimental, devido à tecnologia utilizada que permite revelar a variabilidade do DNA e detectar diferenças entre indivíduos e conseqüentemente entre os riscos sobre a sua patogenicidade. Estudos básicos sobre técnicas de extração de DNA são de extrema importância para o sucesso de trabalhos científicos no campo da biologia molecular, diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar, por DGGE a variabilidade genética dos microrganismos da água do açude várzea grande na cidade de Picuí-PB, aplicando a solução de CTAB para a extração do DNA e posterior análise. E foi possível observar que as extrações ocorridas no presente trabalho demonstraram um rendimento de DNA suficiente e de qualidade para as análises pretendidas e também para futuras análises gênicas pontuais. Os resultados obtidos com as extrações não fugiram dos padrões esperados para este tipo de amostra. Sendo assim conclui-se que o procedimento adotado para a análise pretendida foi suficiente para a obtenção de DNA genômico de qualidade. A aplicação da técnica de DGGE demonstrou ser efetiva para futuras análises temporais do comportamento dos componentes microbiológicos do referido açude e sua possível influência na qualidade de vida da população.

Palavras-Chave: Análise de Água, Microbiologia, Marcadores Moleculares, DGGE.

ABSTRACT

Various molecular techniques for microbiological analyses have recently been developed, and this has led to the acquisition in large amounts of genetic information about microorganisms found in a given environment, especially facilitated by the use of molecular markers from a DNA sequence. Concurrently with the development based in microbiological cultivation, these molecular biology techniques is now considered as the main study subject for certain fields of experimental biology, due to the technology used which allows to reveal the DNA variability and detect the differences among individuals and consequently among the risks in their pathogenicity. Basic studies on DNA extraction techniques are extremely important for the success of scientific papers in molecular biology field, so, this study aimed to evaluate, by DGGE the genetic variability of water microorganisms from Várzea Grande reservoir in the city of Picuí-PB, applying the CTAB solution for DNA extraction and further analysis. It was possible to observe that the extractions performed in this study have demonstrated a sufficient and high quality DNA yield for the intended analyses and also for future specific genetic analyses. The results obtained with these extractions did not diverge from the standards expected for this type of sample. Therefore, we conclude that the process adopted for the intended analysis was sufficient for obtaining a high quality genomic DNA. The DGGE technique showed to be able for future prospection about the microbiological components from the sample place analyzed. This can be answer how the microbiological community is working in this water environment and how they can influence the life quality of population living around there.

Keywords: Water Analyze, Microbiology, Molecular Markers, DGGE.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Demonstração de como acontece as SNPs no DNA, com substituição das bases nitrogenadas_____ **PÁG:14**
- Figura 2.** Representação da divisão física do estado da Paraíba. Destaque para o Município de Picuí_____ **PÁG:25**
- Figura 3.** Localização demarcada em vermelho do Açude Várzea Grande, no município de Picuí-PB_____ **PÁG:25**
- Figura 4.** Açude Várzea Grande (Picuí-PB), sua dimensão e localização_____ **PÁG:26**
- Figura 5.** Material coletado no Açude Várzea Grande, onde foi colocado em um garrafa estéril com capacidade para 1,5 litros. A amostra foi devidamente protegida e higienizada e posteriormente levada para a análise_____ **PÁG:27**
- Figura 6.** Workflow para extração de DNA através da solução CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio)_____ **PÁG:28**
- Figura 7.** Workflow do processo de extração do DNA e aplicação do PCR-DGGE__ **PÁG:30**
- Figura 8.** Extração do DNA genômico das bactérias presentes na amostra de água__ **PÁG:34**
- Figura 9.** Amplificação do gene 16s universal bacteriano por PCR.A amplificação também foi repetida oito vezes_____ **PÁG:35**
- Figura 10.** Aplicação de DGGE para análises da variabilidade de comunidades presentes na amostra aplicação de cada uma das oito amostras no gel de poliacrilamida com gradiente de concentração de desnaturação ureia-formamida de 40 – 60_____ **PÁG:35**

LISTA DE TABELAS E QUADROS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela1- Padrão microbiológico de portabilidade da água para consumo humano _____ **PÁG.21**

Quadro1- Principais reservatórios da Sub bacia do rio Seridó e suas capacidades de acumulação de água. _____ **PÁG.26**

LISTA DE ABREVIATURAS

HG-Composto de mercúrio

IFOCS-Inspetoria de Obras Contra as Secas

DNOCS-Departamento Nacional de Obras Contra a Seca

CONAMA-Conselho Nacional do Meio Ambiente

OMS-Organização Mundial da Saúde

SNPs-Single Nucleotide Polymorphism ou Polimorfismo de Base Única

RAPD- Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP –Restriction Fragment Length Polymorphism

CSGE-Conformação Eletroforese em Gel Sensível

EDTA-Ácido etilenodiamino tetra-acético

ISSR-Inter Simple Sequence Repeats

DGGE-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

CTAB-Brometo de cetil-trimetilamônio

CsCl -Cloreto de Césio

16S -Componente da pequena subunidade dos ribossomos procarióticos.

SSCP-Single Stranded Conformation Polymorphism

CCM-Chemical Cleavage of Mismatch

TGGE-Temperature Gradient Gel Electrophoresis

SUMÁRIO

Ficha Catalográfica.....	i
Termo de Aprovação	ii
Ata de defesa.....	iii
Agradecimentos.....	v
Resumo	vii
Abstract.....	viii
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	x
Lista de Abreviaturas.....	xi
Sumário.....	xii

Conteúdo

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. O município de Picuí-PB e alguns aspectos históricos	3
2.2. A água e o Brasil	4
2.3. Microrganismos na água	5
2.4. Análise da microbiota da água.....	6
2.5. Características Microbiológicas da Água.....	8
2.6. Águas contaminadas	9
2.7. Características da água para o consumo humano.....	10
2.8. Doenças veiculadas pela água	11
2.9. Análise Genética de Microrganismos.....	12
2.9.1 Principais marcadores genético-moleculares.	13
2.9.2 SNPs.....	13
2.9.3 RAPD.....	15
2.9.4 RFLP	16
2.9.5 CSGE	16
2.9.6 ISSR.....	17
2.9.7 DGGE	18
2.10. CTAB (<i>Brometo de cetil-trimetilamônio</i>) para a extração de DNA em células procariontes.....	19
2.11. Parâmetros da qualidade da água.....	20
2.11.1 Classificação e Qualidade das Águas.....	22

3.	JUSTIFICATIVA DE EXECUÇÃO DO TRABALHO	24
4.	OBJETIVOS	25
4.1.	GERAL	25
4.2.	ESPECÍFICOS	25
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1.	Caracterização da Área de Estudo	26
5.2.	Coleta	27
5.3.	Extração do DNA	28
5.3.1	Procedimento de extração de DNA através da solução CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio)	29
5.4.	O Gel de Agarose	30
5.5.	Análise em gel de DGGE	32
5.6.	Amplificação por PCR	30
5.8.	MATERIAL	Erro! Indicador não definido.
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
7.	CONCLUSÕES	40
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
	APÊNDICES	
	46	

1. INTRODUÇÃO

O Açude do município de Picuí–PB é alvo de demasiadas críticas devido acreditarem que o mesmo possui um alto potencial de composto de mercúrio (Hg) devido à área de estudo ser localizado em um ambiente rico em minério, isto pode acarretar diversos tipos de doenças prejudiciais à saúde. Logo para a água ser segura (potável) para o consumo, deve estar livre de microrganismos patogênicos e substâncias químicas prejudiciais à saúde. A água não potável, por outro lado, deve ser purificada antes do seu uso para o consumo humano onde esses métodos de purificação variam, dependendo da fonte de água e da quantidade de água necessária.

Diversas técnicas moleculares para análises microbiológicas têm sido desenvolvidas recentemente, e isto, tem propiciado a aquisição em grandes quantidades de informações genéticas sobre os microrganismos presentes em determinado ambiente, principalmente facilitado com o uso de marcadores moleculares de sequência de DNA. Concomitantemente com o desenvolvimento de técnicas baseadas em cultivo microbiológico estas técnicas da biologia molecular passaram a ser consideradas como principal alvo de estudo de determinados ramos da biologia experimental, devido à tecnologia utilizada que permite revelar a variabilidade do DNA e detectar diferenças entre indivíduos e conseqüentemente entre os riscos sobre a sua patogenicidade.

Essas técnicas têm se mostradas uma poderosa ferramenta no estudo de populações microbianas naturais auxiliando no descobrimento de muitos parâmetros genéticos importantes para a conservação e/ou para a utilização dos recursos genéticos das diversas espécies (HILLIS, 2000). Estes marcadores têm permitido também um grande avanço tanto em estudos que visam à análise da variabilidade genética entre e dentro de populações quanto naqueles que pretendem acessar a variabilidade genética existente entre raças, espécies ou outros grupos taxonômicos (NAGAMINE, 2001).

Através de análises feitas no reservatório de Picuí-PB utilizando métodos genéticos pôde-se realizar um estudo microbiológico básico na água desse reservatório, acarretando mais conhecimento sobre as ocorrências microbiológicas gerais nesse corpo d'água. E com o auxílio de técnicas laboratoriais genéticas como o DGGE, é possível adquirir mais informações sobre a composição específica desses microrganismos e identificá-los.

De acordo com a EMBRAPA (2008), as principais fontes de contaminação dos recursos hídricos são: esgotos de cidades sem tratamento que são lançadas em rios e lagos; aterros sanitários que afetam os lençóis freáticos, os defensivos agrícolas que escoam como

chuva sendo arrastados para rios e lagos, os garimpos que lançam produtos químicos, como o mercúrio, em rios e córregos e as indústrias que utilizam os rios como carreadores de seus resíduos tóxicos.

A finalidade desse trabalho foi realizar uma análise preliminar dos componentes microbiológicos genéticos presentes na água do Açude Várzea Grande na cidade de Picuí-PB, utilizando marcadores genéticos do tipo DNA16S universais. Onde a coleta do material para análise foi realizada em junho/2015. Sendo assim, esta pesquisa tem sua importância para o inicial conhecimento científico sobre a problemática envolvendo a qualidade da água do açude na cidade de Picuí-PB. Onde o conhecimento prévio sobre as condições microbiológicas deste açude de Picuí, com as técnicas de extração e análise de DNA utilizando o DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), pode favorecer sua melhor gestão por parte do poder público bem como esclarecer a população sobre os potenciais riscos no uso desta fonte para o consumo seja para qualquer finalidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O município de Picuí-PB e alguns aspectos históricos

As primeiras incursões para colonização de Picuí ocorreram entre 1704 e 1706, quando o Presidente da Província da Paraíba era Fernando Barros Vasconcelos. No dia 26 de dezembro de 1704, Dona Isabel da Câmara, Capitão Antônio de Mendonça Machado, Alferes Pedro de Mendonça Vasconcelos e Antônio Machado requereram, e obtiveram por sesmaria, três léguas de terra (18 km) no riacho chamado PUCUHY. Posteriormente, no início do século XIX, outras famílias que vinham dos estados vizinhos requereram e obtiveram sesmarias nesta região, onde implantaram propriedades e algumas fazendas de gado, entre elas estavam Conde D'Ávila. No local onde hoje se encontra a igreja matriz ficava o curral de gado da fazenda de Lázaro José Estrela. Ele havia cavado uma cacimba na confluência dos rios das Várzeas e do Pedro e, nos períodos de estiagem, abastecia os moradores das adjacências. Essa cacimba era bastante frequentada por uma espécie de pomba, conhecida como Pucuhy, que, em suas águas, saciavam a sede. Por esta razão, o local passou a ser chamado de Pucuhy. Posteriormente o nome foi mudado para Picuhy - uma palavra composta, unindo Pico (da serra Malacacheta) ao ípsilon (Y), forma da confluência gerada pela união do riacho do Pedro a rio Picuí. Na nova ortografia, o nome passou a ser escrito (Picuí) (PREFEITURA MUNICIPAL DE PICUI, em:< <http://www.picui.pb.gov.br>>. Acesso em 18 fev.2015).

.Entre 1750 e 1760, novas correntes de povoamentos registraram com a aquisição de algumas propriedades, que tinham sido instaladas pelos primitivos. O povoamento inicial da região ocorreu onde hoje se encontra o município de Pedra Lavrada, tendo sido construída a primeira capela em 1760. No ano de 1856, o Nordeste brasileiro foi cenário de uma terrível epidemia de cólera-morbo, que matou milhares de pessoas. Os moradores da região, assustados com a mortandade e liderados pelo Coronel José Ferreira de Macedo, decidiram recorrerão Mártir São Sebastião e juntos fizeram uma promessa ao santo. Após constatarem que não havia mais o surto da doença começaram a construir a capela de São Sebastião, hoje matriz de São Sebastião, padroeiro da cidade. Paralelamente à construção da capela, o Coronel construiu a primeira casa do povoado, conhecida como "A Venda Grande". Ele ocupou o cargo de fiscal e, com o seu prestígio, conseguiu trazer para o aglomerado o primeiro mestre-escola, o primeiro costureiro de roupas masculinas e o primeiro mestre de

música. Dizem até que foi ele quem sugeriu o acréscimo de Triunfo ao nome de São Sebastião. No dia 3 de setembro de 1857, o Padre Francisco de Holanda Chacon, de Areia, celebrou a primeira missa e, em volta da capela, surgiu o povoado de São Sebastião do Triunfo. Em 1874, através da Lei Provincial nº 597 de 26 de novembro, foi criado o Distrito de Paz da Povoação de São Sebastião do Triunfo. O distrito passou a chamar-se apenas de Triunfo. Mas, em 1888, quando a povoação foi elevada à categoria de vila pela Lei Provincial nº 876 de 27 de novembro, o nome passou a ser Picuhy. O município de Picuí foi criado pelo Decreto nº 323 de 27 de janeiro de 1902, sendo instalada no dia 9 de março, a Lei Estadual nº 212 de 29 de outubro de 1904 mudou a sede do município de Cuité para Picuí. No ano de 1924, em 18 de março, Picuí passou ao posto de cidade através da Lei Estadual nº 599. Ao longo do século XX diversos municípios se desmembraram de Picuí, a exemplo de Cuité/Barra de Santa Rosa (1936), Nova Floresta (1959), Pedra Lavrada (1959), Cubatí (1959) Frei Martinho (1961) e Baraúna (1996) (PREFEITURA MUNICIPAL DE PICUI, em: < <http://www.picui.pb.gov.br>>. Acesso em 18 fev.2015)

2.2. A água e o Brasil

O Brasil é um país de enormes proporções e além de uma grande diversificação no clima, solo, vegetação, relevo e características geológicas possuem uma grande discrepância na distribuição hídrica de suas águas superficiais. O país abriga aproximadamente 13,7% de toda água doce do mundo e para confirmar o que foi dito sobre a distribuição irregular ver-se que 73% desta água ficam na bacia das amazonas onde se encontra uma região pouco povoada. A explanação acima é verificada por (CASALI,2008) quando afirma: Em função de suas dimensões continentais, o Brasil apresenta grandes variações relacionadas ao clima, geologia, relevo, vegetação e também de recursos hídricos, desenvolvimento econômico e social e de distribuição da população. Em relação às águas superficiais, o Brasil abriga 13,7% da água doce do mundo, mas mais de 73% desta água doce disponível encontra-se na bacia Amazônica, que é habitada por menos de 5% da população. Sobram aí 27% da água doce do Brasil para ser administrada e conservada por 95% do restante da população. Nas bacias que se encontram em zonas urbanas tem-se o grave problema da poluição e da não adequação e educação ao uso dos recursos hídricos com problemas como: esgoto, indústria, abastecimento desordenado, crescimento das grandes cidades etc. (AGUIAR, 2005).

Nas bacias localizadas em zonas rurais, o desmatamento, erosão, lixiviação as quais destroem a vegetação nativa e o uso inapropriado de agrotóxicos trazem a grande problemática para a qualidade da água e o consumo humano. Corroborando com este relato, (GONÇALVES, 2003) diz: No meio rural, as principais interferências são a destruição das áreas de vegetação permanentes, a utilização de agrotóxicos e fertilizantes, a má destinação dos dejetos animais e humanos e os resíduos de produtos industrializados. Todos esses contaminantes são carregados pela água com as partículas de solo ou são depositados diretamente nos mananciais. Entende-se que para se tiver uma água de qualidade para o consumo humano, tem-se que conter e controlar não só a poluição urbana como também os problemas rurais em relação aos fatores poluidores dos mananciais e do meio ambiente.

Por isso cabe justamente observar como fica a situação da qualidade da água, que já é bastante alterada pela poluição, tanto urbana como rural, nas situações limites de seca em que os níveis dos reservatórios ficam significativamente baixos e o nível de utilização e poluição continua o mesmo.

2.3. Microrganismos na água

Os tipos de microrganismos encontrados em um ambiente aquático são de forma ampla determinada pelas condições físicas e químicas que prevalecem naquele ambiente. A vida aquática inclui interações dos próprios microrganismos e formas de vida superiores tanto animais como vegetais. Listando agentes patogênicos à saúde humana é vasta, compreendendo desde vírus, bactérias, fungos até protozoários e helmintos e as formas infectantes destes agentes, são liberadas via fezes e/ ou urina dos hospedeiros infectados, fazendo com que os esgotos domésticos sejam uma das mais importantes fontes de contaminação ambiental, causando assim um grande impacto na saúde pública (FRANCO, 2008). Infecções transmitidas por água ocorrem quando um microrganismo infeccioso é adquirido por meio da água contaminada por material fecal, contendo patógenos humanos ou de animais. Quando esses patógenos contaminam a rede de abastecimento público ou outras fontes de água potáveis utilizadas por muitas pessoas, podem aparecer surtos epidêmicos de doenças intestinais, afetando um grande número de pessoas em um curto período de tempo.

2.4. Análise da microbiota da água

Um ambiente aquático apresenta certas características físicas, químicas e biológicas que lhe confere qualidade. Esta qualidade varia muito em função das interferências antrópicas nos recursos hídricos e da disponibilidade de água, sendo o seu estudo fundamental para a avaliação das possibilidades de uso (FRANCO, 2007). Diferentes parâmetros são utilizados para indicar direta ou indiretamente a presença efetiva de algumas substâncias ou microrganismos que possa comprometer a qualidade da água. Tanto do ponto de vista de sua estética como da salubridade, exige-se que a água não contenha patogênicos ou substâncias químicas que em concentrações tóxicas possam tornar-se nocivas à saúde pelo uso continuado da água (REBOUÇAS, 2002). Em termos de saúde pública, os aspectos sanitários devem ser enfatizados estudando-se o comportamento dos indicadores de poluição de origem fecal, sendo mais comumente utilizados os coliformes, principalmente o grupo dos fecais ou termo tolerantes, e a *E. Coli*, patógeno pertencente a este grupo (APHA, 1998).

O coliforme termo tolerante são bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes totais, caracterizados pela presença da enzima galactosidase e pela capacidade de fermentar a lactose. Estas bactérias apresentam produção de gás, no prazo de 24 horas a $\pm 44 - 45^{\circ}\text{C}$, em meios contendo sais biliares ou outros agentes tenso-ativos com propriedades inibidoras semelhantes. Ribeiro (2002), afirma que muitos autores questionam a utilização destes organismos como indicadores (BORDALO, 1994) devido ao seu tempo de sobrevivência ser muito menor do que o de alguns patógenos, e também por estarem presentes em fezes de animais de sangue quente, em solos, plantas ou quaisquer corpos d'água contendo matéria orgânica (CONAMA N°274, 2000). As principais fontes de contaminação dos recursos hídricos são: esgotos de cidades sem tratamento que são lançadas em rios e lagos; aterros sanitários que afetam os lençóis freáticos, os defensivos agrícolas que escoam como chuva sendo arrastados para rios e lagos, os garimpos que lançam produtos químicos, como o mercúrio, em rios e córregos e as indústrias que utilizam os rios como carreadores de seus resíduos tóxicos (EMPRA, 2008).

A água armazenada em reservatórios conhecidos popularmente como “açudes” é utilizada como água potável sem nenhum controle em várias cidades brasileiras, e esse tipo de água deve ser avaliada pela sua qualidade microbiológica, pois, o risco de conter patógenos prejudiciais à saúde humana é alto (AMARAL, 2009). A análise microbiológica da água não é feita apenas a águas que se destinam ao consumo das populações, mas também a águas

destinadas ao recreio (praias, piscinas, rios, etc.). É igualmente importante, numa perspectiva de preservação dos ecossistemas, vigiarem a qualidade das águas que não têm uma utilização especificamente humana (ABELHO, 2010). A Portaria nº 518/ 2004 do Ministério da Saúde estabelece que sejam determinados, na água para aferição de sua potabilidade, a presença de coliformes totais e termo tolerantes de preferência *Escherichia coli* a contagem de bactérias heterotróficas. A mesma portaria recomenda que contagem padrão de bactérias não deva exceder a 500 Unidades Formadoras de Colônias por um milímetro de amostra (500/UFC/ml). (FUNASA, 2006).

Segundo Saneado (2009) a água potável é como se chama a água que pode ser consumida por pessoas e animais sem riscos de adquirirem doenças por contaminação da mesma. Ela pode ser oferecida à população urbana ou rural com ou sem tratamento prévio dependendo da origem do manancial. O tratamento de água visa reduzir a concentração de poluentes até o ponto em que não apresentem riscos para a saúde pública, sendo que cada etapa do tratamento é um obstáculo para a proliferação de patógenos nocivos à saúde. É válido lembrar que a água potável somente é necessária para ingestão e higiene humana.

Por isso, parte da água utilizada nas residências não necessita encontrar-se em seu grau último de tratamento (EMBRAPA, 2008).O escoamento da água proveniente da chuva é um dos fatores que diferem o padrão microbiológico para ser consumida, levando-se em consideração que é na zona rural o lugar mais propício a disseminação de organismos que podem trazer danos à saúde humana, pois, a deposição de matéria orgânica diretamente no solo que tem um papel importante na retenção de microrganismos, é um grande fator que estimula essa vasta contaminação por coliformes totais e coliformes fecais (AMARAL, 2009).

A construção de reservatórios hídricos, que popularmente chamamos de açude, surgiu com o acontecimento das secas, nos anos de 1825 a 1830. Nessa época foram construídos reservatórios menores e com a grande seca de 1877 começou-se a construção de grandes reservatórios, pelo antigo IFOCS - Inspeção de Obras Contra as Secas, que hoje é denominado de DNOCS – Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (CEBALLOS, 1997). A região do Semiárido Paraibano passa, mais uma vez, pelo grave problema da seca, com isso os níveis hidrológicos dos reservatórios marcam um dos mais baixos das últimas décadas (DNOCS, 2008) o que proporciona vários problemas relativos à qualidade das águas, visto que com a redução dos níveis dos açudes, através da evapotranspiração, do uso

desregrado, de falta de estrutura e do desperdício, causam a alteração das características físico-químicas da água.

2.5. Características Microbiológicas da Água

As transformações da matéria orgânica decorrentes do metabolismo microbiano são fundamentais para a dinâmica dos ciclos denutrientes e para o fluxo de energia dos ecossistemas aquáticos. A decomposição da matéria orgânica, processo que envolve a ação enzimática, liberadas pelos microrganismos, pode ser realizado tanto na presença quanto na ausência de oxigênio de forma eficiente constituindo-se um processo favorável e essencial. Alguns microrganismos, entretanto, são transmissores de doenças, condição que gera inquietações em relação à qualidade da água para o consumo. Dentre estes estão às bactérias coliformes ou termo tolerante, indicadores de contaminação fecal (BRASIL, 2006).

Os coliformes fecais compreendem as bactérias que habitam normalmente o intestino de homens e animais e chegam até a água por meio de despejo do esgoto que não foi adequadamente tratado. Considerando que a maior parte das doenças associadas com a água é transmitida por via fecal, os organismos patogênicos ao serem eliminados pelas fezes, atingem o ambiente aquático podendo vir a contaminar as pessoas que se abastecem de forma inadequada dessa água. Pelo estudo da sua concentração nas águas pode-se estabelecer um parâmetro indicador da existência de possíveis microrganismos patogênicos que são responsáveis pela transmissão de doenças pelo uso ou ingestão da água, tais como a febre tifoide, disenteria bacilar e cólera (PÁDUA, 2007).

De acordo com o Manual Prático de Análise de Água (2006) a designação desse grupo de bactérias como identificador de contaminação da água está relacionada à sua presença nas fezes de animais pecilotérmicos (anfíbios, répteis, peixes, etc.); por serem detectados e quantificados através de métodos simples e economicamente viáveis; pela sua capacidade de se proliferar em meio aquático e por sua excepcional resistência à desinfecção.

A maioria dos microrganismos patogênicos, causadores de doenças transmitidas pela água, é predominantemente de origem fecal e são conhecidas como patógenos entéricos. A presença destes microrganismos em uma amostra de água constitui-se indicador de contaminação por fezes que representa por si só um perigo para a saúde e também diagnostica a presença de outros organismos agentes de problemas causadores de enfermidades. “A grande importância sanitária das bactérias enquadradas como coliformes, apesar de não

parasitas, está, pois, na sua presença obrigatória em toda fonte poluída por despejos domésticos que tiveram contato com excretas, o que não acontece com as bactérias patogênicas intestinais, que somente existem, e em pequeno número, em águas de esgoto procedentes de residências onde existam pessoas doentes ou portadoras, neste caso enquadrado como fonte contaminada” (PÁDUA, 2007).

2.6. Águas contaminadas

A contaminação é a presença no ambiente de seres patogênicos que provocam doenças ou substâncias em concentração nociva ao ser humano (NASS, 2010). Os contaminantes bastante comuns na água são os microrganismos patogênicos (TEIXEIRA, 2000). A contaminação ocorre quando alguma substância estranha ao meio estar presente onde as enxurradas e erosões constituem fontes adicionais para facilitar as contaminações, com maior ocorrência durante as fortes chuvas (ROCHA, 2004). Por sua vez, contaminação é em geral entendida como um fenômeno de poluição que apresenta risco à saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Os diversos componentes presentes na água, e que alteram o seu grau de pureza podem ser retratados, de uma maneira ampla e simplificados, em termos das suas características físicas, químicas e biológicas. Estas características podem ser traduzidas na forma de parâmetros de qualidade da água (SPERLING, 2005). Para a utilização da água, é necessário considerar a disponibilidade do líquido, a localização do manancial e a presença de substâncias indesejáveis. Estes fatores podem indicar qual deverá ser o melhor tratamento que elimine estas substâncias, dependendo da finalidade a que se destine (PARO, 2008).

Segundo dados da OPAS/OMS (2001), cerca de um quarto dos 4,8 bilhões de pessoas dos países em desenvolvimento continuam sem acesso a fontes de água adequadas, enquanto metade deste total não está servida por serviços apropriados de saneamento. De acordo com Rohden (2009), em estudo realizado no Extremo Oeste de Santa Catarina, foi observada em 2005 uma contaminação de 54,7% das amostras e em 2006 o número de amostras contaminadas continuou aumentando cerca de 60% eram impróprias. Em termos da avaliação da qualidade da água, os microrganismos assumem um papel de grande importância dentre os seres vivos, devido a sua grande predominância em determinados ambientes, à sua atuação nos processos de depuração dos dejetos ou a sua associação com as doenças ligadas a água. (SPERLING, 2005)

2.7. Características da água para o consumo humano

A água, além de ser considerado um solvente universal, é o elemento que participa de todas as etapas da vida, e ao longo dos anos vem perdendo qualidade, justamente pela ação desordenada do homem. Sobre este fato David (2010) diz: A água é considerada solvente universal porque tem grande capacidade de dissolver outras substâncias e, dessa maneira permite a troca de materiais entre os organismos e o ambiente. Isso também a torna importante para a produção de alimentos. E segundo a Funasa (2006), denominam-se de bactérias do grupo coliforme bacilos gram-negativos, em forma de bastonetes, aeróbios ou anaeróbios facultativos que fermentam a lactose a 35°C – 37°C, produzindo ácido, gás e aldeído em um prazo de 24 – 48 horas. O grupo de microrganismos denominados “coliformes totais” inclui todos os coliformes específicos e não específicos do material fecal. É um bom indicador microbiológico da qualidade da água, porque é facilmente detectável e quantificável (ABELHO, 2011).

Quando se fala em qualidade de água para o consumo humano, não se pode ter em mente o conceito de pureza total, mas sim as condições e características suficientes para que estão água possa ser utilizada para as mais diferentes atividades, como também a sua composição química, física e biológica ideal para que não afete a saúde do ser humano. Para cada tipo de classe de água, o CONAMA dispõe as características físicas, químicas e biológicas para a sua perfeita utilização, isso cria um padrão para cada tipo de corpo de água o que possibilita programas e metas de qualidade e fiscalização da qualidade da água. Tal pensamento é exposto por (MERTEN, 2002):

“A classificação padronizada dos corpos de água possibilita que se fixem metas para atingir níveis de indicadores consistentes com a classificação desejada.”. Diante do exposto, para se estiver em harmonia tanto com o meio ambiente, como com a saúde humana, necessitasse de água potável, termo que é definido por Casali (2008), como: A água de qualidade, isto é, aquela que atenda aos padrões de potabilidade estabelecidos pelos órgãos responsáveis, é uma necessidade básica de qualquer ser humano.

De acordo com Amorim (2009), a qualidade da água pode ser afetada por fatores como a poluição atmosférica, pelo sistema de coleta da água pluvial pela manutenção inadequada da cisterna, utilização e manuseio da água, e por fatores ligados à origem da água, transportada por carros pipa, e à vulnerabilidade a que está exposta sendo que a grande meta

da sociedade e do poder público é o estabelecimento de políticas de qualidade de água associadas às políticas de águas, a fim de assegurar a qualidade da água. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 80% de todas as doenças que afetam os países em desenvolvimento provêm da água de má qualidade. A OMS recomenda o tratamento da água a ser utilizada como bebida ou no preparo de alimentos com seis miligramas de cloro que é vendido em cápsulas/comprimidos em farmácias para cada litro (Sociedade Brasileira de Infectologia, 2001). Toda a água a ser usada num suprimento público, ou num privado, deve ser potável e não deve ser quimicamente pura, pois a água carente de matéria dissolvida e em suspensão não tem paladar e é desfavorável à saúde humana. Para tanto os governos preocuparam-se em classificar e criar índices que definem a qualidade da água. A Portaria nº 518 de 2004 do Ministério da Saúde e Secretaria de Vigilância em Saúde, juntamente com a Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental, que estabelece procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu nível de potabilidade definem, no seu art. 4º o que é considerada água potável: Sendo assim os testes e exames realizados em qualquer amostra de água superficial de reservatório deverá passar por comparativo com índices pré-estabelecidos pelo Ministério da Saúde para níveis de: coliformes totais (bactérias do grupo coliforme), coliformes termo tolerantes, *Escherichia coli*, *Salmonella* etc.

2.8. Doenças veiculadas pela água

Quase invariavelmente, o melhor método de assegurar água adequada para consumo consiste em formas de proteção, evitando-se contaminação de dejetos animais e humanos, os quais podem conter grandes variedades de bactérias, vírus, protozoários e helmintos. Falhas na proteção e no tratamento efetivo expõem a comunidade a riscos de doenças intestinais e a outras doenças infecciosas (ALMEIDA, 2008). As doenças causadas pela ingestão de água contaminada são a disenteria amebiana, disenteria bacilar, gastroenterite, giardíase, hepatite infecciosa, leptospirose, paralisia infantil, salmonelose e a cólera, febre tifoide e paratifoide que são as mais frequentemente ocasionadas por água contaminada que penetram no organismo via cutaneomucosa como é o caso da via oral (BRASIL, 2006).

De acordo com OPAS/OMS (2001), ocorrem no mundo, quatro bilhões de casos de diarreia por ano, com 2,2 milhões de mortes, a maioria entre crianças de até cinco anos. A cada oito segundos, uma criança morre devido a uma doença relacionada à água. Na América

Latina apenas 14% das águas residuais são tratadas. Água segura, higiene e saneamento adequados podem reduzir de um quarto a um terço os casos de doenças diarreicas. As preocupações quanto aos níveis de qualidade, contaminação das águas e manutenção dos recursos hídricos assume importância, à medida que a água é destinada ao consumo humano ou a transformação econômica. Água não potável, ou seja, contaminada de alguma forma por agentes patogênicos nocivos pode pôr em perigo a saúde e comprometer o desenvolvimento das comunidades humanas (MATTOS, 2002). A água segura para o consumo deve estar livre de microrganismos patogênicos e substâncias químicas prejudiciais à saúde e é denominada água potável. A água não potável, por outro lado, deve ser purificada antes do seu uso para o consumo humano. Os métodos de purificação variam, dependendo da fonte de água e da quantidade de água necessária (PELCZAR, 1996). Segundo a Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde, toda a água para consumo humano, incluindo fontes individuais como poços e fontes não deveriam apresentar coliforme termo tolerante em 100 ml de água. Quanto aos coliformes totais, à mesma portaria determina que em amostras procedentes de poço seja tolerada a presença de coliformes totais, desde que haja a ausência de *Escherichia coli* e/ou coliformes termo tolerante e que nesta situação seja investigada a origem da ocorrência e medidas de caráter coletivo e preventivo seja adotadas imediatamente, além da realização de uma nova análise de coliformes.

2.9. Análise Genética de Microrganismos

Os marcadores genéticos são usados para controlar a herança de um gene nas proximidades, que ainda não foi identificado, mas cuja localização aproximada é conhecida. O próprio marcador genético pode ser uma parte de um gene ou pode não ter nenhuma função conhecida (COLLINS et al; 2012). Essas técnicas são baseadas em DNA e na complementaridade das duas fitas do DNA duplas hélice, que hibridizam de uma maneira sequência-específica (LIPP, 2001).

Os marcadores genéticos são caracteres com mecanismo de herança simples que podem ser empregados para avaliar diferenças genéticas entre dois ou mais indivíduos (FALEIRO, 2007). Entre as vantagens atribuídas aos marcadores moleculares, destaca-se o grande polimorfismo, o fato de não sofrerem influência do meio ambiente, de serem geralmente codominantes, de poderem ser analisados em qualquer estágio de

desenvolvimento do indivíduo, e também poderem caracterizar um indivíduo a partir de suas células ou tecidos (FORTES,2007).

2.9.1 Principais marcadores genético-moleculares.

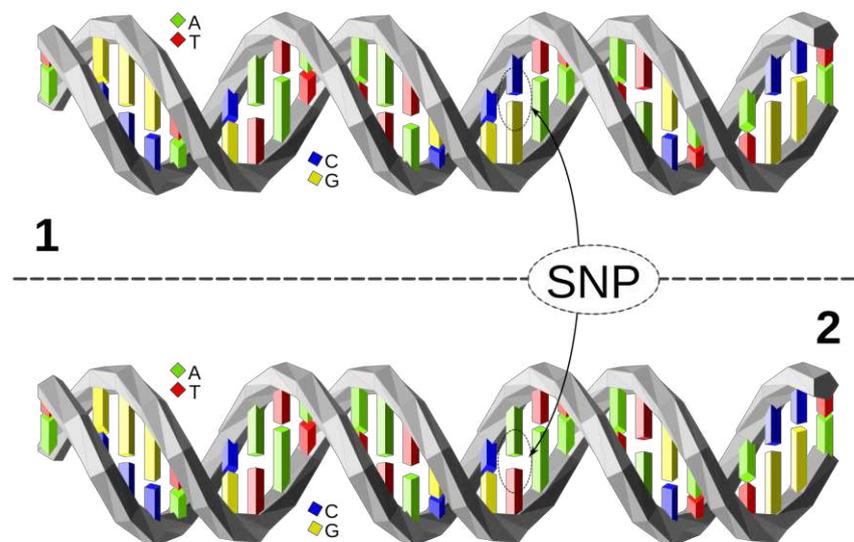
Os SNPs (Single Nucleotide polymorphism), (pronuncia-se 'S"N' 'P' ou 'snip') é a mais comum tipo de variação genética (mais de 90% do total de polimorfismos) em genomas eucarióticos e em genes causadores de doenças (KORKKO et al., 2013) Os marcadores SNP tem como base as alterações mais elementares da molécula de DNA, ou seja, mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas (Adenina, Citosina, Timina e Guanina). As mutações mais comuns são as transições, onde ocorrem trocas de uma purina por outra purina (A " G) ou de uma pirimidina por outra pirimidina (C " T). Menos frequentes, as transversos ocorrem quando há troca de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa (C/T " A/G). Normalmente, os marcadores SNP são bi alélicos, ou seja, geralmente são encontrados apenas dois variantes em uma espécie (Ex: um alelo corresponde a um par de bases A/T e o outro a um G/C). Os SNPs podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória, porém, na maior parte das vezes são encontrados em espaços intergênicos, sem função determinada. Eles podem atuar como marcadores biológicos, ajudando os cientistas localizar genes que estão associados com a doença. Quando SNPs ocorrer dentro de um gene ou de uma região reguladora de um gene perto, eles podem desempenhar um papel mais direto na doença por afetar a função do gene.

2.9.2 SNPs

(Single Nucleotide Polymorphism ou Polimorfismo de Base Única) abrangem uma classe mais geral de polimorfismos sendo mais frequentes que os marcadores microssatélites e são distribuídos uniformemente por todo o genoma (LEWIN, 2001). São os polimorfismos mais comuns dentro do genoma humano possuindo apenas variação em uma base no interior de uma sequência de DNA que pode ser codificante ou não, e ocorrem aproximadamente uma vez a cada 1.350 pb no genoma humano (ARAÚJO, 2009). Com isso, são importantes para a análise genética, tendo uma maior estabilidade quando comparado com os microssatélites (REGITANO, 2001). Os marcadores SNP têm como base as alterações mais elementares da molécula de DNA que são as mutações em bases únicas da cadeia polinucleotídica (Adenina, Citosina, Timina e Guanina). Os marcadores SNP, geralmente, são bi alélicos, ou seja, são encontrados apenas dois variantes em uma espécie (Ex: um alelo corresponde a um par de

bases). Os SNPs podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória, porém, na maior parte das vezes são encontrados em espaços intergênicos, sem função determinada (CAETANO, 2009).

Figura 1. Demonstração de como acontece as SNPs no DNA, com substituição das bases nitrogenadas.



Fonte: biologia.com

A maioria dos SNPs não tem efeito sobre a saúde ou desenvolvimento. Algumas destas diferenças genéticas, no entanto, revelaram-se muito importante no estudo da saúde humana. Pesquisadores descobriram SNPs que podem ajudar a prever a resposta de um indivíduo a determinadas drogas, suscetibilidade a fatores ambientais, como toxinas, e risco de desenvolvimento de doenças específicas. SNPs também pode ser usado para controlar a herança de genes de doenças no seio das famílias. Estudos futuros irão trabalhar para identificar SNPs associados com doenças complexas, como doenças cardíacas, diabetes e câncer.

Os SNPs são extremamente abundantes nos genomas de espécies não endogâmicas. Estudos com humanos, e com espécies de interesse zootécnico, mostram que pode haver milhões de polimorfismos SNP no genoma de um indivíduo, Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium (2009). Além dos marcadores SNP serem abundantes, suas bases moleculares permitem que haja uma distribuição homogênea de SNPs pelo genoma.

2.9.2.1 Vantagens e desvantagens dos SNPs

Uma das principais vantagens dos SNPs em comparação com os outros marcadores, é a possibilidade de detecção de grande quantidade de polimorfismo entre alelos de determinados genes. E em contraposição a isso tem algumas desvantagens como necessita de conhecimento prévio do gene de interesse e o custo/ infraestrutura da técnica envolvido nas etapas necessárias ao sequenciamento de diferentes fragmentos de DNA de interesse.

2.9.3 RAPD

(Random Amplified Polymorphic DNA) são altamente eficazes na identificação de variações no DNA genômico entre subespécies ou populações de várias espécies; identificar linhagens distintas e determinar o impacto genético da introdução de espécies cultivadas em populações naturais. Segundo (HILSDORF, 2002).

Tal técnica consiste basicamente em uma variação do protocolo da reação em cadeia da polimerase, utilizando uma única pequena sequência de oligonucleotídeos (primers) geralmente dez nucleotídeos, capazes de amplificar regiões arbitrárias do genoma. A obtenção desses marcadores envolve a extração e à amplificação do DNA, eletroforese normalmente em gel de Agarose corado com brometo de etídio e foto documentação sob luz ultravioleta.

2.9.3.1 Vantagens e desvantagens dos RAPD

Uma grande vantagem é o fato de poder ser aplicado em qualquer organismo vivo sem que se tenha qualquer conhecimento prévio do seu material genético. No entanto, seu uso também tem sido substituído por técnicas mais modernas e estáveis, pois o RAPD, por suas peculiaridades, possui baixa reprodutibilidade entre laboratórios diferentes. Além disso, esse marcador não permite a diferenciação entre indivíduos homocigotos e heterocigotos, o que reduz seu poder de distinção de genótipos (BORÉM, 1997).

2.9.4 RFLP

(Restriction Fragment Length Polymorphism) é uma técnica baseada na clivagem do DNA genômico em sequências previamente conhecidas que, por sua vez, geram fragmentos de DNA que podem ser separados por eletroforese e comparados no que diz respeito ao tamanho do fragmento. A variação no tamanho do fragmento é à base do polimorfismo desse marcador. As etapas para a aquisição de RFLPs envolvem a extração do DNA, digestão com endonucleases de restrição, eletroforese, transferência dos fragmentos para uma membrana de náilon, hibridização dos fragmentos com sondas marcadas e visualização dos polimorfismos, normalmente, por autorradiografia.

2.9.4.1 Vantagens e desvantagens dos RFLP

A grande vantagem dos marcadores RFLP é sua ampla distribuição no genoma, possibilitando a construção de mapas de frequência de recombinação genética, clonagem posicional de genes, além de outras características desejáveis para utilização no melhoramento de plantas, como a capacidade para discriminar indivíduos homocigotos e heterocigotos (FALEIRO, 2007). Entretanto, por causa de algumas desvantagens desse método, tais como complexidade operacional da técnica, utilização de material radioativo e elevada quantidade de DNA genômico, necessário para realização das análises, associado ao surgimento de outras classes de marcadores moleculares mais eficientes, seu uso tem sido desestimulado comparados às isoenzimas, os marcadores RFLP possuem a vantagem de cobrir todo o genoma do organismo estudado. Possuem expressão codominante, isto é, em cada loco estudado é possível identificar genótipos hetero e homocigotos, gerando mais informações e permitindo uma análise detalhada da ação gênica e da interação entre os alelos. Ao contrário das isoenzimas, o número de marcadores RFLP é praticamente ilimitado, e o nível de polimorfismo alélico em cada loco é muito maior.

2.9.5 CSGE

(Conformação Eletroforese em Gel Sensível). Este método criado por Ganguly. Onde explora a observação de solventes desnaturante em um tampão apropriado para aumentar a capacidade de emparelhamento de uma única base e produzir alterações conformacionais no DNA de cadeia dupla e, assim, aumentar a migração diferencial de moléculas de heteroduplex e homoduplex em um gel. Os produtos químicos normalmente usados para esta finalidade são o etileno-glicol e formamida, e o tampão é Tris-aurina com EDTA.

A capacidade para aumentar o padrão de migração diferente, quando melhorada com a utilização de cloreto de bis (acrilóil) piperazina (BAP), em vez de bisacrilamida (N, N'-metileno-bis-acrilamida) como um agente de reticulação à acrilamida (WILLIAMS et al., 2008). No entanto, se verificara que há uma grande melhoria da taxa de detecção de até 100% com os produtos de 200-450 pb de comprimento, usando mais elevada potência durante o funcionamento (até 40 W) e uma percentagem mais elevada (15%) de acrilamida.

2.9.5.1 Vantagens e desvantagens dos CSGE

Uma desvantagem de CSGE é a incapacidade de detectar alterações das sequências homozigotos porque homoduplex de diferentes SNPs no mesmo produto de PCR geralmente exibem a mesma mobilidade (LEUNG et al, 2011), mas isto não é sempre verdadeiro (UNDERHILL et al., 2012). O ano passado, uma alta eletroforese em gel sensível à conformação de transferência (HTCSGE), que promete ser uma ferramenta muito poderosa para ensaio de detecção de SNPs em larga escala, tem sido desenvolvida por LEUNG et al., (2011). CSGE é muito semelhante à DGGE (eletroforese em gel de gradiente desnaturante) desenvolvido por FISHER & LERM, (1983), no qual são feitas diferentes concentrações de desnaturação formando um gradiente linear no gel, paralela ou perpendicular à direção de eletroforese. Mas CSGE é certamente mais fácil de realizar do que DGGE, porque não tem que ser feito em alta temperatura (60 ° C) e não necessita de equipamentos complementares para formar o gradiente de desnaturação. Além disso, os domínios de fusão de fragmentos de DNA, em que os heteroduplex e dos homoduplex mostram diferenças na DGGE, não tem que ser considerada.

2.9.6 ISSR

(Inter Simple Sequence Repeats) ISSRs são fragmentos de DNA de 100 a 3000 pb amplificados via PCR, usando um único iniciador (16-20 pb), construídos a partir de sequência de microssatélites. As etapas de obtenção desses marcadores são a extração e à amplificação via PCR do DNA, eletroforese em géis de Policrilamina ou Agarose e visualização do polimorfismo por autorradiografia, coloração com prata ou fluorescência (géis de Policrilamina) ou por coloração com brometo de etídio sob luz ultravioleta (géis de Agarose).

2.9.6.1 Vantagens e desvantagens dos ISSR

As principais vantagens dos ISSRs são a geração de grande número de bandas informativas por reação e o fato de não haver necessidade do conhecimento prévio de dados de sequência de DNA para a construção do primer utilizado. A principal desvantagem é a dominância dos marcadores (ZIETKIEWICZ, 1994).

2.9.7 DGGE

(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) a técnica de DGGE tem sido a metodologia mais utilizada para o estudo de estruturas de comunidades microbianas assim como de grupos funcionais específicos de amostras ambientais. A análise com DGGE permite um melhor estudo de grupos específicos de comunidades em ambientes complexos, principalmente para grupos procariotos, como por exemplo, Actinobacterias, Bacilos, Paenibacillus, Pseudomona, Proteobacteria, bactérias metano tróficas de α e β ; proteobacteria, bactérias que oxidam amônia e bactérias fixadoras de nitrogênio (LOVELL,2001). Inicialmente desenvolvida para análises de mutações, a técnica de DGGE (eletroforese em gel com gradiente de desnaturante) foi posteriormente ajustada e utilizada por Muyzer e colaboradores (1993) para análises de comunidades microbianas. Desde então vem sendo amplamente utilizada e é hoje considerada uma técnica importante para estudos em ecologia microbiana.

DGGE é um tipo particular de eletroforese em gel em que um calor constante (cerca de 60°C) e uma concentração crescente de desnaturante são usados produtos químicos para forçar as moléculas de DNA a relaxar. Um olhar rápido na eletroforese diz-nos que esta é uma técnica de separação com base na carga elétrica, forma e peso molecular de partículas como o DNA, RNA e proteínas. Na DGGE, o DNA, que está carregado negativamente, é atraído pelo elétron positivo e forçadas a migrar através dos poros de um gel de Policrilamina. Uma vez que atinge a concentração de desnaturante reagentes em que se desenrola, diz ter derretido. Isto determina os domínios de fusão (4, 5), que são definidos como extensões de pares de bases com uma temperatura de fusão idêntica. Em outras palavras, os pares de bases formados por nucleotídeos A (adenina) e T (timina), e aqueles que são formados por C (citosina) e G (guanina) são quimicamente derretidos separados. Basicamente, o que acontece é que ligação de hidrogênio entre os pares de bases é quebrada pela temperatura e pelo aumento da gradiente de desnaturante produtos químicos (ureia e formamida) (4, 5). Qualquer variação de sequências de DNA no interior destes domínios resulta em diferentes temperaturas de fusão,

fazendo com que, assim, as sequências diferentes para migrar em diferentes posições no gel. Isso fornece DGGE com o poder de distinguir entre sequências de tipo selvagem e mutantes sem o conhecimento prévio do que estas sequências são, justificando por isso que este método é usado para detectar mutações dentro de organismos estreitamente relacionados (HILSDORF, 2002).

2.9.7.1 Vantagens e desvantagens da DGGE

Embora o DGGE permita avaliar a comunidade microbiana total, através do uso de iniciadores universais para bactérias e fungos, estudos mais recentes têm utilizado, também, iniciadores específicos, capazes de caracterizar um determinado gênero ou grupo. A principal vantagem do uso desses iniciadores específicos é que eles permitem o acesso a um grupo que pode ter um efeito importante sobre a comunidade, mas devido à baixa representatividade de sua população em relação à população bacteriana total, pode não ser detectado por PCR. A técnica de DGGE possui vantagens e desvantagens (NISHIO, 2010),

Fatos como a taxa e sensibilidade de detecção elevadas; metodologia simples e uso de método de detecção não radioativo; permite estudar de maneira rápida e simples a variabilidade espaço-temporal das populações, pois adota padrões de banda. Porém ela exige a análise por computador bem como experiências prévias; requer a compra de equipamento específico; os primers são caros e primers adicionais podem ser úteis na sequenciação; o método envolve o uso de formamida (produto químico tóxico pode causar irritação ao trato gastrointestinal, cefaleia, inconsciência, e afetar o sistema nervoso central) (LEUNG et al, 2011).

2.10. CTAB (*Brometo de cetil-trimetilamônio*) para a extração de DNA em células procariontes.

O método mais utilizado com sucesso para diferentes espécies é o baseado no uso do detergente CTAB. Esse detergente solubiliza as membranas, formando com o DNA um complexo que facilita uma posterior precipitação (WEISING, 1995). A maioria dos protocolos descritos na literatura utiliza o protocolo CTAB padrão, com algumas modificações, com vistas a resolver problemas específicos da espécie em estudo. Outros protocolos frequentemente empregados são variações do descrito por Dellaporta e colaboradores. Esses métodos se fundamentam na precipitação simultânea de proteínas e polissacarídeos na presença de altas concentrações de acetato de potássio. Outro método utilizado é a extração de

DNA por meio de núcleos celulares. Essa estratégia é baseada em uma prévia separação dos núcleos dos outros constituintes celulares. Esse procedimento pode resolver o problema de isolamento de constituintes indesejáveis, como os polissacarídeos e polifenóis citoplasmáticos. A principal desvantagem deste método é que a extração de núcleos a partir de material congelado é muito ineficiente. Outra desvantagem é que esse método é mais laborioso do que os previamente mencionados. As preparações de DNA obtidas por qualquer um desses métodos podem sofrer uma posterior purificação por centrifugação em gradiente de densidade de CsCl. Essa purificação, apesar de laboriosa, é eficiente na remoção de RNA, polissacarídeos, proteínas e outros contaminantes da amostra de DNA. Outra estratégia para purificação do DNA isolado é a precipitação com acetato de amônio. Essa estratégia é mais rápida, porém o DNA purificado é menor de idade qualidade.

2.11. Parâmetros da qualidade da água

A Portaria do Ministério da Saúde nº 518/2004 estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências. A Portaria n.º 518/2004 estabelece, em seus capítulos e artigos, as responsabilidades por parte de quem produz a água, no caso, os sistemas de abastecimento de água e de soluções alternativas, a quem cabe o exercício de “controle de qualidade da água” e das autoridades sanitárias das diversas instâncias de governo, a quem cabe a missão de “vigilância da qualidade da água para consumo humano”. Também ressalta a responsabilidade dos órgãos de controle ambiental no que se refere ao monitoramento e ao controle das águas brutas de acordo com os mais diversos usos, incluindo as fontes de abastecimento de água destinada ao consumo humano. Em seu art. 1º aprova a Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano de uso obrigatório em todo território nacional e apresenta as normas de qualidade e conceitos sobre a potabilidade da água e ainda os deveres e responsabilidades do poder público, seja Federal, Estadual e Municipal. O artigo 4º traz em seu inciso I a definição de água potável como “água para consumo humano cujos parâmetros microbiológicos, físicos, químicos e radioativos atendam ao padrão de potabilidade e que não ofereça riscos à saúde” (BRASIL, 2006). Quando a Portaria traz as responsabilidades em Nível Municipal, o artigo 7º apresenta os deveres e obrigações das Secretarias Municipais de Saúde, citados em sua minoria:

I. Exercer a vigilância da qualidade da água em sua área de competência, em articulação com os responsáveis pelo controle de qualidade da água, de acordo com as diretrizes do SUS;

II. Sistematizar e interpretar os dados gerados pelo responsável pela operação do sistema ou solução alternativa de abastecimento de água, assim como, pelos órgãos ambientais e gestores de recursos hídricos, em relação às características da água nos mananciais, sob a perspectiva da vulnerabilidade do abastecimento de água quanto aos riscos à saúde da população;

III. Estabelecer as referências laboratoriais municipais para dar suporte às ações de vigilância da qualidade da água para consumo humano

IV. Efetuar, sistemática e permanentemente, avaliação de risco à saúde humana de cada sistema de abastecimento ou solução alternativa, por meio de informações sobre:

a) a ocupação da bacia contribuinte ao manancial e o histórico das características de suas águas; b) as características físicas dos sistemas, práticas operacionais e de controle da qualidade da água; c) o histórico da qualidade da água produzida e distribuída; d) a associação entre agravos à saúde e situações de vulnerabilidade do sistema. A fim de garantir as normas de potabilidade, apresenta em seu artigo 11º a Tabela 1 com o padrão microbiológico para potabilidade da água:

Tabela1: Padrão microbiológico de potabilidade da água para consumo humano.

PARÂMETRO	VMP ⁽¹⁾
Água para consumo humano ⁽²⁾	
<i>Escherichia coli</i> ou Coliformes termotolerantes ⁽³⁾	Ausência em 100ml
Água na saída do tratamento	
Coliformes totais	Ausência em 100ml
Água tratada no sistema de distribuição (reservatórios e rede)	
<i>Escherichia coli</i> ou Coliformes termotolerantes ⁽³⁾	Ausência em 100ml
Coliformes totais	<p>Sistemas que analisam 40 ou mais amostras por mês: Ausência em 100ml em 95% das amostras examinadas no mês;</p> <p>Sistemas que analisam menos de 40 amostras por mês: Apenas uma amostra poderá apresentar mensalmente resultado positivo em 100ml.</p>

NOTAS:

(1) Valor Máximo Permitido.

(2) água para consumo humano em toda e qualquer situação, incluindo fontes individuais como poços, minas, nascentes, dentre outras.

(3) a detecção de *Escherichia coli* deve ser preferencialmente adotada.

FONTE: Ministério da Saúde, Portaria nº 518/2004.

2.11.1 Classificação e Qualidade das Águas

A Resolução Nº. 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA de 17 de março de 2005 (BRASIL, 2006) no território nacional, dispõe sobre a classificação dos corpos das águas doces em quatro classes especificadas de acordo com o uso e qualidade.

No art. 2º a definição de água doce é especificada como água com salinidade igual ou inferior a 0,5 ‰.

O art. 4º - traz a classificação das águas doces, divididas em quatro classes. Apenas duas classes são apresentadas pois se relacionam com a pesquisa em questão:

I – classe especial: águas destinadas:

- a) ao abastecimento para consumo humano, com desinfecção;
- b) à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas; e,
- c) à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral.

II – classe um: águas que podem ser destinadas:

- a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento simplificado;
- b) à proteção das comunidades aquáticas;
- c) à recreação de contato primário, tais como natação, esqui aquático e mergulho, conforme Resolução CONAMA n° 274, de 2000;
- d) à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película; e à proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas.

A Resolução N°. 357 do CONAMA também dispõem sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento dos corpos de água superficiais, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. O artigo 13 da Resolução CONAMA n° 357, estabelece que nas águas de classe especial devam ser mantidas as condições naturais do corpo de água. E uma vez que não são estabelecidos valores limites para águas de classe especial, adotam-se os padrões pré-determinados para a classe:

I – Condições de qualidade de água:

- a) OD, em qualquer amostra: não inferior a seis mg/L O₂;
- b) Ph: 6,0 a 9,0;
- c) Turbidez: até 40 UNT;
- d) Clorofila a: até 10 µg/L; 36 e
- e) Cor verdadeira: nível de cor natural do corpo de água em G Pt/L.

3. JUSTIFICATIVA DE EXECUÇÃO DO TRABALHO

Doença veiculada pelo uso de água contaminada tem crescido substancialmente devido à falta de tratamento adequado. O açude várzea grande é responsável por abastecer o município de Picuí-PB e, também, algumas cidades circunvizinhas. O açude mencionado é alvo de diversas críticas devido a sua demasiada poluição encontrada, e conseqüentemente o acúmulo de microrganismos patogênicos devido também a precariedade do ambiente.

Esse fato vem provocando um aumento acelerado de doenças hídricas na comunidade. Observa-se que o uso dessa água sem tratamento algum, até mesmo devido muitas vezes a necessidade, está implicando no aparecimento de diversos acometimentos. Nesse sentido é que se torna relevante o estudo mais detalhado deste ambiente com a necessidade de identificar possíveis microrganismos causadores de acometimentos, utilizando técnicas para análise de DNA, com a finalidade de propiciar conhecimento inicial para o melhoramento da qualidade da água desse reservatório e da qualidade de vida dos habitantes que utilizam a mesma para fazer suas atividades caseiras (cozinhar, tomar banho, limpeza doméstica, beber... etc.). Até o momento não foi identificada nenhuma fonte bibliográfica que contenha informações dessa natureza sobre o ambiente em estudo.

Espera-se com isso permitir um maior entendimento e conhecimento do ambiente em questão, proporcionando esclarecimento científico suficiente para a possível tomada de decisões por parte dos poderes públicos locais para melhorar a qualidade da água presente neste ambiente ou, em última instância, procurar fontes hídricas externas de melhor qualidade que supram as necessidades da população que utiliza este ambiente como única fonte de água.

4. OBJETIVOS

4.1. GERAL

- ✓ Prospectar a variabilidade genética utilizando a técnica de DGGE presente na água do açude várzea grande na cidade de Picuí-PB.

4.2. ESPECÍFICOS

- ✓ Aplicar o método do CTAB (*Brometo de cetil-trimetilamônio*) para a extração de DNA e analisar a eficiência deste método;
- ✓ Identificar a variabilidade genética entre os microrganismos presentes na comunidade com a técnica de DGGE;
- ✓ Propiciar um maior conhecimento ao nível biológico dos componentes microbiológico presentes neste ambiente.

MATERIAIS E MÉTODOS

4.3. Caracterização da Área de Estudo

O município de Picuí situa-se na região centro-norte do Estado da Paraíba (Figura 01), Mesorregião Borborema e Microrregião Seridó Oriental Paraibano. Limita-se com o Estado do Rio Grande do Norte e com os municípios de Nova Palmeira (17 km), Pedra Lavrada (27 km), Baraúna (13 km), Cuité (23 km), Nova Floresta (20 km) e Frei Martinho (22 km).

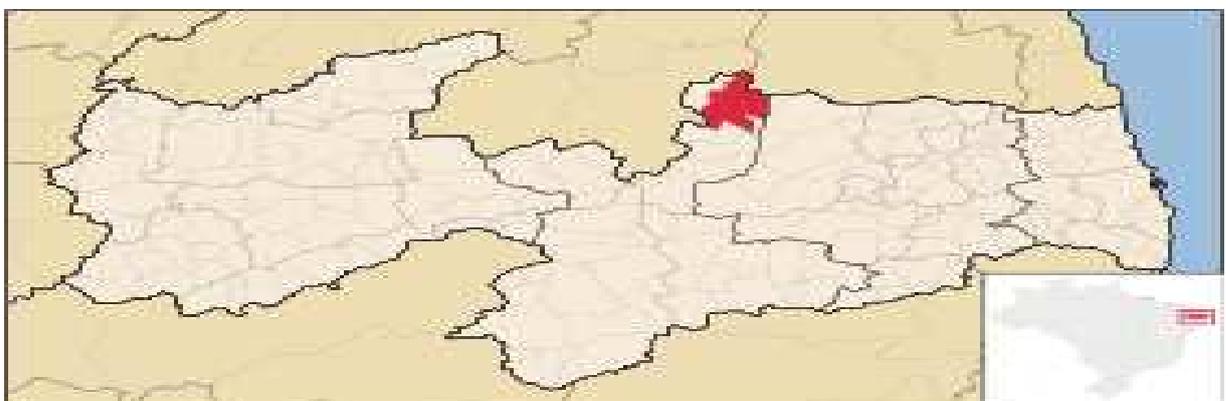
Figura 2. Representação da divisão física do estado da Paraíba. Destaque para o Município de Picuí.



Fonte:CPRM.2005.

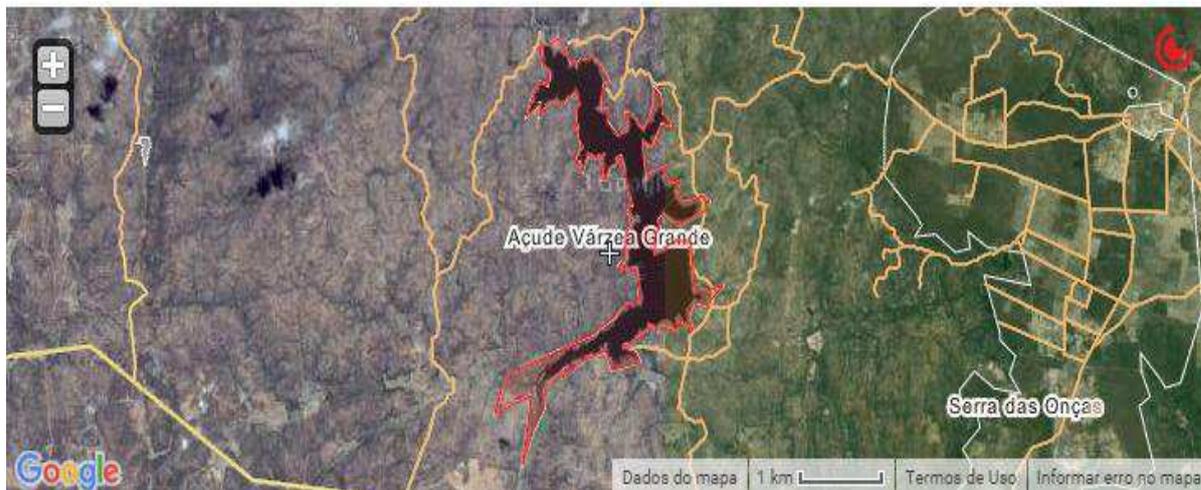
O açude Várzea Grande ($6^{\circ}26'48''S, 36^{\circ}20'54''W$) localiza-se no município de Picuí, Paraíba, e é responsável pelo abastecimento de água da cidade de algumas cidades circunvizinhas, sua capacidade é de 21.532.659 m³.

Figura 3. Localização demarcada em vermelho do Açude Várzea Grande, no município de Picuí-PB.



Fonte:Panomario.com (2015).

Figura 4. Açude Várzea Grande (Picuí-PB), sua dimensão e localização.



Fonte: wikimapia.org(2015).

O açude Várzea Grande é o maior em relação à capacidade de acumulação hídrica dentre os reservatórios do setor Leste da sub-bacia do rio Seridó. O quadro um abaixo apresenta os principais reservatórios e suas capacidades de acumulação hídrica.

Quadro1: Principais reservatórios da Sub-bacia do rio Seridó e suas capacidades de acumulação de água.

RIO SERIDÓ					
Município	Açude	Capacidade Máxima (m ³)	Volume Atual (m ³)	Volume Atual (%)	Data
Picuí	Caraibeiras	2.709.260	1.256.230	46,4	28/01/2011
Picuí	Várzea Grande	21.532.659	12.215.570	56,7	01/03/2011
Santa Luzia	Santa Luzia	11.960.250	4.519.225	37,8	02/03/2011
São Vicente do Seridó	Felismina Queiroz	2.060.000	1.210.620	58,8	08/02/2011
São José do Sabugi	São José IV	554.100	1.860	0,3	03/01/2011
São Mamede	São Mamede	15.791.280	6.162.756	39,0	07/02/2011
Várzea	Várzea	1.132.975	275.551	24,3	02/03/2011

Fonte: EASA, 2011.

4.4. Coleta

O material (amostra de água) foi coletado no açude Várzea Grande no período de junho de 2015. A coleta foi realizada com as mãos protegidas por luvas de látex e em seguida o material foi colocado em uma garrafa estéril com capacidade para 1,5 litros de amostra

devidamente protegida e higienizada, para não comprometer a pesquisa com a inserção de microrganismo exógena ao meio. Imediatamente após a coleta foi adicionada a amostra uma substância conservante que neste caso foi o lugol a 4%. Após a fixação a amostra de água do açude foi acondicionada em refrigerador a 4°C para evitar possíveis alterações biológicas à espera das futuras análises. No momento oportuno as análises foram procedidas no Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicado da UFRPE. Onde foi utilizado o método CTAB para a extração do DNA e posterior aplicação no DGGE para análise da população microbiana do corpo d'água.

Figura 5= Material coletado no Açude Várzea Grande, onde foi colocado em um garrafa estéril com capacidade para 1,5 litros. A amostra foi devidamente protegida e higienizada e posteriormente levada para a análise.



4.5. Extração do DNA

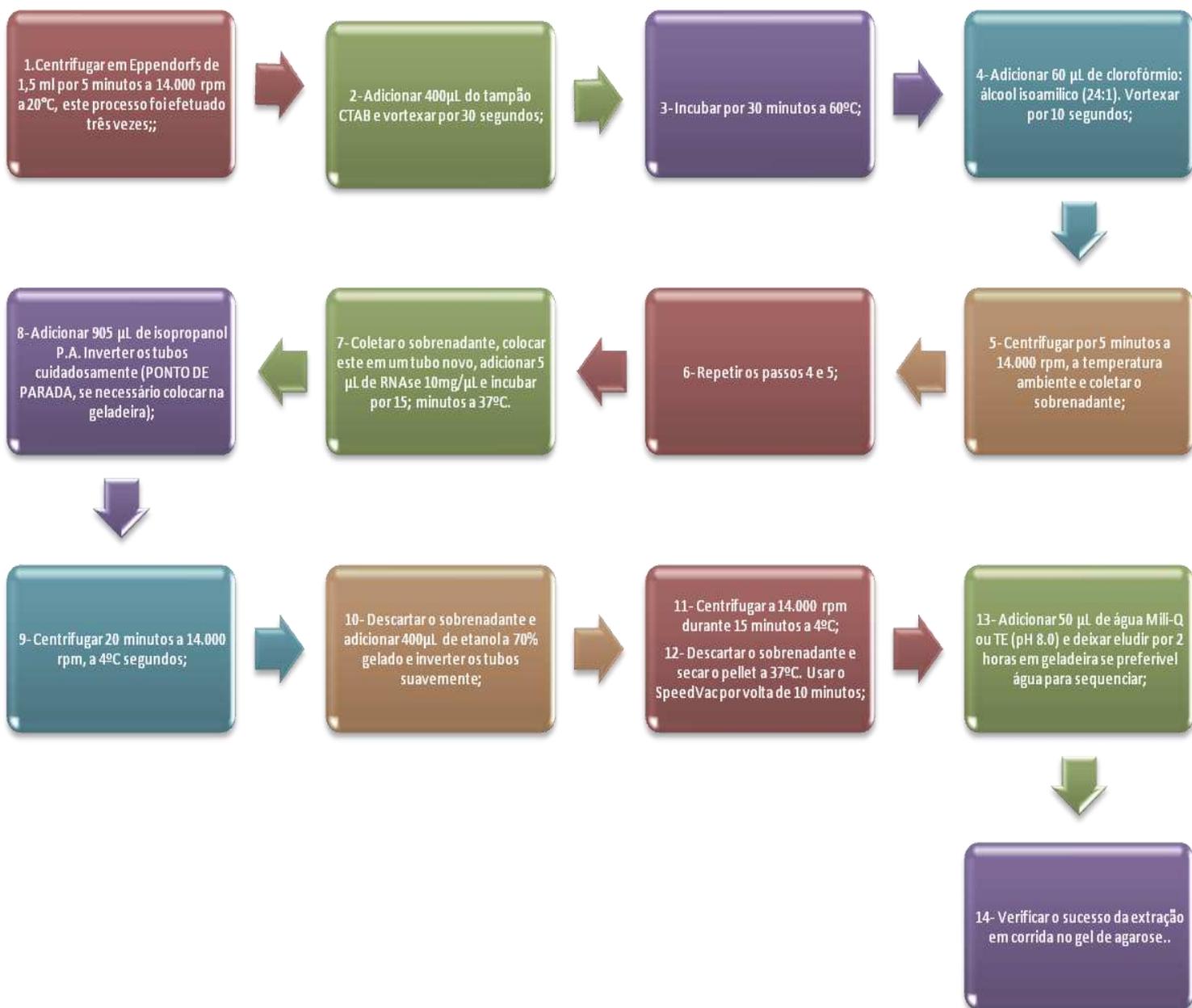
A extração de DNA é o primeiro passo para utilizar as técnicas moleculares. Neste aspecto, a qualidade e integridade do DNA são fundamentais para o sucesso nas etapas posteriores. Existem diferentes protocolos de extração de DNA que variam em função da espécie e do material a ser utilizado. A maneira de coletar e acondicionar o material, assim como o estado do mesmo fundamental para o sucesso da extração. Visto assim nessa pesquisa, que a solução extratora utilizada nessa análise foi CTAB, um detergente que solubiliza as membranas.

4.5.1 Procedimento de extração de DNA através da solução CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio):

A solução CTAB é um composto capaz de extrair e qualificar o DNA em células procarióticas de maneira rápida.

Esse método de produção consistiu em algumas etapas:

Figura 6- Workflow para extração de DNA através da solução CTAB (brometo de cetil-trimetilamônio).



4.6. O Gel de Agarose

A Agarose é um polissacarídeo extraído da parede celular de uma de alga vermelha marinha. Sua estrutura química possibilita a formação de um gel altamente resistente, mesmo em baixas concentrações. É considerado uma das principais ferramentas nos processos de fragmentação de amostras de DNA, RNA e proteínas (LUNN et al., 2015).

O gel de Agarose é feito apenas através da mistura de um tampão que nesse caso se usou o CTAB devido não apresentar toxicidade, mais a Agarose. A polimerização é mais rápida e o gel pode ser reciclado após o uso, isto é, pode ser reutilizado na elaboração de outros géis. Além disso, a eletroforese em gel de Agarose pode ser usada como método analítico ou preparativo, isto é, quando o fragmento de DNA é recuperado e purificado a partir do gel. Esse método permitiu que as moléculas fossem separadas de acordo com o seu tamanho, pois as de menor massa irão migrar mais rapidamente.

Após o processo de extração, torna-se necessário proceder a quantificação, para verificar a quantidade de DNA obtida, que é uma etapa fundamental para a eficiência da reação. Este procedimento é necessário porque a concentração de DNA inadequada implicará em falhas nas etapas subsequentes. Vale ressaltar que a quantidade de DNA obtida, varia em função do genoma e da eficiência do protocolo de extração utilizado. Após a quantificação e qualificação do DNA, devem ser feitas soluções de trabalho adequadas à concentração exigida no protocolo que será utilizado. O DNA genômico bruto foi extraído e corrido em gel 0,8%. Enquanto os amplicons foram corridos em gel de Agarose a 1,5%.

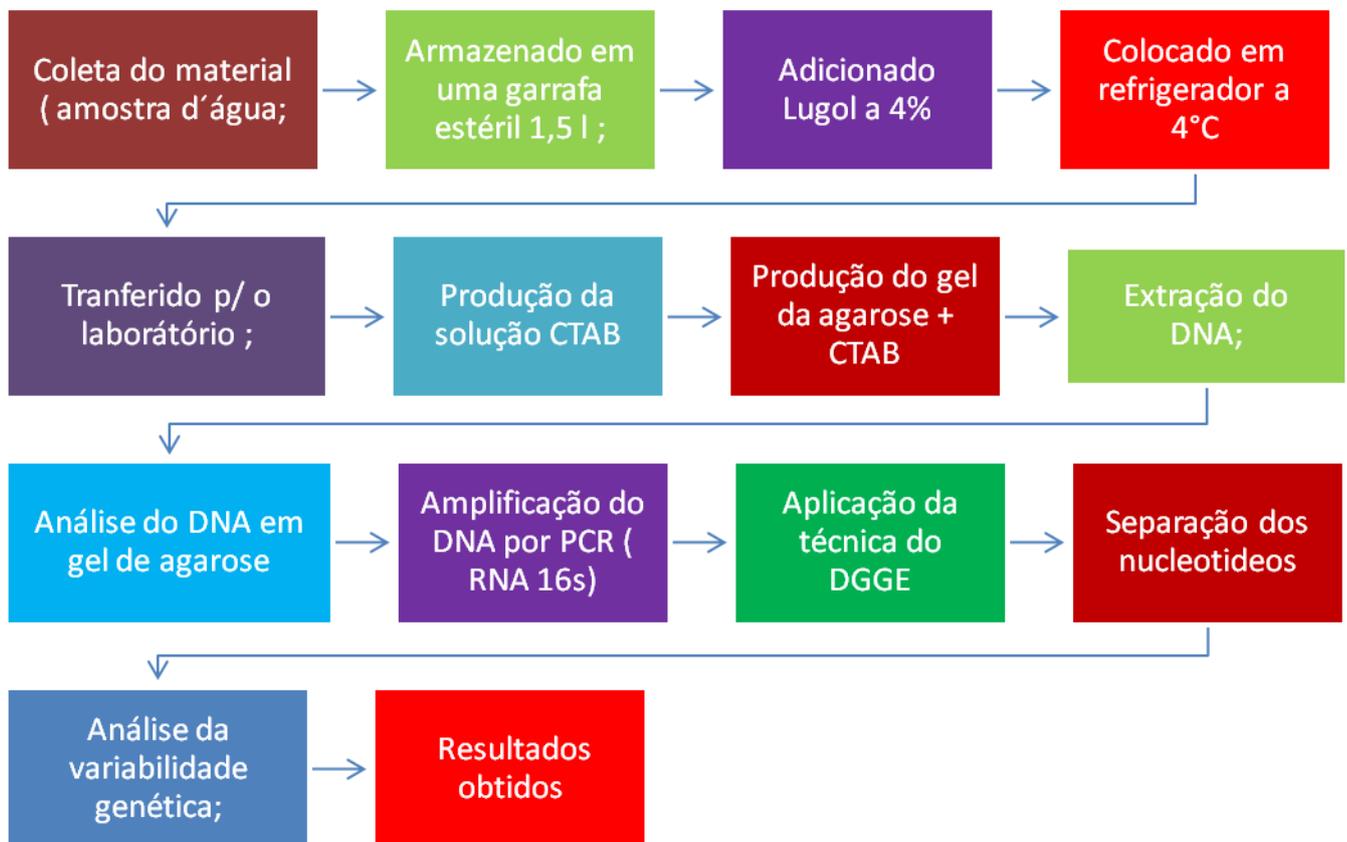
4.7. Amplificação por PCR

As reações de PCR foram realizadas no termociclador (Mastercycler Gradient 5331, Hamburg, Germany, Perkin-Elmer Corporation) contendo as seguintes concentrações 2,5mM de Mgcl₂, 10nmole de DNTPs, 40ng de DNA molde, 40pmole de cada *Primer*, 2,5Us de Taq DNA Polimerase (Taqgen Biosystems) e doisµl de Tampão de Enzima 10x, para um volume final de 20µl. O programa utilizado para as amplificações do DNA metagenômico consistiu em: 94°C por 3min, 56° por 30s, 94°C por 3min, 10 ciclos a 94°C por 1min, com a temperatura de anelamento diminuindo um grau a cada ciclo entre 56°C e 47°C por 1min, 72°C por 1min, 25 ciclos a 94°C por 1min, 46°C por 1min, 72°C por 1min e uma extensão

final de 72°C por 10min. Esse procedimento foi utilizado para os dois pares de *primers* empregados nesse trabalho.

Os amplicons gerados nas reações de PCR com os oligonucleotídios foram analisados em gel de agarose (Amershan Biosciences, Submarine Eletrophoresis Unit) a 1,5% durante 1 hora a 100V e 100mA, corados com SYBR GREEN 0,5µg/ml, e submetidos ao transiluminador de UV (Cole Parmer 97500, Chicago, USA) foram foto documentados com o aparato da Kodak (Kodak Edas 290 1D v3.5.4. Scientific Imaging Systems, New Haven, USA). Utilizamos dois µl das reações de PCR na eletroforese em gel de agarose para estimar a integridade e o tamanho molecular dos produtos, comparando-os com quantidades conhecidas do marcador de peso molecular de 1000pb 100ng/µl. A verificação da especificidade e tamanho molecular dos amplicons foi realizada também por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 10% durante 1 hora a 120 v e 120ma corado e foto documentado da mesma forma.

Figura 7- Workflow do processo de extração do DNA e aplicação do PCR-DGGE.



4.8. Análise em gel de DGGE

A metodologia foi aplicada a partir de uma amostra dos fragmentos de DNA onde são amplificados utilizando a técnica de PCR. Estes produtos incluem geralmente sequências amplificadas que são bem conservadas de organismo para organismo - por exemplo, as sequências para RNA 16S são uma escolha comum. Estes fragmentos são, então, submetidos à técnica de DGGE.

O DGGE é um tipo particular de eletroforese em gel em que um calor constante (cerca de 60°C) e uma concentração crescente de desnaturante são usados produtos químicos para forçar as moléculas de DNA para relaxar. Um olhar rápido na eletroforese diz-nos que esta é uma técnica de separação com base na carga elétrica, forma e peso molecular de partículas como o DNA, RNA e proteínas (MCAULIFFE L et al., 2005).

Na DGGE, o DNA, que está carregado negativamente, é atraído pelo elétron positivo e forçadas a migrar através dos poros de um gel de poliacrilamida. Uma vez que atinge a concentração de desnaturante reagentes em que se desenrola, diz ter derretido. Isto determina os domínios de fusão, que são definidos como extensões de pares de bases com uma temperatura de fusão idêntica. Em outras palavras, os pares de bases formados por nucleotídeos A (adenina) e T (timina), e aqueles que são formados por C (citosina) e G (guanina) são quimicamente derretido separados. Basicamente, o que acontece é que ligação de hidrogênio entre os pares de bases é quebrada pela temperatura e pelo aumento da gradiente de desnaturante produtos químicos (ureia e formamida). Qualquer variação de sequências de DNA no interior destes domínios resulte em diferentes temperaturas de fusão, fazendo com que, assim, as sequências diferentes para migrar em diferentes posições no gel. Isso fornece DGGE com o poder de distinguir entre sequências de tipo selvagem e mutantes sem o conhecimento prévio do que estas sequências são, justificando por que este método é usado para detectar mutações dentro organismos estreitamente relacionados (CREIGHTON, THOMAS C. 2014).

Após a confirmação da especificidade das ampliações os produtos de PCR foram analisados pela técnica de PCR-DGGE utilizando o aparelho DGGE-1001, C.B.S., Scientific Company. O PCR-DGGE foi realizado em poliacrilamida a 8% durante 20 horas a 75 v e 75ma, com gradiente de desnaturação Ureia-Formamida de 40% a 70%, considerando uma solução 100% desnaturante aquela possuindo 40% /vol. de formamida e 7M de Ureia, com a

temperatura do tampão de corrida TAE 1x (40 mm Tris, 20 mm Ácido Acético, um mm EDTA e ph 8.0) a 60°C. Foi carregado em cada canaleta do DGGE 10µl das reações de PCR, posteriormente o gel foi corado SYBR Gold (Sanguinetti et. al., 1994) e foto documentado da mesma forma que os géis de agarose.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como sabemos existe alguns marcadores moleculares que se destacam na detecção do material genéticos de microrganismos, os quais foram destacados durante o trabalho, Dentre eles, o DGGE foi o marcador genético utilizado nessa pesquisa para rastrear a variação de sequência de DNA de microrganismo. Sabendo que, DGGE é uma técnica de separação molecular de produtos de PCR de dupla fita com tamanhos semelhantes, mas com composições nucleotídicas diferentes. A técnica explora fundamentalmente os princípios básicos da físico-química do emparelhamento de bases de DNA, onde a adenina com a timina tem uma ligação mantida por duas pontes de hidrogênio, e a guanina com a citosina possuem uma ligação que é mais forte, mantida por três pontes de hidrogênio. A técnica trabalha com mobilidades distintas do DNA de cadeia dupla, mas parcialmente desnaturado numa matriz de poliacrilamida. O melting das cadeias duplas de DNA é alcançado durante a eletroforese por um aumento da concentração de compostos desnaturantes de DNA, principalmente a uréia e a formamida. A medida que o DNA é desnaturado, e no decorrer do experimento vai se tornando fita simples, a mobilidade da molécula é significativamente reduzida em comparação com a molécula de cadeia dupla, helicoidal (MUYZER, 1999). O DGGE foi primeiramente utilizado para a identificação de mutações pontuais em sequências de DNA. O seu uso foi posteriormente expandido para o estudo da diversidade genética microbiológica em amostras ambientais sem a necessidade de cultivo.

O método DGGE é relativamente rápido e permite análise de várias amostras simultaneamente. Entretanto, a interpretação dos resultados obtidos deve ser efetuada com alguns cuidados, em razão de limitações dessa metodologia. Além da eficiência das sequências iniciadoras utilizadas na etapa de amplificação e população dos microrganismos presentes na amostras, têm sido demonstrado experimentalmente que sequências 16S rDNA diferindo em mais de um par de bases podem migrar para posição idêntica no gel DGGE. Isto mostra que a presença de bandas em posição similar não implica, necessariamente, uma mesma sequência ou espécie de microrganismos. Provavelmente, esse fato explica um menor número de bandas observado no gel DGGE para algumas das amostras analisadas, quando comparado com o número de fenótipos de colônias observado em meio de cultura para bactérias, nas mesmas amostras (dados não mostrados).

Para este efeito, o DNA genômico bacteriano foi extraída a partir de amostras naturais, E os genes foram amplificados na reação em cadeia da polimerase PCR (SAIKI et al., 2009).

Isto resultou numa misturados produtos de PCR obtidos a partir das diferentes bactérias presente na amostra. Os produtos de PCR individuais foram posteriormente separadas por DGGE. O resultado foi um padrão de bandas, para a qual o número de bandas correspondeu a quantidade de membros em predominantes nas comunidades microbianas. Para obter informações mais detalhada foram transferidas para membranas de nylon e hibridado com um oligonucleótido marcado radioativamente em uma sonda específica para as bactérias redutoras de sulfato (AMANN et al., 2008). Em um estudo posterior, Muyzer e De Waal (2005) foram capazes de identificar comunidades de sequenciamento do DNA fluido a partir analisada.

O princípio da separação das moléculas no DGGE baseia-se no comportamento de melting dos fragmentos de DNA onde uma molécula de DNA migra num gel com gradiente de desnaturação até o seu domínio de melting menos estável. Após a eletroforese do gel, as mudanças de mobilidade dos fragmentos amplificados podem ser vistas com diferentes técnicas de coloração. Entre estas pode ser utilizado o brometo de etídio diretamente, o nitrato de prata revelado com hidróxido de sódio ou outro corante de fita simples como o SYBR Gold. Após isso, o gel será fotografado num sistema de luz visível branca ou utilizando um transiluminador de luz ultravioleta, dependendo é claro do corante utilizado, isto elimina a necessidade de auto-radiografia (GREEN et al., 2009). **Figura 9.**

Além disso, a DGGE é um método flexível que permite uma combinação única de diferentes abordagens para uma identificação mais precisa de, por exemplo, os genes funcionais presentes, em particular, populações bacterianas ou espécies bacterianas específicas, utilizando hibridação ou sondas específicas das espécies.

Figura8. Extração do DNA genômico das bactérias presentes na amostra de água.

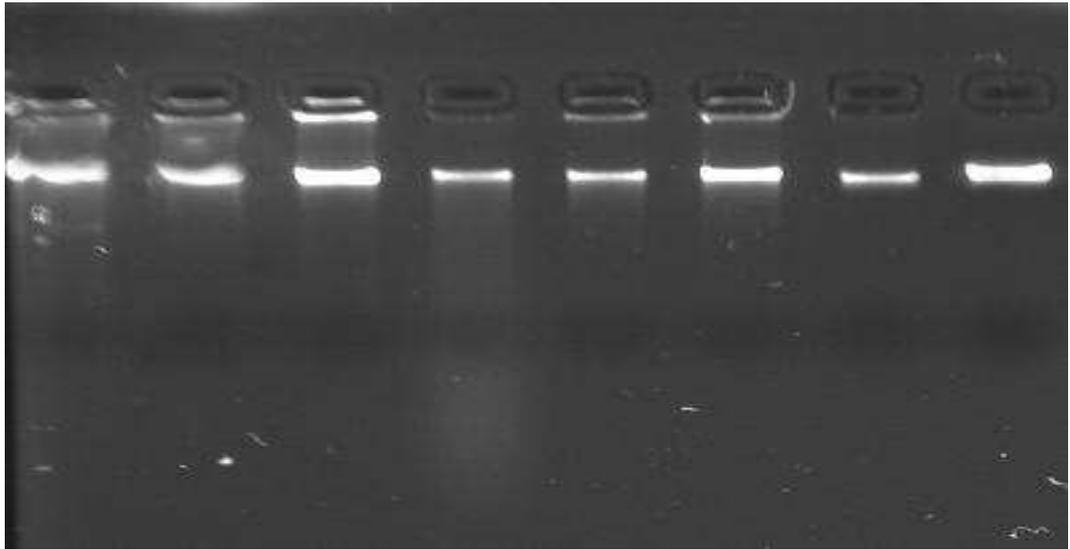


Figura 9. Amplificação do gene 16s universal bacteriano por PCR. A amplificação também foi repetida oito vezes apenas para testes. A esquerda o marcador de peso molecular 100pb.

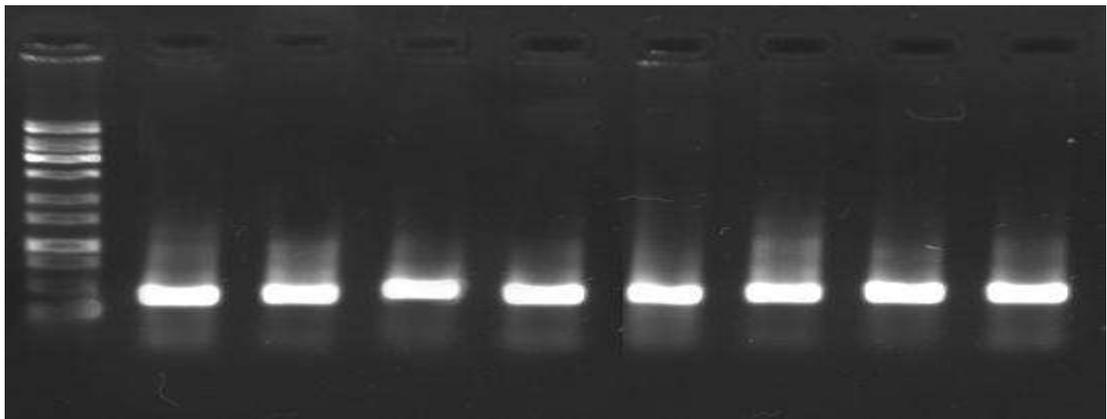
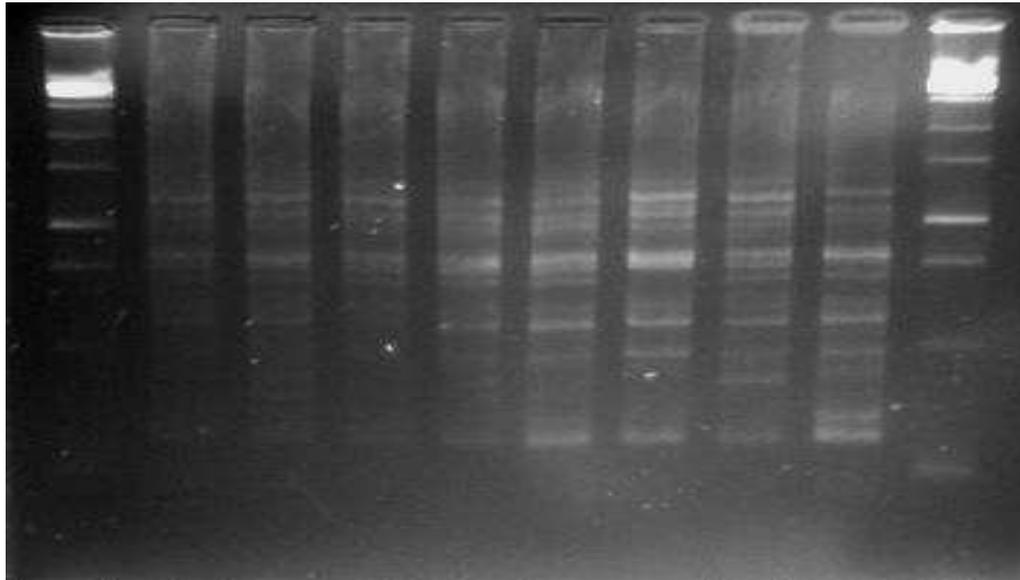


Figura 10. Aplicação de DGGE para análises da variabilidade de comunidades presentes na amostra aplicação das oito amostras no gel de Policrilamina com gradiente de concentração de desnaturação ureia-formamida de 40% – 60%. Nas extremidades tempos marcadores moleculares de fita simples específicos.



Os sistemas baseados em gel permanecem métodos predominantes utilizados em laboratórios de diagnóstico em todo o mundo (TINDALL et al., 2009). As principais técnicas para análises de rastreamento utilizadas, que são baseadas em gel, são o SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism), a CCM (Chemical Cleavage of Mismatch), a CSGE (Confirmation Sensitive Gel Electrophoresis), o TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) e o DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). É bem verdade que todas as técnicas possuem seus prós e seus contras, no caso do DGGE é interessante devido ao fato de que ele é um método bem amigável, não-radioativo, a rotina de trabalho é menos intensa e, o mais importante de todos, ele é um método confiável, facilmente reproduzível e tem uma taxa de detecção de mutações muito alta (KUPERSTEIN et al., 2006). Além disso, ele possui um ótimo custo-benefício, o DGGE é um protocolo que custa pouco mais do que uma eletroforese em poliacrilamida convencional.

A técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante possibilita a separação dos produtos de PCR (as fitas de DNA) de acordo com suas sequências de pares de bases, e não de acordo com os tamanhos dos fragmentos de DNA, como a maioria das técnicas de fingerprint genético. Assim, teoricamente, cada banda no gel representa uma espécie ou um grupo de espécies de bactéria, e a imagem final do gel corresponderá a um padrão de “códigos de barra” referente à comunidade bacteriana do material estudado. Os géis da eletroforese são confeccionados com Policrilamina (acrilamida e bisacrilamida) e o gradiente desnaturante pode ser químico (agentes desnaturante como ureia e formamida no DGGE), (GREEN et al., 2009).

PCR (Polymerase Chain Reaction) é uma técnica relativamente simples, que amplifica um molde de DNA para a produção de fragmentos específicos. Os métodos tradicionais de clonagem de uma sequência de DNA, muitas vezes necessitam de dias ou semanas de trabalho, mas a amplificação de sequências de DNA por PCR requer apenas algumas horas. Embora a maioria das análises bioquímicas, incluindo a detecção de ácidos nucleicos com radioisótopos, requer a utilização de quantidades significativas de material biológico, o processo de PCR requer muito pouco. Assim, a PCR pode alcançar a detecção mais sensível e níveis mais elevados de amplificação de sequências específicas em menos tempo do que os métodos anteriormente utilizados. Estas características tornam a técnica extremamente útil, não só em pesquisa básica, mas também em usos comerciais, incluindo testes de identidade genética, forense, controle de qualidade industrial e de diagnóstico *in vitro*. PCR básica é comum em muitos laboratórios de biologia molecular, onde é usado para amplificar fragmentos de DNA e detectar sequências de DNA ou RNA dentro de uma célula ou ambiente. No entanto, a PCR tem evoluído muito além amplificação e detecção simples, e muitas extensões do método de PCR original foram descritos. (PETER et al., 2011)

Apesar da dificuldade inerente a técnica de DGGE as análises dos fragmentos amplificados por PCR foram efetivas e replicáveis demonstrando um padrão de bandamento específico representativo das bactérias presentes no Açude Várzea Grande. Isso favorecerá a futura identificação bacteriana utilizando técnicas mais apuradas da biologia molecular como é o caso do sequenciamento nucleotídico para que cada microrganismo presente na amostra seja identificado ao nível de espécie sem a necessidade de cultivo bacteriano, e isto é uma economia de tempo e de recursos consideráveis.

Portanto, os resultados apresentados demonstram a validade da técnica de DGGE para fins de comparar e discriminar comunidades microbianas em amostras da água do açude várzea grandes. Porém, o mérito maior dessa metodologia é permitir a caracterização e a identificação de membros predominantes de grupos específicos de microrganismos, através da excisão, eluição, sequenciamento dos fragmentos e afiliação filogenéticas de sequências de interesse. Isto é a pretensão futura para o prosseguimento dos trabalhos.

Na análise pelo gel do DGGE podemos notar a presença de 12 a 15 bandas referentes a OTUs específicas. Isto é um indicativo da variedade de espécies de comunidades microbianas existentes no referido açude. Análises das condições físico-químicas e também da presença de grupos de cianobactérias diferentes estão também sendo realizadas no LACEN (Laboratório

Central do Estado de Pernambuco) e na CPRH (Companhia Pernambucana de Recurso Hídricos) para uma posterior publicação dos resultados globais. Mas, devido a um atraso nas análises as mesmas não estavam prontas para serem descritas neste trabalho. Acreditamos que a identificação das cianobactérias por características morfológicas convencionais poderão também servir de base para uma comparação efetiva entre os resultados encontrados com a técnica do DGGE.

Num sentido amplo é que podemos analisar a variabilidade genética através da técnica de DGGE nos microrganismos presentes na água do açude várzea grande. A relevância está implícita no estudo mais detalhado deste ambiente com a necessidade de identificar possíveis microrganismos causadores de acometimentos, utilizando outras técnicas para análise de DNA, com a finalidade de propiciar conhecimento inicial para um melhor entendimento da qualidade da água desse reservatório e das possíveis influencias na qualidade de vida dos habitantes que utilizam este açude para fazer suas atividades caseiras (cozinhar, tomar banho, limpeza doméstica, beber... etc.). Até o momento não foi identificada nenhuma fonte bibliográfica que contenha informações dessa natureza sobre o ambiente em estudo.

6. CONCLUSÕES

Ao longo do desenvolvimento desse trabalho foi possível observar diversos tipos de técnicas genéticas para analisar o DNA de microrganismos presentes na Água do Açude Várzea Grande, em Picuí-PB. Tais métodos facilitaram a análise e identificação dos microrganismos presentes nas amostras coletadas.

Sempre são verificadas dificuldades em extrair DNA de amostras ambientais de modo efetivo e representativo da possível diversidade microbiana existente naquele ambiente. A realização de análises ambientais sempre se depara com a subestimação das comunidades analisadas pelas tecnologias de análise hoje disponíveis para os cientistas. Apesar desses entraves corriqueiros foi possível observar que as extrações ocorridas no presente trabalho demonstraram um rendimento de DNA suficiente e de qualidade para as análises pretendidas e também para futuras análises gênicas pontuais. Os resultados obtidos com as extrações não fugiram dos padrões esperados para este tipo de amostra. Sendo assim conclui-se que o procedimento adotado para a análise pretendida foi suficiente para a obtenção de DNA genômico de qualidade.

As ampliações por PCR utilizando um conjunto de primers universais para o gene 16S bacteriano presentes nas amostras foi efetiva para a aplicação pretendida oferecendo o fragmento gênico de qualidade e com o tamanho esperado para as posteriores análises por DGGE.

Apesar da dificuldade inerente a técnica de DGGE as análises dos fragmentos amplificados por PCR foram efetivas e replicáveis demonstrando um padrão de bandamento específico representativo das bactérias presentes no Açude Várzea Grande. Isso favorecerá a futura identificação bacteriana utilizando técnicas mais apuradas da biologia molecular como é o caso do sequenciamento nucleotídeo para que cada microrganismo presente na amostra seja identificado ao nível de espécie sem a necessidade de cultivo bacteriano, e isto é uma economia de tempo e de recursos consideráveis.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

❖ A

ABELHO, M. Trabalhos práticos de Biologia – **Módulo Microbiologia**. ESAC, Coimbra, 2010.

ABELHO, M. Protocolos de Microbiologia Ambiental, Parte 3. **Qualidade microbiológica da água**. Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Coimbra. 2011.

AGUIAR, R.A.R., **Direito do meio ambiente e participação popular**. Brasília, 2005.

AMARAL, L.A. et al., Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. **Revista de Saúde Pública de São Paulo**, 2009; 37(4): 510-4. Disponível em: <http://www.scielo.org/pdf/rsp/v37n4/16787.pdf>.

AMANN RI, LUDWIG W & SCHLEIFER K-H (2008) **Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation**. *Microbiol. Rev.* 59: 143–169

ALMEIDA, R. M. A.; HUSSAR, G. J.; PERES, M. R.; FERRIANI JR., A. L. Qualidade microbiológica do Córrego “Ribeirão dos Porcos” no município de Espírito Santo do Pinhal – São Paulo. **Revista Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, 1(1): 51-56. 2009.

AMORIM, M. C. C.; Porto, E. R. Avaliação da Qualidade Bacteriológica das Águas de Cisternas: Estudo de Caso no Município de Petrolina - PE. **Anais do 3º Simpósio Brasileiro de Captação de Água de Chuva no Semiárido**. Campina Grande – PB, ABCMAC, 2001. Disponível: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/CPATSA/9058/1/OPB132.pdf>> Acessado em: 25/10/15.

APHA, 1998. Standard Methods for the Examination of water and Wastewater. 20ª ed. United States of América. **American Public Health Association**, 1998.

ARAÚJO, K.L. O papel do polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) Povo II e Xba 1 - e das pequenas repetições em tandem (STRs) (TA)_n e (GT)_n do receptor de estrogênio alfa (ESR1). Na suscetibilidade do câncer de mama (BRCA). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.55, n.2, p.185-192, abr-jun._2009.

❖ B

BALOGH M., BALDRY I.K., NICHOL R. et al., 2004a, *ApJ*, 615, L101

BORDALO, A. A. “Fecal coliform recovery in two standard media along an estuarine gradient” **Water Science Technology**, v.28, p.2331-2334, 1994.

BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa:UFV, 1997.

BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM. **The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution.** Science, v.324, n.5926, p.522-528, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.** – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 212 p.

❖ C

CAETANO, A.R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de zootecnia**, v.38, p.185-192, abr-jun., 2009.

CASALI, C. A. Qualidade da água para o consumo humano ofertada em escolas e comunidades rurais da Região Central do Rio Grande de Sul. **Dissertação de Mestrado.** Santa Maria: UFSM, 2008.

CEBALLOS, B.S. O. Determinação de coliformes fecais E. coli pelo método do substrato definidos: alguns inconvenientes. **Atualidades técnicas Revista de Engenharia sanitária e ambiental.** V.3. Nº1:jan./fev. e nº 2 abr./jun., 1998.p 9-10.

Genetic-marker. **Collins English Dictionary** - Complete & Unabridged 10th Edition. Harper Collins Publishers. 16 Nov. 2015. <Dictionary.com/http://dictionary.reference.com/browse/genetic-marker>. Acesso em 16 de novembro, 2015.

CONAMA, CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE (Brasil). Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000. Dispõe sobre qualidade das águas de balneabilidade e alteram o disposto na Resolução nº 20, de 18 de junho de 1986. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil.** Brasília, 08 de Jan. 2001.

CREIGHTON, THOMAS C. 2014. Encyclopedia of Molecular Biology, Volumes 1-4. John Wiley & Sons.

❖ D

DAVID, M. A. **Tópico nº 9 do CBC de Ciências.** 2010. Disponível em: Acessado em: 20 out 2015.

DNOCS – Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (Fortaleza/CE). **Perímetro Irrigado Araras Norte.** Disponível em: Acessado em: 20 de setembro 2015.

❖ E

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Atlas do meio ambiente do Brasil**. Brasília, DF: Terra Viva, 2008. 138 p.

❖ F

FALEIRO, F.G.; PIRES, J.L.; LOPES, U.V. Uso de marcadores moleculares RAPD e microssatélites visando à confirmação da fecundação cruzada entre *Theobroma bromacação* e *Theobroma grandiflorum*. **Agrotrópica**, Itabuna, v 15. p. 41-46, 2003.

FALEIRO, A.S.G.; SANTOS, M.C.M. Variability in cação accessions from the Brazilian, Ecuadorian, and Peruvian Amazons based on molecular markers. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, Viçosa, v.4, p.227-233, 2004.

FALEIRO, F.G. Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos. Planaltina, DF: **Embrapa Cerrados**, p. 102, 2007.

FISCHER SG, LERMAN LS (1983). **DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 80(6): 1579-1583.

FORTES, Marina Rufino Salinas – **Polimorfismo dos genes CAPN1, CAST, LEP, TG e DGAT1 como possíveis indicadores da qualidade da carne em bovinos zebuínos e cruzados abatidos em idade jovem**, São Paulo/2007.

FRANCO, R. A. M.; HERNANDEZ, F. B. T.; VANZELA, L. S. “Utilização dos parâmetros coliformes totais e fecais e oxigênio dissolvido na avaliação da qualidade de água para irrigação XVIII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos 12 na microbacia do córrego três barras, Marinópolis, SP”. **In anais do XXXVI Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola**, Bonito - MS, 30-7 a 2-8-2007.

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde Ministério da Saúde. **Manual Prático de Análise de Água**. Brasília, 2006.

❖ G

GONÇALVES, M. A. **Tópico nº 9 do CBC de Ciências**. 2010. Disponível em: . Acessado em: 20 out 2015.

❖ H

HILLIS D. M.; MORITZ, C.; MABLE, B. K. *Molecular Systematics*. Massachusetts: **Sinauer Associates**, 2000. MERTEN, G.H.; MINELLA, J.P. Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. *Agroecol. e Desenvolv. Rur. Sustent.*, v. 3, p. 33-38, 2002.

HILSDORF, A; KRIEGER, J. E. *Biologia molecular na conservação de peixes: ferramentas moleculares e conservação genética*. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 1, p. 10-12. Disponível em: . Acesso em: 13 nov 2015.

❖ K

KORKKO J, Annunen S, Pihlajamaa T et al. (2013). **Conformation sensitive gel electrophoresis for simple and accurate detection of mutations**: comparison with denaturing gradient gel electrophoresis and nucleotide sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(4): 1681-1685.

KUPERSTEIN G, Jack E, Risch H et al (2006) **A fluorescent multiplexed-DGGE (FMD) screening test for BRCA1 gene**. *Genet Test* 10:1-7

❖ L

LEUNG YF, Tam PO, TONG WC et al. (2011). **High-throughput conformation-sensitive gel electrophoresis for discovery of SNPs**. *Biotechniques* 30(2): 334-335, 338-340.

LEWIN, B. *Genes VII. Tratado de biologia molecular*. Editora ARTMED. São Paulo, p.960. 2001.

LIPP, M. LIPP, A. BLUTH, F. EYQUEM, L. KRUSE, H. SCHIMMEL AND G. VAN DEN EEDE. Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs, **European Food Research Technology** v. 212, p. 497-504, 2001.

LOVELL, C.R., 2001. Recovery and phylogenetic analysis of nit sequences from diastrophic bacteria associated with dead aboveground biomass of *Spartina alterniflora*. **Appl. Environ. Microbiol.** 67:5308;14.

LUNN, G et. al SANSONE, E.B. Ethidium bromide: destruction and decontamination of solutions. **Analytical Biochemistry**, London, v.162, n.2, p.453, 1987.

❖ M

MATTOS, M. L. T.; SILVA, M. Controle da Qualidade Microbiológica das Águas de Consumo na Microbacia Hidrográfica Arroio Passo do Pilão. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Rio Grande do Sul, 2002.

McAuliffe L, Ellis RJ, Lawes JR, Ayling RD, Nicholas RA. 2005. 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; **a single generic test for detecting and differentiating Mycoplasma species**. J Med Microbiol. 54(Pt 8):731-9.

MERTEN, G.H.; MINELLA, J.P. Qualidade da água em bacias hidrográficas rurais: um desafio atual para a sobrevivência futura. **Agroecol. e Desenvol. Rur. Sustent.**, v. 3, p. 33-38, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em saúde. **Manual de procedimentos de vigilância em saúde ambiental relacionada a qualidade a qualidade da água para consumo humano**. Brasília: DF, 2006.

MOSS, D. W. **Isoenzimas**. London: Capman & Hall, 1992

❖ N

NAGAMINE, HIGUCHI. Genetic distance and classification of domestic animals using genetic markers. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 118, n. 2, p. 101-109, 2001. PELZER, Michael J.; CHAN, E. C. S.; KRILG, Noel R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. V. 2; 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996.

NASS, Daniel Perdigão. Conceito de poluição. **Revista eletrônica de ciências**. São Paulo: N°. 13; p. 1-2, nov. 2002. Disponível em http://www.cdcc.usp.br/ciencia/artigos/art_13/poluicao.html. Acesso em 13 agosto, 2015.

NISHIO, S.R. Avaliação da Comunidade Microbiana Procarionte Através de Técnicas Moleculares – FISH, PCR/DGGE e Sequenciamento em Sistemas Artificiais de Redução de Cargas: Ênfase ao Estudo de Lagoa de Estabilização Facultativa. 2010. **Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas**, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

❖ O

OPAS/OMS, 2001. Água e saúde – Brasil. **Representação sanitária pan-americana escritório regional da organização mundial da saúde**, 2001.

❖ P

PÁDUA HB. Informações sobre os Coliformes totais/ fecais e alguns outros organismos indicadores, em sistemas aquáticos – Aquicultura [internet]. Goiás: **Caderno de Doutrina Ambiental**;2003[Acessado 12 Out 2015]. 20p. Disponível em: http://www.serrano.neves.nom.br/helcias/018_helcias.pdf.

PARO, Gracielly C.; PANZA, Sandra G. Avaliação parasitológica da água para irrigação de hortas das cidades de Engenheiro Beltrão e Campo Mourão, PR. **Revista Higiene Alimentar**. São Paulo: V.22; 1.ed. p.29 -31, out. 2008.

PELCZAR, Michael J.; CHAN, E. C. S.; KRILG, Noel R. Microbiologia: conceitos e aplicações. V. 2; 2.ed. São Paulo: **Makron Books**,1996.

PREFEITURA MUNICIPAL DE PICUI, em:< <http://www.picui.pb.gov.br>>. Acesso em 18 fev.2015.

PETER M., GILBERT E., DELATTRE O. **A multiplex real-time pcr assay for the detection of gene fusions observed in solid tumors**. Lab. Invest. 2011;81(6):905–912

❖ R

REBOUÇAS, A.C. (org.). Águas doces no Brasil. Escrituras editora: São Paulo, 2002. **American Public Health Association** . Standard Methods for the examination of water and wasterwater,16 ed. New York, Apha, 2002.

RIBEIRO, E. N.; Avaliação de Indicadores Microbianos de Balneabilidade em Ambientes Costeiros de Vitória/ES. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória/ES, março de 2002.

ROCHA, Julio C. **Introdução a química ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2004.

❖ S

SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL SJ, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB & ERLICH HA (2009) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. Science 239: 487–491

SANEAGO – **Saneamento de Goiás S.A**, 2009. Disponível em: Acessado em: 24/10/2015.

SPERLING, Marcos Von. **Princípios de tratamento biológico de águas residuais: Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. V.1; 3.ed. Belo Horizonte: UFMG, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE INFECTOLOGIA, 2001. Disponível em: Acessado em: 21/10/15.

❖ T

TEIXEIRA, Wilson. et al. **Decifrando a terra**. São Paulo: Oficina de textos, 2000.

TEIXEIRA, Wilson. et al. **Decifrando a terra**. São Paulo: Oficina de textos, 2010.

TINDALL RS, ROLLINS JA, PHILLIPS JT, GREENLEE RG, WELLS L, Belendiuk G. **Preliminary results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial of cyclosporine in myasthenia gravis.** 2009. N Engl J Med 1987; 316: 719–724.

❖ U

UNDERHILL PA, Jin L, ZEMANS R et al. (2012). A pre-Columbian Y chromosome-specific transition and its implications for human evolutionary history. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 93(1): 196-200.

❖ W

Williams CJ, Rock M, Considine E et al. (2008). **Three new point mutations in type II procollagen (COL2A1) and identification of a fourth family with the COL2A1 Arg519-->Cys base substitution using conformation sensitive gel electrophoresis.** Human Molecular Genetics 4(2): 309-312.

WEISING , K. **DNA fingerprinting in plants and fungi.** CRC Press, Boca Raton.1995.

❖ Z

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (ssr)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics** 20:176-183, 1994.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Açude Várzea Grande no município de Picuí



APÊNDICE B- Local específico de onde as amostras de Água foram coletadas do Açude para análise.

