



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



MILENA ROBERTA FREIRE DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO AMOSTRAL DA MICROBIOTA DO RIO SÃO FRANCISCO
NO MUNICÍPIO DE PAULO AFONSO, BAHIA, E SUA RELAÇÃO COM A SAÚDE
PÚBLICA**

Recife- PE,
2021

MILENA ROBERTA FREIRE DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO AMOSTRAL DA MICROBIOTA DO RIO SÃO FRANCISCO
NO MUNICÍPIO DE PAULO AFONSO, BAHIA, E SUA RELAÇÃO COM A SAÚDE
PÚBLICA**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Pernambuco, como
requisito parcial para obtenção do
título de mestre em Ciências
Biológicas

Área de concentração: Meio
Ambiente

Orientadora: Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira

Co-orientadora: Dra. Livia Caroline Alexandre de Araújo

Recife- PE,
2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Silva, Milena Roberta Freire da

Caracterização amostral da microbiota do Rio São Francisco no município de Paulo Afonso, Bahia, e sua relação com a saúde pública / Milena Roberta Freire da Silva. – 2021.

110 f. : il.

Orientadora: Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira.

Coorientadora: Dra. Livia Caroline Alexandre de Araújo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2021.

Inclui referências.

1. Ecologia dos rios. 2. Água - Poluição. 3. Saúde ambiental. I. Oliveira, Maria Betânia Melo de (orientador). II. Araújo, Livia Caroline Alexandre de (coorientadora). III. Título.

577.64

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-127

MILENA ROBERTA FREIRE DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO AMOSTRAL DA MICROBIOTA DO RIO SÃO FRANCISCO
NO MUNICÍPIO DE PAULO AFONSO, BAHIA, E SUA RELAÇÃO COM A SAÚDE
PÚBLICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre/doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 30/09/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Kátia Cilene da Silva Felix (Examinadora Externa)

Centro Universitário do Rio São Francisco

Dedico este trabalho aos meus avós José Grigrório e Inês Freire (*in memorian*) e aos meus pais Paulo Roberto e Irenildes Freires por todo amor, incentivo, força e apoio de estarem ao meu lado na conquista dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, minha eterna gratidão por seu amor e misericórdia. Por me sustentar em todos os momentos e por me ensinar em meio as minhas limitações. Obrigada por me permitir conviver com pessoas tão especiais que enchem minha vida de sentido. Obrigada por nunca me deixar desistir dos meus sonhos e ser persistente nos meus objetivos, sei que tudo que o senhor faz tem um propósito, e hoje minha vida se enche de alegria por vê que tudo está se realizando da forma mais linda possível.

Aos meus pais Paulo Roberto e Irenildes Freires, obrigada por acreditarem e incentivarem os meus sonhos, vocês são minha fonte de inspiração, responsáveis pela formação do meu caráter e personalidade. Obrigada por compreenderem a minha ausência. Foram momentos difíceis e de muita saudade, mas hoje a recompensa chegou. Sei o quanto estão orgulhosos e felizes por mim. Obrigada por serem esses pais maravilhosos que sempre estão dispostos a fazerem o melhor pela minha formação. Vocês são o meu alicerce, o meu orgulho e maior exemplo de vida.

Ao meu namorado Caique Braz, obrigada por estar ao meu lado durante essa caminhada. Por ser meu incentivador, companheiro, amigo e por cuidar tão bem de mim em todos os momentos.

Ao meu tio e padrinho Aauto Freire, obrigada por tanto amor, cuidado e proteção mesmo longe.

A minha tia Maria do Socorro, obrigada por sempre me incentivar a apoiar meus sonhos. És uma inspiração para minha vida!

As minhas primas Izabel Ferreira e Sarah Gomes, minhas companheiras de vida, hoje sei o quanto se orgulham dessa minha conquista. Obrigada por sempre estarem do meu lado e torcerem por mim.

À minha família, gratidão por todo apoio e torcida na conquista dos meus objetivos.

À minha amiga Karolayne Silva, obrigada por tornar o período do mestrado tão incrível, assim como foi na graduação. Sou grata a Deus por ter você na minha vida, por todos os momentos de apoio, incentivo e companheirismo. Hoje essa conquista tem muito de você. Que possamos trilhar

o caminho do sucesso sempre juntas. Estarei sempre aqui para tudo o que precisar.

À minha orientadora professora Dra. Maria Betânia, gratidão por ter confiado no meu potencial e por ter me proporcionado viver uma experiência tão rica como o mestrado. Sou muito grata por poder aprender tanto com a senhora. Obrigada por sempre me fazer dar o melhor de mim nas produções, pois quando eu achava que não conseguiria mais, a senhora mostrava que ainda poderia ir além e fazer melhor, e foi esse incentivo que hoje me faz almejar coisas maiores.

À minha co-orientadora Livia Caroline, a senhora foi um anjo que surgiu no meu caminho, tudo que aprendi na prática foi graças a ti. Muito obrigada por toda paciência e dedicação. Sei que ainda faremos grandes trabalhos juntas.

Ao professor Fabricio Motteran em nome do Laboratório de Biologia Molecular e Tecnologia Ambiental (LABIOTA) por todo suporte na execução da minha pesquisa.

Aos professores Ricardo Nogueira, Kátia Felix, Kaline Katiele e Ilton Palmeiras por todo suporte desde a graduação, vocês fazem parte desta conquista. Sou muito grata por ter tido professores tão incríveis como vocês.

Agradeço a Bruno Veras, Caio e Rodrigo Reges por toda ajuda na execução do projeto e até mesmo pelos conselhos.

Agradeço a Milena Danda pela parceria, sua ajuda foi essencial para a concretização deste trabalho.

A Michael, Ionara e Isac obrigada por terem feito parte desta caminhada, a contribuição de todos foi essencial.

Aos companheiros de trabalho do Laboratório de Biologia Molecular por todo conhecimento compartilhado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo suporte financeiro que possibilitou a realização desse trabalho.

Aos parceiros, Laboratório de Parasitologia do Centro Universitário do Rio São Francisco (UniRios), ao Laboratório de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz, Recife e ao Laboratório de Biologia Molecular e Tecnologia Ambiental (LABIOTA) do Centro de Tecnologia e Geociências (CTG-UFPE) por todo auxílio na realização das análises.

“Sem sonhos, a vida é uma manhã sem orvalhos, um céu sem estrelas, um oceano sem ondas, uma vida sem aventura, uma existência sem sentido”.

Augusto Cury.

RESUMO

O rio São Francisco corresponde a um dos mais importantes rios brasileiros, sendo a principal fonte hídrica da região Nordeste do Brasil. O uso indiscriminado de suas águas vem intensificando seu processo de degradação. No município de Paulo Afonso, Bahia, esta bacia hidrográfica desempenha funções importantes para a população local. Contudo, o crescimento populacional desordenado e a utilização inadequada desse ecossistema vêm impactando a qualidade da água e vida aquática. O presente estudo objetivou avaliar os parâmetros físico-químicos, microbiológicos e parasitológicos deste rio no município de Paulo Afonso, Bahia, bem como realizar trabalhos de revisão relacionados a temas voltados para o monitoramento de ambientes aquáticos impactados. Para isso, foram realizadas coletas de água em cinco pontos estratégicos denominados P1-P5. A determinação dos parâmetros físico-químicos e de metais foram realizadas por meio de equipamentos e kits específicos. Já a presença de contaminantes emergentes foi determinada por meio da análise cromatografia líquida de alta eficiência. Para classificação e identificação bacteriana foram utilizadas a coloração de Gram e o método bioquímico automatizado, respectivamente. Este último também foi aplicado para identificação do perfil de suscetibilidade/resistência a antibióticos. Adicionalmente, as amostras foram avaliadas quanto à presença de coliformes totais, termotolerantes e parasitas. Os resultados demonstraram que a maioria dos pontos investigados apresentou os parâmetros físico-químicos em conformidade com a resolução nº 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA). Apenas o P3 apresentou divergência para os valores de amônia encontrados. Todos os metais investigados foram detectados na água, todavia, estes estavam dentro dos valores limítrofes. Em relação à análise cromatográfica não foi identificado nenhum dos contaminantes avaliados. Já em relação a caracterização da microbiota, foram identificadas tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, classificadas em 15 gêneros, representando 54 isolados. O perfil de suscetibilidade/resistência revelou que 40% foram resistentes à ampicilina e 31% a amoxicilina/ácido clavulânico. Dos pontos investigados o P1 e o P3 foram os mais contaminados, uma vez que apresentaram maior diversidade bacteriana e resistência aos fármacos testados. Coliformes totais estavam presentes nos cinco pontos com valores iguais ou maiores que 6.600 NMP/100 mL. Já a análise parasitológica detectou parasitas nos pontos P1, P3 e P5,

sendo estes as espécies: *Endolimax nana* (P1 e P3); *Entamoeba coli* (P5) e *Tênia* sp. (P3). Os resultados aqui apresentados correspondem a uma alternativa viável para o monitoramento de ambiente aquático impactado. A presença e disseminação de bactérias patogênicas é um indicativo de que este ambiente está albergando microrganismos patogênicos que representam risco à população podendo contribuir com problemas futuros de saúde pública. Diante disso, é evidente que sem a tomada de medidas corretivas pleiteando a recuperação do rio e a conscientização da população do entorno, os riscos para a saúde, segurança e bem-estar dos que utilizam esta água tendem a crescer.

Palavras-chave: Bacia hidrográfica; Patógenos bacterianos; Resistência; Saúde pública.

ABSTRACT

The São Francisco River corresponds to one of the most important Brazilian rivers, being the main water source in the Northeast region of Brazil. The indiscriminate use of its waters has intensified its degradation process. In the municipality of Paulo Afonso, Bahia, this watershed plays important roles for the local population. However, disordered population growth and inadequate use of this source ecosystem impacting the quality of water and aquatic life. The present study aimed to evaluate the physical-chemical, microbiological and parasitological parameters of this river in the municipality of Paulo Afonso, Bahia, as well as to carry out review works related to themes related to the monitoring of impacted aquatic environments. For this, water collections were carried out at five strategic points called P1-P5. The determination of physical-chemical and metal parameters were performed using specific equipment and kits. The presence of emerging contaminants was provided by means of high performance liquid chromatography analysis. For bacterial classification and identification, Gram stain and automated biochemical method were used, respectively. The latter was selected for identification of the antibiotic susceptibility/resistance profile. Additionally, how they were evaluated for the presence of total coliforms, thermotolerants and parasites. The results showed that most of the investigated points present the physical-chemical parameters in accordance with the resolution nº 357/2005 of the National Council for the Environment (CONAMA). Only P3 diverged from the ammonia values found. All investigated metals were detected in water, however, these were within the limit values. Regarding the chromatographic analysis, none of the contaminants evaluated were identified. In relation to a characterization of the microbiota, both Gram-positive and Gram-negative bacteria were identified, classified into 15 genera, representing 54 named. The susceptibility/resistance profile revealed that 40% were resistant to ampicillin and 31% to amoxicillin\clavulanic acid. Of the investigated points, P1 and P3 were the most contaminated, as they are a source of greater bacterial diversity and resistance to the drugs tested. Coliforms were present in the five points with values equal to or greater than 6600 NMP / 100 mL. The parasitological analysis detected parasites at points P1, P3 and P5, these being as species: *Endolimax nana* (P1 and P3); *Entamoeba coli* (P5) and Tapeworm sp. (P3). The results here attributed to a viable alternative for the monitoring of impacted aquatic environment. The presence

and dissemination of pathogenic bacteria is an indicator that this environment is harboring pathogenic microorganisms that pose a risk to the population and may contribute to future public health problems. Therefore, it is evident that without taking corrective measures claiming the recovery of the river and the awareness of the surrounding population, the risks to the health, safety and well-being of those who use this water tend to grow.

Keywords: Hydrographic basin; Bacterial pathogens; Resistance; Public health.

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1 - Proporção da população que usa os serviços de água potável com gestão segura em 117 países.....	18
Figura 2 - Principais fontes poluidoras dos ambientes aquáticos	22
Figura 3 - Ser humano como fonte geradora de resíduos no meio ambiente e sua destinação final	23
Figura 4 - Mapa de localização da Região Hidrográfica do Rio São Francisco.....	24
Figura 5 - Divisão Fisiográfica da Região Hidrográfica do Rio São Francisco	25
Figura 6 - - Representação esquemática dos pontos de estudo no município de Paulo Afonso – BA.....	27

ARTIGO DE REVISÃO 2

Figura 1- Fluxograma de análise de inclusão e exclusão dos artigos selecionados de acordo com as diretrizes do protocolo PRISMA	52
Figure 2 - Respresentação esquemáticas das principais técnicas molecular utilizadas para identificação de patógenos de importância clínica e ambiental	57

CAPÍTULO DE LIVRO

Figura 1- Esquema representativo da origem potencial, propagação, transmissão, degradação e diluição de ARBs e ARGs.....	72
--	----

ARTIGO EXPERIMENTAL

Figura 1– Descrição geográfica dos pontos de coleta em Paulo Afonso – BA, Brasil	86
--	----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO DE REVISÃO 2

Tabela 1 - Descrição dos artigos selecionados sobre identificação de bactérias patogênicas de importância clínica e ambiental utilizados nesta revisão, contemplando a abordagem, título, objetivo, técnica molecular, autor/ano 53

CAPÍTULO DE LIVRO

Tabela 1- Prevalência dos principais antibióticos encontrados em estudos de ambientes de água doce 73

Tabela 2- Grupos e espécies de ARBs detectados em análises de ambientes de água doce 74

Tabela 3- ARGs relatados em estudos de estações de tratamento para efluentes .. 75

ARTIGO EXPERIMENTAL

Tabela 1 - Avaliação dos parâmetros físico-químicos investigados em cinco pontos do Rio São Francisco, nordeste do Brasil 89

Tabela 2 - Concentração de metais em cinco pontos de monitoramento do Rio São Francisco em Paulo Afonso, BA, nordeste do Brasil 92

Tabela 3 - Caracterização bioquímica e perfil de resistência dos isolados bacterianos obtidos do Rio São Francisco, Paulo Afonso-BA..... 93

Tabela 4 - Análise de coliformes totais e termotolerantes nos cinco pontos avaliados 96

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 GERAL.....	17
2.2 ESPECÍFICOS	17
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
3.1 AMBIENTES AQUÁTICOS IMPACTADOS	18
3.2 BIOMONITORAMENTO DE AMBIENTES AQUÁTICOS IMPACTADOS.....	19
3.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MICRORGANISMOS ÁQUATICOS.....	19
3.4 POLUENTES EM AMBIENTES ÁQUATICOS	20
3.5 CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA E OS IMPACTOS PARA SAÚDE PÚBLICA	22
3.6 ASPECTOS GERAIS DO RIO SÃO FRANCISCO.....	24
4 RESULTADOS	28
4.1 ARTIGO DE REVISÃO.....	28
4.2 ARTIGO DE REVISÃO.....	48
4.3 CAPÍTULO DE LIVRO.....	69
4.4 ARTIGO EXPERIMENTAL	82
5 CONCLUSÕES.....	105
6 SÚMULA CURRICULAR	106
REFERÊNCIAS	107

1 INTRODUÇÃO

Os recursos hídricos são essências à manutenção da vida, representando um meio natural insubstituível em todo o processo ecológico considerado, portanto, fundamental desde o início da história da civilização humana (YI *et al.*, 2017). Sua utilização busca atender as necessidades essenciais dos seres vivos. No entanto, em decorrência do crescimento populacional, as atividades humanas têm representado sérias ameaças a esses recursos (ZHONG *et al.*, 2018).

Aproximadamente 82% da população mundial não tem acesso à água potável de qualidade. Decorrente disso, anualmente, mais de cinco milhões de pessoas morrem por adquirirem doenças veiculadas pela água. No Brasil, 35 milhões de pessoas não tem acesso à água tratada, bem como menos da metade (46%) do esgoto do país é tratado (GUEDES *et al.*, 2017; HECK *et al.*, 2021).

O suprimento de água de boa qualidade é essencial para o desenvolvimento econômico, para a qualidade de vida das populações humanas e para a sustentabilidade dos ciclos dos nutrientes do planeta. Todavia, a sociedade tem explorado de forma não sustentável, ocasionando graves problemas à fauna e à flora, provocando sua escassez. (OLIVEIRA *et al.*, 2021).

Os rios, encontram-se entre os ecossistemas mais vulneráveis e sujeitos a diversos impactos antrópicos. Esses ambientes vêm sofrendo graves transformações em consequência da grande quantidade de efluentes sem tratamento prévio, o que culmina na deterioração das propriedades físicas, químicas e biológicas (AGUILLAR *et al.*, 2020).

O monitoramento e avaliação da qualidade da água são fatores primordiais para a gestão adequada desse recurso. Desta forma, analisar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos da água permite detectar não apenas o grau de poluição presente, mas também auxilia na tomada de decisão por meio de estratégias que melhorem e/ou resgatem a qualidade de água e vida desses ecossistemas (QUINELATO *et al.*, 2020), eliminando os riscos para o ambiente e para saúde pública (DIAS, 2020).

O Rio São Francisco é um importante curso de água que percorre aproximadamente 2.756 km. Tem uma grande importância regional, principalmente para as comunidades ribeirinhas e é considerado como um dos principais fatores de desenvolvimento do Nordeste. O abuso indiscriminado sofrido pelo corpo d'água ao

longo do seu leito vem intensificando o processo de degradação do rio (MELO *et al.*, 2018). No município de Paulo Afonso-BA, este rio desempenha um papel importante para a população, principalmente no que diz respeito a sua utilização para recreação, lazer e pesca. Todavia, o crescimento da cidade provocou a ocupação de terrenos, desobedecendo às normas ambientais e sanitárias reduzindo, conseqüentemente, a qualidade das águas e comprometendo a biota local (PINTO; MARQUES; SANTOS, 2020).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os parâmetros, físico-químicos e microbiológicos do Rio São Francisco no município de Paulo Afonso, Bahia.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Analisar a qualidade das águas do rio São Francisco no município de Paulo Afonso, Bahia.

2.2 ESPECÍFICOS

- Realizar trabalhos de revisão (artigos e capítulo de livro) abordando as seguintes temáticas: 1. Monitoramento de ambientes aquáticos impactados; 2. Técnicas moleculares para identificação de bactérias de importância clínica e ambiental e 3. Ambientes aquáticos de água doce como um reservatório de bactérias resistentes;
- Avaliar os parâmetros físico-químicos da água em pontos estratégicos deste rio;
- Analisar quantitativamente a presença de metais de transição tóxicos na água;
- Identificar espécies Gram-positivas e Gram-negativas ao longo do rio São Francisco e avaliar seu perfil de suscetibilidade/resistência a diferentes antimicrobianos;
- Avaliar a qualidade da água por quantificação de coliformes totais e termotolerantes;
- Realizar a análise parasitológica da água coletada nos pontos investigados;
- Realizar análises cromatográficas nos pontos investigados;
- Ampliar o acervo da bacterioteca de microrganismos de ambientes aquáticos impactados da UFPE.

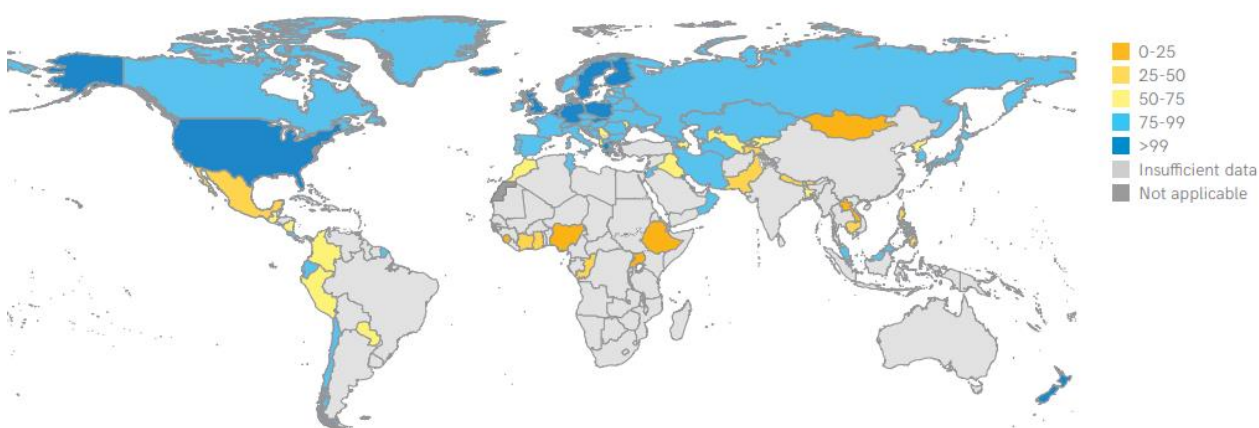
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 AMBIENTES AQUÁTICOS IMPACTADOS

A água é um dos recursos naturais mais significativos para manutenção da vida. Entretanto, ações antrópicas têm resultado, cada vez mais, na sua escassez. A utilização da água têm sido progressiva devido ao aumento populacional e às alterações no manejo do solo, resultando assim, em uma crescente pressão sobre os ecossistemas aquáticos e, com isso, potencializando sua degradação (MARTINS; ANTUNES, 2019).

Em 2019, foram divulgados dados do relatório de água, saneamento e higiene da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do Fundo das Nações Unidas para a Infância (Unicef), os quais relataram que aproximadamente 2,2 bilhões de pessoas no mundo não têm serviços de água potável; 4,2 bilhões de indivíduos não possuem acesso a esgotamento sanitário seguro e cerca de 3 bilhões de pessoas não possuem instalações básicas para lavar as mãos de forma adequada. Nesta abordagem, a Figura 1 apresenta dados referentes à utilização de água potável em 117 países no ano de 2017.

Figura 1 - Proporção da população que usa os serviços de água potável com gestão segura em 117 países



Fonte: WHO (2019).

De acordo com o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), a água designada para o consumo humano deve respeitar os padrões de potabilidade, estando livre de qualquer tipo de contaminação, sendo esta de origem química, física, microbiológica e/ou radioativa, devendo assim, não oferecer riscos à saúde

(CONAMA, 2011).

Os ecossistemas de água doce são os que mais têm sofrido influências antrópicas, com destaque para os rios e riachos (ARAÚJO; OLIVEIRA, 2013). Nesta ótica, a principal preocupação com a qualidade da água se concentra nos contaminantes emergentes (presentes em efluentes domésticos, industriais, hospitalares e provenientes das atividades agrícolas e pecuária). Esses contaminantes, mesmo em concentrações extremamente baixas na matriz aquática, possuem efeitos tóxicos que se atribuem à exposição crônica na ordem de nanogramas a picogramas por litro e, portanto, podem acarretar danos diretos à biota local. Assim, conhecer os riscos que esses contaminantes representam aos ecossistemas aquáticos é de suma importância, uma vez que permite a antecipação de medidas preventivas (CARTAXO *et al.*, 2020).

3.2 BIOMONITORAMENTO DE AMBIENTES AQUÁTICOS IMPACTADOS

Os impactos ambientais ocasionados nos ecossistemas aquáticos têm levado à sua degradação, afetando diretamente e indiretamente sua permanência. Desta forma, faz-se extremamente necessária a avaliação desses impactos causados por diferentes poluentes e suas consequências para sobrevivência dos seres que ali habitam ou daqueles que utilizam de suas águas (GARCIA *et al.*, 2018).

Este tema será mais detalhado no artigo 1 de revisão encontrado no tópico resultados desta dissertação.

3.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE MICRORGANISMOS AQUÁTICOS

O entendimento de que o genoma carrega informações que podem ser utilizadas para o estudo de relações evolutivas entre os organismos foi um grande marco para o desenvolvimento de métodos moleculares, pois, até então a taxonomia dos procariotos era baseada na observação de características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas que, apesar de muito úteis, não possibilitavam o estabelecimento das suas relações evolutivas (DUARTE *et al.*, 2019).

Desta forma, o desenvolvimento de ferramentas moleculares impulsionou grandes mudanças na identificação microbiana, uma vez que, diversos métodos moleculares estão disponíveis para análises da diversidade microbiana em amostras

ambientais (AVANZI *et al.*, 2017).

Esses métodos podem ser usados para estudos de parentescos entre os isolados e diferenciação entre as espécies. A escolha de metodologias apropriadas dependerá da finalidade do estudo e da escala geográfica de utilização, visto que, uma comunidade de microrganismos pode englobar diferentes espécies, logo esses métodos de identificação devem ser adequados para a diferenciação e tipificação dos isolados (BORAH, 2018).

O artigo 2 de revisão localizado no tópico de resultados mostra um levantamento das principais técnicas moleculares atualmente utilizadas para caracterização molecular de bactérias, tanto de origem clínica quanto ambiental.

3.4 POLUENTES EM AMBIENTES ÁQUATICOS

O desenvolvimento industrial e a urbanização lançam uma variedade de poluentes no meio ambiente, principalmente nos ambientes aquáticos, gerando cada vez mais consequências aos organismos que os habitam. Um dos maiores desafios da humanidade é a disponibilidade de água, que devido à poluição têm se tornado mais escassa, de modo que, os produtos químicos são os importantes agentes responsáveis por essa mudança global (CAVALCANTI *et al.*, 2014, BERNHARDT; ROSI; GESSNER, 2017).

Um ponto importante a ser considerado corresponde a urbanização. Este é um dos principais processos que tem resultado nas mudanças do solo, o que tem ocasionado a liberação de cargas químicas em corpos d'água alterando o ecossistema aquático e gerando perturbações nos sedimentos. Diversos poluentes possuem a capacidade de estarem presentes em sedimentos de ecossistemas aquáticos, os quais podem adsorver esses componentes e com isso permanecer por décadas. Entretanto, além da adsorção, esses poluentes podem ser lançados diretamente em colunas de água e serem incorporados pela biota (CARDOSO *et al.*, 2019).

Estes contaminantes podem causar alterações e anormalidades em estruturas populacionais desses ecossistemas, os quais passam a ter baixa capacidade de sustentar processos autodepurativos, ocasionando problemas ambientais graves e de saúde pública à população (SINGH *et al.*, 2020). Muitos são produtos químicos como pesticidas e produtos farmacêuticos, sendo estes planejados de forma específica para

prevenir ou matar o crescimento de organismos indesejáveis, interferindo principalmente no seu metabolismo bioquímico. Adicionalmente, podem provocar problemas no meio ambiente a longo prazo, visto que vários desses pesticidas e compostos farmacêuticos são pseudo-persistentes, ou seja, seu processo de degradação pode ser muito lento no ambiente, e até mesmo uma liberação constante e continuada neste ambiente podem diminuir sua capacidade degradativa (BERNHARDT; ROSI; GESSNER, 2017).

Os metais também são compostos poluentes que podem ser encontrados nestes ecossistemas. Estes são liberados principalmente através de efluentes industriais, urbanos e agrícolas, sendo lançados diretamente no ambiente podendo afetar tanto a saúde de plantas, quanto dos animais e seres humanos. Seus impactos correspondem a uma das mais principais preocupações da nossa atualidade, substancialmente quando há interações com as pessoas, devido sua baixa capacidade de biodegradação (FLECK; TAVARES; EYNG, 2013; CAVALCANTI *et al.*, 2014).

A existência de metais tóxicos em ambientes aquáticos pode causar danos renais, cerebrais, no fígado e lesões nos ossos, como também câncer e problemas do sistema respiratório (FLECK; TAVARES; EYNG, 2013). A exposição de organismos a esses compostos pode ser de modo crônico, e com isso o organismo absorvê-los de forma progressiva. Muitos desses contaminantes possuem potencial mutagênico e carcinogênico sendo considerados também disruptores endócrinos (VASQUEZ *et al.*, 2014). A Figura 2 ilustra um esquema representativo com os principais locais de descarga de efluentes liberados em ambientes aquáticos.

Figura 2 - Principais fontes poluidoras dos ambientes aquáticos



Fonte: Adaptado (<https://acquablog.acquasolution.com/poluicao-da-agua-causas-e-consequencias/fontes-de-poluicao-da-agua-causas-e-consequencias/>)

3.5 CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA E OS IMPACTOS PARA SAÚDE PÚBLICA

A água é um dos principais recursos para a sobrevivência dos seres vivos no planeta, visto que, a mesma participa de diversos processos biológicos e ocupa cerca de $\frac{3}{4}$ da superfície da terra. Um dos principais problemas relacionados aos recursos hídricos é a contaminação dos ecossistemas aquáticos, o qual tem ocorrido principalmente em países em desenvolvimento, sendo ocasionado sobretudo pelos resíduos industriais e domésticos (MELLO; COSTA, 2016).

A crescente necessidade por água tem aumentado os níveis de contaminantes desse ecossistema, com isso, associação entre água contaminada e a falta de saneamento básico ocasiona cerca de 1,6 milhões de óbitos anuais no mundo (YAMAGUCHI *et al.*, 2013). Grande parte das internações hospitalares no Brasil são causadas por Doenças de Veiculação Hídrica (DVHs), sendo estas resultantes da baixa qualidade da água consumida pela sociedade. Sendo assim, o abastecimento de água somente é considerável potável para seres humanos se estiver de acordo com os valores limítrofes dos parâmetros físicos, químicos, microbiológicos e

organolépticos (MELLO; COSTA, 2016).

Devido a característica da água de veicular a transmissão de microrganismos, é de suma importância as análises microbiológicas, sobretudo porque são os principais responsáveis pela ocorrência de doenças em seres humanos, podendo causar diarreias, disenterias, hepatites, cólera, entre outras enfermidades graves. Sendo assim, as análises de coliformes totais e termotolerantes, protozoários, vírus e fungos também são imprescindíveis para o controle e prevenção de doenças na população e agravos na saúde pública (YAMAGUCHI *et al.*, 2013; MELLO; COSTA, 2016). A Figura 3 representa a geração de resíduos pelo ser humano e a destinação final destes no meio ambiente, bem como os impactos que podem ser ocasionados.

Figura 3 - Ser humano como fonte geradora de resíduos no meio ambiente e sua destinação final



Fonte: Adaptado, Aragão (2018).

Nesta ótica, é perceptível que um dos maiores problemas encarados atualmente refere-se às doenças de veiculação hídrica, posto que a água e a saúde humana estão intimamente relacionadas. Uma vez contaminada, a água passa a ser o principal meio de veiculação de doenças. Devido a isso, conhecer os riscos associados à exposição deste recurso permite antecipar e mitigar sérios danos para as gerações futuras (CARTAXO *et al.*, 2020). Neste contexto, a realização de estudos voltados para o monitoramento dos recursos hídricos em relação à presença de contaminantes emergentes e como esses afetam os seres vivos é crucial para determinar os impactos gerados ao meio ambiente, saúde pública e a sociedade.

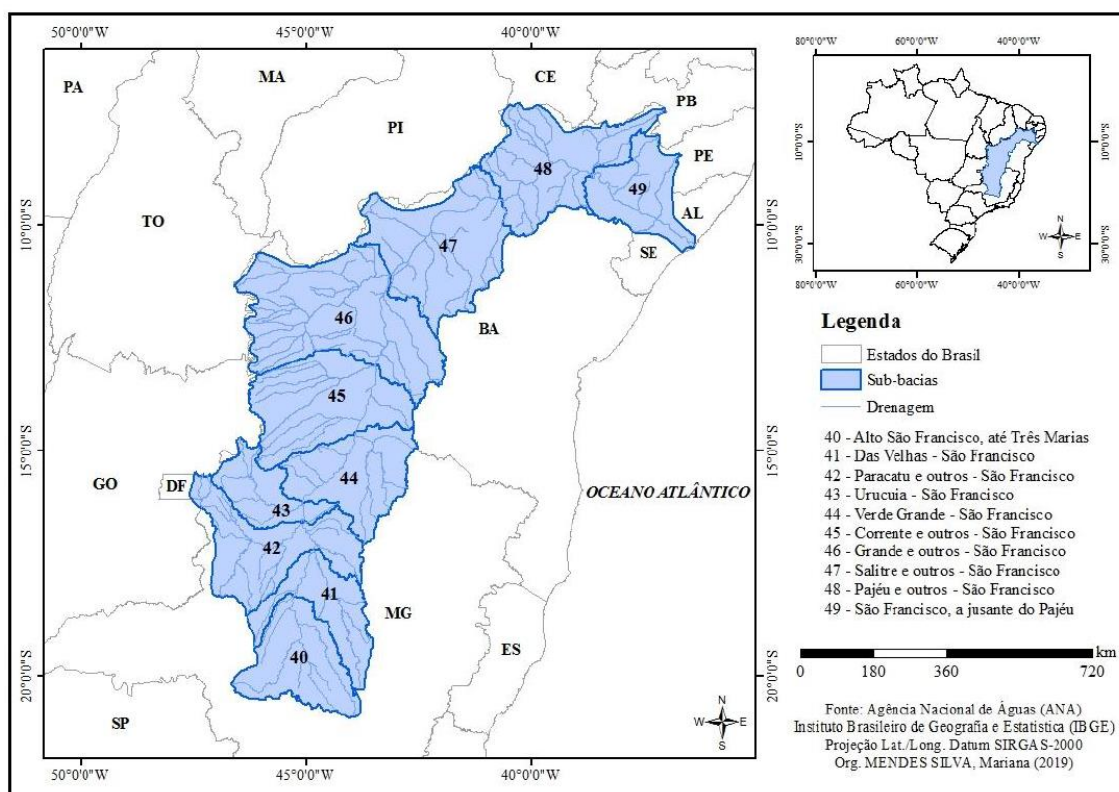
O subtópico 4.3 dos resultados corresponde a um capítulo de livro aceito para publicação. Este faz uma análise sobre o ambiente aquático como reservatório de

bactérias resistentes.

3.6 ASPECTOS GERAIS DO RIO SÃO FRANCISCO

O Brasil possui 12 regiões hidrográficas, umas delas é a região hidrográfica do Rio São Francisco (Figura 4) que corresponde a 8% do território nacional. Este é o maior rio totalmente brasileiro, com cerca de 2.756 km. Possui uma área de drenagem de aproximadamente 640.000 km² e está localizado nos estados da Bahia/BA, Minas Gerais/MG, Pernambuco/PE, Alagoas/AL, Sergipe/SE, Goiás/GO e Distrito Federal/DF, abrangendo 507 municípios (ASSIS; RIBEIRO; MORAES, 2018).

Figura 4 - Mapa de localização da Região Hidrográfica do Rio São Francisco

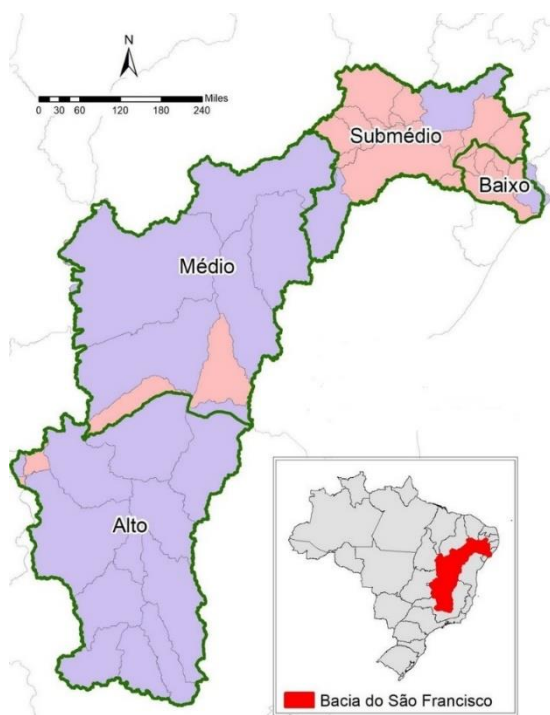


Fonte: SILVA (2021).

Devido à sua extensão e aos diferentes ambientes percorridos, a região hidrográfica deste rio foi dividida em quatro unidades fisiográficas: Alto, Médio, Submédio e Baixo São Francisco (Figura 5). O alto São Francisco situa-se em Minas Gerais e abrange as sub-bacias do rio das Velhas, Pará e Indaiá, além das sub-bacias dos rios Abaeté e Jequitaiá. O médio São Francisco compreende as sub-bacias dos

afluentes Pilão arcado e do Jacaré, e as sub-bacias dos rios Paracatu, Urucuaia, Carinhanha, Corrente, Grande, Verde grande e Paramirim, nos estados de Minas e Bahia. O submédio situa-se nos estados da Bahia e de Pernambuco, incluindo as sub-bacias dos rios Pajeú, Tourão, Vargem e Moxotó. Já o baixo do São Francisco engloba parte do estado da Bahia, começando no município de Paulo Afonso, e dos estados de Alagoas e Sergipe, alcançando a foz (CAMARGO *et al.*, 2020).

Figura 5 - Divisão Fisiográfica da Região Hidrográfica do Rio São Francisco



Fonte: SOUZA *et al.*, (2017).

A bacia do São Francisco contempla fragmentos dos biomas: Floresta Atlântica, Cerrado, Caatinga, costeiros e insulares. É localizado em parte da região, do Polígono das Secas, sendo reconhecido como um território propenso a prolongadas estiagens com várias zonas geográficas e diferentes índices de aridez. Encontra-se majoritariamente na região Nordeste, estendendo-se até o norte de Minas Gerais. O clima apresenta variabilidade associada a transições do úmido para o árido, com temperatura média anual variando de 18 a 27 °C. A pluviosidade apresenta média anual de 1.036 mm, sendo que os mais altos valores de precipitação ocorrem nas nascentes do rio e os mais baixos entre Sento Sé e Paulo Afonso, na Bahia (CASTRO; PEREIRA, 2019).

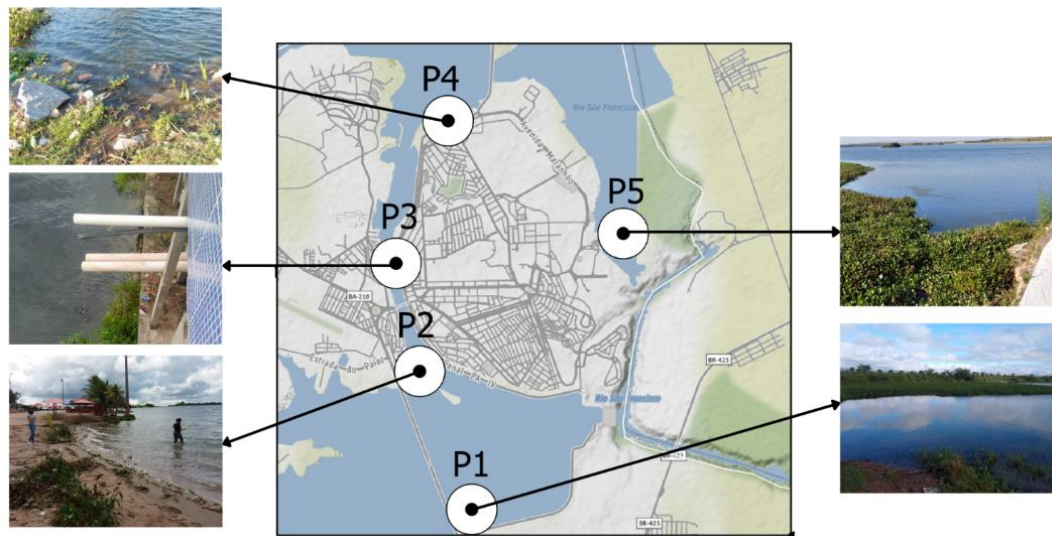
Nascida em função da criação da hidrelétrica em meados do século XX, a

cidade de Paulo Afonso, emancipada em 1958, localiza-se no interior da Bahia e pertence à mesorregião do Vale do São Francisco, a qual abrange uma área total de 1545 km². Este município se desenvolveu a partir da necessidade da geração de energia para o Nordeste sendo implantada a Companhia Hidrelétrica do São Francisco (CHESF). Possui população estimada em 119.930 habitantes, sendo considerada o décimo quinto município mais populoso do estado baiano (GIUDICE, 2021; BRANDÃO *et al.*, 2019).

Paulo Afonso conta com um complexo hidrelétrico formado por quatro usinas (Paulo Afonso I, II, III e IV), com total de 3.880 MW, além da Usina de Apolônio Sales, em Delmiro Gouveia-AL. Atualmente o município desempenha importante papel na vida dos que vivem em seu entorno, visto que as águas do Rio São Francisco abrigam em suas margens pontos comerciais, sendo uma via intensa para o turismo e lazer na região (SANTOS *et al.*, 2020; MELO *et al.*, 2018).

Devido a sua localização no baixo do São Francisco, esta é uma das regiões que mais sofre impactos ambientais (Figura 6), comprometendo o uso dos recursos naturais e o desempenho de atividades como a pesca. O trecho final do submédio e início do baixo São Francisco possui o maior número de barragens de toda a bacia, o que impacta significativamente o rio e as espécies que estão praticamente extintas na região. No entanto, além da construção das barragens, outros impactos têm contribuído para a deterioração deste ambiente, como a poluição, projetos de irrigação, desmatamento e mau uso do solo, assoreamento, introdução de espécies não nativas, sobrepesca e turismo (ASSIS *et al.*, 2017; BRITO; MAGALHÃES, 2017; SOUSA; GOMES; BRITO, 2017).

Figura 6 - - Representação esquemática dos pontos de estudo no município de Paulo Afonso – BA



Fonte: Autora (2021).

4 RESULTADOS

Os resultados desta dissertação serão apresentados na forma de artigos e capítulo.

4.1 ARTIGO DE REVISÃO

A revisão de literatura sobre a estado-da-arte de biomarcadores como uma ferramenta para monitorar o impacto ambiental em ecossistemas aquáticos foi construída na forma de artigo de revisão publicado em outubro de 2020 no periódico: Brazilian Journal of Development, link para acesso: [file:///C:/Users/Milena/Downloads/17871-46056-1-PB%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/Milena/Downloads/17871-46056-1-PB%20(3).pdf)

Biomarkers as a tool to monitor environmental impact on Aquatic Ecosystems**Biomarcadores como ferramenta para monitorar o impacto ambiental nos Ecossistemas Aquáticos**

DOI:10.34117/bjdv6n10-120

Recebimento dos originais: 08/09/2020

Aceitação para publicação: 07/10/2020

Milena Roberta Freire da Silva

Biomédica

UFPE/Campus - Recife

Address: Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901

E-mail: milena.freire@hotmail.com

Karolayne Silva Souza

Biomédica

UFPE/Campus - Recife

Address: Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901

E-mail: karolayne.silvasouza@ufpe.br

Caio Rodrigo Dias de Assis

PhD

UFPE/Campus - Recife

Address: Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901

E-mail: caiodias2@hotmail.com

Rafael Artur de Queiroz Cavalcanti de Sá

Mestre

UFPE/Campus - Recife

Address: Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901

E-mail: r.artur.queiroz@gmail.com

Milena Danda Vasconcelos Santos

Mestre

UFPE/Campus - Recife

Address: Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901

E-mail: milenadanda@gmail.com

Maria Betânia Melo de Oliveira

Doutora

Address: Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901

E-mail: maria.bmoliveira@ufpe.br

ABSTRACT

The assessment of aquatic contaminants through biomarkers is an efficient approach in studies of environmental risk and impact since it detects the effects of living beings exposed to the polluted environment early. In this sense, this study aims to demonstrate the use of metallothionein, acetylcholinesterase, micronuclei, comet assay, and cytochrome P450 biomarkers, correlating them

Braz. J. of Develop., Curitiba, v. 6, n. 10, p. 75702-75720, oct. 2020. ISSN 2525-8761

Brazilian Journal of Development

to the xenobiotic process in the aquatic environment and how they signal changes in this environment. This is a bibliographic review, which was carried out searches in the VHL databases: Lilacs, Medline, and Google Scholar, from 2006 to 2020. Metallothioneins is a biomarker that assesses the process of detoxification and homeostasis of metal ions. Acetylcholinesterase is used to assess the neurotoxic effects caused by xenobiotics. Exposure to genotoxic compounds is verified by the micronucleus tests and comet assay, being this an evaluation at the cellular level, where the first analyzes nuclear abnormalities or deformation in the morphology of the nucleus, and the other verifies breaks in the DNA structure. Cytochrome P450 plays a central role in oxidative metabolism and detoxification of natural and xenobiotic substances present in pesticides and fertilizers. It is known that aquatic contamination is a threat to the conservation and management of these ecosystems, making it necessary to use specific and sensitive biomarkers that are capable of detecting the damage early. Therefore, biomarkers correspond to an effective tool for this purpose, as it enables the production of reliable data, favoring the implementation of adequate measures for the prevention, either-or recovery of aquatic ecosystems.

Keywords: monitoring, polluted environment, contaminants.

RESUMO

A avaliação de contaminantes aquáticos através de biomarcadores é uma abordagem eficiente nos estudos de risco e impacto ambiental, uma vez que detecta os efeitos dos seres vivos expostos ao ambiente poluído precocemente. Neste sentido, este estudo visa demonstrar o uso de metalotionina, acetilcolinesterase, micronúcleos, ensaio de cometa e biomarcadores de citocromo P450, correlacionando-os com o processo xenobiótico no ambiente aquático e como eles sinalizam mudanças neste ambiente. Esta é uma revisão bibliográfica, que foi realizada através de buscas nas bases de dados da BVS: Lilacs, Medline, e Google Scholar, de 2006 a 2020. Metallothioneins é um biomarcador que avalia o processo de desintoxicação e homeostase de íons metálicos. A acetilcolinesterase é utilizada para avaliar os efeitos neurotóxicos causados pelos xenobióticos. A exposição a compostos genotóxicos é verificada pelos testes de micronúcleo e ensaio de cometa, sendo esta uma avaliação a nível celular, onde o primeiro analisa anormalidades nucleares ou deformações na morfologia do núcleo, e o outro verifica quebras na estrutura do DNA. O citocromo P450 desempenha um papel central no metabolismo oxidativo e na desintoxicação de substâncias naturais e xenobióticos presentes em pesticidas e fertilizantes. Sabe-se que a contaminação aquática é uma ameaça à conservação e ao manejo destes ecossistemas, tornando necessário o uso de biomarcadores específicos e sensíveis, capazes de detectar os danos precocemente. Portanto, os biomarcadores correspondem a uma ferramenta eficaz para este fim, pois permitem a produção de dados confiáveis, favorecendo a implementação de medidas adequadas para a prevenção, ou a recuperação dos ecossistemas aquáticos.

Palavras-chave: monitoramento, meio ambiente poluído, contaminantes.

1 INTRODUCTION

The world population growth caused the expansion of urban and rural activities, triggering an increase in industrial activities and in the production of chemical residues that are produced on a large scale, constituting, in most cases, the main polluting source of the aquatic environment. As a consequence, these environments have been undergoing serious changes resulting from large amounts of effluents without previous treatment, which generates physical, chemical, and biological

Brazilian Journal of Development

deterioration, putting at risk the organisms that live there and the population health (AGUIAR et al., 2020; SAVASSI, 2019; PURIFICAÇÃO JÚNIOR et al., 2017).

According to the World Health Organization (WHO), water scarcity will affect two-thirds of the world population in 2050 as a result of the excessive use of water resources for food production and agriculture (FAO, 2015). Brazil holds almost 15% of the world's water reserves, which is a scarce natural resource, indispensable for life and most economic activities. Contamination of this water can occur in several ways, with emphasis on pollution by sewage, heavy metals, pesticides, and fertilizers (MIGUEL, 2019).

The consequences resulting from impacts on the aquatic environment lead to the degradation of this environment, through changes in the characteristics of the local biota, resulting from human activities that directly or indirectly affect the health of this ecosystem (GARCIA et al., 2018). Therefore, it is necessary to assess the impact that pollutants cause on environmental quality, thus identifying their effects on the living beings of these ecosystems. The use of biological parameters to assess water quality is based on the response of organisms to the environment in which it is inserted. In this context, the use of biomarkers arises, which are important tools for assessing ecological risks, also used to assist in understanding the effects at the population or community level, besides to determine the degree of impact on the biota, as well as identifying the stressors or pollutants responsible for this effect. These biomarkers also assist in the diagnosis of risk of exposure to the human population (GOMES et al., 2019).

Thus, the assessment of aquatic contaminants through biomarkers is an efficient approach in studies of risk and environmental impact due to they detect early the effects that are occurring in living beings exposed to the polluted environment. Also, The use of biomarkers is essential so that protective measures can be taken for this environment. This review demonstrates the use of metallothionein, acetylcholinesterase, micronuclei, comet assay, and cytochrome P450 biomarkers. These correlated to the xenobiotic process in the aquatic environment and how they can signal the processes of alteration in this medium.

2 METHODOLOGIES

This is a bibliographic review with a qualitative approach to the exploratory narrative type. For this, there used as a strategy for the identification and selection of articles, the survey of studies indexed in the databases available in the Virtual Health Library - VHL such as Lilacs, Medline, and Google Scholar. In the bibliographic survey, there used descriptors based on the Health Sciences Descriptors (HSD): Biomarkers and Aquatic Environment, also used in isolation and combination.

Brazilian Journal of Development

There used uncontrolled descriptors to meet the objective of this study, which are aquatic environment and pollution biomarkers. Controlled descriptors represent the terms registered in the HSD, while the uncontrolled ones refer to words or synonyms that represent the subject to be searched. There used studies from 2006 to 2019, Portuguese and English were considered eligible, besides theses and dissertations.

3 ENVIRONMENTAL IMPACTS CAUSED TO THE AQUATIC ECOSYSTEM

Water is an indispensable resource for the survival of various forms of living beings. Also, it is essential for the maintenance of the physiological conditions of organisms. Due to the increased demand for consumption, the availability of potable water is becoming increasingly limited, as well as the increase in population and the consequent degradation of its quality (YAMAMOTO, 2016).

According to CONAMA Resolution No. 01 of 01/23/86, the designation of environmental impact corresponds to any changes in the physical, chemical, and biological properties of the environment, as a result of human activities that, directly or indirectly, affect the health, safety, either-or well-being of the population. Besides, social and economic activities, biota, sanitary and aesthetic conditions of the environment, and quality of environmental resources.

Industrial growth and urbanization have been increasing exponentially in recent decades, causing the expansion of urban and rural activities and significantly altering the aquatic ecosystem, due to the multiple impacts arising from human activities. The increase in these activities generates important damages to these environments, since the improper destination of aquatic contaminants such as solid, liquid, and volatile residues. Without the proper treatment, it can subsequently lead to bioaccumulation and biomagnification processes in the different trophic levels of the food chain, thus reaching places far from the starting point of the discharge (MENEZES et al., 2019; SILVA, 2016).

In Brazil, there produced, approximately 214 thousand tons of solid waste daily, almost all of them are disposed of on the ground, either in the form of landfills, controlled landfills, or open-air dumps. The main arising damages from these residues that can be considered the eutrophication of water bodies, leaching, mainly nitrate, and the emission of greenhouse gases. The inadequate disposal of organic waste produced through agricultural activities, mainly ranching, leads to the production of a large number of contaminants in the environment. The main damages resulting from these residues are the eutrophication of water bodies, which causes partial and even total death of aquatic life, and leaching, mainly of nitrate, which can reach groundwater, generating damage mainly for the man who uses this water for consumption. If not treated efficiently before being

Brazilian Journal of Development

released into the environment, Leachates are potentially adverse to the environment and can contaminate soil and ground, and surface water (MORAES et al., 2020; TROMBETTA et al., 2020). This changing process in the aquatic environment over time can compromise the species' permanence in the ecosystem, which causes higher ecological damage if the community is affected as a whole (SANTOS, 2013).

The environmental impact assessment (EIA) is a measure to predict changes that will occur in the environment and aims to assess environmental impacts and their consequences. According to the United Nations (UN), the United Nations Environment Program (UNEP) corresponds as the main global authority on the environment, responsible for promoting conservation and sustainable development to improve the quality of population's life without compromising environmental resources and services of future generations (ALMEIDA; GARRIDO; ALMEIDA, 2017).

4 BIOMARKERS AS A TOOL FOR ASSESSING EXPOSURE TO CONTAMINANTS

The homeostasis of a natural ecosystem depends on the process of monitoring and adopting adequate prevention and precautionary measures, based on the analysis of the harmful effects caused by contaminants to the aquatic environment. Therefore, environmental contamination biomonitoring is a tool that provides information about the effects caused in this environment. One of these biological tools is biomarkers, which can define as a measurable response that reflects the interaction between a biological system and a potential stressor, whether physical, chemical, or biological (SILVA, 2016; YAMAMOTO, 2016).

Biomarkers can be identified at the biochemical, cellular, individual, population, community, or ecosystem levels. However, the initial effects have the highest impact on the most basic organizational levels of biochemical and molecular responses. These responses can be used as biomarkers of early contamination since, at a low level, it is sufficient to cause physiological effects. Thus, determining the nature and degree of contamination, making it possible, in some situations, to reverse the impact or prevent the environment from a more severe impairment (LOUREIRO, 2017).

The use of biomarkers is largely advantageous since it is considered an indicator of biological response to contaminants or environmental stressors. Its inclusion in environmental research, especially in contaminated areas, is increasingly frequent. It is due to its potential to evaluate the general health of organisms that live in contaminated ecosystems, in addition to having the ability to detect contaminants early, reflecting a reversible toxic effect and subclinical. These

Brazilian Journal of Development

enable efficiently and relatively quickly environmental changes, as they are low cost and robust in their information (GOMES et al., 2019; VASCO et al., 2016).

The need to detect and evaluate arising impacts from polluting substances in low concentrations and sublethal leads to the assessment of a range of biological responses in several species, often using biomarkers at the cellular/molecular level. They assess changes in high levels of biological organization, which is before death or disease onset. These can analyze damage caused by exposure to metals, organic xenobiotics, and organometallic compounds. The choice of the species that indicates the quality of the environment under study, it must be done correctly, since it will assist in the process of identifying the impacts caused to the environment.

Among the countless animals present in these ecosystems, fish, mollusks, and benthic macroinvertebrates have been widely used in the biomonitoring of aquatic environments, due to their easy geographical distribution and position in the trophic chain (CAMARGO; SOUZA; BURANELLO, 2019; RIBEIRO; NUNES 2017).

5 GENERAL CLASSIFICATION OF BIOMARKERS

Several types of biomarkers respond differently to the toxic effect of contaminants, presenting different functions, where some allow defining the presence of substances that cause changes in the genetic material of the organism. It can cause mutagenic either-or potentially carcinogenic effects (VASCO et al., 2016). These can be divided into three different classes the exposure, effect, and susceptibility biomarkers.

Exposure biomarkers are capable of detecting and quantifying exogenous substances or a metabolite, or even a product of the interaction between the xenobiotic or metabolite and an endogenous component, establishing a relationship between external exposure and internal concentrations (OLIVEIRA, 2014). Exposure to a xenobiotic is a necessary condition, although not sufficient to bring about changes in the body. Bearing in mind that these can be used for the most varied purposes, such as leading to the early detection of exposure, although significant changes in the health of the exposed organism have not yet occurred. Thus, they can contribute to the primary prevention and adoption of measures useful for reducing exposure (SILVA, 2016).

The effect biomarkers do not provide information about their nature, but they are characteristic of the occurrence of stress that can be reversible. These include biochemical, physiological, or other changes in the tissues of an organism, which begins with an adaptive response at the molecular/biochemical level. However, if this recognition mechanism fails or if its response capacity is exceeded, it can lead to physiological or histopathological irreversible damage,

Brazilian Journal of Development

depending on the capacity of the organ or system to respond to the stressor (CANTANHÊDE, 2016; NOGUEIRA, 2013).

Susceptibility biomarkers are indicators of processes that cause variations in responses over time between exposure and the effect of a xenobiotic, which are predominantly genetic, although pathologies, physiological changes, drugs, and exposure to other environmental agents can also change individual susceptibility (CANTANHÊDE, 2016).

Thus, biomarkers are sensitive and specific to chemical exposure and reflect the interaction between a substance and a biological system, being able to identify an early effect before it becomes irreversible at a more complex level of biological organization (YAMAMOTO, 2016). Below are described some of the biomarkers used in programs for monitoring impacted aquatic environments.

5.1 METALLOTHIONEINS

Metallothioneins (MT) correspond to a class of cytosolic proteins, rich in cysteines that have low molecular weight and affinity for divalent cations. MT has the function of detoxification and homeostasis of metal ions. It is through the presence of thiol groups (-SH) that they bind to excess metals, polluting or not, protecting the organism from the toxicity of these compounds. It acts on the intracellular metabolism of copper (Cu), zinc (Zn), and cadmium (Cd), helping to protect against oxidative damage and toxicity resulting from excessive exposure to third metals. Thus, they act as fundamental chelating agents for the mechanism detox (LAVRADAS et al., 2016; GÓMEZ et al., 2018; KROON; STRENN; HARRIES, 2017).

In aquatic organisms, there is induced production of MT by an increase in the entry of metals into cells. The gills, kidney, and digestive glands are directly involved in this process of entry, storage, and excretion. These also act against cellular oxidative stress, being directly connected to the cellular antioxidant defense system (SEVCIKOVA et al., 2013; SAVASSI, 2019).

The study by Rajeshkumar; Mini; Munuswamy (2013), found that the metals most often related to inducing MT synthesis are Cd and Hg. Although the higher synthesis of this protein is associated with the organs involved in the uptake, metabolism, and excretion of metals, this author detected a higher concentration of metals in the liver of the evaluated organism, the milk-fish (*Chanos chanos*).

According to Buzzi; Marcovecchio (2016), MTs are early warning signs of exposure to metals. In this study, they evaluated the levels of heavy metals in sediments and the synthesis of MT in the crab *Neohelice granulata* from the estuary of Bahía Blanca, Argentina. The authors

Brazilian Journal of Development

demonstrated that there was a slow decrease in the level of metals in the analyzed area, and the female crabs showed a higher MT when compared to the males.

5.2 ACETYLCHOLINESTERASE (ACHE)

Acetylcholinesterase (AChE) is a biomarker widely used in the diagnosis of neurotoxic effects resulting from xenobiotics. It is an enzyme in the group of serine esterases that catalyzes the hydrolysis of the neurotransmitter acetylcholine (ACh) in excess in the synaptic cleft, releasing choline and acetate and preventing an exacerbated stimulation of neurons in order to guarantee the normal functioning of the motor and sensory system (ARAÚJO et al., 2016).

Inhibition of AChE activity leads to a block in the transmission of nerve impulses, paralyzing vital functions, resulting from the overlap of nerve impulses caused by the permanence of open Na^+ channels. This consequence results in death in the exposed organisms, as an effect of hyperstimulation of the parasympathetic autonomic nervous system (ARAÚJO et al., 2018; FU et al., 2018).

Besides, AChE is inhibited by pesticides of the carbamate and organophosphate classes, as well as by metals. The toxicity mechanism results in the accumulation of acetylcholine in the synaptic cleft, leading to cholinergic hyperstimulation and alterations in the functionality of the Central Nervous System (CNS), causing changes in behavior and even the death of the organism. Thus, this enzyme has been frequently used in the biomonitoring of the aquatic environment, being considered as one of the best indicators of effect on acute or chronic exposure of fish species (ARAÚJO et al., 2016; MORENO et al., 2019).

The organophosphate compounds phosphorylate AChE irreversibly, which prevents the hydrolysis of acetylcholine, causing its accumulation in the muscarinic and nicotinic synapses, resulting in a continuous propagation of nerve impulses. Carbamates cause an action similar to organophosphates, differing only in the intensity and duration of the carbamylation bond, which is lower, causing a reversible inhibition of acetylcholinesterase (SILVA, 2016).

Although these pesticides are rapidly hydrolyzed in the environment, the increase in their use and discharge causes high toxic effects to the organisms exposed in the aquatic ecosystem. Determination of the activity inhibition of this enzyme is a useful tool in the evaluation of the effects of contamination, which makes it possible to monitor the presence of these compounds and their possible risk for both the environment and human health (COIMBRA et al., 2018; ARAÚJO et al., 2016).

Brazilian Journal of Development

In their research, Alavinia et al., (2019) report that the exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to malathion leads to inhibition of AChE activities due to the binding of this pesticide to the active enzyme site and consequent over-stimulation in synaptic transmission between nerve cells. The maximum reduction in AChE activity in brain tissue during the time of exposure to malathion can be seen by the increase in neurotransmission at synapses and subsequent hyperactivity of cholinergic pathways. Recently, some researchers have reported significant inhibition of AChE brain activity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (HAMED, 2015, as well as juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) (WANG et al., 2016).

According to Araújo et al., (2016), the activity of cholinesterases (ChEs) of several fish has been widely used as biomarkers in programs for monitoring water resources. In their work, the authors investigated the activity of ChEs in the Jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*), observing the behavior of the enzyme in the presence of different substrates and selective inhibitors, metal ions, as well as organophosphate and carbamate pesticides. The use of these substrates and selective inhibitors evidenced the presence of AChE and butyrylcholinesterase (BChE) in the brain of *P. managuensis*. In another work by Araújo et al., (2018), they observed the in vitro exposure of Tamoatá (*Hoplosternum littorale*) to pesticides and metal ion, and it led to AChE inhibition in the brain of this species, as well as in the presence of specific AChE (BW284c51) and BChE (Iso-OMPA) inhibitors (ARAÚJO et al., 2018).

5.3 MICRONUCLEUS

Another biomarker recently used for monitoring aquatic environments corresponds to micronuclei. These are biomarkers at the cellular level for exposure to genotoxic compounds, formed from the condensation of the acentric chromosomes either-or whole chromosomes that do not migrate to the poles of the mitotic spindles in cell mitosis, as they present a delay in cell division due to lack of centromere, damage or defect in cytokinesis. These nuclear abnormalities or deformations in the nucleus' morphology are considered indicators of genotoxic effects (SANTOS et al., 2016).

Xenobiotics can act in two ways on the nucleus, directly on the chromosome or on the mitotic spindle, leading to the loss of part or all of the chromosome (D'COSTA; SHYAMA; HUMAR, 2017). As previously mentioned, this process occurs during cytokinesis in the formation of the nuclear envelope and, if not incorporated into the main nucleus, they form their own envelope, generating the micronuclei. These changes tend to be irreversible and continue to manifest

Brazilian Journal of Development

themselves in future generations through heredity, which may lead to a reduction in species diversity in the impacted aquatic ecosystems (BUENO et al., 2017; COIMBRA et al., 2018).

The frequency of micronucleus has been used as a quick and sensitive indication of changes as it shows breaks in the genetic material that lead to chromosomal abnormalities. This test aims to assess the mutagenic potential that substances have to cause structural or numerical chromosomal damage to cells in the division stage. Damage is often associated with the appearance either-or progression of tumors and with adverse reproductive effects, which makes early detection importante (CANTANHÊDE, 2016; COBANOGU et al., 2019).

According to Costa; Shyama; Kumar (2017), the increased incidence of micronucleus in the blood cells of *Arius arius* fish occurred due to high concentrations of trace metals, after long-term exposure even with low concentrations of these, leading to an increase in the effects genotoxic in cells of this species and potentially other aquatic organisms.

The work of Khalek; Morsy; Shati (2020) demonstrated that the *O. niloticus* (Nile tilapia) species, when exposed to zinc, showed an increase in nuclear deformities. However, when exposed to nanoparticles of this metal, a significant increase in MN induction was observed, thus exerting a clastogenic effect causing direct, irreversible chromosomal damage to DNA and loss of genetic information. A similar result was demonstrated in the study by Gaete et al., (2019), showing that when *Perumytilus purpuratus* was exposed to copper, the frequency of micronuclei was significantly higher in all concentrations tested (1, 30 and 45 $\mu\text{g L}^{-1}$ by 24, 48 and 96 h).

It is worth mentioning that this test constitutes a relatively simple, inexpensive, and fast results methodology on mutagenicity effects through simple laboratory tests of cell staining and observation under an optical microscope. The erythrocyte's observation under the microscope allows this identification. However, to be considered a micronucleus, it must be separated from the main nucleus of the cell, which presents distinguishable edges and with the same refringence as the main nucleus. It is possible to observe changes in the morphology and the nuclear envelope since they are caused by the effects of chemical substances present in the water (ALVES, 2017).

5.4 COMET TEST

The comet assay (SCGE, Single-Cell Gel Electrophoresis) is an alternative widely used to determine genotoxicity in aquatic environments. This method checks for breaks in the DNA structure after exposure that can be performed in vivo or in vitro. It has as a principle the investigation of DNA damage of cells, which are identified in the shape of a comet structure, whose tail size is proportional to the damage suffered in the genetic material (LAPUENTE et al., 2015).

Brazilian Journal of Development

It is a test widely used to assess the genotoxic effects of industrial, domestic, and agricultural effluents that cause damage induction and DNA repair. It has the advantage of high sensitivity to various types of damage, being considered in some cases more sensitive to the action of toxic agents than the micronucleus test, in addition to requiring a small number of cells and the mitotically active cells do not need to be analyzed, enabling the analysis of any cell nucleus. This assay allows the detection of breaks in single and double DNA bands, cross-links, alkali labile sites, and incomplete excision repair sites (BIANCHI et al., 2017).

The basic principle of the test is the lysis of cell membranes, followed by the induction of electrophoretic migration of DNA released in an agarose matrix. This test, in turn, promotes the migration of DNA fragments through the flow of electrons. The smaller fragments after migration along with the larger ones (encapsulated in the agarose mesh), when viewed under a microscope, assume the apparent shape of a comet, with its head, nuclear region, and tail. Cells with a round nucleus are considered normal and without detectable damage. In contrast, the injured are visually identified by a species of the tail, which corresponds to the DNA fragments that were dragged by the electrophoresis electric current, and the damage observed is proportional to the length of the comet's tail (KNAPPIK; RAMSDORF, 2020).

According to Singh et al., (2019), exposure to metals in freshwater triggered the process of genotoxicity in fish of the species *Channa punctatus*. This study evaluated exposure to metals in different periods and concentrations and revealed that they cause selective DNA damage, with Arsenic (As), Nickel (Ni), and Chromium (Cr) being the main ones. Cadmium (Cd) did less damage. However, at the time of the tail extension, the damage was observed in all evaluated organisms.

According to Gallão et al., (2019), the leaching process increases the damage to the DNA of fish exposed to sublethal concentrations, given that this is considered a polluting process of aquatic ecosystems that provides the transport of several toxic substances, such as metals. When present in water bodies, these agents can interact with aquatic organisms and present risks to local biota due to their deleterious effects on organisms at various trophic levels. The use of the comet assay technique in this condition allows detection even in small concentrations of these substances when it causes DNA damage.

5.5 CITOCHROME P450

Cytochrome P450 (CYP 450) belongs to the family of enzymes of the Mixed Function Monooxygenase (MFO) system and plays a central role in the oxidative metabolism and detoxification of natural and xenobiotic substances present in pesticides and fertilizers, for example.

Brazilian Journal of Development

The isoenzymes of CYP 450 are an enzyme complex that contains the heme group involved in the metabolism of many drugs, steroids, and carcinogenic agents, and these enzymes are responsible for catalyzing the oxygenation of numerous endogenous and xenobiotic substrates (RAINONE et al., 2015).

CYP 450 has different isoforms, some of which are used as biomarkers. These are present mainly in the liver, although they occur in a lower concentration in extrahepatic tissues. In fish, different cytochrome subfamilies are responsible for the metabolism of xenobiotics, such as CYP1, CYP3, and, to a lesser extent, CYP4, while CYP 450 is related with the metabolism of endogenous substrates (BHUTIA; RAI; PAL, 2015; CARDOSO; OLIVEIRA; ROCHA, 2019).

The subfamily CYP1A, especially the enzyme etoxiresorufina-O-deethylase (EROD), plays an important role in the biotransformation of organic compounds, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and dioxins. They are among the most dangerous compounds released into aquatic habitats. The induction of this enzyme represents one of the most studied biomarkers for contamination, as its levels and activities are related to exposure to aromatic hydrocarbons in a dose-dependent manner, both in fish and in mammals (VIEIRA et al., 2018; YAMAMOTO, 2016).

This enzyme has the function of metabolizing lipophilic xenobiotics into more hydrophilic compounds to favor its excretion, but many of these metabolites formed in the detoxification process are potentially reactive and can be genotoxic, which can cause DNA damage or lead to carcinogenesis. After exposure to xenobiotics, EROD levels increase, and this is the basis for using this enzyme as a biomarker of the effects of water contamination by organic pollutants resulting from anthropic activities (BURKINA et al., 2018; SANTANA et al., 2018).

According to Araújo et al., (2018), there reported increasing EROD activity in fish exposed to a wide range of pollutants, such as PAHs. These findings demonstrate that the lowest EROD activity is concentrated in an area where most pollutants are incorporated into the sediment by decantation due to the decrease in water flow. In contrast, Leggieri et al., (2019) showed that oil contamination induces the enzyme CYP1A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Similar results have been reported in *O. niloticus* under oil pollution, as demonstrated in the study of Ahmed et al., (2019), which showed that oil spills into natural water resources expose fish to serious problems. The authors also observed a significant increase in CYP1 A1 mRNA expression levels in the liver tissue of this fish.

6 CONCLUSION

Aquatic contamination represents a direct threat to the conservation and management of these ecosystems and drastically reduces the availability of quality water for the population. Besides, it causes damage to the organisms that live there, influenced directly by human activities.

The growing use of toxic substances, such as pesticides, metals, and other organic compounds, brings to the fore the need for their effects being evaluated in the environments in which they are disseminated, to analyze the damage caused, and avoid consequences to the aquatic environment. In this context, the use of biomarkers is a very useful tool for this purpose.

Biomarkers serve different purposes in the aquatic environment, as shown throughout this study, and can be used for assessments of genotoxicity, neurotoxicity, cytoplasmic organelle integrity, which are indicators often used to assess damage to aquatic organisms caused by xenobiotics.

For effective monitoring with these tools, it is important to pre-determine which biomarkers and species will be used as a possible damage indicator. Besides, taking into consideration the internal particularities of each biomarker, considering extrinsic and intrinsic factors process that may cause changes in the assessment.

Therefore, there strongly recommended the use of biomarkers in assessing impacts on the aquatic environment, so that reliable data can be produced, enabling the implementation of appropriate measures for the prevention, either-or recovery of aquatic ecosystems.

REFERENCES

- AGUILLAR, C. N. et al., Evaluation of heavy metal contents in water in Rio Paranaíba – MG, Brazilian Journal of Development, v. 6, n. 9, p. 64781-64880, 2020.
- ALAVINIA, S. J. et al., DNA damage, acetylcholinesterase activity, and hematological responses in rainbow trout exposed to the organophosphate malathion, Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 182, 2019.
- AHMED, Y. H. et al., Histopathological, biochemical and molecular studies on the toxic effect of used engine oil on the health status of *Oreochromis niloticus*, Acta Histochemica, v. 121, p. 563-574, 2019.
- ALMEIDA, F. S.; GARRIDO, F. S. R. G.; ALMEIDA, A. A. Avaliação de impactos ambientais: uma introdução ao tema com ênfase na atuação do gestor ambiental, Diversidade e Gestão, v. 1, n. 1, p. 70-87, 2017.
- ALVES, R. S. Uso de peixe como bioindicador de poluição aquática do rio catolé grande, Bahia, 70 F. 2017, Dissertação (Mestre em Ciências Ambientais), Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2017.
- ARAÚJO, F. G. et al., Biomarkers and bioindicators of the environmental condition using a fish species (*Pimelodus maculatus* Lacepède, 1803) in a tropical reservoir in Southeastern Brazil, Brazilian Journal of Biology, v. 78, n. 2, 2018.
- ARAÚJO, M. C. et al., Brain acetylcholinesterase of jaguar cichlid (*Parachromis managuensis*): From physicochemical and kinetic properties to its potential as biomarker of pesticides and metal ions, Aquatic Toxicology v. 177, 2016.
- ARAÚJO, M. C. et al., Characterization of brain acetylcholinesterase of bentonic fish *Hoplosternum littorale*: Perspectives of application in pesticides and metal ions biomonitoring, Aquatic Toxicology, v. 205, 2018.
- BHUTIA, D.; RAI, B. K.; PAL, J. Hepatic Cytochrome P450 as Biomarkers of Cypermethrin Toxicity in Freshwater Teleost, *Channa punctatus* (Bloch), Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 58, n. 1, 2015.
- BIANCHI, E. et al., Monitoring the Genotoxic and Cytotoxic Potential and the Presence of Pesticides and Hydrocarbons in Water of the Sinos River Basin, Southern Brazil, Arch Environ Contam Toxicol, v. 72, n. 3, 2017.
- BUENO, A. P. M. et al., Teste de micronúcleos em peixes e parâmetros físico-químicos da água da represa Cocaís, Minas Gerais, Acta Brasiliensis, v. 1, n. 3, 2017.
- BURKINA, V. et al., Complex effects of pollution on fish in major rivers in the Czech Republic, Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 164, 2018.

Brazilian Journal of Development

BUZZI, N. S.; MARCOVECCHIO, J. E. A baseline study of the metallothioneins induction and its reversibility in *Neohelice granulata* from the Bahía Blanca Estuary (Argentina), *Marine Pollution Bulletin*, v. 112, 2016.

CAMARGO, P. R. S.; SOUZA, F.; BURANELLO, P. A. A. Influência de impactos antrópicos na comunidade de macroinvertebrados na bacia do baixo Rio Grande, *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente*, v. 12, n. 2, p. 643-662, 2019.

CANTANHÊDE, S. M. Biomarcadores em peixes como ferramenta na avaliação da qualidade de ambientes estuarinos na ilha do Maranhão, Brasil, 62 F. 2016, Dissertação (Pós-graduação em Recursos Aquáticos e Pesca), Universidade Estadual do Maranhão, São Luiz, 2016.

CARDOSO, P. G.; OLIVEIRA, R. R.; ROCHA, E. Combined effects of increased temperature and levonorgestrel exposure on zebrafish female liver, using stereology and immunohistochemistry against catalase, CYP1A, HSP90 and Vitellogenin, *Environmental Pollution*, v. 252, p. 1059-1067, 2019.

CASTRO, C. N.; PEREIRA, C. N. Revitalização do rio São Francisco, *Boletim regional, urbano e ambiental*, v. 17, 2017.

CHIVITZ, C. C. Avaliação do biomarcador de contaminação ambiental CYP1A em duas espécies de peixes guarús *liititlii*, 74 F. 2014, Dissertação (Mestre em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2014.

COBANOGLU, H. et al., Results of buccal micronucleus cytome assay in pesticide-exposed and non-exposed group, *Environmental Science and Pollution Research*, v. 26, 2019.

COIMBRA, R. S. C. et al., Metal loads and biomarker suite responses in a tropical carnivorous fish indicative of anthropogenic impacts in a Southeastern Brazilian lagoon, *Environ Monit Assess*, v. 190, n. 9, 2018.

COSTA, A.; SHYAMA, S. K.; KUMAR, M. K. P. Bioaccumulation of trace metals and total petroleum and genotoxicity responses in an edible fish population as indicators of marine pollution, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 142, p. 22-28, 2017.

D'COSTA, A.; SHYAMA, S. K.; KUMAR, P. Bioaccumulation of trace metals and total petroleum and genotoxicity responses in an edible fish population as indicators of marine pollution, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 142, 2017.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Towards a water and food secure future: critical perspectives for policy-makers. Rome: FAO, 2015.

FU, H. et al., Acetylcholinesterase is a potential biomarker for a broad spectrum of organic environmental pollutants, *Environmental Science e Technology*, v. 52, n. 15, 2018.

GAETE, H. et al., Lysosomal Membrane Stability in Hemocytes and Micronuclei in Gills of *Perumytilus purpuratus* Lamarck 1819 (Bivalvia: Mytilidae) Exposed to Copper, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 103, n. 6, p. 796-801, 2019.

Brazilian Journal of Development

GALLÃO, M., et al., The Impact of Sublethal Concentrations of Treated Leachate on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 120, n. 11, 2019.

GARCIA, J. M. et al., Degradação ambiental e qualidade da água em nascentes de rios urbanos, *Sociedade e Natureza*, v. 30, n. 1, p. 228-254, 2018.

GOMES, J. B. et al., Evaluation of aquatic contamination in an urban lagoon environment in a coastal region in the north of Brazil, *Bioscience Journal*, v. 35, n. 3, p. 920-932, 2019.

HAMED, H. S. Impact of a Short – Term Malathion Exposure of Nile Tilapia, (*Oreochromis niloticus*): The Protective Role of Selenium, *International Journal of Environmental Monitoring and Analysis*, v. 3, n. 5-1, p. 30-37, 2015.

HOLTH, T. F. et al., Effects of water accommodated fractions of crude oils and diesel on a suite of biomarkers in Atlantic cod (*Gadus morhua*), *Aquatic Toxicology*, 2014.

KHALEK, A. A. A.; MORSY, K. SHATI, A. Comparative Assessment of Genotoxic Impacts Induced by Zinc Bulk and Nano-Particles in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 104, n. 1, 2020.

KNAPIK, L. F. O.; RAMSDORF, V. Ecotoxicity of malathion pesticide and its genotoxic effects over the biomarker comet assay in *Daphnia magna*, *Environ Monit Assess*, v. 192, n. 5, 2020.

KROON, F.; STRETEN, C.; HARRIES, S. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review, *PLoS One*, v. 12, n. 4, 2017.

LAPUENTE, J. et al. The comet assays and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives. *Frontiers in Genetics*, v. 6, 2015.

LAVRADAS, R. T. et al., Investigation of thermostable metalloproteins in *Perna perna* mussels from differentially contaminated areas in Southeastern Brazil by bioanalytical techniques, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* v. 34, 2016.

LEGGIERI, L. R. et al., Gills CYP1A of *Oncorhynchus mykiss* as a sensitive biomarker of crude oil pollution in freshwater environments, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 67, p. 61-65, 2019.

LEITE, K. A. S.; ZANDONATO, V. V.; FLUMINHAN, A. Avaliação da genotoxicidade provocada por fatores ambientais em *Tradescantia pallida* cv purpurea através do ensaio cometa, *IX Fórum Ambiental da Alta Paulista*, v. 9, n. 11, P. 399-417, 2013.

LIMA, P. A. S. Análise morfológica e detecção de micronúcleo em hemócitos de *Biomphalaria glabrata* exposto ao oxifluorfen (GOAL BR®), 48 F. 2011, Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2011.

LOUREIRO, S. N. Efeitos da poluição aquática e do ectoparasitismo sobre distintos órgãos de peixes de água doce: uma abordagem em baixo nível de organização biológica, 108 F. 2017, Tese (Doutora em Ecologia Aquática e Pesca), Universidade Federal do Pará, Belém 2017.

Brazilian Journal of Development

MARCONI, M. A.; LAKATOS, E. M. Fundamentos de metodologia científica, 7º Ed. São Paulo: Atlas, 2010.

MENEZES, C. T. B. et al., Percepção de impactos socioambientais e a gestão costeira: estudo de caso em uma comunidade de pescadores no litoral sul de Santa Catarina, Brasil, R. gest. sust. ambient., v. 8, n. 3, p. 457-481, 2019.

MIGUEL, F. L. F. Ações para diminuir os impactos ambientais aquáticos resultantes da ausência de drenagem pluvial sobre o rio cacolo, Revista Eletrônica KULONGESA, v. I, n. 1, 2019.

MORAIS, M. V. A. et al., Análise físico-química e microbiológica do lixiviado do aterro sanitário no município de rio branco – Acre, South American Journal of Basic Education, Technical and Technological, v. 7, n. 1, p. 282-292, 2020.

MORENO, D. H. et al., Brain biomarkers in tench (*Tinca tinca* L.) after semi-static exposure to the pesticide carbofuran, Rev Colomb Cienc Pecu, v. 32, n. 3, 2019.

MOORE, M. N.; ALLEN, J. I.; MCVEIGH, A. Environmental prognostics: An integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status, Marine Environmental Research, v. 61, 2006.

NOGUEIRA, L. A. M. Análise dos efeitos de fármacos no meio ambiente aquático – uso de biomarcadores, 43 F. 2013, Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas), Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

NOGUEIRA, L. S. P. et al., Uso de ferramentas químicas e biológicas na avaliação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos policíclicos e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos, Ciência e Saúde Coletiva, v. 12, n. 1, 2007.

OLIVEIRA, L. L. D. Biomarcadores enzimáticos e testes ecotoxicológicos na avaliação de toxicidade de fármacos em invertebrados aquáticos, 279 F. 2014, Tese (Doutor em Ciências da Engenharia Ambiental), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

PURIFICAÇÃO JÚNIOR, A. F. et al., Microbiota sampled from a polluted stream in Recife- PE, Brazil and its importance to public health, African Journal of Microbiology Research, v. 11, n. 28, 2017.

RAINONE, A. et al., Clinically relevant of cytochrome p450 family enzymes for drug-drug, WCRJ, v. 2, n. 2, 2015.

RAJESHKUMAR, S.; MINI, J.; MUNUSWAMY, N. Effects of heavy metal ion oxidant and expression of HSP70 in different tissues of Milk fish (*Chanos chanos*) of Kaattupalli Island, Chennai, India, Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 98, p. 8-18, 2013.

REIMANN, M. M. Utilização de enzimas citocromo P- 450 de tilápias (*Oreochromis niloticus*) como biomarcadores no monitoramento da qualidade da água do Rio Guandu, 39 F. 2012, Trabalho de conclusão de curso (Ciências Biológicas), Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, 2012.

Brazilian Journal of Development

RIBEIRO, M. F. R.; NUNES, J. L. S. Comparação de dois métodos de análise de impacto ambiental no Rio Munim, Boletim do Laboratório de Hidrobiologia, v. 27, n. 19-24, 2017.

RIVERO, C. L. G. Perfil da frequência de micronúcleos e de nados no DNA de diferentes espécies de peixes do lago Paranoá, Brasília-DF, Brasil, 113 F. 2007, Dissertação (Mestre Patologia Molecular), Universidade de Brasília, 2007.

SANTANA, M. S. et al., Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Systematic review and meta-analysis, Environmental Pollution, v. 242, 2018.

SANTOS, D. R. Uso de biomarcadores na avaliação da resposta de peixes à poluição aquática nos reservatórios do irai e passaúna, 94 F. 2013, Dissertação (Mestre em Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

SANTOS, M. S. et al., Avaliação da qualidade da água do Rio dos Sinos (Brasil) por meio do teste de micronúcleos em *Cyprinus carpio* e de análises físico-químicas e microbiológicas, Acta Toxicol. Argent. v. 24, n. 3, 2016.

SAVASSI, L. A. Efeitos da contaminação por metais pesados e biomarcadores de impacto ambiental em peixes da bacia do rio São Francisco, MG, 59 F. 2019, Tese (Doutor em Ciências), Universidade Federal de Minas Gerais, 2019.

SEVCIKOVA M. et al., Effect of Metals on Metallothionein Content in Fish from Skalka and Želivka Reservoirs, Int. J. Electrochem. Sci., v. 8, 2013.

SILVA, A. C. A. Biomarcadores de Contaminação Ambiental, 72 F. 2016, Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas), Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2016.

SINGH, M. et al., Distinctive fingerprints of genotoxicity induced by As, Cr, Cd, and Ni in a freshwater fish, Environmental Science and Pollution Research, v. 26, n. 2, 2019.

SOUZA, D. G. et al., Aplicação de técnicas de análise exploratória no monitoramento da qualidade da água do rio Cuiá, João Pessoa-PB, Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais, v. 15 n. 1, 2019.

SOUZA, I. C. et al., Avaliação da resposta celular do mexilhão *Perna perna* (Linnaeus, 1758) na Baía do Espírito Santo por meio do tempo de retenção do vermelho neutro (TRVN), Natureza Online, v. 9, n. 2, 2011.

TROMBETTA, L. J. et al., Resíduos orgânicos e suas implicações com o carbono orgânico e microbiota do solo e seus potenciais poderes poluentes, Braz. J. of Develop, v. 6, n. 7, p. 43996-44005, jul. 2020.

VASCO, G. et al., Biomarcadores para avaliação de alterações na qualidade ambiental de ambientes aquáticos, Regulamentação Ambiental, Desenvolvimento e Inovação, 2016.

VENTURA, L. et al., Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) assay with plants: Research on DNA repair and ecogenotoxicity testing, Chemosphere, v. 92, p. 1-9, 2013.

Brazilian Journal of Development

VIEIRA, L. M. et al., Historical Pollution of an Urban Watershed Based in Geochemical, Geoaccumulation, and EROD Activity in PLHC-1 Analyses in Sediment Cores, Arch Environ Contam Toxicol, v. 72, n. 2, 2018.

WANG, L. et al., Olfactory Transcriptional Analysis of Salmon Exposed to Mixtures of Chlorpyrifos and Malathion Reveal Novel Molecular Pathways of Neurobehavioral Injury, Toxicological Sciences, v. 149, n. 1, 2016.

YAMAMOTO, F. Y. Avaliação da qualidade da água e detecção de desreguladores endócrinos em cinco reservatórios do rio iguaçu, 197 F. 2016, Tese (Doutor em Biologia Celular e Molecular), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

4.2 ARTIGO DE REVISÃO

A revisão de literatura sobre o estado-da-arte em técnicas moleculares para identificação de bactérias de importância clínica e ambiental foi construída na forma de artigo de revisão.

ARTIGO

TÉCNICAS MOLECULARES USADAS PARA IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS DE IMPORTÂNCIA CLÍNICA E AMBIENTAL

Milena Roberta Freire da Silva¹; Karolayne Silva Souza¹; Thaynara Millena de Oliveira Bezerra²; Tainá Maria Santos da Silva¹; Rafael Artur de Queiroz Cavalcanti de Sá¹; Diego Leandro Reis da Silva Fernandes²; Francisco Henrique Santana da Silva¹; Lívia Caroline Alexandre de Araújo¹; Alzira Maria Paiva de Almeida², Maria Betânia Melo de Oliveira¹

¹Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

²Departamento de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães-FIOCRUZ, Recife.

***Corresponding author:**

Prof.^a Maria Betânia Melo de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

Departamento de Bioquímica

E-mail: maria.bmoliveira@ufpe.br

Resumo

A identificação rápida, eficaz e específica de patógenos bacterianos presentes em amostras clínicas e ambientais é de primordial importância para o seu controle. Tradicionalmente, as bactérias eram identificadas por meio de métodos fenotípicos baseados na morfologia, propriedades bioquímicas e metabólicas. Esta metodologia permite a identificação mais provável, mas apresenta limitações como baixa capacidade de diferenciação intra e interespecíes, além de ser demorada e

trabalhosa. O desenvolvimento dos métodos moleculares tem permitido uma caracterização taxonômica mais rápida e precisa, a identificação de variantes, a diferenciação entre agentes patogênicos e não patogênicos e a distribuição geográfica e temporal de patógenos de importância clínica e ambiental. No entanto, alguns desses métodos ainda são desconhecidos da maioria dos pesquisadores e dos laboratórios de diagnóstico, além de serem considerados inacessíveis devido ao custo dos equipamentos, necessidade de profissionais treinados e atualizações constantes. Assim, a disseminação do conhecimento sobre os avanços nas técnicas de identificação molecular é necessária para tornar essas metodologias acessíveis, contribuindo para o aprimoramento dos tratamentos personalizados e implementação pelos órgãos de vigilância epidemiológica. O objetivo deste trabalho foi realizar uma análise das técnicas moleculares empregadas atualmente na identificação de bactérias para rastrear e monitorar a presença de agentes microbianos em amostras clínicas e ambientais.

Palavras-chave: Patógenos bacterianos. Amostras clínicas e ambientais. Diagnóstico. Métodos moleculares.

Abstract

The quick, effective, and specific identification of clinical and environmental bacterial pathogens is of prime importance for their control. Traditionally the bacteria were identified via phenotypic methods based on the morphology, biochemical, and metabolic properties. This methodology allows the most probable identification but bear limitations as low capacity for intra- and inter-species differentiation besides being time-consuming and laborious. The emergence of molecular methods is allowing faster and more accurate taxonomic characterization, identification of variants, the differentiation between pathogenic and non-pathogenic agents, and the geographical and temporal distribution of clinically and environmental importance pathogens. However, some of these methods are still unknown to most researchers and diagnostic laboratories besides being considered inaccessible due to the equipment cost, the need for trained professionals and constant updates. Thus, the dissemination of the knowledge on the advances in molecular identification techniques is necessary to make these methodologies approachable, contributing to the improvement of

personalized treatments and implementation by the epidemiological surveillance agencies. The objective of this work was to perform an analysis of the current molecular techniques employed in the identification of the bacteria aiming to tracking and monitoring the microbial agents within clinical and environmental samples.

Key words: bacterial pathogens, clinical and environmental samples, diagnosis, molecular methods.

Introdução

Os microrganismos, mais precisamente as bactérias, são seres vivos conhecidos por sua capacidade de adaptação nos mais diferentes ambientes seja de maneira isolada ou mais frequentemente agrupada (MURRAY *et al.*, 2020). Estudos envolvendo a detecção desses organismos e seu impacto na saúde pública têm sido cada vez mais frequentes, devido alguns representarem agentes etiológicos de doenças, principalmente aquelas decorrentes da ingestão de alimentos e águas contaminadas (BRUYAND *et al.*, 2018; BRAIEK *et al.*, 2019).

Como as bactérias são desprovidas de defesas físicas, geralmente estas desenvolvem vias de adaptações em ambientes considerados desfavoráveis para sua sobrevivência e crescimento. Uma destas vias é a Transferência Horizontal de Genes (TGH) a qual permite o aumento da resistência bacteriana dificultando o tratamento e, portanto, o controle das infecções (CROUCHER *et al.*, 2016; JUTKINA *et al.*, 2016). Essas características, isoladas ou em conjunto, potencializam as infecções causadas por esses microrganismos cada vez mais difíceis de serem erradicados. Sendo assim, é importante destacar a relevância de um diagnóstico rápido, eficaz e específico, como uma das medidas iniciais para o controle e disseminação desses agentes.

Inicialmente, foram desenvolvidos e utilizados diferentes métodos para identificação da morfologia e das propriedades bioquímicas e metabólicas de bactérias, os quais foram nomeados de métodos ou ferramentas fenotípicas (MALDONADO, ROBLEDO; ROBLEDO, 2018). Apesar de sua contribuição, esses possibilitam a identificação mais provável, porém não definitiva. Além disto, estes métodos apresentam limitações por sua baixa capacidade de diferenciação intra e interespécies, além de consumirem tempo e serem laboriosos (PURIFICAÇÃO-JUNIOR *et al.*, 2017). Como alternativa, surgiram os moleculares, os quais

possibilitam uma caracterização taxonômica mais rápida e precisa na viabilização de diagnósticos microbiológicos clínicos e ambientais (MAKRISTATHIS *et al.*, 2019).

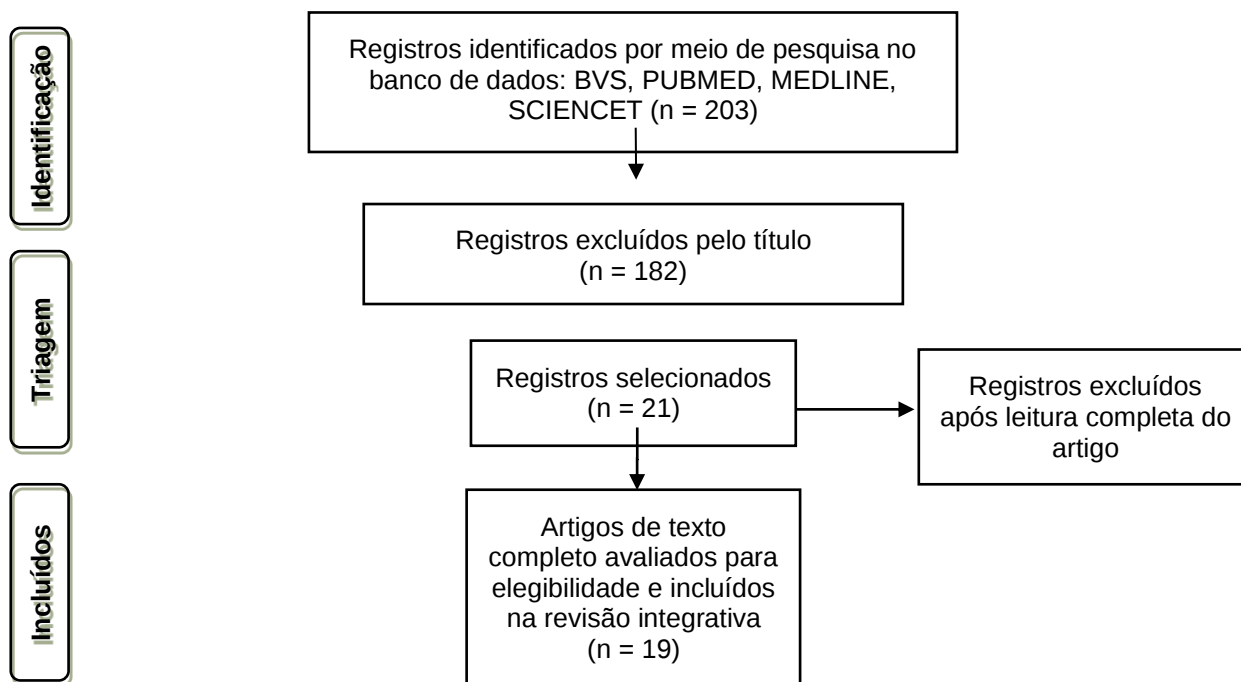
Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi descrever as principais técnicas moleculares recentemente empregadas na identificação de agentes microbianos encontrados tanto em amostras clínicas quanto ambientais, como alternativas de rastreamento e monitoramento destes locais.

Metodologia

Este estudo corresponde a uma revisão de literatura do tipo integrativa. Para o direcionamento e condução do trabalho foi desenvolvido a seguinte pergunta norteadora: Como as técnicas moleculares contribuem para identificação de bactérias patogênicas de importância clínica e ambiental? Foram estabelecidos critérios de inclusão e exclusão, sendo: textos completos no período de 2019 a 2021 e trabalhos compatíveis com o assunto de interesse e indexados em bases de dados internacionais. Foram excluídas publicações duplicadas, revisões bibliográficas, editoriais, dissertações e teses.

A pesquisa foi conduzida a partir dos descritores extraídos da plataforma Descritores em Ciências da Saúde (DeSC) (<https://decs.bvsalud.org/>) entre eles: Técnicas de Diagnóstico Molecular; Bactérias; Reação em Cadeia da Polimerase; Infecções bacterianas e Alteração ambiental, utilizando as bases de dados *Pubmed*, *Medline*, *Science Direct* e *BVS*. O fluxograma de seleção dos artigos pode ser identificado na Figura 1.

Figura 1 - Fluxograma de análise de inclusão e exclusão dos artigos selecionados de acordo com as diretrizes do protocolo PRISMA



Fonte: AUTORES (2021).

Resultados e Discussão

Dos 203 artigos encontrados nesta revisão integrativa por meio dos descritores e critérios de inclusão estabelecidos, 19 foram selecionados. Destes, oito (43%) foram identificados no *Pubmed*, sete (36%) na *Science Direct*, dois (10%) na *BVS* e dois (10%) na *Medline*, todos correspondentes a pesquisas experimentais. Para melhor apresentação dos resultados foi elaborado uma síntese apresentada em forma de tabela, contendo: área/abordagem do estudo, título, objetivo, técnica molecular utilizada e autor/ano (Tabela 1).

Tabela 1 - Descrição dos artigos selecionados sobre identificação de bactérias patogênicas de importância clínica e ambiental utilizados nesta revisão, contemplando a abordagem, título, objetivo, técnica molecular, autor/ano

Abordagem	Título	Objetivo	Técnica Molecular	Autor/Ano
Clínica	Rapid and sensitive detection of the <i>vanA</i> resistance gene from clinical <i>Enterococcus faecium</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> isolates by loop-mediated isothermal amplification	Detectar o gene de resistência <i>vanA</i> em isolados de <i>Enterococcus</i> spp	Amplificação isotérmica Mediada por Loop (LAMP)	Huanga, Q. Q. <i>et al.</i> , 2019.
	Simple Visualized Detection Method of Virulence-Associated Genes of <i>Vibrio cholerae</i> by Loop-Mediated Isothermal Amplification	Desenvolvimento de um método LAMP simples, rápido, específico e sensível para <i>V. cholerae</i>	Amplificação isotérmica Mediada por Loop (LAMP)	Xu M. Et al., 2019
	Establishment and application of a multiple cross displacement amplification coupled with nanoparticle-based lateral flow biosensor assay for detection of <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Desenvolver e aplicar um complexo MCDA-LFB para detecção rápida, simples e confiável de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Amplificação de deslocamento cruzado múltiplo combinado à biossensor de fluxo lateral baseado em nanopartículas formando o complexo MCDA-LFB	Wang, Y. <i>et al.</i> , 2019.
	Establishment and Application of Multiple Cross Displacement Amplification Coupled With Lateral Flow Biosensor (MCDA-LFB) for Visual and Rapid Detection of <i>Candida albicans</i> in Clinical Samples	Estabelecer um ensaio MCDA-LFB para detecção de <i>C. Albicans</i> via sequência espécie-específica da região ITS II com molde de DNA de culturas puras da cepa referência	Amplificação de deslocamento cruzado múltiplo acoplado com biossensor de fluxo lateral (MCDA-LFB)	Zhao, F. <i>et al.</i> , 2019.
Ambiental	Quantitative detection of Streptococcosis infection in dead samples of Nile tilapia	Identificar <i>Streptococcus agalactiae</i> em tecido de cérebro de peixes mortos em estudos	Reação em cadeia da polimerase em tempo real qPCR	He, R. Z. <i>et al.</i> , 2020.

epidemiológicos para elucidar a causa de surtos de estreptococcosis em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Improvement and evaluation of loop-mediated isothermal amplification combined with chromatographic flow dipstick assays for <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Aperfeiçoar e avaliar a amplificação isotérmica mediada por loop combinada com medição de fluxo cromatográfico para detecção do <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Amplificação isotérmica mediada por loop combinada com medição de fluxo cromatográfico (LFD) .	Xing, J.; Yub, J.; Liua, Y. 2020.
Validation of droplet digital polymerase chain reaction for <i>Salmonella spp.</i> quantification	Validar um ensaio de reação da polimerase digital de gotículas para quantificar o DNA genômico de <i>Salmonella spp.</i>	Reação em cadeia da polimerase digital de gotículas (ddPCR)	Villamil, C. et al., 2020
Combining fish and environmental PCR for diagnostics of diseased laboratory zebrafish in recirculating systems	Identificar peixes doentes em condições de laboratório e em sistemas de recirculação de água e detritos	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)	Miller, M. et al., 2019.
Rapid and in-situ detection of fecal indicator bacteria in water using simple DNA extraction and portable loop-mediated isothermal amplification (LAMP) PCR methods	Desenvolver um dispositivo portátil para amplificação isotérmica mediada por loop a partir de DNA extraído <i>in situ</i> usando um filtro de seringa para avaliação rápida de bactérias indicadoras fecais na água	Amplificação isotérmica mediada por loop LAMP	Lee, S. et al., 2019.
Xylenol orange-based loop-mediated DNA isothermal amplification for sensitive naked-eye detection of <i>Escherichia coli</i>	Utilizar Xylenol Orange na amplificação isotérmica mediada por loop para detecção visual de DNA de <i>Escherichia coli</i>	Amplificação isotérmica mediada por loop LAMP	Jaroenram, W.; Cecere, P.; Pompa, P. 2019.
Probe-specific loop-mediated isothermal amplification magnetogenosensor assay for	Desenvolver uma sonda para amplificação isotérmica mediada por loop associada a um biosensor magnético para detecção de <i>Leptospira</i> patogênica	Sonda para amplificação isotérmica mediada por loop associado a biosensor magnético	Najian, A. B. N. et al., 2019.

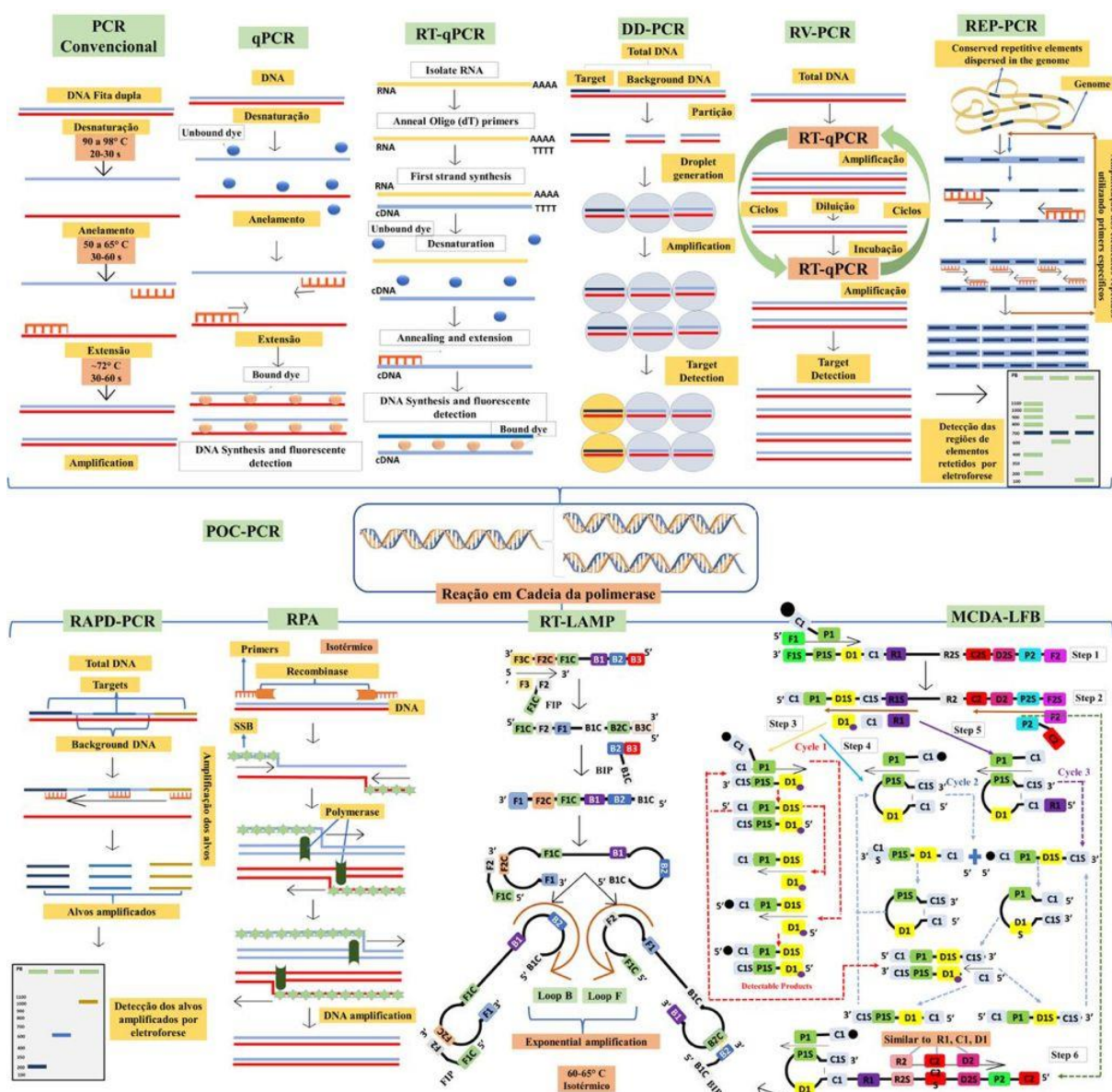
	rapid and specific detection of pathogenic <i>Leptospira</i>			
	Visual and rapid detection of <i>Leptospira interrogans</i> using multiple cross displacement amplification coupled with nanoparticle-based lateral flow biosensor	Utilizar o complexo MCDA-LFB para visualização rápida de <i>Leptospira interrogans</i>	Amplificação de deslocamento cruzado múltiplo associado à biossensor de fluxo lateral baseado em nanopartículas formando o complexo MCDA-LFB	Li, S. <i>et al.</i> , 2019.
	Viability-based quantification of antibiotic resistance genes and human fecal markers in wastewater effluent and receiving waters	Quantificar genes de resistência a antibióticos (ARGs) e marcadores fecais humanos em efluentes de estações de tratamento de águas residuais (ETAR)	Reação em cadeia da polimerase de viabilidade rápida (RV-PCR).	Eramo, A. <i>et al.</i> , 2019.
	Rapid viability polymerase chain reaction method for detection of <i>Francisella tularensis</i>	Detectar e identificar células viáveis de <i>Francisella tularensis</i> em amostras ambientais	Reação em cadeia da polimerase de viabilidade rápida (RV-PCR)	Kane, S. R. <i>et al.</i> , 2019.
	Development of a rapid-viability PCR method for detection of <i>Clostridioides difficile</i> spores from environmental samples	Adaptar o método de PCR de viabilidade rápida (RV-PCR) para a confirmação de amostras ambientais positivas para <i>C. difficile</i> .	Reação em cadeia da polimerase de viabilidade rápida (RV-PCR)	Shams, A. M.; Rose, L. J.; Noble-Wang, J. A. 2020.
Clínica e Ambiental	<i>Serratia marcescens</i> in the neonatal intensive care unit: A cluster investigation using molecular methods	Descrever o controle de um surto de infecções multiclonais por <i>Serratia marcescens</i> em uma Unidade de Terapia Intensiva Neonatal de nível terciário e a tipagem molecular usando PCR palindrômica de elemento repetitivo (rep-PCR) e sequenciamento de última geração (NGS) na investigação	Amplificação da polimerase palindrômica de elemento repetitivo e sequenciamento de última geração rep-PCR – NGS	Yeo, K. T. <i>et al.</i> , 2020.
	Fast, simple and highly specific molecular detection of <i>Vibrio alginolyticus</i> pathogenic strains using a	Desenvolver um método rápido, simples e altamente específico para detecção visual de cepas patogênicas de <i>V. alginolyticus</i>	Amplificação da polimerase de recombinase isotérmica	Dong, Y. <i>et al.</i> , 2020.

visualized isothermal amplification method		combinada com medição de fluxo cromatográfico (RPA-LFD)	
An improved recombinase polymerase amplification assay for visual detection of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> with lateral flow strips.	Desenvolver um ensaio RPA aprimorado para detecção visual de <i>V. parahaemolyticus</i> aplicando LFS para a detecção	Amplificação da polimerase de recombinase isotérmica com faixa de fluxo lateral (RPA-LFS)	Yang, X. et al., 2020
Assessment of test performance and potential for environmental contamination associated with a point-of-care molecular assay for group A Streptococcus in an end user setting	Realizar uma avaliação prospectiva do Ensaio de Estreptococos do grupo A - Roche Cobas Liat (GAS) em comparação com a PCR em tempo real de rotina	Roche cobas Liat (GAS)	Donato, L. J. et al., 2019.

Fonte: AUTORES (2021).

Os resultados encontrados possibilitaram identificar as principais técnicas moleculares utilizadas para identificação de patógenos de importância clínica e ambiental (Figura 2) e categorizá-los em três tópicos principais: Caracterização de patógenos clínicos; Caracterização de patógenos ambientais e Caracterização de patógenos clínicos e ambientais.

Figure 2 - Respresentação esquemáticas das principais técnicas molecular utilizadas para identificação de patógenos de importância clínica e ambiental



Fonte: AUTORES (2021).

Deteccção de patógenos clínicos

As infecções por patógenos de importância clínica têm aumentado ao longo dos anos, principalmente infecções microbianas resistentes a antibióticos. As rápidas disseminações desses microrganismos constituem uma ameaça para humanidade, já que estão associados a altas taxas de mortalidade. Assim, sua identificação baseia-se no diagnóstico etiológico das infecções, principalmente voltado para a detecção de genes específicos através de técnicas moleculares, uma vez que estes são mais rápidos e sensíveis na caracterização desses patógenos (ZANOL; PICOLI; MORSCH, 2010; BROOKS et al., 2014).

Uma das técnicas moleculares mais recentes destinadas a esse objetivo corresponde ao Ensaio de Amplificação Isotérmica de DNA Mediada por Loop (LAMP). O ensaio de LAMP foi desenvolvido por Notomi et al (2000), com intuito de amplificar ácidos nucleicos de apenas uma cópia para 10^9 cópias a uma temperatura constante. Esta técnica de amplificação decorre do deslocamento da fita de DNA, através da enzima Bst DNA (Proteína polimerase de DNA de *Bacillus stearothermophilus* com atividade polimerasica $5' \rightarrow 3'$), e três pares de iniciadores: FIP-forward inner primer e BIP- backward inner primer, F3 e B3 outer primers, LBP e LFP loop primers, os quais são especificamente desenhados para o reconhecimento de regiões distintas do gene alvo de um microrganismo (NZELU; KATO; PETERS, 2019).

Este método requer equipamentos simples como, por exemplo, banho-maria, que permite a observação dos resultados diretamente no tubo, podendo ser utilizados diferentes corantes para a detecção da amplificação do DNA do patógeno, sendo então uma ferramenta de baixo custo, rápida, simples, sensível e específica. Essa técnica foi utilizada para detecção de genes de resistência para vancomicina em *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* diretamente em amostras clínicas de urina de pacientes (HUANGA, et al., 2019). Os autores realizaram a comparação do ensaio de LAMP com a técnica de PCR convencional e demonstraram que a LAMP se mostrou mais sensível na detecção deste gene. Quanto a sua especificidade, o ensaio diferenciou com sucesso os isolados das duas espécies investigadas. Similarmente a este estudo, a pesquisa realizada por Xu et al (2019), também utilizou ensaio molecular LAMP para a detecção de genes de resistência, neste caso, associados a bactéria *Vibrio cholerae*. No estudo, os autores confirmaram ser essa uma ferramenta promissora para a detecção desse patógeno, apresentando alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico.

Outra técnica molecular recentemente utilizada para detecção de patógenos

corresponde a Amplificação de Deslocamento Cruzado Múltiplo (MCDA), combinada com Biossensores de Fluxo Lateral baseado em nanopartículas (LFB) (MCDA-LFB), para detecção de *Mycoplasma pneumoniae*. Esta, se baseia na amplificação do ácido nucléico a uma temperatura fixa de 58 °C – 69 °C, em 40 min, visto que, utiliza iniciadores específicos projetados para sequências alvos distintas (WANGUE et al., 2019). A combinação com LFBs deve-se às ligações de anticorpos LFB e haptenos especificamente marcados no lado 5' dos *primers* (ZHAO et al., 2019). Sua aplicação também vem sendo utilizada em fungos, como no trabalho de Zhao et al., (2019) para detecção visual e rápida de *Candida albicans*. Neste trabalho os autores demonstraram a eficiência desta ferramenta para este diagnóstico comparando-a com o método padrão-ouro utilizado, a técnica de PCR em tempo real (qPCR), revelando que a MCDA-LFB também é uma alternativa viável para este fim, por ser um método molecular fácil, rápido, específico e altamente sensível.

Deteção de patógenos ambientais

Em decorrência, nos últimos anos, da crescente exploração dos recursos naturais, tem se tornado imprescindível conhecer as potenciais fontes poluidoras e seus efeitos no ambiente. Neste sentido é necessário estabelecer estratégias que visem diagnosticar essas fontes, assim como os organismos atingidos, sobretudo a microbiota que represente riscos ao ambiente e à saúde humana (HE et al., 2020; VILLAMIL et al., 2020; XING; YUB; LIUA, 2020; ERAMO; MEDINA; FAHRENFELD, 2019; MILLER et al., 2019; JAROENRAM; CECERE; POMPA, 2019; KANE; SHAH; ALFARO 2019; LEE, et al., 2019; LI, et al., 2019; NAJIAN, et al., 2019; WANG, Y. et al., 2019).

Os trabalhos recentes evidenciam o aumento no uso de técnicas moleculares para identificação de microrganismos patogênicos. O uso destas metodologias vem em ascendência causando, conseqüentemente, um declínio na utilização dos métodos de diagnóstico tradicional (TATTIYAPONG; SIRIKANACHANA; SURACHETPONG, 2018).

Uma das técnicas moleculares que vêm sendo amplamente utilizada para este fim é a Reação da Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR). Esta oferece boa sensibilidade e capacidade para testar uma ampla variedade de agentes patogênicos em diferentes tipos de amostras. Como exemplo, pode-se citar o trabalho de He et al.,

(2020). Os autores identificaram um surto de estreptococose (*Streptococcus agalactiae*) no tecido cerebral de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), revelando ser esta a causa da elevada mortandade daquela espécie no ambiente investigado. Já Miller *et al.*, (2019) avaliaram a qualidade da água e saúde do peixe-zebra (*Danio rerio*). Neste estudo, os autores identificaram vários patógenos na água: *Edwardsiella ictaluri*, *Flavobacterium columnare* e *Ichthyophthirius multifiliis*, entretanto na espécie de peixe investigada não foi detectado nenhum microrganismo patogênico.

No entanto, esta técnica permite identificar não apenas bactérias, mas outras formas de microrganismos. Nicholson; Rawiwan e Surachetpong (2018) utilizaram RT-PCR para identificação do vírus Tilápia Lake Vírus (TiLV) em tecidos de tilápia (*O. niloticus*). Neste trabalho, eles indicaram a eficiência desta técnica na detecção deste vírus reafirmando a importância da detecção de patógenos em estágios iniciais da infecção, como um ponto chave para o controle de doenças na aquicultura.

Além desta técnica, outras são utilizadas para identificação de patógenos ambientais, como por exemplo, o ensaio de LAMP utilizado para detecção de *Escherichia coli* e *Vibrio parahaemolyticus* (Jaroenram; Cecere; Pompa, 2019; Xing; Yub; Liua, 2020). A eficiência colorimétrica do ensaio LAMP utilizando o corante xilenol laranja foi confirmada para detecção de *E. coli* em amostras de leite contaminadas. Os resultados demonstraram que as amostras contaminadas apresentaram coloração amarelo, ou seja, positiva para o patógeno e as puras apresentaram coloração roxa, indicando resultado negativo. Os dados foram confirmados por eletroforese em gel, sendo necessário apenas 120 min para a conclusão da análise (Jaroenram; Cecere; Pompa, 2019). Já o estudo de Xing; Yub; Liua (2020) combinou a vareta de medição de fluxo cromatográfico (LFD) com o ensaio de LAMP buscando otimizar a detecção de *V. parahaemolyticus* em cultura pura e em alimentos. Essa combinação apresentou uma alta especificidade e sensibilidade, já que a detecção do patógeno ocorreu em um período curto de apenas 30 minutos, quando comparados às técnicas moleculares frequentemente utilizadas como, por exemplo, a PCR convencional.

Outro estudo realizado em 2019 por Lee e colaboradores validou a técnica molecular de LAMP acoplada a um filtro de seringa de extração de DNA, e desenvolveu um dispositivo portátil para a avaliação rápida de *E. coli* e *Enterococcus faecalis*. Os autores monitoraram *in situ* bactérias indicadoras fecais na água, de maneira rápida e precisa sendo necessário apenas um tempo médio de 1h, desde a amostragem até a extração de DNA e confirmação dos patógenos. O mesmo ensaio

foi utilizado acoplado a um magnetogenosensor baseado em DNA colorimétrico para detecção do gênero *Leptospira*. Neste estudo, 172 amostras foram utilizadas, sendo 31 patogênicas e 141 intermediárias e não patogênicas. O ensaio de LAMP com biossensor obteve uma alta sensibilidade e especificidade por ser capaz de detectar as 31 amostras de DNA de *Leptospira* patogênicas em baixas concentrações com a coloração azul, e 141 amostras negativas com cepas não patogênicas e intermediárias com coloração marrom.

A técnica MCDA descrita anteriormente, também vem sendo utilizada em amostras ambientais. Os autores Li et al (2019) realizaram um ensaio com esta técnica também combinada com biossensores LFB, os quais formaram o complexo MCDA-LFB para detecção de *L. interrogans*. A técnica utilizou o gene *lipL41* como alvo para a amplificação na detecção desta espécie em culturas, sendo necessário apenas 70 minutos para conclusão da análise, demonstrando excelente especificidade e sensibilidade para sua caracterização molecular.

Diversas outras metodologias rápidas para detecção e quantificação de patógenos com base em genes e proteínas específicas vêm sendo desenvolvidas, uma vez que, além de serem testes mais rápidos, também fornecem um melhor potencial de detecção e especificidade. Uma dessas técnicas, corresponde a PCR digital de Gotículas (ddPCR), utilizada para quantificar o número de moléculas de DNA em uma amostra. A solução contendo os *primers*, o Master mix, o DNA e a água são divididos em milhares de partes independentes, através de capilares e emulsão de óleo em micropoços, isso permite que aconteça uma reação individual nesta mistura. O número de cópias alvo na amostra poderá ser calculado baseado no número de partições positivas (que emitem fluorescência) e negativas (que não emitem fluorescência) (VYNCK et al., 2016; KUYPERS et al. 2017). Um estudo realizado por Villamil et al (2020), utilizou esta técnica para quantificar o DNA genômico de *Salmonella* spp. Os resultados indicaram que a amplificação foi positiva e possibilitou caracterizar os 16 sororotipos testados. A ddPCR é uma tecnologia aprimorada da PCR convencional que pode amplificar clonalmente e quantificar DNA e RNA. A principal diferença entre ambos os métodos é que o ddPCR apresenta maior sensibilidade. É uma metodologia empregada para detectar baixa concentração de DNA, além de ser aplicada na detecção de patógenos, mutação de gene, variação do número de cópias de gene, nível de expressão de mRNA e modificação de DNA (LI et al., 2018). Outro exemplo da aplicabilidade deste método pode ser vistos no trabalho

de Morisset et al., (2013), os quais utilizaram esta tecnologia para investigar patógenos de origem alimentar, especificamente de Organismo Geneticamente Modificados (OGM), além de alguns alimentos complexos e matrizes de alimentos para animais.

Em 2019 foi descrito um novo método de reação de amplificação do DNA, conhecido como Reação em Cadeia da Polimerase de Viabilidade Rápida (RV-PCR), para detectar e identificar células viáveis de *Francisella tularensis* em amostras ambientais (Kane; Shah; Alfaro, 2019). Embora as metodologias de cultura tradicionais sejam consideradas padrão ouro para análise de viabilidade, este trabalho demonstrou que RV-PCR pode detectar até o nível de 10^2 Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por amostra de 3 mL com microrganismos de fundo em <36 h (processamento da amostra e tempo de análise), em comparação a >72 h necessárias para resultados confirmados da análise de cultura em placa. Este nível de UFC seria difícil de detectar em placas de ágar onde outros microrganismos com crescimento mais rápido superariam *F. tularensis* para o desenvolvimento de colônias. Além disso, o método RV-PCR utilizou uma única placa de 48 poços para as 48 amostras (e controles) para crescimento da espécie investigada, indicando que esta técnica é mais viável do que as alternativas tradicionais de cultura que utilizam placas com ágar chocolate, placas de diluição e placas com meio enriquecido para identificação desta espécie. Portanto, mais espaço na incubadora (maior área de laboratório) seria necessário para placas e tubos em comparação com placas de 48 poços usadas para análise de RV-PCR. Além destes fatores, ao incorporar a extração automatizada de DNA, menos resíduos consumíveis são gerados e os extratos de DNA podem ser obtidos mais rapidamente com menos trabalho.

Outra técnica molecular utilizada para análise de bactérias ambientais corresponde a viabilidade qPCR (vPCR) com Propídio Monoazida (PMA). Um estudo realizado por Eramo; Medina; Fahrenfeld, (2019), utilizou esta metodologia para investigar genes resistentes a antibióticos (ARGs) nos efluentes de três Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) e nas águas superficiais receptoras, onde foi quantificada cópias de genes de células viáveis de ARGs *sul1*, *tet_G* e *bla_{TEM}*, genes de marcador fecal humano *BacHum* e *16S rRNA*. O método de viabilidade qPCR (vPCR) usado neste estudo reduz o sinal de qPCR do DNA proveniente de fontes não viáveis em amostras ambientais, obtido com a PMA, um corante que intercala de forma irreversível o DNA extracelular ou o DNA em células com membranas comprometidas.

Dentre as aplicações deste método para direcionar ARGs, encontra-se: determinar a eficiência de desinfecção do efluente e medir as taxas de decomposição microbiana. Os resultados do estudo indicam que qPCR pode subestimar ARGs de células viáveis e genes indicadores fecais em efluentes. Assim, os métodos de viabilidade qPCR têm sido usados para direcionar patógenos e indicadores fecais com correlações positivas observadas entre RV-PCR e métodos de cultivo. Esta metodologia também foi aplicada para detecção de esporos de *Clostridioides difficile* em amostras ambientais viáveis após 22h de incubação anaeróbia em Caldo de Frutose de Cicloserina Cefoxitina (CCFB). A utilização deste método diminuiu a quantidade de tempo para a detecção de esporos viáveis sendo necessária apenas 28h para realização, tempo este bem menor que o necessário com os métodos tradicionais, os quais utilizariam de 2 a 10 dias (SHAMS; ROSE; WANG, 2019).

Deteção de patógenos clínicos e ambientais

Muitos trabalhos utilizam técnicas moleculares direcionadas à caracterização de patógenos apenas em fluidos corpóreos. No entanto, nos últimos anos vem sendo observado um crescente número de trabalhos aplicando diferentes metodologias moleculares para análise de bactérias em diferentes ambientes. A rep-PCR é uma técnica molecular que se baseia em sequências palindrômicas extragênicas repetitivas em genes de patógenos e *primers* projetados para essa sequência, sendo utilizada, portanto, para detecção de amostras clínicas ou ambientais (KHARE et al., 2020). Como exemplo, pode ser citado o trabalho do Yeo et al. (2020) que utilizou a PCR Palindrômica de Elemento Repetitivo (rep-PCR) e o sequenciamento de última geração (NGS) para identificação de surtos de *Serratia marcescens* em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) neonatal. Neste estudo foram realizados testes combinados de amostras do neonato e amostras ambientais da UTI, principalmente de superfícies de alto contato, como incubadoras, balanças e carrinhos médicos. Vinte e três isolados foram analisados usando rep-PCR e NGS, onde foram identificados 11 grupos distintos. Um isolado ambiental também se mostrou positivo, no entanto o microrganismo era clonalmente distinto dos reportados nos neonatos.

Outra técnica promissora em relação a PCR convencional corresponde a Amplificação da Polimerase de Recombinase Isotérmica (RPA) e Dipsticks de Fluxo Lateral (LFD). No estudo realizado por Dong et al., (2020), os autores utilizaram a RPA

e LFD para detecção de cepas patogênicas de *V. alginolyticus* na maricultura, pois esse patógeno é responsável por grandes perdas econômicas nesse setor. O teste teve como foco a detecção de gene de virulência *toxR* e a análise apresentou alta afinidade pelas cepas patogênicas de *V. alginolyticus* sem apresentar qualquer reação cruzada com outras espécies de *Vibrio* ou bactérias patogênicas. Similarmente, o estudo de YANG et al., (2020) utilizou a RPA combinado com LFD para detecção visual de *V. parahaemolyticus*. Neste trabalho foi necessário apenas 25 minutos de experimento a uma temperatura de 35 a 45 °C, resultando na identificação da espécie com alta especificidade e redução significativa de tempo de execução. A RPA é um ensaio molecular que oferece vantagens comparadas a métodos de amplificação de DNA, como por exemplo, a PCR. Esta técnica é específica, podendo ser realizada em temperatura ambiente, e sua amplificação pode ser visualizada através de fitas de fluxos, fluorescência, dos quais se obtém uma flexível detecção e utilidade em locais endêmicos (ROSSER et al., 2015).

Nos últimos anos, os métodos de Ponto de Atendimento (POC) têm sido vantajosos principalmente pelo tempo de resposta imediato (<30 minutos), que permite tomada de decisões para tratamentos mais favoráveis e hábeis ao paciente. A Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos vem liberando várias plataformas moleculares de POC, dos quais, estes testes mostram sensibilidade e especificidade semelhantes aos testes de amplificação de ácido nucleico. O estudo de Donato et al (2019) descreve uma investigação sobre o desempenho da Roche Cobas Liat (GAS), um tipo de POC, que baseia-se em um teste molecular automatizado para testagem de ácido nucleico de patógenos específicos. Os autores realizaram a pesquisa de estreptococos em duas clínicas de conveniência, visto que, realizaram monitoramento clínico e ambiental do local. Diante disso, fizeram avaliação prospectiva do ensaio de estreptococos do grupo A (GAS) em comparação com a PCR em tempo real. Os resultados apresentaram concordância geral de 97,2%, sem identificação de contaminação no decorrer do estudo, demonstrando assim elevada especificidade, podendo ser utilizado como uma opção de teste de diagnóstico rápido para a rotina de doenças infecciosas.

O GAS foi utilizado em outro estudo para detecção de *Streptococcus pyogenes*. Os autores investigaram amostras de esfregaço de garganta de 427 pacientes, comparando-a com o Teste de Detecção Rápida de Antígeno (RADT). No estudo, o GAS demonstrou sensibilidade (97,7%) e especificidade (93,3%) melhorada em

relação ao RADT, com resultados obtidos em 15 minutos (WANG et al., 2017). Assim, o POC-GAS tornou-se uma resposta rápida para identificação de patógenos específicos, sendo realizado através de um teste em tempo real automatizado de PCR de fácil manipulação e compactado. Atualmente, este ensaio tem sido utilizado para detecção de Strep A, influenza A/B, Vírus Sincicial Respiratório (RSV), SARS-CoV-2 e para a detecção da toxina B (TCD B) do gene de toxigênica da *Clostridium difficile* (MURI; WALD, 2020; DIAGNOSTICS ROCHE, 2021).

Conclusão

O estudo de novas técnicas moleculares tem revolucionado os métodos de diagnóstico, contribuindo de forma eficaz para a identificação de microrganismos e suas variantes, assim como, na diferenciação entre agentes patogênicos e não patogênicos e na análise da distribuição geográfica e temporal de patógenos de importância clínica e ambiental.

Nos últimos anos, essas técnicas têm sido aprimoradas e empregadas na identificação molecular de bactérias, resultando em novas possibilidades para o diagnóstico, como os métodos que são variações da PCR convencional, os quais vem sendo aperfeiçoada, abrindo perspectivas para métodos mais específicos, rápidos e precisos. Outras técnicas moleculares como MCDA-LFB, LAMP, RPA-LFD, GAS vem ganhando notoriedade na literatura com resultados positivos e eficientes, devido a maior facilidade e menor tempo de execução, maior sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade. Porém, algumas dessas permanecem desconhecidas para alguns laboratórios de diagnóstico e pesquisadores, e quando conhecidas, são consideradas inacessíveis devido ao custo de equipamentos e à necessidade de profissionais capacitados e constantes atualizações.

Dessa forma, os avanços nas técnicas de identificação moleculares e a propagação do conhecimento através de técnicas já descritas, são necessários para tornar estas metodologias acessíveis, contribuindo para a melhoria de tratamentos personalizados e atualização dos órgãos de vigilância epidemiológica. Os estudos na área se mostram bastante promissor e com potencial inovador.

Referências

BRAÏEK, Olfa; SMAOUI, Slim. Enterococci: between emerging pathogens and

potential probiotics. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.

BROOKS, Geo F. et al. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg-26**. AMGH Editora, 2014.

BRUYAND, M. *et al.*, Hemolytic uremic syndrome due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. **Medecine et maladies infectieuses**, v. 48, n. 3, p. 167-174, 2018.

CROUCHER, Nicholas J. *et al.*, Horizontal DNA transfer mechanisms of bacteria as weapons of intragenomic conflict. **PLoS biology**, v. 14, n. 3, p. e1002394, 2016.

DONATO, Leslie J. *et al.*, Assessment of test performance and potential for environmental contamination associated with a point-of-care molecular assay for group A *streptococcus* in an end user setting. **Journal of clinical microbiology**, v. 57, n. 2, p. e01629-18, 2019.

DONG, Yu *et al.*, Fast, simple and highly specific molecular detection of *Vibrio alginolyticus* pathogenic strains using a visualized isothermal amplification method. **BMC veterinary research**, v. 16, n. 1, p. 1-12, 2020.

ERAMO, Alessia; MEDINA, William R. Morales; FAHRENFELD, Nicole L. Viability-based quantification of antibiotic resistance genes and human fecal markers in wastewater effluent and receiving waters. **Science of The Total Environment**, v. 656, p. 495-502, 2019.

HE, R. Z. *et al.*, Quantitative detection of streptococcosis infection in dead samples of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Journal of applied microbiology**, v. 129, n. 5, p. 1157-1162, 2020.

HUANG, Qian-Qian *et al.*, Rapid and sensitive detection of the vanA resistance gene from clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates by loop-mediated isothermal amplification. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 16, p. 262-265, 2019.

JAROENRAM, Wansadaj; CECERE, Paola; POMPA, Pier Paolo. Xylenol orange-based loop-mediated DNA isothermal amplification for sensitive naked-eye detection of *Escherichia coli*. **Journal of microbiological methods**, v. 156, p. 9-14, 2019.

JUTKINA, Jekaterina *et al.*, An assay for determining minimal concentrations of antibiotics that drive horizontal transfer of resistance. **Science of the Total Environment**, v. 548, p. 131-138, 2016.

KANE, Staci R.; SHAH, Sanjiv R.; ALFARO, Teneile M. Rapid viability polymerase chain reaction method for detection of *Francisella tularensis*. **Journal of microbiological methods**, v. 166, p. 105738, 2019.

KHARE, Neha et al. Diversidade genotípica em *E. coli* multirresistente, isolada de fezes de animais e da água do rio Yamuna, Índia, usando impressões digitais rep-PCR. **Monitoramento e Avaliação Ambiental**, v. 192, n. 11, pág. 1-13, 2020.

KUYPERS, Jane; JEROME, Keith R. Applications of digital PCR for clinical

microbiology. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1621-1628, 2017.

LEE, Seunguk *et al.*, Rapid and in-situ detection of fecal indicator bacteria in water using simple DNA extraction and portable loop-mediated isothermal amplification (LAMP) PCR methods. **Water research**, v. 160, p. 371-379, 2019.

LI, Shijun *et al.*, Visual and rapid detection of *Leptospira interrogans* using multiple cross-displacement amplification coupled with nanoparticle-based lateral flow biosensor. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 19, n. 8, p. 604-612, 2019.

MALDONADO, Natalia; ROBLEDO, Carlos; ROBLEDO, Jaime. La espectrometría de masas MALDI-TOF en el laboratorio de microbiología clínica. **Infectio**, v. 22, n. 1, p. 35-45, 2018.

MILLER, Manuel *et al.*, Combining fish and environmental PCR for diagnostics of diseased laboratory zebrafish in recirculating systems. **Plos one**, v. 14, n. 9, p. e0222360, 2019.

MORISSET, Dany *et al.* Análise quantitativa de amostras de alimentos e rações com PCR digital de gotículas. **PloS one**, v. 8, n. 5, pág. e62583, 2013.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Medical microbiology E-book**. Elsevier Health Sciences, 2020.

NAJIAN, AB Nurul *et al.*, Probe-specific loop-mediated isothermal amplification magnetogenosensor assay for rapid and specific detection of pathogenic *Leptospira*. **Molecular and cellular probes**, v. 44, p. 63-68, 2019.

NICHOLSON, Pamela; RAWIWAN, Pattarasuda; SURACHETPONG, Win. Detection of Tilapia lake virus using conventional RT-PCR and SYBR green RT-qPCR. **Journal of Visualized Experiments**, v. 141, p. e58596, 2018.

NOTOMI, Tsugunori *et al.* Amplificação isotérmica mediada por loop de DNA. **Pesquisa de ácidos nucleicos**, v. 28, n. 12, pág. e63-e63, 2000.

NZELU, Chukwunonso O.; KATO, Hirotomo; PETERS, Nathan C. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): An advanced molecular point-of-care technique for the detection of Leishmania infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 11, p. e0007698, 2019.

PURIFICAÇÃO JÚNIOR, Antonio Fernando *et al.*, Microbiota sampled from a polluted stream in Recife-PE, Brazil and its importance to public health. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 28, p. 1142-1149, 2017.

SEPÚLVEDA, Dagoberto *et al.*, Design and evaluation of a unique RT-qPCR assay for diagnostic quality control assessment that is applicable to pathogen detection in three species of salmonid fish. **BMC veterinary research**, v. 9, n. 1, p. 1-8, 2013.

SHAMS, Alicia M.; ROSE, Laura J.; NOBLE-WANG, Judith A. Development of a rapid-viability PCR method for detection of *Clostridioides difficile* spores from environmental samples. **Anaerobe**, v. 61, p. 102077, 2020.

TATTIYAPONG, P.; SIRIKANCHANA, K.; SURACHETPONG, W. Development and validation of a reverse transcription quantitative polymerase chain reaction for tilapia lake virus detection in clinical samples and experimentally challenged fish. **Journal of fish diseases**, v. 41, n. 2, p. 255-261, 2018.

VILLAMIL, Carolina *et al.*, Validation of Droplet Digital Polymerase Chain Reaction for *Salmonella* spp. Quantification. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 1512, 2020.

VYNCKA M, VANDESOPPELE J, NIJIS N, METENB B, GANCK D, THAS O. Flexible analysis of digital PCR experiments using generalized linear mixed models. *Biomolecular Detection and Quantification* 9 -1– 13. 2016.

XING, Jiahua; YU, Jia; LIU, Yin. Improvement and evaluation of loop-mediated isothermal amplification combined with chromatographic flow dipstick assays for *Vibrio parahaemolyticus*. **Journal of microbiological methods**, v. 171, p. 105866, 2020.

XU, Mengjie *et al.* Simple visualized detection method of virulence-associated genes of *Vibrio cholerae* by loop-mediated isothermal amplification. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2899, 2019.

WANG, Fangnian *et al.* Accurate detection of *Streptococcus pyogenes* at the point of care using the cobas Liat Strep A nucleic acid test. **Clinical pediatrics**, v. 56, n. 12, p. 1128-1134, 2017.

WANG, Yacui *et al.*, Establishment and application of a multiple cross displacement amplification coupled with nanoparticle-based lateral flow biosensor assay for detection of *Mycoplasma pneumoniae*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 325, 2019.

YANG, Xiaohan *et al.* An improved recombinase polymerase amplification assay for visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* with lateral flow strips. **Journal of Food Science**, v. 85, n. 6, p. 1834-1844, 2020.

YEO, Kee T. *et al.*, *Serratia marcescens* in the neonatal intensive care unit: A cluster investigation using molecular methods. **Journal of infection and public health**, v. 13, n. 7, p. 1006-1011, 2020.

ZANOL, Franciele Maria; PICOLI, Simone Ulrich; MORSCH, Fernanda. Detecção fenotípica de metalobetalactamase em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de hospitais de Caxias do Sul. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, p. 309-314, 2010.

ZHAO, Fan *et al.*, Establishment and application of multiple cross displacement amplification coupled with lateral flow biosensor (MCDA-LFB) for visual and rapid detection of *Candida albicans* in clinical samples. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, p. 102, 2019.

4.3CAPÍTULO DE LIVRO

A revisão de literatura sobre o estado-da-arte: Ambientes aquáticos como um reservatório de bactérias resistentes foi construída na forma de capítulo aceito para publicação no livro intitulado Multiplicidade do meio ambiente na contemporaneidade da Editora e-publicar.

CAPÍTULO

AMBIENTES AQUÁTICOS DE ÁGUA DOCE: UM RESERVATÓRIO DE BACTÉRIAS RESISTENTES?

Milena Roberta Freire da Silva¹; Karolayne Silva Souza¹; Francisco Henrique Santana da Silva¹; Rodrigo reges dos Santos Silva¹; Hévellin Talita Sousa Lins¹; Tainara Fernandes Dantas¹; Livia Caroline Alexandre de Araújo¹; Maria Betânia Melo de Oliveira¹

¹Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

***Autor correspondente:**

Prof.^a Maria Betânia Melo de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

Departamento de Bioquímica
E-mail: maria.bmoliveira@ufpe.br

Resumo

A resistência bacteriana a antibióticos é um problema de saúde pública mundial. A incidência e disseminação de bactérias e genes resistentes em ambientes aquáticos de água doce vêm aumentando nos últimos anos. Este fato deve-se, entre outros fatores, ao descarte inadequado de compostos químicos advindos da agricultura, indústrias e setores da saúde e veterinária. A presença destes compostos na água se configura em uma grave ameaça à qualidade da água e aos organismos ali presentes, uma vez que, alguns permanecem ativos por um longo período de tempo. Dentre estes, destacam-se os antibióticos, os quais por muito tempo foi utilizado e descartado de forma inadequada nestes ambientes, possibilitando o desenvolvimento de Genes Resistentes a Antibióticos (ARGs) e Bactérias Resistentes a Antibióticos (ARBs) e

inviabilizando, conseqüentemente, estes locais para uso e recreações. Apesar disso, o surgimento de bactérias resistentes nestes ecossistemas é baixo quando comparado ao ambiente hospitalar. No entanto, é de fundamental importância a realização de monitoramento nestes ambientes aquáticos, uma vez que, estes podem não apenas albergar, mas também veicular ARGs e ARBs ao longo do seu percurso atingindo diferentes nichos ecológicos e populações ribeirinhas.

Palavras-chave: ARBs, ARGs, Antibióticos, Contaminantes.

Introdução

A descoberta dos antibióticos possibilitou um aumento na expectativa de vida dos seres humanos, diminuindo o número de infecções hospitalares e elevando a produtividade animal. Entretanto, seu uso exagerado e inadequado vem possibilitando o surgimento de bactérias cada vez mais resistentes (GOTHWAL; SHASHIDHAR, 2017). Este fato, não se restringe apenas ao ambiente hospitalar. A poluição no ambiente aquático pelo descarte de resíduos farmacêuticos vem causando uma pressão de seleção contínua na microbiota local interferindo na qualidade da saúde pública (GOTHWAL; THATIKONDA, 2018; ARAÚJO *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2020).

Os ambientes aquáticos, principalmente àqueles de água doce podem receber poluições por antibióticos através da agricultura, unidades de criações de animais, unidades de saúde, além de domicílios domésticos (GIEBUŁTOWICZ *et al.*, 2018; GOTHWAL; THATIKONDA, 2018). De acordo com o aumento populacional a nível mundial e, conseqüentemente o aumento no consumo destes fármacos, esses ambientes vem sendo cada vez mais comprometidos pelo descarte inadequado de seus resíduos farmacêuticos (ARAÚJO *et al.*, 2020).

A existência de antibióticos em ambientes de água doce é uma preocupação mundial e crescente, visto que, essa interação vem possibilitando o desenvolvimento de Bactérias Resistentes a Antibióticos (ARBs) e Genes de Resistência a Antibióticos (ARGs). Assim, esse complexo de agentes bioativos e bactérias representa um risco para estes ecossistemas os quais tornam-se na maioria das vezes em receptores de poluentes (MANAIA *et al.*, 2018; CACACE *et al.*, 2019).

Investigações sobre a ocorrência de tipos de resistência a antibióticos em ambientes de água doce possuem limitações quando comparadas a estudos de

ambientes hospitalares. Embora, nos últimos anos, a presença de bactérias patogênicas nestes ambientes vem sendo detectada e vem se tornando uma preocupação cada vez maior (NNADOZIE; ODUME, 2019).

Diante da relevância deste tema para o meio ambiente e a saúde pública, o objetivo desta revisão foi realizar um levantamento na literatura sobre a prevalência de ARBs e ARGs em ambientes aquáticos de água doce e suas implicações nestes locais.

Metodologia

Trata-se de uma revisão bibliográfica de abordagem qualitativa do tipo exploratória narrativa. Foram realizadas buscas nas principais bases eletrônicas nacionais e internacionais: Pubmed, Biblioteca virtual de saúde (Bvs) e Scholar Google (Google Acadêmico). Foram selecionados artigos científicos utilizando os descritores em ciências da saúde (DeCS) e operadores booleanos: “Anti-Bacterial Agents” AND “Bacteria” AND “Environment” no período de 2005 a 2021, considerando-se elegíveis artigos na língua inglesa e espanhola.

Resultados e Discussões

Nos últimos anos, tem sido crescente a liberação de compostos orgânicos de origem antropogênica, visto que, há uma preocupação pertinente com esses contaminantes emergentes no meio ambiente. Inúmeros compostos químicos integram esse grupo de contaminantes emergentes, principalmente os fármacos, pesticidas e aditivos industriais (GARCÍA *et al.*, 2020).

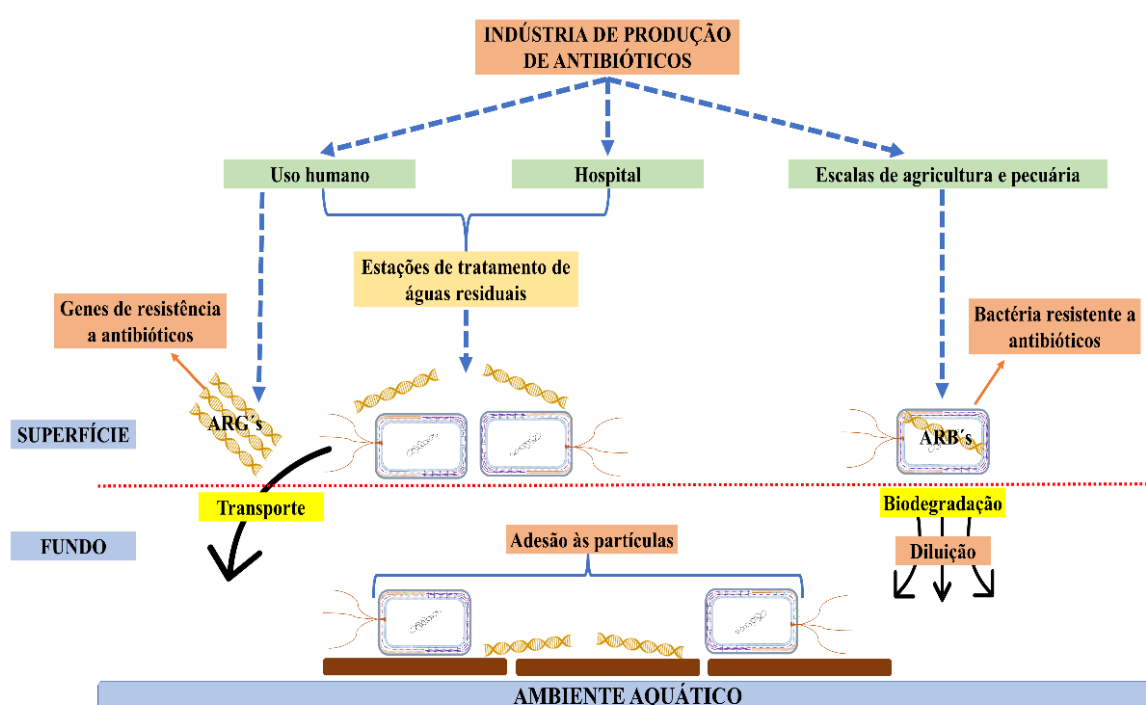
A presença desses contaminantes em ambientes aquáticos pode configurar em uma grave ameaça aos organismos vivos que ali habitam, uma vez que esses são planejados para perdurar biologicamente ativos por períodos prolongados. Com isso, um dos compostos químicos que tem sido levado em consideração devido a essas características supracitadas são os antibióticos (CACACE *et al.*, 2019; CORNO *et al.*, 2019).

O uso excessivo de antibióticos tem ocasionado a liberação continuada e descontrolada em ambientes aquáticos, despertando os cientistas para necessidade de monitorar ainda mais estes ambientes, uma vez que, esses compostos podem

causar o desenvolvimento de Genes Resistentes a Antibióticos (ARGs) e Bactérias Resistentes a Antibióticos (ARBs) (CHEN *et al.*, 2017; NNADOZIE; ODUME, 2019).

Os antibióticos são agentes terapêuticos extensamente utilizados na medicina humana e veterinária principalmente no combate a infecções microbianas, inibindo o crescimento ou matando os microrganismos (GIEBUŁTOWICZ *et al.*, 2018). A figura 1 corresponde a um esquema representativo da potencial origem, propagação, disseminação, degradação e diluição de ARGs e ARBs.

Figura 1 - Esquema representativo da origem potencial, propagação, transmissão, degradação e diluição de ARBs e ARGs



Fonte: Adaptado de NNADOZIE; ODUME (2019).

Estudos recentes de Boopathy (2017) e Grabert *et al.*, (2018) demonstraram que o metabolismo incompleto de antibióticos em humanos e o descarte inadequado dessas substâncias em estações de tratamento de água, é uma das mais importantes fontes de liberação desses agentes no meio ambiente.

Com isso, os sistemas de tratamento de águas residuais são as principais fontes de contaminação de antibióticos na água, visto que, devido às propriedades químicas desses agentes, as Estações de Tratamentos de Água - ETA são incapazes de remover completamente esses compostos, resultando assim na contaminação de águas superficiais (GIEBUŁTOWICZ *et al.*, 2018).

Uma das características pertinentes aos antibióticos é que raramente esses compostos são metabolizados totalmente no organismo sendo excretados pela urina e fezes de forma parcial em conjunto com seus metabólitos, após alguns dias do consumo. (GARCÍA *et al.*, 2020).

A entrada desses antibióticos no meio ambiente em zonas rurais e urbanas acontece de maneiras diferentes. Em áreas rurais, esta excreção ocorre principalmente de forma direta pelo gado, visto que, são medicados em instalações de criações de animais, assim como esta entrada pode também acontecer por meio do escoamento agrícola e pela piscicultura. Já em áreas urbanas, as descargas de efluentes (principalmente resíduos hospitalares) em rios e lagos, por exemplo, são as vias principais de entrada desses compostos químicos na água (HOCQUET; MULLER; BERTRAND, 2016; SAPKOTA *et al.*, 2018; BIRD *et al.*, 2019). De modo que, estes resíduos de antibióticos podem afetar a população de microrganismos na água, influenciando a resistência bacteriana a esses medicamentos. Assim, uma mistura de bactérias resistentes a antibióticos e microrganismos de fontes antropogênicas, podem oferecer riscos ao surgimento de novas cepas resistentes em grande escala (GIEBUŁTOWICZ *et al.*, 2018).

Os ambientes de água doces são um dos mais relevantes reservatórios de ARBs e ARGs (NNADOZIE; ODUME, 2019). Segundo Tacao; Correia; Henriques (2015), estes ambientes podem conter altas concentrações de ARBs resistentes a medicamentos antimicrobianos básicos como: penicilina, tetraciclina, ampicilina, cefalotina e cloranfenicol, já que esses antibióticos são de uso mais frequente pela sociedade. A tabela 1 mostra os principais antibióticos encontrados em análises de ambientes de água doce.

Tabela 1- Prevalência dos principais antibióticos encontrados em estudos de ambientes de água doce

ESTUDOS	AMBIENTE AQUÁTICO	ANTIBIÓTICOS
Harmon <i>et al.</i> , 2019	Lago, Barragem, Piscina Natural	Carbapenem
Tacao; Correia; Henriques, 2015	Rio	Carbapenem
Pang <i>et al.</i> , 2015	Lago	Penicilina, Ampicilina, Cefalotina, Cloranfenicol, Tetraciclina, Rifampicina
Aubron <i>et al.</i> , 2005	Rio	Ampicilina, Cefalotina, Cefotaxima, Ceftazidima, Imipenem, Amoxicilina + ácido clavulânico

Fonte: Autores (2021).

Os ARBs resultam em uma grande ameaça à saúde pública, dos quais as principais espécies de ocorrência são especialmente: Enterobacteriaceae produtoras de β -lactamase de espectro estendido, Enterobacteriaceae produtoras de Carbapenemase, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Enterococcus* resistente à vancomicina, as quais podem causar infecções de espectro epidêmico (ARORA *et al.*, 2014). Estudos realizados em Portugal, França, Japão, Estados Unidos da América (EUA), Espanha, China, Coreia e Brasil relataram a presença de ARBs em ambientes de água doce (Tabela 2).

Tabela 2 - Grupos e espécies de ARBs detectados em análises de ambientes de água doce

GRUPO DE ARBs	ESTUDOS/PAÍS	ESPÉCIE DE ARBs
Enterobacteriaceae produtoras de β -lactamase de espectro estendido	Miyagi; Hirai, 2019 (Japão)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> ,
	Ye et al., 2017 (China)	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>
	Harmon et al., 2019 (EUA)	<i>Enterobacter asburiae</i>
	Girlich; Poirel; Nordmann, 2011 (França)	<i>Aeromonas spp</i>
	Tacao; Correia; Henriques, 2015 (Portugal)	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas sp</i> , <i>Acinetobacter sp</i>
	Spindler et al., 2012 (Brasil)	<i>Pseudomonas spp.</i>
Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemase	Piedra et al., 2017 (Espanha)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>
Staphylococcus aureus resistente à meticilina	Thapaliya et al., 2017 (EUA)	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Hatcher et al., 2016 (EUA)	<i>Staphylococcus aureus</i>
Enterococos resistentes à vancomicina	Nishiyama et al., 2017 (Japão)	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
	Nam et al., 2019 (Coreia)	<i>Enterococcus spp</i>

Fonte: Autores (2021).

Estes dados são preocupantes e demonstram que a resistência bacteriana é um problema não apenas das unidades de saúde, mas também dos ambientes aquáticos impactados. Geralmente as bactérias possuem dois tipos diferentes de

resistência a antibióticos, os quais são denominados de resistência intrínseca e adquirida (GARCÍA *et al.*, 2020). A resistência intrínseca ocorre naturalmente nos microrganismos, já a adquirida revela a alteração de uma bactéria anteriormente sensível que tornou-se resistente. Essas resistências são decorrentes de mutações na estrutura do seu material genético, independente da quantidade de antibióticos presentes no meio (GARCÍA *et al.*, 2020).

Bactérias são eficientes para obter ARGs através de mutações e transferência de genes, de modo que, a transferência de genes de antibióticos é um dos mais relevantes, obtido por meio da transferência horizontal de genes. Nesse tipo de transferência, estes microrganismos possuem a capacidade de adquirir genes de outras bactérias dentre das mesmas espécies ou de espécies distintas, visto que, enquanto as células procariotas se dividem e se multiplicam, os ARGs se espalham em escala exponencialmente significativa, e de forma vertical (SALYERS; GUPTA; WANG, 2004; GRABERT *et al.*, 2018).

Assim, conforme o tipo de antibiótico pode haver genes distintos, de modo que, as bactérias poderão sobreviver à sua exposição. Um exemplo seria os genes de resistência à tetraciclina, dos quais, já existem relatos na literatura cerca de 38 tipos de genes distintos (ROBERTS, 2005; GRABERT *et al.*, 2018). A tabela 3 demonstra diversas abordagens sobre os ARGs em estudos de efluentes de águas residuais tratadas no mundo todo.

Tabela 3 - ARGs relatados em estudos de estações de tratamento para efluentes

GRUPO DE GENES DE RESISTÊNCIA	GENES ABORDADOS	ESTUDOS
Genes de resistência à sulfonamida	<i>Sul-1</i>	Czekalski et al., 2012, Chen; Zhang, 2013, Munir; Wong; Xagorarakis, 2011, Naquin et al., 2015
	<i>Sul-II</i>	Czekalski et al., 2012
	<i>Sul-III</i>	Chen; Zhang, 2013
	<i>tetA</i>	Zhang et al., 2009, Bird et al., 2019
	<i>tetC</i>	Zhang et al., 2009
Genes de resistência à tetraciclina	<i>tetG</i>	Auerbach; Seyfried; McMahon, 2007
	<i>tetM</i>	Chen; Zhang, 2013
	<i>TetQ</i>	Auerbach; Seyfried; McMahon, 2007
	<i>tetO</i>	Munir; Wong; Xagorarakis, 2011
	<i>tetW</i>	Munir; Wong; Xagorarakis, 2011

	<i>tetX</i>	Munir; Wong; Xagorarakis, 2011, Naquin et al., 2015, Belding; Boopathy, 2018
Genes resistentes a beta-lactâmicos	<i>Bla_{TEM-uni}</i>	Lachmayr et al., 2009
	<i>blaM-1</i>	Uyaguari et al., 2011
	<i>amp-C</i>	Böckelmann et al., 2009
	<i>Blas_{hv-5}</i>	Böckelmann et al., 2009
	<i>mecA</i>	Naquin et al., 2015, Boopathy et al., 2017
Genes de resistência a macrolídeos	<i>ermB</i>	Böckelmann et al., 2009, Negreanu et al., 2012
	<i>ermF</i>	Negreanu et al., 2012
Outros	<i>VanA</i>	Böckelmann et al., 2009

Fonte: Autores (2021).

Os ARGs se relacionam com minerais e ácidos úmidos em ecossistemas de água doce, dos quais, se mantém em sedimentos (NNADOZIE; ODUME, 2019). Com isso, os ARGs em ecossistemas aquáticos podem existir tanto em forma intracelular em DNA genômico e plasmídeo de bactérias resistentes a antibióticos, quanto na forma extracelular como em eDNA livre (DNA ambiental), os quais são protegidos no interior de cápsides de fago, substâncias poliméricas extracelulares, detritos celulares e/ou superfícies minerais de argila (ANYADUBA, 2016).

Em relação à destinação dos ARBs e ARGs, estes podem sofrer declínio através de processos biológicos e não biológicos (adsorvidos em partículas, diluídos, absorvidos por microrganismos aquáticos através de transferência horizontal de genes), e transportados por distâncias consideráveis em rios e lagos. O transporte dos ARBs e ARGs em ambientes aquáticos geralmente é dependente do regime de fluxo da água. Portanto, em rios que ocorrem grandes cursos de água estes são diluídos, diferentemente das áreas que estão sujeitas a seca, nas quais as concentrações são mais elevadas (JERDE *et al.*, 2016).

Desse modo, ambientes de água doces utilizados para recreação, bem como estações de tratamento de água potável e sistemas de distribuição de água doce, podem adquirir ARBs e ARGs, representando risco para saúde pública. Esta interação de bactérias resistentes a antibióticos e seres humanos podem causar efeitos como redução da eficácia na terapia com agentes antimicrobianos, bem como elevar a incidência, gravidade e custos no tratamento de infecções (MCEWEN; COLLIGNONN, 2018; NADOZIE; ODUME, 2019).

Considerações finais

No presente estudo observou-se que os ARBs e ARGs são prevalentes em ambientes de água doce, atuando como parte de um reservatório natural de resistência a antibióticos e possibilitando, portanto, sua veiculação entre os corpos de água. Os achados e evidências relatados neste estudo sustenta a relevância da avaliação continua do risco que estes ambientes contaminados podem representar à saúde publica e a fauna local. Este tema é extremamente relevante e necessita do direcionamento de políticas públicas para evitar o descarte inadequado desses compostos nestes ambientes.

Referências

- ANYADUBA, T. Fate and Transport of Antibiotic Resistance Genes in Aquatic Ecosystem. 2016.
- ARAÚJO, Livia Caroline Alexandre et al. In vitro evaluation of mercury (Hg²⁺) effects on biofilm formation by clinical and environmental isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 169, p. 669-677, 2019.
- ARAÚJO, Livia Caroline Alexandre et al. Effects of Antibiotics on Impacted Aquatic Environment Microorganisms. **Emerging Contaminants**, 2020.
- ARORA, Shilpa *et al.*, Novel chromogenic medium for detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin resistant Enterococcus. **Journal of Medical Investigations and Practice**, v. 9, n. 2, p. 98-98, 2014.
- AUBRON, Cécile *et al.*, Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, US rivers. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 2, p. 260, 2005.
- AUERBACH, Eric A.; SEYFRIED, Erin E.; MCMAHON, Katherine D. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. **Water research**, v. 41, n. 5, p. 1143-1151, 2007.
- BELDING, Cameron; BOOPATHY, Raj. Presence of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes in coastal recreational waters of southeast Louisiana, USA. **Journal of Water Supply: Research and Technology-AQUA**, v. 67, n. 8, p. 800-809, 2018.
- BIRD, Kyle *et al.*, Water pollution and observation of acquired antibiotic resistance in Bayou Lafourche, a major drinking water source in Southeast Louisiana, USA. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 33, p. 34220-34232, 2019.
- BÖCKELMANN, Uta *et al.*, Quantitative PCR monitoring of antibiotic resistance genes and bacterial pathogens in three European artificial groundwater recharge

systems. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 1, p. 154-163, 2009.

BOOPATHY, Raj. Presence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in sewage treatment plant. **Bioresource technology**, v. 240, p. 144-148, 2017.

CACACE, Damiano *et al.*, Antibiotic resistance genes in treated wastewater and in the receiving water bodies: A pan-European survey of urban settings. **Water research**, v. 162, p. 320-330, 2019.

CORNO, Gianluca *et al.*, Effluents of wastewater treatment plants promote the rapid stabilization of the antibiotic resistome in receiving freshwater bodies. **Water research**, v. 158, p. 72-81, 2019.

CHEN, Zhaojun *et al.*, Prevalence of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in drinking water sources in Hangzhou city. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 1133, 2017.

CHEN, Hong; ZHANG, Mingmei. Occurrence and removal of antibiotic resistance genes in municipal wastewater and rural domestic sewage treatment systems in eastern China. **Environment international**, v. 55, p. 9-14, 2013.

CZEKALSKI, Nadine *et al.*, Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into Lake Geneva, Switzerland. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 106, 2012.

GARCÍA, Joan *et al.*, A review of emerging organic contaminants (EOCs), antibiotic resistant bacteria (ARB), and antibiotic resistance genes (ARGs) in the environment: Increasing removal with wetlands and reducing environmental impacts. **Bioresource technology**, v. 307, p. 123228, 2020.

GIEBUŁTOWICZ, Joanna *et al.*, Occurrence of antimicrobial agents, drug-resistant bacteria, and genes in the sewage-impacted Vistula River (Poland). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 6, p. 5788-5807, 2018.

GAWRYSZEWSKA, I. *et al.*, Invasive enterococcal infections in Poland: the current epidemiological situation. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 35, n. 5, p. 847-856, 2016.

GIRLICH, Delphine; POIREL, Laurent; NORDMANN, Patrice. Diversity of clavulanic acid-inhibited extended-spectrum β -lactamases in *Aeromonas* spp. from the Seine River, Paris, France. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 1256-1261, 2011.

GOTHWAL, Ritu; SHASHIDHAR. Occurrence of high levels of fluoroquinolones in aquatic environment due to effluent discharges from bulk drug manufacturers. **Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste**, v. 21, n. 3, p. 05016003, 2017.

GOTHWAL, Ritu; THATIKONDA, Shashidhar. Mathematical model for the transport of fluoroquinolone and its resistant bacteria in aquatic environment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 21, p. 20439-20452, 2018.

GRABERT, Richard *et al.*, Effect of tetracycline on ammonia and carbon removal by the facultative bacteria in the anaerobic digester of a sewage treatment plant. **Bioresource technology**, v. 267, p. 265-270, 2018.

HARMON, Dana E. *et al.*, Prevalence and characterization of carbapenem-resistant bacteria in water bodies in the Los Angeles–Southern California area. **Microbiologyopen**, v. 8, n. 4, p. e00692, 2019.

HATCHER, S. M. *et al.*, Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in surface waters near industrial hog operation spray fields. **Science of the Total Environment**, v. 565, p. 1028-1036, 2016.

HOCQUET, Didier; MULLER, Allison; BERTRAND, Xavier. What happens in hospitals does not stay in hospitals: antibiotic-resistant bacteria in hospital wastewater systems. **Journal of Hospital Infection**, v. 93, n. 4, p. 395-402, 2016.

JERDE, Christopher L. *et al.*, Influence of stream bottom substrate on retention and transport of vertebrate environmental DNA. **Environmental science & technology**, v. 50, n. 16, p. 8770-8779, 2016.

LACHMAYR, Karen L. *et al.*, Quantifying nonspecific TEM β -lactamase (*bla* TEM) genes in a wastewater stream. **Applied and environmental microbiology**, v. 75, n. 1, p. 203-211, 2009.

MANAIA, Célia M. *et al.*, Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: tackling the black box. **Environment international**, v. 115, p. 312-324, 2018.

NAM, Sehee *et al.*, Detection and genotyping of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. by multiplex polymerase chain reaction in Korean aquatic environmental samples. **International journal of hygiene and environmental health**, v. 216, n. 4, p. 421-427, 2013.

MCEWEN, Scott A.; COLLIGNON, Peter J. Antimicrobial resistance: a one health perspective. **Microbiology spectrum**, v. 6, n. 2, p. 6.2. 10, 2018.

MIYAGI, Kazufumi; HIRAI, Itaru. A survey of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in environmental water in Okinawa Prefecture of Japan and relationship with indicator organisms. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 8, p. 7697-7710, 2019.

MUNIR, Mariya; WONG, Kelvin; XAGORARAKI, Irene. Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. **Water research**, v. 45, n. 2, p. 681-693, 2011.

NAQUIN, Anthony *et al.*, Presence of antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant in Thibodaux, Louisiana, USA. **Bioresource technology**, v. 188, p. 79-83, 2015.

NEGREANU, Yael *et al.*, Impact of treated wastewater irrigation on antibiotic

resistance in agricultural soils. **Environmental science & technology**, v. 46, n. 9, p. 4800-4808, 2012.

NISHIYAMA, Masateru *et al.*, Antibiotic resistance profiling and genotyping of vancomycin-resistant enterococci collected from an urban river basin in the provincial city of Miyazaki, Japan. **Water**, v. 9, n. 2, p. 79, 2017.

NNADOZIE, Chika F.; ODUME, Oghenekaro Nelson. Freshwater environments as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and their role in the dissemination of antibiotic resistance genes. **Environmental pollution**, v. 254, p. 113067, 2019.

PANG, Yu-Chen *et al.*, Prevalence of antibiotic-resistant bacteria in a lake for the storage of reclaimed water before and after usage as cooling water. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 17, n. 6, p. 1182-1189, 2015.

PIEDRA, Núria Carrasco *et al.* Carbapenemase-producing enterobacteriaceae recovered from a Spanish river ecosystem. **PloS one**, v. 12, n. 4, p. e0175246, 2017.

ROBERTS, Marilyn C. Update on acquired tetracycline resistance genes. **FEMS microbiology letters**, v. 245, n. 2, p. 195-203, 2005.

SALYERS, Abigail A.; GUPTA, Anamika; WANG, Yanping. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. **Trends in microbiology**, v. 12, n. 9, p. 412-416, 2004.

SAPKOTA, Amir *et al.*, Aquaculture practices and potential human health risks: current knowledge and future priorities. **Environment international**, v. 34, n. 8, p. 1215-1226, 2008.

SILVA, Sivoneide *et al.*, Effects of Cefazolin and Meropenem in Eradication Biofilms of Clinical and Environmental Isolates of *Proteus mirabilis*. **Current microbiology**, v. 77, n. 8, p. 1681-1688, 2020.

TACAO, Marta; CORREIA, António; HENRIQUES, Isabel S. Low prevalence of carbapenem-resistant bacteria in river water: resistance is mostly related to intrinsic mechanisms. **Microbial Drug Resistance**, v. 21, n. 5, p. 497-506, 2015.

THAPALIYA, Dipendra *et al.*, Prevalence and characterization of staphylococcus aureus and methicillin-resistant staphylococcus aureus on public recreational beaches in northeast ohio. **GeoHealth**, v. 1, n. 10, p. 320-332, 2017.

UYAGUARI, Miguel I. *et al.*, Characterization and quantitation of a novel β -lactamase gene found in a wastewater treatment facility and the surrounding coastal ecosystem. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, n. 23, p. 8226-8233, 2011.

YE, Qinghua *et al.*, Antibiotic-resistant extended spectrum ss-lactamase-and plasmid-mediated AmpC-producing enterobacteriaceae isolated from retail food products and the pearl river in Guangzhou, China. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 96, 2017.

ZHANG, Xuxiang *et al.*, Class 1 integronase gene and tetracycline resistance genes tet A and tet C in different water environments of Jiangsu Province, China. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 6, p. 652-660, 2009.

4.4 ARTIGO EXPERIMENTAL

Os resultados da avaliação da qualidade da água do rio São Francisco e sua relação com a saúde pública estão apresentados no artigo a seguir, a ser submetido para publicação.

ARTIGO

MICROBIOTA DE AMBIENTES AQUÁTICOS: UMA ALTERNATIVA PARA AVALIAR OS RISCOS PARA SAÚDE PÚBLICA

Milena Roberta Freire da Silva¹; Karolayne Silva Souza¹; Milena Danda Vasconcelos Santos¹; Bruno Oliveira de Veras¹; Iago José Santos da Silva²; Fabricio Motteran²; Ilton Palmeira da Silva³; Lívia Caroline Alexandre de Araújo¹; Maria Betânia Melo de Oliveira¹

¹*Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE*

²*Departamento de Engenharia Civil e Ambiental da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE*

³*Centro Universitário do Rio São Francisco – UniRios*

Autor correspondente:

Prof.^a Maria Betânia Melo de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco

Departamento de Bioquímica

E-mail: maria.bmoliveira@ufpe.br

RESUMO

As atividades antrópicas têm gerado grandes impactos para os ambientes aquáticos, especialmente os rios. O Rio São Francisco representa a principal fonte hídrica da região Nordeste do Brasil. Na cidade de Paulo Afonso, Bahia, este ambiente desempenha importante função para a população local. O objetivo deste trabalho foi avaliar por meio de métodos físicos, químicos e microbiológicos a qualidade das suas águas. A água foi coletada em cinco pontos distintos e foram submetidas a diferentes

análises: físico-química, cromatográfica, microbiológica (identificação bioquímica dos isolados bacterianos, bem como seu perfil de resistência\susceptibilidade), parasitológica e de coliformes totais e termotolerantes. Os parâmetros físico-químicos estavam de acordo com o estabelecido pela Resolução CONAMA 357/2005, e apenas o ponto 3 apresentou a concentração de amônia acima do recomendado. Metais pesados foram detectados em todos os pontos investigados, todavia, estes não ultrapassaram os limites indicados. Um total de 54 bactérias foram isoladas e identificadas bioquimicamente representando 15 gêneros (um Gram-positivo e 14 Gram-negativos). Dentre os pontos investigados, o ponto 3 foi o que teve maior diversidade microbiana. Quanto ao perfil de resistência/susceptibilidade a maioria dos isolados foi resistente a ampicilina (40%) e amoxilina\ácido clavulânico (31%). Já em relação a qualidade da água, todos os pontos foram positivos para coliformes totais e apenas o ponto 3 apresentou parasitas. Nas análises cromatográficas não foram detectadas as substâncias investigadas. Os resultados aqui apresentados demonstram que apesar da maioria dos parâmetros estarem em conformidade com o recomendado pela legislação, o perfil de susceptibilidade microbiana é um alerta da qualidade da água deste ecossistema a qual representa risco para a saúde pública, uma vez que está albergando e disseminando patógenos microbianos.

Palavras-chaves: Bactérias patogênicas. Antibióticos. Contaminantes. Saúde pública.

Introdução

A água é um recurso indispensável para a sustentabilidade da vida (NGANJE *et al.*, 2020). Entretanto, inúmeras atividades têm desencadeado graves problemas de poluição, o que vem resultando na deterioração da qualidade das águas superficiais e subterrâneas, e consequentemente, reduzindo sua disponibilidade (PACA *et al.*, 2019).

Dentre os diferentes ecossistemas aquáticos, os rios representam os principais caminhos de transporte hídrico da terra para os lagos e oceanos, e são amplamente responsáveis por atender as necessidades da sociedade em relação a água potável, irrigação e energia hidrelétrica. Apesar de sua relevância, este ecossistema vem sofrendo influência de ações antrópicas, principalmente relacionadas ao lançamento

de efluentes sem tratamento prévio. Essa descarga pode causar deterioração física, química e biológica, além de acarretar danos aos organismos aquáticos e à saúde humana (PURIFICAÇÃO *et al.*, 2017; PALMER; RUHI, 2019; HUANG *et al.*, 2021).

De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), cerca de 80% de todas as doenças e mortes nos países em desenvolvimento são causadas por doenças relacionadas à veiculação hídrica e à falta de saneamento básico. Dentre estas, a diarreia costuma ser a mais frequente, principalmente em crianças menores de 5 anos, elevando em até 40% os gastos com internações hospitalares (PINTANEL; CECCONELLO; CENTENO, 2021). A morbidade por diarreia é um indicador importante para a saúde pública, uma vez que permite mostrar respostas relacionadas as diversas condições, como a falta de saneamento básico, a qualidade sanitária de alimentos, hábitos higiênicos e comportamentais de uma comunidade (SOUZA *et al.*, 2021).

Para o Brasil, a Organização Mundial da Saúde (OMS), indica que os fatores ambientais são responsáveis por 19% do total de doenças que afetam o país, sendo estas correlacionadas com a falta de saneamento básico e água potável. Em escala global, a contaminação da água potável por patógenos representa um risco para a saúde humana o que pode resultar na morbimortalidade da população, ocasionando 870.000 mortes anualmente (AMORIM *et al.*, 2021; MELLO, 2020).

Neste sentido, avaliar a qualidade da água torna-se uma alternativa indispensável, não apenas para investigar o impacto ambiental causado nestes ecossistemas, mas também para relacioná-lo com problemas de saúde pública (FRENA *et al.*, 2016). São várias as ferramentas utilizadas para diagnosticar e monitorar um ambiente aquático impactado. Entre os parâmetros que podem ser avaliados, os físicos, químicos e microbiológicos são àqueles que fornecem uma análise preliminar dos efeitos dos poluentes presentes nestes locais (PURIFICAÇÃO *et al.*, 2017; ARAÚJO; & OLIVEIRA, 2013).

Considerado um dos principais rios brasileiros, o Rio São Francisco representa a principal fonte hídrica para as regiões que atravessa (BULHÕES *et al.*, 2018). No município de Paulo Afonso, Bahia, nordeste do Brasil, este rio desempenha função importante para a população, sendo utilizado principalmente para recreação, lazer e pesca. Contudo, o crescimento da cidade provocou a ocupação de terrenos, desobedecendo às normas ambientais e sem apresentar infraestrutura sanitária (PINTO; MARQUES; SANTOS, 2020).

O objetivo deste trabalho foi avaliar por meio de parâmetros físicos-químicos, microbiológicos e parasitológicos a qualidade da água do Rio São Francisco no município de Paulo Afonso-BA, nordeste do Brasil e correlacionar os dados com a saúde pública.

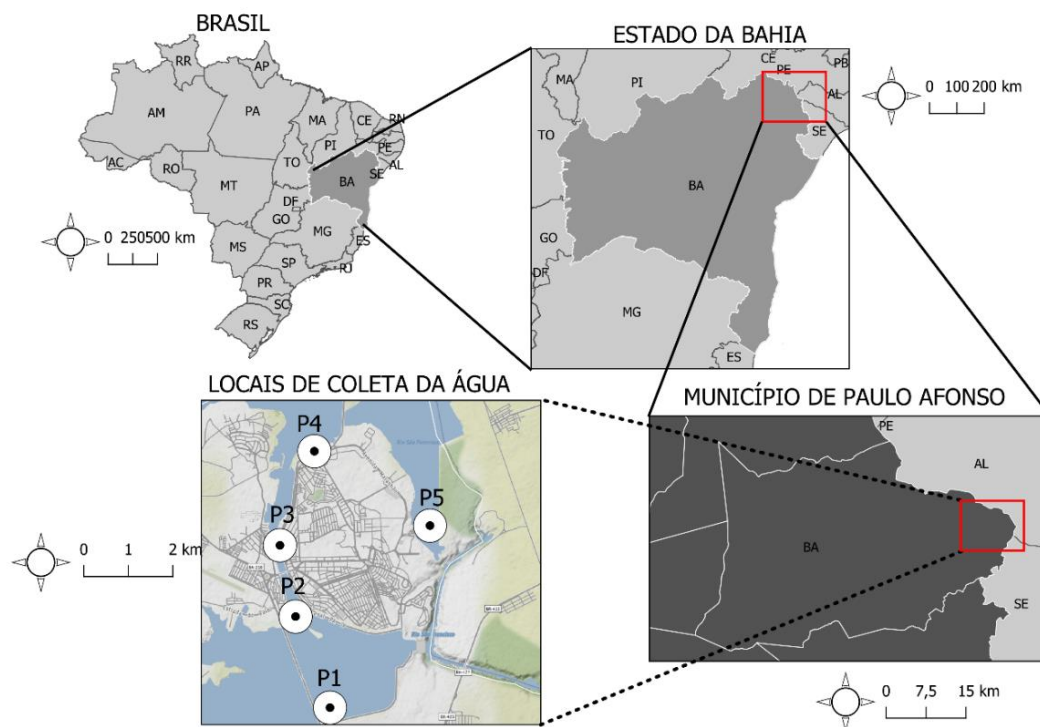
Metodologia

Descrição da área de estudo e coleta das amostras

O estudo foi conduzido na cidade de Paulo Afonso, Bahia, localizada na região nordeste do Brasil, ocupando uma área de 579,723 km² e uma população de 119.930 habitantes (IBGE, 2016). O município situa-se entre os paralelos de 9°59'27" e 9°21'10" de latitude de Sul e entre os meridianos de 37°59'52" e 38°21'16" de longitude Oeste, fazendo divisa com os Estados de Alagoas, Pernambuco e Sergipe (PINTO; MARQUES; SANTOS, 2020).

Para este estudo foram coletadas amostras de água em cinco pontos ao longo do rio (Figura 1): Lago de Paulo Afonso, Av. Velho Chico (P1), Balneário Prainha (P2), Lago de Paulo Afonso, Av. Boa Viagem (P3), Lago Moxotó, Bico de Pedra (P4) e Parque Belvedere (P5). A coleta da água foi realizada na superfície do espelho d'água. As amostras foram armazenadas em garrafas de polietileno tereftalato e encaminhadas ao Laboratório de Biologia Molecular da UFPE, onde foram acondicionadas em ambiente refrigerado a 4 °C até a realização das análises.

Figura 1 – Descrição geográfica dos pontos de coleta em Paulo Afonso – BA, Brasil



Análise físico-química

Para as análises físico-químicas foram realizadas mensurações *in loco* referentes aos parâmetros de alcalinidade, amônia, cloreto, dureza total, ferro, pH e temperatura. Para a medição da temperatura e do pH foi utilizado o pHmetro AT 315 S.P. microprocessado, já os demais parâmetros foram avaliados por meio do Kit Básico de Potabilidade da Alfakit seguindo as recomendações do fabricante. As análises do Oxigênio Dissolvido (OD), Potencial Redox (ORP), Demanda Química de Oxigênio (DQO) e condutividade foram realizadas com o auxílio do multiparametro portátil HQ40d da Hach.

Análise de metais

A determinação de Al, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb e Zn foi realizada usando um espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES, Modelo 5100, Agilent Technologies, EUA). As seguintes condições operacionais foram utilizadas para o ICP OES: potência de radiofrequência de 1200 W, vazão do gás do plasma de 12 L min⁻¹, vazão do gás auxiliar de 1,0 L min⁻¹, vazão do gás de

nebulização de 1,0 L min⁻¹, vazão da amostra de 1,0 mL min⁻¹, tempo de lavagem com a nova amostra (*flush time*) de 10 s, tempo de retardo na captação do sinal da nova amostra (*delay time*) de 15 s, nebulizador concêntrico e câmara de nebulização ciclônica. As seguintes linhas de emissão, em nm, foram monitoradas na vista axial do plasma: Al (396,152); Cd (228,802); Cr (267,716); Cu (324,754); Mn (257,610); Ni (231,604) Pb (220,353) e Zn (213,857). Argônio com pureza mínima de 99,999% (White Martins - Praxair, Brasil) foi usado nas determinações por ICP OES para a geração do plasma, na nebulização e como gás auxiliar.

Isolamento Bacteriano

Para o isolamento bacteriano foram retirados 50 µl da água coletada e com o auxílio de uma alça de Drigalski foram semeados em Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), ágar sangue a 5% e ágar nutriente. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 e 48 horas. A coloração de Gram foi então realizada para fazer identificações presuntivas das bactérias encontradas de acordo com a técnica descrita por Koneman e Winn (2006). A coleta de material biológico foi realizada de acordo com a autorização (número 50816) do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio).

Identificação Bioquímica e Perfil de Susceptibilidade

A identificação automatizada foi realizada pelo sistema *MicroScan*® (Dade Behring – West Sacramento, Califórnia, USA), leitor automático *autoSCAN 4*®. Para Gram-positivos, foi empregado o painel Pos Combo 21 e para os Gram-negativos o Painel Neg Combo 32, sendo estes isolados separados previamente pela metodologia da coloração de Gram. O perfil de susceptibilidade das bactérias também foi avaliado pelo sistema *MicroScan*®. A susceptibilidade dos isolados foi determinada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) e os resultados reportados como sensível, resistência intermediária ou resistente. Para interpretação dos *breakpoints*, foram utilizadas as recomendações de *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018).

Análise de Coliformes Totais e Termotolerantes

Para análise dos coliformes totais e termotolerantes, foram coletadas amostras de água da superfície da água em cada um dos cinco pontos amostrais, as quais foram armazenadas entre 1 e 4 °C até a análise. A presença e o número de coliformes totais e termotolerantes foram determinados pelo método cromogênico (reagente cromogênio Colilert® e cartelas Quanti-Tray/2000) do fabricante IDEXX e os resultados foram expressos como Número Mais Provável (NMP) por 100 mL de amostra.

Técnicas de Análise Parasitológica em Amostras Ambientais

Para pesquisa parasitológica foram aplicadas duas técnicas, uma de sedimentação e outra de flutuação. A técnica de sedimentação foi de acordo com o Método de Hoffman, Pons e Janer (2016) com adaptações. As amostras foram homogeneizadas e transferidas (100 mL) para um cálice, permanecendo em repouso por um período de 24 horas. Após este período, o sedimento resultante foi coletado e analisado (PÓVOAS *et al.*, 2020).

Na técnica de flutuação foi aplicado o método de Faust modificado de acordo com Neves (2016). Nesse método cada amostra de água foi distribuída em tubos Falcon de 15 mL e centrifugada por 1 min a 2500 rpm. Em seguida, foi desprezado o sobrenadante e adicionado o sulfato de zinco a 33% e centrifugado por mais 1 min a 2500 rpm. Com o auxílio de uma alça de platina foi recolhida a película formada na parte superior da solução e colocada em uma lâmina para análise. Todas as amostras foram analisadas em um microscópio óptico modelo Olympus® (objetivas de 10x e 40x). Para cada amostra de água três lâminas foram analisadas (BEN AYED *et al.*, 2018; UMEH *et al.*, 2020).

Análises Cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas com o Cromatógrafo Líquida de Alta Eficiência modelo LC-20AT da Shimadzu, com detectores de arranjo de diodo e índice de refração.

Resultados e Discussão

Análise físico-química

Os parâmetros físico-químicos analisados e sua comparação com os índices propostos como aceitáveis pela Resolução CONAMA 357/2005 podem ser observados na Tabela 1. Todos os parâmetros dos pontos investigados estavam em conformidades com o recomendado na resolução, exceto o nível de amônia (3,642 mg L⁻¹) que estava inadequado no ponto 3.

Tabela 1- Avaliação dos parâmetros físico-químicos investigados em cinco pontos do Rio São Francisco, nordeste do Brasil

Parâmetro	Amostra					Limítrofes
	P1	P2	P3	P4	P5	
Temperatura (°C)	25,0	27,0	28,6	28,6	27,6	ND
pH	8,80	8,42	8,30	8,59	8,28	6-9
Condutividade (μS cm ⁻¹)	92,8	91,2	91,7	89,3	92,1	≥100 μS/cm
OD (mg O ₂ L ⁻¹)	7,73	9,38	8,49	9,79	8,75	≥5 mg L ⁻¹
ORP (mV)	204,2	158,7	163,9	135,1	158,3	≥ 400 mV
DQO (mg O ₂ L ⁻¹) ^a	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	5,0 mg L ⁻¹
Alcalinidade (mgL ⁻¹ CaCO ₃)	30,0	50,0	50,0	50,0	40,0	30-500 mg L ⁻¹
Cloreto (mgL ⁻¹ Cl)	20,0	20,0	30,0	20,0	20,0	≤250 mg L ⁻¹
Dureza total (mgL ⁻¹ CaCO ₃)	50,0	50,0	50,0	50,0	40,0	500mg L ⁻¹
Amônia (mg L ⁻¹ NH ₃)	0,1214	0,1214	3,642	0,1214	0,1214	0,5 (pH>8)
Ferro (mgL ⁻¹ Fe)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	≤0,3 mg L ⁻¹

Legenda: OD – Oxigênio Dissolvido; ORP – Potencial Redox; DQO – Demanda Química de Oxigênio. ^aO limite inferior da curva analítica do parâmetro DQO é 10 mg O₂ L⁻¹.

A temperatura desempenha papel crucial no meio aquático, condicionando as influências de uma série de variáveis físico-químicas como densidade, viscosidade e concentração de sais dissolvidos, além de apresentar efeito direto sobre as reações químicas dos organismos (ALVES; MARTINS; JESUS, 2019). No período avaliado, a temperatura da água variou de 25 a 28,6 °C considerada, portanto, adequada para este ambiente.

A avaliação do pH é considerada como um dos parâmetros mais relevantes quando se trata de pesquisas relativas à qualidade da água (UMEH *et al.* 2020). Sua origem natural é decorrente da fotossíntese, da dissolução de rochas, oxidação da matéria orgânica e do processo de absorção de gases presentes na atmosfera; já o

de origem antropogênica é proveniente de despejos industriais e domésticos (COUTO *et al.*, 2018; UMEH; CHUKWURA; IBO, 2020). Conforme os resultados apresentados na Tabela 1, pode-se verificar que os achados nos cinco pontos estiveram de acordo com a Resolução CONAMA 357/2005. Os valores oscilaram numa faixa de 8,28 (P5) a 8,80 (P1). Em consonância com os resultados obtidos, um estudo realizado por França e colaboradores (2019) nos municípios de Juazeiro – BA e Petrolina – PE avaliando as águas superficiais do Rio São Francisco encontraram resultados similares.

Em relação à medição da condutividade, foram encontrados valores que variaram de 89,3 $\mu\text{S/cm}$ (P4) a 92,8 $\mu\text{S/cm}$ (P1). Na legislação nacional não há padrões para condutividade em corpos d'água, entretanto, níveis superiores a 100 $\mu\text{S/cm}$ podem ser um indicativo de ambientes impactados (ARAÚJO; OLIVEIRA, 2013). A condutividade elétrica em recursos hídricos é um parâmetro físico que possibilita a capacidade da água em conduzir corrente elétrica, estando diretamente relacionada com a presença de íons solubilizados, indicando que quanto maior for a quantidade destes íons no meio, maior será a condutividade (SOUSA *et al.*, 2017; POL *et al.*, 2019; UMEH; CHUKWURA; IBO, 2020).

De acordo com o CONAMA nº 357/05 os valores limites para OD são de $\geq 5,0 \text{ mg L}^{-1}$, sendo este um parâmetro importante para avaliação da qualidade da água, pois revela a possibilidade de manutenção da vida dos organismos aeróbios, uma vez que durante a estabilização da matéria orgânica, as bactérias fazem uso do oxigênio nos seus processos respiratórios, podendo acarretar em uma redução da sua concentração no meio (FRANÇA *et al.*, 2019). Os resultados obtidos no presente estudo revelam que em todos os pontos investigados os valores de OD estavam em conformidade com o estabelecido pela legislação vigente.

Um parâmetro analisado em estudos de diagnósticos e monitoramento de ambientes aquáticos é o ORP, além do OD, uma vez que existem outros elementos químicos além do oxigênio que afetam a capacidade oxidativa de rios e lagos e fornecem informações adicionais sobre a qualidade da água e o grau de poluição (MAMUN *et al.*, 2019). Este parâmetro não é estabelecido pela Resolução do CONAMA 357/2005, entretanto, para o Ministério do Meio Ambiente (MMA), valores entre 200 mV e 600 mV indicam um meio fortemente oxidante e entre -100 mV e -200 mV indicam meios redutores (FIORUCCI; BENEDETTI FILHO, 2005). No presente trabalho, os resultados encontrados para ORP apresentam valores positivos para esta

variável em todos os pontos pesquisados, indicando, portanto, condições oxidantes.

Já o DQO juntamente com os demais parâmetros, torna-se confiável para avaliar a extensão da poluição na água, pois sua concentração aumenta quando há elevadas concentrações de matéria orgânica e inorgânica (DEVI *et al.*, 2017). Tem-se como valor padrão para o DQO 5,0 mg L⁻¹, o que leva a concluir que nos pontos analisados todas se encontram em conformidade, ou seja, não há elevadas concentrações de matéria orgânica e inorgânica neste ambiente.

A alcalinidade é uma medida total das substâncias presentes na água, e é definida como a capacidade da água neutralizar ácidos. Esta determina a dosagem das substâncias flocculantes no tratamento da água e de despejos industriais (AGUIRRE; PIRANEQUE; CUETO, 2021). Do ponto de vista sanitário a alcalinidade não tem significado relevante, mesmo para valores elevados. No entanto, as águas de alta alcalinidade podem gerar sabor desagradável e quando associadas com pH elevado, excesso de dureza e de sólidos dissolvidos, podem ser inadequadas para uso (LIMA *et al.*, 2020). Neste estudo, os valores da alcalinidade mantiveram-se dentro da faixa estabelecida como aceitável. Valores abaixo de 20 mg/L podem ser indicativo de despejos urbanos neste ambiente (FRANÇA *et al.*, 2019).

O teor de cloreto das águas tem por finalidade obter informações sobre o grau de mineralização ou indícios de poluição, como esgotos domésticos e resíduos industriais. Os cloretos em concentrações normais não afetam a saúde dos seres humanos nem dos organismos de água doce (FERNANDES *et al.*, 2019). Deste modo, em nenhum dos cinco pontos analisados a concentração de cloretos ultrapassou o valor ≤ 250 mg L⁻¹ permitido pela legislação. Os resultados concentraram-se na faixa de 30,0 mg L⁻¹ (P3), sendo este o ponto com maior concentração.

A Resolução do CONAMA 357/2005 não estabelece valores para a dureza. No entanto, a Portaria N° 2.914/2011 do Ministério da Saúde (MS) determina que para a água ser considerada potável o valor máximo permitido (VPM) é de 500 mg/L CaCO₃ (LACERDA *et al.*, 2021). Nesta pesquisa foi identificada a ausência de cálcio e magnésio na composição da água, podendo esta ser classificada como uma água mole, com valores inferiores a 60 CaCO₃ em mg/L.

A matéria orgânica nos rios e riachos transforma-se em amônia, a qual é altamente tóxica para a fauna aquática. A atividade bacteriana é responsável por transformar a amônia em nitrato, substância menos tóxica (ARAÚJO; OLIVEIRA, 2013). Esta, por sua vez, provoca consumo de oxigênio dissolvido das águas naturais

ao ser oxidada biologicamente o que afeta a vida nestes ecossistemas (COUTO *et al.*, 2018). A presente análise revelou que os níveis de amônia estavam inadequados apenas no P3. Este resultado pode indicar que neste ponto há um maior lançamento de matéria orgânica e que não está ocorrendo o processo de nitrificação de forma adequada. O ferro, encontrado nas águas subterrâneas está associado a despejos domésticos e industriais. Este é um parâmetro que quando se encontra elevado pode causar alteração na cor e sabor da água. Dessa maneira, estabeleceu-se a concentração limite de ferro de 0,3 mg/L na CONAMA nº 396/08 (SANTOS *et al.*, 2021; PACHECO NETO; MATOSINHOS; BAGGIO FILHO, 2021), o que confere conformidade com os resultados obtidos neste estudo.

Análise de metais

No período avaliado todos os metais analisados foram detectados na água, no entanto, estão dentro dos valores estabelecidos pela Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011 do MS.

Tabela 2 - Concentração de metais em cinco pontos de monitoramento do Rio São Francisco em Paulo Afonso, BA, nordeste do Brasil

Metais (mg L ⁻¹)	P1	P2	P3	P4	P5	Limítrofes (mg/L)
Al	0,024	< 0,011	< 0,011	< 0,011	< 0,011	0,2
Cd	< 0,0017	< 0,0017	< 0,0017	< 0,0017	< 0,0017	0,005
Cr	< 0,0021	< 0,0021	< 0,0021	< 0,0021	< 0,0021	0,05
Cu	< 0,0054	< 0,0054	< 0,0054	< 0,0054	< 0,0054	2
Mn	0,0088	0,0023	0,0022	0,0023	0,0039	0,1
Ni	< 0,0087	< 0,0087	< 0,0087	< 0,0087	< 0,0087	0,07
Zn	< 0,018	< 0,018	< 0,018	< 0,018	< 0,018	5
Pb	< 0,016	< 0,016	< 0,016	< 0,016	< 0,016	0,01

Legenda: Al – Alumínio, Cd -Cádmio, Cr -Cromo, Cu – Cobre, Mn - Manganês, Ni – Níquel, Pb Chumbo, Zn – Zinco.

Insumos antrópicos, estrutura geoquímica e mineração de metais criam fontes potenciais de poluição por metais pesados em ambientes aquáticos. Os metais pesados são constituintes naturais de rochas e solos e entram no meio ambiente como consequência de intemperismo e erosão. Diante de certas condições ambientais estes podem se acumular até uma concentração tóxica e causar danos ecológicos. Cd, Cu, Hg e Zn são os cinco metais com maior potencial de impacto para o meio ambiente, visto que quando detectados em concentrações elevadas, são decorrentes da

atividade agrícola e industrial (AL NAGGAR; KHALIL; GHORAB, 2018).

A presença em altas concentrações de metais pesados está relacionada à redução drástica da qualidade da água e principalmente às atividades humanas (MATOS *et al.*, 2017). Normalmente estão presentes em pequenas quantidades, assim como demonstrado no presente estudo. No entanto, quando estão em concentrações elevadas são resultantes das atividades humanas, incluindo o descarte de efluentes, atividades industriais, agrícolas e de mineração (ROGOWSKA *et al.*, 2018).

Desta forma, a detecção de metais na água torna-se um preditor dos problemas ambientais, visto que, estes são responsáveis por ocasionarem problemas graves à biota, pois são geralmente tóxicos, mesmo em concentrações muito baixas e não são biodegradáveis, podendo degradar seriamente a qualidade da água (SALL *et al.*, 2020).

Identificação bioquímica dos microrganismos e perfil de resistência

Por meio da identificação bioquímica dos isolados, foram identificados 15 gêneros bacterianos incluindo 1 gram-positivos (*Staphylococcus*) e 14 gram-negativos (*Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Leminorella*, *Plesiomonas*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Serratia* e *Tatumella*). Mediante essas análises, verificou-se que o ponto 3 apresentou maior diversidade microbiana (nove espécies), diferentemente do ponto 2 (duas espécies), Tabela 3.-

Quanto ao perfil de resistência a antibióticos dos isolados, verificou-se que a maioria foi resistente a ampicilina (40%) e amoxilina/ácido clavulânico (31%). A tabela 3 mostra os perfis de resistência dos isolados e seus respectivos locais de isolamento. De acordo com estes dados foi possível visualizar que o ponto 3 é o que apresenta mais riscos do ponto de vista microbiológico, o qual apresentou os isolados bacterianos mais resistentes. O ponto 1 também apresenta uma relevância significativa, tendo em vista que dos 11 isolados, apenas três não foram resistentes a nenhum antibiótico.

Tabela 3 - Caracterização bioquímica e perfil de resistência dos isolados bacterianos obtidos do Rio São Francisco, Paulo Afonso-BA

Isolados	Identificação Bioquímica	Perfil de resistência
----------	--------------------------	-----------------------

Pontos		
P1	P1A01	<i>Staphylococcus aureus</i> CLI, LEV, TEC
	P1A03	<i>Enterobacter cloacae</i> AMC, ERT
	P1A05	<i>Enterobacter cloacae</i> AMC, AMP, ATM, FOS
	P1A09	<i>Plesiomonas shigelloides</i> AMI, ATM, CPM, CAZ, GEN
	P1A11	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> AMP, CRO, CIP, CLI, LEV, LNZ, OXA, PEN, RIF, SZT, TEC, VAN
	P1A12	<i>Acinetobacter baumannii</i> -
	P1B01	<i>Enterobacter amnigenus</i> -
	P1B02	<i>Staphylococcus aureus</i> AMC, AMP, CRO, CLI, ERI, LNZ, OXA, PEN, RIF, TEC, VAN
	P1B03	<i>Staphylococcus epidermidis</i> AMC, AMP, CRO, CLI, ERI, LNZ, OXA, PEN, RIF, TEC, VAN
	P1B04	<i>Staphylococcus auricularis</i> -
P2	P1B05	<i>Kluyvera intermedia</i> ATM, CPM, CTX, CAZ, COL, FOS
	P2A01	<i>Enterobacter cloacae</i> AMC, AMP, FOS, PIT, SUT
	P2A02	<i>Enterobacter cloacae</i> AMC
	P2A03	<i>Enterobacter cloacae</i> -
	P2A04	<i>Enterobacter cloacae</i> -
	P2B01	<i>Enterobacter cloacae</i> AMC
	P2B03	<i>Staphylococcus schleiferi</i> -
	P2B04	<i>Enterobacter cloacae</i> -
P3	P3A01	<i>Aeromonas veronii</i> ATM, CLO
	P3A02	<i>Staphylococcus sciuri</i> AMP, CRO, CLI, ERI, GEN, LNZ, OXA, PEN, RIF, TEC, VAN
	P3A03	<i>Acinetobacter baumannii</i> -
	P3A05	<i>Enterobacter cloacae</i> AMP, ERT
	P3A06	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> AMC, AMP, CRO, CLI, ERI, LNZ, OXA, RIF, TEC, VAN
	P3A07	<i>Enterobacter cloacae</i> AMC, AMP, FOS
	P3A08	<i>Escherichia coli</i> -
	P3A09	<i>Leminorella grimontii</i> AMP, CPM, COL, FOS, PIT, SZT
	P3A10	<i>Klebsiella pneumoniae</i> AMP, PIT
	P3A11	<i>Klebsiella pneumoniae</i> -
	P3A12	<i>Klebsiella pneumoniae</i> AMP, ATM, CPM, CTX, CRX, ERT, PIT
	P3A13	<i>Acinetobacter baumannii</i> -
	P3A14	<i>Klebsiella pneumoniae</i> AMP, PIT
	P3B01	<i>Aeromonas veronii</i> ATM, CLO
	P3B02	<i>Enterobacter cloacae</i> AMC, AMP
	P3B04	<i>Enterobacter cloacae</i> AMC, AMP
	P3B05	<i>Acinetobacter baumannii</i> -
	P3B06	<i>Citrobacter freundii</i> COL, ERT
P4	P3B07	<i>Citrobacter freundii</i> AMC, AMP, COL, PIT
	P3B08	<i>Klebsiella pneumoniae</i> AMP, COL, PIT
	P4A01	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -
	P4A02	<i>Enterobacter cloacae</i> AMC, AMP
	P4A03	<i>Acinetobacter baumannii</i> -
	P4A04	<i>Tatumella ptyseos</i> ATM, CAZ, COL, FOS
	P4A05	<i>Staphylococcus epidermidis</i> AMC, AMO, CRO, CLI, ERI, LNZ, OXA, PEN, RIF, TEC, VAN
	P4B01	<i>Cedecea davisae</i> AMC, AMP, COL, FOS

	P4B02	<i>Enterobacter cloacae</i>	AMC
	P4B03	<i>Enterobacter cloacae</i>	AMC
	P5A02	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	-
	P5A03	<i>Cedecea neteri</i>	AMC, ATM, COL
	P5A05	<i>Aeromonas veronii</i>	-
P5	P5A06	<i>Serratia plymuthica</i>	AMP
	P5A07	<i>Providencia alcalifaciens</i>	AMP, ATM, PIT
	P5A08	<i>Staphylococcus auricularis</i>	CIP
	P5B03	<i>Tatumella ptyseos</i>	AMP, ATM, COL
	P5B07	<i>Staphylococcus auricularis</i>	CLI

AMC: Amoxicilina/ Ácido Clavulânico, AMI: Amicacina, AMO: Amoxilina, AMP: Ampicilina, ATM: Aztreonam, CAZ: Ceftazidima, CIP: Ciprofloxacina, CLI: Clindamicina, CLO: Cloranfenicol, COL: Colistina, CPM: Cefepime, CRO: Ceftriaxona, CRX: Cefuroxima, CTX: Cefotaxima, ERI: Eritromicina, ERT: Ertapenem, FOS: Fosfomicina, GEN: Gentamicina, LEV: Levofloxacina, LNZ: Linezolida, OXA: Oxacilina, PEN: Penicilina, PIT: Piperacilina/ Tazobactam, RIF: Rifampicina, SUT: Sulfazotrim, SZT: Sulfametrim, TEC: Teicoplanina, VAN: Vancomicina.

A identificação e caracterização de microrganismos presentes no ambiente aquático se faz necessária para compreender o impacto ambiental e sua influência e dinâmica nos sistemas biológicos locais (SANTOS; HILDENBRAND; SCHUG, 2016; MARTIN *et al.*, 2018). Desta forma, a partir da caracterização bioquímica dos 54 isolados obtidos dos diferentes pontos do rio São Francisco, verificou-se uma diversidade de gêneros e espécies.

Membros da família Enterobacteriaceae foram obtidos na maioria dos pontos do rio, os quais foram representados por espécies como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Leminorella grimontii*, *Providencia alcalifaciens*, *Serratia plymuthica* e *Tatumella ptyseos*. Estes isolados foram adicionados a bacterioteca de ambientes aquáticos impactados da UFPE. A maioria dessas espécies são comumente encontrada no trato intestinal de seres humanos e animais, e sua presença em ambientes aquáticos indica a contaminação de origem fecal, sendo encontrada em esgotos, efluentes, águas naturais e solos que tenham recebido contaminação fecal recente (LOIOLA; SOBRINHO COSTA, 2020; RIOS *et al.*, 2020).

Além das bactérias pertencentes a família Enterobacteriaceae, outras espécies isoladas do ambiente estudado são descritas na literatura como potenciais patógenos humanos, como *Staphylococcus aureus* (Amirsoleimani *et al.*, 2019) *Acinetobacter baumannii* (Jesus; Santos; Ferreira, 2019) e *Staphylococcus saprophyticus* (Balogun; Akinsuroju; Oluwasola, 2019), pois podem ocasionar diversos tipos de infecções, que vão desde invasivas a doenças mediadas por toxinas, visto que a gravidade da infecção depende das cepas que o humano adquire no local contaminado (RIOS *et*

al., 2020).

Desta forma, observa-se que a presença de esgoto não tratado jogado diretamente no rio corrobora para que essa contaminação aumente. Destro *et al.* (2020) demonstraram em seu estudo que a descarga de esgoto sanitário, a mudança na estação do ano, e um grande número de banhistas contribuíram para a sobrevivência e dispersão de microrganismos patogênicos em ambientes aquáticos.

Analisando o perfil de resistência dos pontos de coleta, nota-se uma maior resistência no ponto P3, tendo em vista que a maioria dos isolados foram resistentes a pelo menos um antibiótico testado, sendo este um ponto que recebe o descarte direto de efluentes doméstico no curso do rio. O ponto 1 também apresentou relevância quando aos isolados resistentes, local utilizado para atividades recreativas pela população do município.

Os sistemas de tratamento de esgoto não degradam resíduos de antibióticos e outros fármacos e a carga de antimicrobianos utilizados nos sistemas de saúde gera efluentes com presença de organismos resistentes. O descarte inadequado de medicamentos entre os quais podemos destacar os antibióticos podem favorecer o aparecimento de resistência em organismos pelo contato com o ambiente aquático a longo prazo. Estes impactos causados aos ambientes podem levar a problemas de saúde pública (ADESOJI; EGYIR; SHITTU, 2020; SAVIN *et al.*, 2020), tornando-se evidente a importância de se avaliar a qualidade microbiológica da água e a presença de bactérias resistentes.

Análise de coliformes

Todas as amostras analisadas foram positivas para coliformes totais, apresentando uma variação do NMP de $3,3 \times 10^3$ a $6,6 \times 10^4$ /100 mL (Tabela 4). No entanto não foram identificados coliformes termotolerantes.

Tabela 4 - Análise de coliformes totais e termotolerantes nos cinco pontos avaliados

Pontos	NMP ^a de coliformes em 100 mL de amostra	
	Coliformes totais	<i>E. coli</i>
P1	$4,6 \times 10^3$	ND
P2	$4,6 \times 10^3$	ND
P3	$3,3 \times 10^3$	ND
P4	$6,6 \times 10^4$	ND
P5	$2,2 \times 10^4$	ND

^aNMP – Número Mais Provável. ND – Nada detectado

Os resultados microbiológicos das amostras analisadas demonstraram elevada taxa de contaminação por coliformes totais, com resultados positivos para todos os pontos e com valores maiores ou iguais a 6.600 NMP/100 mL. Similarmente, Cayado *et al.*, (2019) e Flores e Lima (2020) encontraram informações semelhantes investigando o Rio Jundiá na cidade de São Paulo. A determinação da concentração de coliformes totais é um dos principais parâmetros de investigação sobre a ocorrência de microrganismos patogênicos (FERNANDES *et al.*, 2019).

Estes são responsáveis pela transmissão de inúmeras doenças de veiculação hídrica, tais como: febre tifoide, cólera e paratifoide. De maneira geral, a presença destes microrganismos na água ocorre por diversos fatores, como fezes de animais e seres humanos, além de sua presença possuir relação direta com o grau de contaminação fecal (BORTOLETTO *et al.*, 2015; GOMES *et al.*, 2019). De acordo com a Resolução do CONAMA 357/2005 as amostras de água analisada apresentam má qualidade higiênico-sanitária e não atendem aos padrões definidos pela legislação em vigor, sendo essa uma evidência de que o esgoto sanitário continua sendo despejado irregularmente no rio São Francisco, acarretando em poluição e contaminação.

Análise parasitológica

Dentre as amostras parasitológicas analisadas foram encontrados os seguintes parasitas: *Endolimax nana* (nos pontos 1 e 3); *Entamoeba coli* (no ponto 5) e *Tenia sp* (no ponto 3), este último identificado pelos dois métodos utilizados. Esses resultados apontam para problemas como contaminação fecal de animais e excrementos humanos. A presença de enteroparasitas serve como indicador sanitário da qualidade das águas. Estes parasitas na água podem levar os indivíduos a desenvolverem doenças entéricas, estando a sua presença atrelada às precárias condições sanitárias, constituindo um importante marcador do estado de saúde daquela população, conforme demonstrado nos trabalhos de Ben Ayed *et al.* (2018) e El-Khayat *et al.* (2021).

Adicionalmente, o resultado positivo para as análises parasitológicas é um indicativo das adaptações desenvolvidas pelas formas parasitárias frente aos

estresses ambientais sofridos no determinado ambiente, uma vez que condicionam o aumento da sobrevivência local (SIQUEIRA; APRILE; MIGUÉIS, 2012).

Análise Cromatográfica

Foram realizadas análises cromatográficas para anilina, ácido benzoico, catecol, ácidos orgânicos voláteis (acético, propanoico, isobutanoico, butanoico, isopentanoico, pentanoico, hexanoico), açúcares (sacarose, glicose, frutose), álcoois (glicerol, 1,3 propanodiol, etanol, butanol), Linear Alquil Benzeno Sulfonato de Sódio (LAS), 2,4-diaminoanisol (DAAN), 2,4-dinitroanisol (DNAN), 2-metoxi-5-nitroanilina (MENA), paracetamol e diclofenaco. As substâncias analisadas não foram detectadas (ND) em nenhum dos pontos investigados.

O monitoramento destes contaminantes em ambientes aquáticos tem crescido ultimamente, uma vez que a utilização de técnicas analíticas possibilita identificar e quantificar poluentes em concentrações traços nestes ecossistemas (FERNÁNDEZ *et al.*, 2017). Atualmente, a cromatografia é considerada a técnica mais utilizada e versátil devido diversos fatores como: disponibilidade de métodos de detecção muito sensíveis para todas as categorias de técnicas cromatográficas; velocidade relativa das separações cromatográficas; facilidade de uso quando comparada a outros métodos analíticos e possibilidade de desenvolvimento de métodos analíticos precisos e de veracidade (ALMEIDA, 2021).

Dentre as técnicas cromatográficas, a Cromatografia Líquida (CL) é a mais empregada para análise de contaminantes ambientais, uma vez que permite a detecção de diferentes substâncias e diferentes propriedades físico-químicas (MOLINA *et al.*, 2014). A ausência destes contaminantes nas águas do rio São Francisco pode justificar-se pela presença em quantidades inferiores aos limites de detecção do equipamento, tendo como exemplo o paracetamol e diclofenaco com limite de detecção de 0,03 mg/L. Outra questão que pode ter contribuído para não detecção destas amostras nas águas superficiais é o volume de água do rio, que é superior ao volume de efluentes, fator este que auxilia na diluição dos contaminantes.

Conclusão

Apesar da maioria dos parâmetros investigados no rio São Francisco se apresentarem em conformidade com o recomendado pela resolução do CONAMA

375/2005, os dados relacionados aos metais pesados e a microbiota local com seu respectivo perfil de resistência são os principais indicativos do impacto local. Os dados aqui observados podem ser utilizados para despertar a comunidade e os gestores locais quanto ao descarte inadequado dos poluentes neste ecossistema.

Referências

ADESOJI, Tomiwa Olumide; EGYIR, Beverly; SHITTU, Adebayo Osagie. Antibiotic-resistant staphylococci from the wastewater treatment plant and grey-water samples in Obafemi Awolowo University, Ile-Ife, Nigeria. **Journal of Water and Health**, v. 18, n. 6, p. 890-898, 2020.

AGUIRRE, Sonia Esperanza; PIRANEQUE, Nelson Virgilio; CUETO, Jean Linero. Concentración de metales pesados y calidad físico-química del agua de la Ciénaga Grande de Santa Marta. **Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica**, v. 24, n. 1, 2021.

AKUBUENYI, F. C.; UTTAH, E. C.; ENYI-IDOH, K. H. Microbiological and physicochemical assessment of major sources of water for domestic uses in Calabar Metropolis Cross River state, Nigeria. **Transnational Journal of Science and Technology**, v. 3, n. 2, p. 31-44, 2013.

AL NAGGAR, Yahya; KHALIL, Mohamed S.; GHORAB, Mohamed A. Environmental pollution by heavy metals in the aquatic ecosystems of Egypt. **Open Acc. J. Toxicol**, v. 3, p. 555603, 2018.

ALMEIDA, Cristina MM. Overview of Sample Preparation and Chromatographic Methods to Analysis Pharmaceutical Active Compounds in Waters Matrices. **Separations**, v. 8, n. 2, p. 16, 2021.

ALVES, Luciano Silva; MARTINS, Lorena Alencar; JESUS, Lucineide Bispo. Avaliação da qualidade da água na bacia do rio Camarajipe (Salvador–Brasil): diagnóstico dos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e determinação do IQA. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 6, n. 1, 2019.

AMIRSOLEIMANI, Atena *et al.*, Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* in wastewater treatment plants by whole genomic sequencing. **Water research**, v. 158, p. 193-202, 2019.

AMORIM, Carolina Ferreira *et al.*, Análise bacteriológica da água em bebedouros de escolas municipais de Feira de Santana/BA. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 1, p. e40010111742-e40010111742, 2021.

ARAÚJO, Marlyete Chagas de; OLIVEIRA, Maria Betânia Melo de. Monitoramento da qualidade das águas de um riacho da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. **Revista Ambiente & Água**, v. 8, p. 247-257, 2013.

BALOGUN, O. B.; AKINSUROJU, M. O.; OLUWASOLA, P. O. Bacteriological Analysis of Selected Industrial Wastewater in Akure Metropolis. **International Journal of Recent Innovations in Academic Research**, v. 3, n. 1, p. 228-236, 2019

BARRETO, Marlen; CASTILLO-RUIZ, Mario; RETAMAL, Patricio. Salmonella enterica: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. **Revista chilena de infectología**, v. 33, n. 5, p. 547-557, 2016.

BEN AYED, Layla *et al.*, Assessment of the parasitological quality of water stored in private cisterns in rural areas of Tunisia. **Journal of water and health**, v. 16, n. 5, p. 737-749, 2018.

BORTOLETTO, E. C. *et al.*, Water quality monitoring of the Pirapó River watershed, Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, p. 148-157, 2015.

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente, Resolução Nº 357 de 17 de março de 2005. Disponível em: https://www.icmbio.gov.br/cepsul/images/stories/legislacao/Resolucao/2005/res_conama_357_2005_classificacao_corpos_agua_rtfcd_a_altrd_res_393_2007_397_2008_410_2009_430_2011.pdf Acessado: 22 de setembro de 2021

BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente, Resolução Nº 396 de 03 de abril de 2008. Disponível em: <http://portalpnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLU%C3%87%C3%83O%20CONAMA%20n%C2%BA%20396.pdf> Acessado: 22 de setembro de 2021.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução 357/2005, Enquadramento de Corpos Hídricos Superficiais no Brasil. **Diário Oficial [da] União**, n. 53, de 17 de março de 2005, Seção 1, p. 58-63.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 dez. 2011. Seção 1, p. 39-46

CHUBAKA, Chirhakarlula E. *et al.*, A review of roof harvested rainwater in Australia. **Journal of environmental and public health**, v. 2018, 2018.

COUTO, C. M. C. M. *et al.*, Assessment of Douro and Ave River (Portugal) lower basin water quality focusing on physicochemical and trace element spatiotemporal changes. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 53, n. 12, p. 1056-1066, 2018.

COYADO, Giorgia Ariani Lujan *et al.*, Análises físico-químicas e microbiológicas de águas de pré e pós-tratamento na cidade de Jundiaí-SP. 2019.

DESTRO, Júlia Oscar *et al.*, Qualidade microbiológica das areias de praia do Litoral Norte gaúcho. **Scientia Prima**, v. 6, n. 1, p. 48-58, 2020.

DEVI, P. Anusuya *et al.*, Review on water quality parameters in freshwater cage fish culture. **International Journal of Applied Research**, v. 3, n. 5, p. 114-120, 2017.

EL-KHAYAT, Hanaa Mahmoud M. *et al.*, Bacteriological, parasitological and chemical pollution of Nile River water at some Greater Cairo sites. **International Journal of Environmental Studies**, p. 1-17, 2021.

FERNANDES, Jaiane Freitas *et al.*, Análise da qualidade da água do rio Jaguaribe, em um trecho situado no município de Jaguaribe, Ceará, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 40, n. 2, p. 215-226, 2019.

FERNÁNDEZ, Virginia Pérez *et al.*, Recent advancements and future trends in environmental analysis: Sample preparation, liquid chromatography and mass spectrometry. **Analytica chimica acta**, v. 983, p. 9-41, 2017.

FRANÇA, Carlos Laécio Evangelista *et al.*, Caracterização físico-química das águas superficiais do Rio São Francisco nos municípios de Juazeiro/BA e Petrolina/PE. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 10, n. 6, p. 218-230, 2019.

FRENA, Morgana *et al.*, Evaluation of anthropogenic contamination using sterol markers in a tropical estuarine system of northeast Brazil. **Marine pollution bulletin**, v. 109, n. 1, p. 619-623, 2016.

FROES, Bruna Heloisa Cadete; LIMA, Ana Beatriz Carollo Rocha. Avaliação preliminar dos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e organolépticos do Rio Jundiá e comparação com os padrões estabelecidos para o seu enquadramento. **Unisanta BioScience**, v. 9, n. 1, p. 46-53, 2020.

GOMES, Janderson Bruzaca *et al.*, Evaluation of aquatic contamination in an urban lagoon environment in a coastal region in the north of Brazil. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 3, 2019.

HUANG, Jiacong *et al.*, Characterizing the River Water Quality in China: Recent Progress and On-Going Challenges. **Water Research**, p. 117309, 2021.

JESUS, Priscila Rodrigues; SANTOS, Juliana Carmo; FERREIRA, Joana Angélica Barbosa. Avaliação microbiológica da água utilizada nos serviços de hemodiálise na cidade do Rio de Janeiro nos anos 2016 a 2018. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 7, n. 1, p. 53-59, 2019.

LACERDA, L. M. *et al.*, QUALIDADE DA ÁGUA NATURAL PRODUZIDA EM UMA INDÚSTRIA NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DE RIBAMAR-MA. **Ars Veterinaria**, v. 37, n. 2, p. 83-86, 2021.

LIMA, Santana Livia *et al.*, Análise de parâmetros físico-químicos do rio pedra comprida na zona urbana do município de Sumé-PB. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 85303-85319, 2020.

LOIOLA, Nilson Santos; SOBRINHO COSTA, Mayara Letícia. Análise microbiológica da água bebida pela comunidade das cachoeiras, Povoado Vila Real, Barra do Corda-Maranhão. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 4, p. 441-449, 2020.

MAMUN, K. A. *et al.*, Smart water quality monitoring system design and KPIs analysis: case sites of fiji surface water. **Sustainability**, v. 11, n. 24, p. 7110, 2019.

MARTIN, Misty S. *et al.*, Characterization of bacterial diversity in contaminated groundwater using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Science of the Total Environment**, v. 622, p. 1562-1571, 2018.

MATOS, Leomá A. *et al.*, The influence of heavy metals on toxicogenetic damage in a Brazilian tropical river. **Chemosphere**, v. 185, p. 852-859, 2017.

MELLO, Rafael Reis Pereira Bandeira *et al.*, Desafios No Acesso À Água E Saneamento Básico No Brasil E O Controle Da Covid-19. **Revista Augustus**, v. 25, n. 51, p. 281-293, 2020.

MOLINA, José Robles-*et al.*, Método multirresíduo para a determinação de mais de 400 poluentes prioritários e emergentes em água e efluentes por extração em fase sólida e espectrometria de massa por cromatografia líquida de tempo de voo. **Journal of Chromatography A**, v. 1350, p. 30-43, 2014.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 13^a ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2016.

NGANJE, T. N. *et al.*, Public health challenges as a result of contaminated water sources in Kumba, Cameroon. **Environmental geochemistry and health**, v. 42, n. 4, p. 1167-1195, 2020.

OKUMURA, Adriana Tiemi Ramos *et al.*, Determinação da qualidade da água de um rio tropical sob a perspectiva do uso. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 13, n. 04, p. 1835-1850, 2020.

PACA, Juliana M. *et al.*, Quality assessment of water intended for human consumption from Kwanza, Dande and Bengo rivers (Angola). **Environmental Pollution**, v. 254, p. 113037, 2019.

PACHECO NETO, Wallace Maciel; MATOSINHOS, Cristiano Christófar; BAGGIO FILHO, Hernando. Efeito do uso e ocupação do solo sobre a concentração dos metais nas águas da sub-bacia do Rio Paraúna. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 1, p. 749-759, 2021.

FILHO, Hernando. Efeito do uso e ocupação do solo sobre a concentração dos metais nas águas da sub-bacia do Rio Paraúna. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 1, p. 749-759, 2021.

PALMER, Margaret; RUHI, Albert. Linkages between flow regime, biota, and ecosystem processes: Implications for river restoration. **Science**, v. 365, n. 6459, 2019.

PINTANEL, Suelen Ramires; CECCONELLO, Samanta Tolentino; CENTENO, Luana Nunes. Análise da correlação entre os indicadores de saneamento básico e as doenças de veiculação hídrica em municípios do sul do Rio Grande do Sul. **Revista Ambientale**, v. 13, n. 2, p. 41-52, 2021.

PINTO, Angerlane Costa; MARQUES, Luiz Henrique Braz da Silva; SANTOS, Fátima Lúcia de Brito. Utilização de bioensaio na avaliação ecotoxicológica de lagos urbanos (Paulo Afonso/BA) com *Poecilia reticulata* (Peters, 1859)(Chordata: Teleostei)/Use of bioassay in ecotoxicological evaluation of urban lakes (Paulo Afonso/BA) with *Poecilia reticulata* (Peters, 1859)(Chordata: Teleostei). **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 3, p. 1297-1313, 2020.

POL, Jeferson Jeldoci et al. Avaliação ambiental da água superficial do arroio schmidt (Campo Bom, RS), por meio de análises físico-química, biológica e toxicológica em dois pontos. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, v. 8, n. 3, p. 159-171, 2019.

PÓVOAS, Lucas Vieira *et al.*, Avaliação físicoquímica e microbiológica da qualidade da água do rio Cachoeira, Bahia, BR. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 61258-61269, 2020.

PURIFICAÇÃO, Antonio Fernando *et al.*, Microbiota sampled from a polluted stream in Recife-PE, Brazil and its importance to public health. **African Journal of Microbiology Research**, v. 11, n. 28, p. 1142-1149, 2017.

RIOS, Lillian Longue *et al.*, Isolamento, identificação e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos de bactérias patogênicas em vestimentas usadas por profissionais de saúde em ambiente hospitalar. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 5, p. 12999-13027, 2020.

ROGOWSKA, Justyna *et al.*, Gadolinium as a new emerging contaminant of aquatic environments. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 37, n. 6, p. 1523-1534, 2018.

SALL, Mohamed Lamine *et al.*, Toxic heavy metals: impact on the environment and human health, and treatment with conducting organic polymers, a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 29927-29942, 2020.

SANTOS, Inês C.; HILDENBRAND, Zacariah L.; SCHUG, Kevin A. Applications of MALDI-TOF MS in environmental microbiology. **Analyst**, v. 141, n. 10, p. 2827-2837, 2016.

SANTOS, Ipojucan Soares *et al.*, Estudo da remoção e controle de ferro nas águas da nascente Serra do Andrade-MG. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 6, p. e59910615980-e59910615980, 2021.

SAVIN, Mykhailo *et al.*, Antibiotic-resistant bacteria and antimicrobial residues in wastewater and process water from German pig slaughterhouses and their receiving

municipal wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v. 727, p. 138788, 2020.

SILVA, Júlia Pereira Oliveira; FERREIRA, Gessé Pereira; MATOS, Jaqueline Borges. Monitoramento dos aspectos físico-químicos da qualidade da água na Praia Lagunar das Palmeiras. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 9, n. 1, 2021.

SIQUEIRA, Gilmar W.; APRILE, Fabio; MIGUÉIS, Antonio Miguel. Diagnóstico da qualidade da água do rio Parauapebas (Pará-Brasil). **Acta Amazonica**, v. 42, n. 3, pág. 413-422, 2012.

SOUSA, Welinagila Grangeiro *et al.*, Análise de parâmetros físico-químicos do rio Pedra Comprida na zona urbana do município de Sumé-PB. 2017.

SOUZA, Alice Rocha *et al.*, QUALIDADE DA ÁGUA PARA CONSUMO HUMANO E DOENÇAS DIARREICAS AGUDAS NO ESTADO DO TOCANTINS. **REVISTA DE ENGENHARIA E TECNOLOGIA**, v. 13, n. 2, 2021.

UMEH, Odera R. *et al.*, Evaluation of the physicochemical, bacteriological and parasitological quality of selected well water samples in Awka and its environment, Anambra State, Nigeria. **Archives of Agriculture and Environmental Sciences**, v. 5, n. 2, p. 73-88, 2020.

UMEH, Odera Richard; CHUKWURA, E. I.; IBO, Eziafakaego Mercy. Physicochemical, bacteriological and parasitological examination of selected fish pond water samples in Awka and its environment Anambra State, Nigeria. **Journal of Advances in Microbiology**, p. 27-48, 2020.

5 CONCLUSÕES

- Os resultados analisados indicam que os parâmetros prejudiciais relacionados ao rio São Francisco correspondem sobretudo a presença de metais, bactérias patogênicas e parasitas, de modo que, este ambiente pode ser considerado um reservatório de bactérias ambientais de importância clínica, podendo causar danos à saúde da população;
- Os dados apontados pelo perfil de resistência/susceptibilidade nos isolados bacterianos a antibióticos, corroboraram com a literatura científica acerca da ocorrência de ARBs em ambientes aquáticos de água doce;
- A adição de bactérias isoladas do rio São Francisco à bacterioteca de ambientes impactados da UFPE, representa uma contribuição significativa para a caracterização da microbiota destes ambientes e para a compreensão futura da dinâmica de sobrevivência desses microrganismos em ambientes poluídos, uma vez que, os materiais biológicos e/ou genéticos conservados nesta bacterioteca são sempre analisados por meio de outros parâmetros e condições;
- Os resultados abordados revelam o risco microbiano do ambiente aquático investigado indicando a necessidade da criação de um programa de gestão voltado para a manutenção e conservação da qualidade de água e monitoramento da vida deste ecossistema na cidade de Paulo Afonso-BA, visando a diminuição de risco à saúde pública.

6 SÚMULA CURRICULAR

- Biomarkers as a tool to monitor environmental impact on Aquatic Ecosystems. Link: [file:///C:/Users/Milena/Downloads/17871-46056-1-PB%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/Milena/Downloads/17871-46056-1-PB%20(3).pdf)
- Analysis of Exogenous Poisoning by Pesticide in the State of Bahia-Brazil during the Period from 2007 to 2017. Link: <https://www.intechopen.com/chapters/73903>
- Biotechnological Potential of Carotenoids Produced by Extremophilic Microorganisms and Application Prospects for the Cosmetics Industry. Link: <https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=102537>
- Mecanismos de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. Link: <https://editoraomnisscientia.com.br/editora/livros/0402091.pdf>
- Resistência antimicrobiana e os impactos na saúde pública: uma revisão integrativa. Link: <https://editoraomnisscientia.com.br/editora/livros/0402091.pdf>
- Mecanismo de resistência genética de *Acinetobacter baumannii* à carbapenêmicos.
- Aplicação biotecnológica de microrganismos na bioremediação de ambientes impactados com polietileno.
- Curso ministrado: IV Curso de Extensão em Biologia Molecular aplicada ao Diagnóstico Laboratorial
- Curso ministrado: A importância da microbiologia ambiental para a saúde pública.
- Curso ministrado: Biologia Molecular aplicada a análise microbiológica ambiental e o impacto para a saúde pública.
- Curso ministrado: Principais biomarcadores como ferramenta para monitoração de ambientes aquáticos impactados.
- Palestra ministrada: O impacto ambiental ocasionado pela pandemia da covid-19.
- 1º Simpósio de Bioquímica E Biologia Molecular
- CINASAMA - Congresso Internacional de Saúde e Meio Ambiente.
- V Encontro Multidisciplinar de Biologia e Saúde CAV/UFPE.
- I Congresso Brasileiro de Ciências Biológicas On-line.
- I Congresso Norte-Nordeste de Saúde Pública.
- II Congresso Internacional de Saúde Única

REFERÊNCIAS

- AGUILLAR, Carolina Neri *et al.*, Avaliação do teor de metais pesados na água de Rio Paranaíba–MG. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 64871-64880, 2020.
- ARAGÃO, Rafaela Barbosa de Andrade. Fármacos como poluentes emergentes em ambientes aquáticos: panorama de consumo na Região Metropolitana de São Paulo e quadro comparativo de políticas públicas entre países. 2018.
- ARAÚJO, Marlyete Chagas de; OLIVEIRA, Maria Betânia Melo de. Monitoramento da qualidade das águas de um riacho da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. **Revista Ambiente & Água**, v. 8, p. 247-257, 2013.
- ASSIS, Daniel Alvares Silveira de *et al.*, Establishment of the non-native fish *Metynnis lippincottianus* (Cope 1870)(Characiformes: Serrasalminidae) in lower São Francisco River, northeastern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 52, n. 3, p. 228-238, 2017.
- ASSIS, Wanessa Dunga de; RIBEIRO, Márcia Maria Rios; MORAES, Márcia Maria Guedes Alcoforado de. Proposição de melhorias para o sistema de cobrança pelo uso da água bruta da Bacia Hidrográfica do rio São Francisco. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 23, p. 779-790, 2018.
- AVANZI, Ingrid Regina *et al.*, Rapid bacteria identification from environmental mining samples using MALDI-TOF MS analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 4, p. 3717-3726, 2017.
- BERNHARDT, Emily S.; ROSI, Emma J.; GESSNER, Mark O. Synthetic chemicals as agents of global change. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 15, n. 2, p. 84-90, 2017.
- BORAH, Probodh. Molecular typing of bacterial pathogens with special reference to Salmonella. 2018. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Probodh-Borah/publication/332523417_Molecular_typing_of_bacterial_pathogens_with_special_reference_to_Salmonella/links/5cb9802892851c8d22f5cb58/Molecular-typing-of-bacterial-pathogens-with-special-reference-to-Salmonella.pdf. Acesso em: 08.09.2021.
- BRANDÃO, Camilo Rafael Pereira *et al.*, Composição gravimétrica dos resíduos sólidos descartados irregularmente no bairro dos rodoviários, Paulo Afonso-BA. **Semioses**, v. 13, n. 1, p. 60-76, 2019.
- BRITO, Marcelo Fulgêncio Guedes; MAGALHÃES, André Lincoln Barroso. Brazil's development turns river into sea. **Science**, v. 358, n. 6360, p. 179-179, 2017.
- CAMARGO, Pedro Luiz Teixeira *et al.*, USO DE SIGS PARA GERAÇÃO DE MAPAS COM A LOCALIZAÇÃO MÉDIA DA AROEIRA (*Schinus terebinthifolius*) NA MARGEM NOROESTE DO MUNICÍPIO DE SÃO FRANCISCO, BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO SÃO FRANCISCO, MG. **Revista Geografica Academica**,

v. 14, n. 1, p. 162-173, 2020.

CARDOSO, Simone Jaqueline *et al.*, The role of sediments in the carbon and pollutant cycles in aquatic ecosystems. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 31, 2019.

CARTAXO, Amanda da Silva Barbosa *et al.*, Contaminantes emergentes presentes em águas destinadas ao consumo humano: ocorrência, implicações e tecnologias de tratamento. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 61814-61827, 2020.

CASTRO, César Nunes de; PEREIRA, Caroline Nascimento. Revitalização da bacia hidrográfica do rio São Francisco: histórico, diagnóstico e desafios. 2019.

CAVALCANTI, P. P. *et al.*, Contamination from an affluent of Furnas reservoir by trace metals. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, p. 877-885, 2014.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. Resolução nº 357, de 18 de março de 2005. Alterada pela Resolução 410/2009 e pela 430/2011. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 07.09.2021.

DIAS, Carlos Henrique Araujo. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO RIACHO MACARRÃO, AFLUENTE DO RIO SÃO FRANCISCO, NA CIDADE DE JUAZEIRO, BAHIA. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 44, n. 1, p. 103-110, 2020.

DUARTE, Ricardo Franco *et al.*, Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present. **Microorganisms**, v. 7, n. 5, p. 130, 2019.

FLECK, Leandro; TAVARES, Maria Hermínia Ferreira; EYNG, Eduardo. Adsorventes naturais como controladores de poluentes aquáticos: uma revisão. **Revista Eixo**, v. 2, n. 1, p. 39-52, 2013.

GARCIA, Joice Machado *et al.*, Degradação ambiental e qualidade da água em nascentes de rios urbanos. **Sociedade & Natureza**, v. 30, n. 1, p. 228-254, 2018.

GIUDICE, Dante Severo. Arborização urbana no Município de Paulo Afonso—Bahia: algumas sugestões de manejo. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 12889-12912, 2021.

GUEDES, Anderson Ferreira *et al.*, Tratamento da água na prevenção de doenças de veiculação hídrica. **Journal of medicine and Helth Promotion**, v. 2, n. 1, p. 452-461, 2017.

HECK, Tatiana Moraes Silva *et al.*, Parasitoses de interesse clínico em sedimento de rio: uma abordagem na Saúde Pública. **Saúde e Pesquisa**, v. 14, n. 2, 2021.

MARTINS, Fábio S.; ANTUNES, Sara C. Qualidade ecológica de ecossistemas aquáticos. **Revista de Ciência Elementar**, v. 7, n. 2, 2019.

MELLO, Fabíola Azevedo; COSTA, Letícia Aparecida. Escherichia coli e seu impacto

na saúde pública. **Colloquium Vitae**, vol. 8, n. Especial, p. 30-35, 2016.

MELO, José Gustavo Silva *et al.*, Degradação socioespacial: análise dos impactos provocados pela construção do complexo hidroelétrico de Paulo Afonso. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 2, n. 1, 2018.

OLIVEIRA, Jean Luis *et al.*, CORRELAÇÃO DA QUALIDADE DE ÁGUA BRUTA E DOENÇAS DE VEICULAÇÃO HÍDRICA EM TRÊS CORAÇÕES-MG. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, v. 12, n. 4, 2021.

PINTO, Angerlane Costa; MARQUES, Luiz Henrique Braz Silva; SANTOS, Fátima Lúcia de Brito. Utilização de bioensaio na avaliação ecotoxicológica de lagos urbanos (Paulo Afonso/BA) com *Poecilia reticulata* (Peters, 1859)(Chordata: Teleostei)/Use of bioassay in ecotoxicological evaluation of urban lakes (Paulo Afonso/BA) with *Poecilia reticulata* (Peters, 1859)(Chordata: Teleostei). **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 3, p. 1297-1313, 2020.

QUINELATO, Raquel Viana *et al.*, Análise espaço temporal da qualidade da água dos rios Peruípe, Itanhém e Jucuruçu, Bahia. **Scientia Plena**, v. 16, n. 7, 2020.

SANTOS, Fátima Lúcia de Brito *et al.*, Avaliação Quali-Quantitativa de microplásticos em sedimentos e na coluna D'água no balneário Canto das Águas–Glória/BA e balneário da Prainha–Paulo Afonso/BA/Quali-Quantitative evaluation of microplastics in sediments and in the water column in Canto das Águas balneário-Glória/BA and Prainha balneário-Paulo Afonso/BA. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 2, p. 8439-8453, 2020.

SILVA, Mariana Mendes *et al.*, Tendências e extremos da pluviosidade na região hidrográfica do Rio São Francisco. 2021.

SINGH, Jyoti *et al.*, Water pollutants: Origin and status. In: **Sensors in Water Pollutants Monitoring: Role of Material**. Springer, Singapore, . p. 5-20, 2020.

SOUSA, Thiago; GOMES, Marcos Vinícius Teles; BRITO, Marcelo Fulgêncio Guedes de. A percepção dos pescadores e a educação ambiental como subsídios para a conservação do Baixo São Francisco. **Ecologias Humanas: revista da Sociedade Brasileira de Ecologia Humana**, 2017.

SOUZA, Clécio Barbosa *et al.*, Sinais de um problema crônico: a governança hídrica carece promover os comitês de bacias, coordenar planos e gerir informações. **Revista Ambiente & Água**, v. 12, p. 1054-1067, 2017.

VASQUEZ, Marlen I. *et al.*, Environmental side effects of pharmaceutical cocktails: what we know and what we should know. **Journal of Hazardous Materials**, v. 279, p. 169-189, 2014.

YAMAGUCHI, Mirian Ueda *et al.*, Qualidade microbiológica da água para consumo humano em instituição de ensino de Maringá-PR. **O mundo da saúde**, v. 37, n. 3, p. 312-320, 2013.

YI, Yujun *et al.*, Health risk assessment of heavy metals in fish and accumulation patterns in food web in the upper Yangtze River, China. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 145, p. 295-302, 2017.

ZHONG, Wenjue *et al.*, Health risk assessment of heavy metals in freshwater fish in the central and eastern North China. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 157, p. 343-349, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.*, **Progress on household drinking water, sanitation and hygiene 2000-2017: special focus on inequalities**. World Health Organization, 2019.