

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas  
Genética e Biotecnologia

**Julliane Dutra Medeiros**

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE TAXONÔMICA E FUNCIONAL DA  
COMUNIDADE MICROBIANA DE UM AMBIENTE LÓTICO URBANO**

Juiz de Fora  
2013

**JULLIANE DUTRA MEDEIROS**

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE TAXONÔMICA E FUNCIONAL DA  
COMUNIDADE MICROBIANA DE UM AMBIENTE LÓTICO URBANO**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Genética e Biotecnologia.

**Orientador: Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz**  
**Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cíntia Marques Coelho**  
**Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marisa Fabiana Nicolás**

Juiz de Fora

2013

## **DESENVOLVIMENTO**

Laboratório de Ecologia e Biologia Molecular de Microrganismos  
Departamento de Biologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora

Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana  
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora

Laboratório de Bioinformática  
Laboratório Nacional de Computação Científica

## **COLABORAÇÃO**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Dioneia Evangelista Cesar  
Departamento de Biologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vânia Lúcia Silva  
Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Maurício Egídio Cantão  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA Suínos e Aves

## **APOIO**

CNPq  
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

FAPEMIG  
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

CAPES  
Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

JULLIANE DUTRA MEDEIROS

**ANÁLISE DA DIVERSIDADE TAXONÔMICA E FUNCIONAL DA  
COMUNIDADE MICROBIANA DE UM AMBIENTE LÓTICO URBANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre. Área de concentração Genética e Biotecnologia.

Aprovada em

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz  
(Universidade Federal de Juiz de Fora)

---

Prof. Dr. Guilherme Correa de Oliveira  
(Centro de Pesquisas René Rachou Fundação Oswaldo Cruz)

---

Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini  
(Universidade Federal de Juiz de Fora)

*À Ciência, fonte de inspiração.*

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus queridos pai, mãe e irmão, por serem meus maiores exemplos, por nas horas de dificuldade sempre me ajudarem com uma palavra de carinho. Obrigada pelo apoio e amor incondicional.

Ao meu amigo e namorado João, obrigada pela compreensão, pelos ensinamentos, pelo apoio e por estar sempre ao meu lado. Você também é responsável pelas minhas conquistas!

A minha sempre orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Cíntia Coelho, obrigada por tudo que me ensinou durante todos estes anos e por continuar me orientando e superando as dificuldades da distância. Obrigada também pela confiança de tocar este projeto.

Ao Prof. Dr. Cláudio Diniz pelos conhecimentos, apoio e acolhimento!

A amiga Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Dionéia Cesar, por sempre facilitar essa caminhada que as vezes foi bem difícil.

A Prof. Dr<sup>a</sup> Marisa Nicolás, por toda a co-orientação e por me receber de braços abertos no Laboratório Nacional de Computação Científica.

A Prof. Dr<sup>a</sup> Vânia Silva, por todos os ensinamentos de Microbiologia.

Ao amigo Dr. Maurício Cantão pela valiosa contribuição com as análises de Bioinformática.

Ao Prof. Dr. Guilherme Oliveira e Prof. Dr. Lyderson Viccini pela gentileza de aceitar avaliar meu trabalho e pela participação na banca.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas que contribuíram de alguma forma para minha formação acadêmico-científica.

A EMBRAPA e FAPEMIG pela concessão de bolsa e auxílio à pesquisa.

Aos amigos do LEBIOMM pela parceria nos momentos de dificuldades pelos FISHs, PCRs, extrações de DNA, congressos, reuniões e acima de tudo pela amizade construída.

A todos os membros do Laboratório de Microbiologia e Genética, por me receberem tão bem e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Enfim, minha sincera gratidão a todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Os rios e córregos são importantes reservas de água doce disponível para consumo. A crescente urbanização vem se tornando uma ameaça para estes ecossistemas principalmente devido à descarga de esgoto, que altera os nutrientes dissolvidos na água, e pode afetar a composição da comunidade microbiana. O objetivo desse trabalho foi conhecer a diversidade genética e funcional da comunidade microbiana de um ambiente lótico urbano. Para isso, amostras de águas de duas regiões, urbanizada e sem interferência da urbanização, do córrego São Pedro foram coletadas. As concentrações dos nutrientes dissolvidos foram medidas. Para identificar e quantificar micro-organismos envolvidos no ciclo do nitrogênio e potenciais patogênicos para os seres humanos e outros animais as técnicas de PCR e FISH foram realizadas. A fim de traçar o perfil taxonômico e funcional da comunidade microbiana deste ambiente, análises metagenômicas foram realizadas. Altas concentrações de nutrientes dissolvidos foram detectadas na área urbanizada. Os resultados de PCR e FISH apontaram para maior incidência de micro-organismos envolvidos no ciclo do nitrogênio bem como potenciais patogênicos na região urbanizada do córrego. O perfil taxonômico indicou que o ambiente não urbanizado possui uma distribuição relativamente homogênea dos grupos bacterianos com a predominância de Proteobacteria, já no ambiente urbanizado muitas sequências se concentraram em filos específicos: Proteobacteria (Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria), Bacteroidetes e Firmicutes. Também houve o predomínio de gêneros e espécies relacionados com patogenicidade no ambiente urbanizado. O perfil funcional sugeriu que os micro-organismos destes ambientes estão atuando no metabolismo de metano, nitrogênio e enxofre, principalmente na região urbanizada. Também foi possível observar que genes relacionados à virulência (resistência a antimicrobianos e metais) e resposta ao estresse estão disseminados no ambiente urbanizado. Estes resultados indicam uma mudança na estrutura da comunidade microbiana imposta pelas ações antrópicas.

Palavras-chave: Ambiente lótico. Urbanização. Comunidade microbiana. Poluição. Metagenômica.

## ABSTRACT

Rivers and streams are important reservoirs of fresh water available for consumption. The increasing urbanization represents a threat to these ecosystems. Specifically, the discharge of sewage alters the content of nutrients and may affect the composition of the microbial community. This study aimed to know the genetic and functional diversity of the microbial community from an urban lotic environment. Samples of water were collected from two areas of São Pedro stream, one urbanized and the other not influenced by urbanization. The dissolved nutrient content was analyzed. To identify and quantify microbes involved in the nitrogen cycle and potentially pathogenic bacteria PCR and FISH analysis were performed. In order to know the taxonomic and functional profile of the microbial community of this lotic environment, metagenomic analysis was carried out. High concentration of dissolved nutrients was observed on the urbanized area. The PCR and FISH results showed higher incidence of microbes involved on nitrogen cycle and potentially pathogenic bacteria on the urbanized area of the stream. The taxonomic profile indicates that the non-urbanized environment had relatively homogeneous distribution of bacterial groups with the predominance of Proteobacteria. The urbanized metagenome had a higher number of sequences concentrated on specific phyla: Proteobacteria (Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria), Bacteroidetes and Firmicutes. Genera and species related to pathogenicity were also prevalent on the urbanized area. The functional profile indicated that the microbes are acting on the metabolism of methane, nitrogen and sulfur especially on the urbanized area. It was also observed that genes related to virulence (antibiotic resistance and metal resistance) and stress response are spread on the urbanized environment. These results indicate a structural change of the microbial community imposed by anthropic actions.

Keywords: Lotic environment. Urbanization. Microbial community. Pollution. Metagenomic.



## LISTA DE FIGURA

- Figura 1 Esquema ilustrativo da técnica de Hibridização in situ Fluorescente (FISH). Modificada de Amann e Fuchs (2008).....26
- Figura 2 Esquema ilustrativo da técnica de Metagenômica. Modificado de Gilbert e Dupont (2011). .....28
- Figura 3 Localização da Bacia Hidrográfica do Córrego São Pedro (BHCSP) no município de Juiz de Fora/ Minas Gerais. A- Localização do Estado de Minas Gerais. B- Rede de drenagem da região de Juiz de Fora/MG. C- Bacia Hidrográfica do Córrego São Pedro, em destaque os pontos de coleta. (Adaptado de Latuf, 2004) .....34
- Figura 4 Pontos de amostragem do Córrego São Pedro. A- Ponto 1, região não Urbanizada. B- Ponto 2, região Urbanizada. ....35
- Figura 5 Identificação de marcadores moleculares do ciclo do nitrogênio e bactérias nitrificantes, por PCR. As imagens são representativas dos experimentos. A- *Bacteria*, B- *nrfA*, C- *napA*, D-*amoA*, E- Nitrosomonadaceae, F- *Nitrospira*, G- *Nitrosospira*, H- *Nitrobacter*. 1- Peso Molecular; 2- Região Urbanizada; 3- Região Não Urbanizada; 4- Controle Positivo. ....42
- Figura 6 Densidade de micro-organismos dos domínios *Bacteria* (EUB) e *Archaea* (Arc) e dos grupos Nitrosomonadaceae (Nso), Nitrospiraceae (Ntspa), *Nitrobacter* (NIT), nas áreas não urbanizada e urbanizada.....42
- Figura 7 Identificação de bactérias potencialmente patogênicas por PCR. As imagens são representativas dos experimentos. A- *Bacteria*, B- *Streptococcus* sp., C- *Enterococcus* sp., D- *Salmonella* sp., E- *Bacteroides/Prevotella/Porphyromonas*, F- *Pseudomonas aeruginosa*, G- *Aeromonas hydrophila*, H- *Staphylococcus aureus*. 1- Peso Molecular; 2- Região Urbanizada; 3- Região Não Urbanizada; 4- Controle Positivo. ....43
- Figura 8 Identificação de *Escherichia coli* e linhagens diarreagênica por PCR. As imagens são representativas dos experimentos. A- *Bacteria*, B- *Escherichia coli*, C- *E.coli* EPEC (*eae*), D- *E.coli* EPEC (*bfpA*), E- *E.coli* EIEC (*ipaH*), F- *E.coli* EHEC (*stx1*), G- *E.coli* EHEC (*stx2*), H- *E.coli* ETEC (*elt*). 1- Peso Molecular; 2- Região Urbanizada; 3- Região Não Urbanizada; 4- Controle Positivo.....44
- Figura 9 Curva de rarefação obtida através do programa Megan. ....55
- Figura 10 Porcentagem das sequências anotadas para os domínios *Bacteria*, *Archaea*, *Eukaryota* e vírus nos metagenomas urbanizado e não urbanizado. ....56
- Figura 11 Porcentagem das sequências anotadas para os Filos nos metagenomes urbanizado e não urbanizado.....57

Figura 12 Porcentagem de sequências anotadas para as Classes de Proteobacteria nos metagenomas urbanizado e não urbanizado. ....	58
Figura 13 Gêneros com diferença estatística entre os metagenomas urbanizado e não urbanizado, obtido pelo programa STAMP. ....	59
Figura 14 Porcentagem de micro-organismos patogênicos e não patogênicos nos metagenomas urbanizado e não urbanizado, obtido através do MEGAN. ....	61
Figura 15 Classificação funcional nos subsistemas gênicos (SEED) para os metagenomas urbanizado e não urbanizado, obtido pelo MG-RAST. Valores em proporção de sequências. ....	63
Figura 16 Classificação funcional nas categorias gênicas do KEGG, obtido pelo MG-RAST. Círculo interno- Metagenoma urbanizado. Círculo externo- Metagenoma Não urbanizado. Valores em proporção das sequências. ....	64
Figura 17 Classificação funcional nas categorias gênicas (KEGG) para os metagenomas urbanizado e não urbanizado, obtido pelo MEGAN. Valores em número de sequências. ....	65
Figura 18 Classificação das sequências metagenômicas (urbanizada e não urbanizada) nos subsistemas Metabolismo de Proteína (A) Metabolismo de RNA (B) e Metabolismo de DNA (C), obtidos através do SEED. ....	66
Figura 19 Classificação das sequências metagenômicas (urbanizada e não urbanizada) nos subsistemas Virulência (A) e Resposta ao Estresse (B), obtidos através do SEED. ....	67
Figura 20 Vias do Metabolismo de Metano, Nitrogênio e Enxofre representando ambos os metagenomas, obtido do KEGG. ....	71
Figura 21 Contribuição dos diferentes grupos taxonômicos para os subsistemas gênicos mais relevantes (Metabolismo de DNA, RNA, Proteína, Metano, Nitrogênio, Enxofre, Virulência e Resposta ao Estresse) no metagenoma urbanizado. ....	73
Figura 22 Contribuição dos diferentes grupos taxonômicos para os subsistemas gênicos mais relevantes (Metabolismo de DNA, RNA, Proteína, Metano, Nitrogênio, Enxofre, Virulência e Resposta ao Estresse) no metagenoma não urbanizado. ....	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Sequência e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no ensaio da PCR .....	37
Tabela 2 Sequência e especificidade das sondas utilizadas no ensaio de Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente (FISH). .....	40
Tabela 3 Concentração de nutrientes dissolvidos nas áreas de estudo.....	41
Tabela 4 Número e características das sequências de DNA obtidas através do Sequenciamento .....	55
Tabela 5 Genomas predominantes no metagenoma urbanizado, obtidos pelo MG-RAST.....	60
Tabela 6 Genomas predominantes no metagenoma não urbanizado, obtidos pelo MG-RAST .....	61
Tabela 7 Sequências anotadas para metabolismo de metano no metagenoma urbanizado e não urbanizado, obtido através do KEGG. ....	68
Tabela 8 Sequências anotadas para metabolismo de nitrogênio no metagenoma urbanizado e não urbanizado, obtido através do KEGG. ....	69
Tabela 9 Sequências anotadas para metabolismo de enxofre no metagenoma urbanizado e não urbanizado, obtido através do KEGG. ....	70

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA	Agência Nacional da Águas
AOB	Ammonia-oxidizing Bacteria - Bactérias Oxidadoras de Amônia
ARDRA	Amplified rDNA Restriction Analysis - Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado
ARG	Antibiotic Resistance Genes - Genes de Resistência a Antibióticos
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
DBO	Demanda Biológica de Oxigênio
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis - Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante
EHEC	Enterohemorrágica
EIEC	Enteroinvasiva
EPEC	Enteropatogênica
ETEC	Enterotoxigênica
FISH	Fluorescence in situ Hybridization - Hibridização in situ Fluorescente
IQA	Índice de Qualidade da Água
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LCA	Last Common Ancestor - Último ancestral Comum
MEGAN	MEtaGenome ANalyzer
MG-RAST	The Metagenomics Rapid Annotation using Subsystem Technology
NCBI	National Center for Biotechnology Information - Centro Nacional de Informações Biotecnológicas
NIT	Nitrogênio
NIT Org Tot	Nitrogênio Orgânico Total
NOB	Nitrite-Oxidizing Bacteria - Bactérias Oxidadoras de Nitrito
OD	Oxigênio Dissolvido
P	Fósforo
PCR	Polymerase Chain Reaction - Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction - Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa

RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA - Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico
rDNA	DNA ribossomal
RDPII	Ribossomal Database Project
STAMP	Statistical Analysis of Metagenomic Profiles

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
2.1. O PROBLEMA DA URBANIZAÇÃO EM AMBIENTES AQUÁTICOS.....	18
2.2. OS MICRO-ORGANISMOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS .....	21
2.3. FERRAMENTAS DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADAS AO ESTUDO DE COMUNIDADES MICROBIANAS .....	24
2.4. METAGENÔMICA E O SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO.....	27
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
3.1. OBJETIVO GERAL .....	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	31
<b>4 CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA DE UM AMBIENTE LÓTICO COM FOCO EM BACTÉRIAS POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS E DO CICLO DO NITROGÊNIO</b> .....	<b>32</b>
4.1 INTRODUÇÃO .....	33
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.2.1. Caracterização do ambiente de estudo .....	34
4.2.2. Coleta .....	35
4.2.3. Análise dos parâmetros físico-químicos .....	35
4.2.4. Detecção de bactérias nitrificantes .....	36
4.2.5. Detecção de microrganismos potencialmente patogênicos .....	40
4.3 RESULTADOS.....	40
4.3.1. Análise dos parâmetros físico-químicos .....	41
4.3.2. Bactérias nitrificantes.....	41
4.3.3. Bactérias potencialmente patogênicas .....	43
4.4 DISCUSSÃO .....	44
4.5 CONCLUSÕES .....	49
<b>5 ANÁLISE METAGENÔMICA DA COMUNIDADE MICROBIANA DE UM AMBIENTE LÓTICO COMPARANDO AS REGIÕES URBANIZADA E NÃO URBANIZADA</b> .....	<b>50</b>
5.1. INTRODUÇÃO .....	51
5.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
5.2.1. Coleta .....	52
5.2.2 Extração de DNA .....	52
5.2.3. Sequenciamento e análises.....	52

5.2.4. Perfil taxonômico .....	53
5.2.5. Perfil funcional .....	53
5.2.6. Análise estatística .....	54
5.3 RESULTADOS.....	54
5.3.1 Característica geral das sequências de DNA obtidas através do sequenciamento .....	54
5.3.2. Perfil Taxonômico .....	56
5.3.3. Perfil Funcional .....	62
5.3.4. Classificação taxonômica dos subsistemas funcionais.....	71
5.4. DISCUSSÃO .....	74
5.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	83
5.6. CONCLUSÕES .....	84
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>104</b>
<b>APÊNDICE B .....</b>	<b>105</b>
<b>APÊNDICE C .....</b>	<b>106</b>
<b>APÊNDICE D .....</b>	<b>107</b>
<b>APÊNDICE E .....</b>	<b>108</b>
<b>APÊNDICE F.....</b>	<b>109</b>
<b>APÊNDICE G.....</b>	<b>110</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar de a água ser um dos elementos de maior importância para a manutenção da vida no planeta, 97% é salgada, o que inviabiliza a sua utilização. Assim, ambientes lóticos como rios e córregos têm uma importância fundamental na vida humana e de outros animais, pois são os responsáveis por suprir água potável para o seu consumo. No entanto, em muitas partes do mundo, a água vem se tornando cada vez mais escassa, e ameaçada pelas ações antrópicas. A crescente urbanização é um grande problema para os ecossistemas aquáticos principalmente devido à poluição e descarga de xenobióticos. Esta pode afetar o ambiente pelo aumento da concentração de nutrientes ou adição de patógenos vindos especialmente do esgoto doméstico. Sendo assim é de fundamental importância o entendimento de que a dinâmica dos ecossistemas aquáticos normalmente é resultado de inúmeras interações bióticas e abióticas complexas. A urbanização também pode contribuir para a seleção de genes de resistência a antimicrobianos no ambiente, já que as bactérias provenientes dos esgoto humanos podem ter sido previamente expostas a antibióticos e os determinantes da resistência podem ser transmitidos horizontalmente entre os micro-organismos. E neste sentido, as comunidades microbianas são consideradas valiosos indicadores dos estresses antrópicos nos ambientes.

Estima-se que existem aproximadamente  $10^6$  células microbianas em 1mL de água doce entretanto, em ambientes eutrofizados esse número pode aumentar. Os micro-organismos desempenham papéis fundamentais nestes ecossistemas. Nos ciclos biogeoquímicos, participam da transformação e desmineralização de nutrientes o que permite a manutenção do fluxo de energia. Atuam também na biodegradação de poluentes derivados das atividades humanas, contribuindo assim para a purificação natural das águas. Apesar de estarem em todos os lugares e em grande quantidade, ainda sabe-se pouco sobre os micro-organismos. Estima-se que se conheça apenas 1-10% da diversidade microbiana do planeta e essa limitação se dá aos métodos de estudos dependente de cultivo, que não conseguem recuperar a microbiota total de um ambiente. Porém, este cenário tende a mudar com a aplicação de técnicas moleculares em estudos de ecologia microbiana, como exemplo, as baseadas em reação em cadeia da polimerase (PCR) e hibridização *in*



*situ*, e principalmente nos dias atuais com o sequenciamento de alta velocidade consolidando os estudos de metagenômica.

Conhecer a comunidade microbiana nos ambientes aquáticos preservados ou poluídos é essencial já que os micro-organismos são importantes indicadores da qualidade da água. Entender os fenômenos que estão acontecendo nestes ambientes é fundamental para se compreender as reais consequências das ações antrópicas. Entretanto, trabalhos que visam conhecer a diversidade e função dos micro-organismos nestes ecossistemas impactados ainda são escassos, principalmente no Brasil.

Assim, este estudo visa a caracterização taxonômica e funcional da comunidade microbiana do Córrego São Pedro que é um dos afluentes do Rio Paraibuna na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais. Responsável por suprir água para 9% da população da cidade, esse córrego tem sua nascente em um local de fazendas, porém ao longo do seu curso atravessa regiões urbanizadas. Acredita-se que a ação antrópica através da urbanização seja o principal agente de mudanças na estrutura trófica desse córrego, sobretudo na região metropolitana.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O PROBLEMA DA URBANIZAÇÃO EM AMBIENTES AQUÁTICOS

De todos os recursos necessários para a manutenção da vida, a água é o mais importante, sendo essencial na estrutura e metabolismo dos organismos. Portanto, assegurar que água de boa qualidade está sendo distribuída é fundamental para o bem-estar dos seres humanos. A água doce representa apenas uma pequena fração dos recursos aquáticos globais. Aproximadamente 97% da água disponível no planeta é salgada. Rios e córregos são considerados ambientes lóticos já que suas águas são correntes e drenam uma área de 150 milhões de Km<sup>2</sup> (GILLER e MALMQVIST, 1998). Ao contrário do que parece, esse valor é apenas uma ínfima porção dos 3% de água doce disponíveis. A grande maioria está mantida em calotas polares na Antártica e confinada em aquíferos (GILLER e MALMQVIST, 1998). Assim, a água potável e disponível para utilização é um bem extremamente escasso. Um grande esforço precisa ser feito para conservação dos recursos hídricos.

Além de vital para os organismos vivos, atuando no metabolismo celular, nas reações químicas e na estrutura das células e órgãos, a água tem função importante na nutrição das florestas, irrigação da produção agrícola, indústrias, consumo humano, hidroeletricidade e regulação térmica do planeta (KENZAKA et al., 2001; TUNDISI, 2003). Segundo a Agência Nacional das Águas (ANA), o Brasil é dividido em 12 bacias hidrográficas sendo elas: Amazônica, Tocantins-Araguaia, Atlântico Nordeste Ocidental, Atlântico Nordeste Oriental, Parnaíba, São Francisco, Atlântico Leste, Atlântico Sudeste, Atlântico Sul, Paraná, Paraguai e Uruguai. O índice da qualidade da água (IQA) é uma medida que avalia a qualidade da água no Brasil e leva em conta nove parâmetros que refletem principalmente a contaminação dos rios pelo lançamento de esgotos domésticos. Esse índice aponta para uma boa situação geral das bacias hidrográficas do Brasil. Entretanto é preciso alertar para as regiões nas quais o IQA vai de péssimo para ruim que constituem principalmente as regiões metropolitanas (São Paulo, Curitiba, Belo Horizonte, Porto Alegre, Rio de Janeiro, Salvador) e cidades de médio porte (ex.: Campinas/SP, Juiz de Fora/MG).

A extensiva e crescente urbanização representa uma ameaça para os ecossistemas, principalmente os aquáticos. A população brasileira é eminentemente urbana. Em 2010 o número de habitantes em regiões urbanas chegou a aproximadamente 161 milhões de pessoas (IBGE, 2010). Essa concentração nas cidades acarreta uma série de transformações nos ambientes. Entre outros problemas, geram graves consequências para rios e córregos. A poluição e descarga de compostos xenobióticos principalmente esgoto doméstico levam os córregos a sofrerem um fenômeno denominado “Síndrome do Córrego Urbano” (BOOTH, 2005; PAUL e MEYER, 2001; WALSH et al., 2005).

Esse fenômeno foi discutido como sendo desencadeado por impactos físicos e químicos para rios e córregos. Dentre os físicos podemos citar problemas como infiltração e escoamento da água, alteração na sua geomorfologia e temperatura (PAUL e MEYER, 2001). Já os aspectos químicos são mais diversos e merecem ser discutidos com maior atenção.

Os efeitos químicos estão diretamente relacionados com o tipo de resíduos eliminados no curso d'água (domésticos, industriais, comerciais ou agrícolas). Paul e Meyer (2001) discutem que há um aumento na maioria dos constituintes orgânicos com a urbanização principalmente, demanda de oxigênio, alterações no pH, partículas suspensas, metais, hidrocarbonetos, nutrientes e outros íons. Hoare (1984), Metson et al. (2012) e Meybeck (1998) mostraram que em córregos urbanos há um aumento significativo na concentração de fósforo total e fósforo dissolvido. A agricultura com o uso abusivo de fertilizantes é uma das fontes principais deste nutriente, porém a poluição por esgotos também pode ser determinante, como mostraram estes pesquisadores.

Embora as concentrações de fósforo possam ser elevadas em córregos urbanos (HOARE, 1984; METSON et al., 2012; MEYBECK, 1998), o aumento efetivo não é tão grande quanto o observado para os compostos nitrogenados. Diferentes estudos mostraram um aumento relevante nos índices de nitrogênio amoniacal, nitrito, nitrato, e nitrogênio total em rios e córregos, que passam por regiões urbanas, quando comparados à regiões rurais. Estes ambientes são ameaçados com dejetos agrícolas, industriais e domésticos (HENJUM et al., 2009; HESSEN, HENRIKSEN e SMELHUS, 1997; HOARE, 1984; KROON et al., 2012; MEYBECK, 1998; USGS, 1999; WERNICK, COOK e SCHREIER, 1998). Outros íons também são elevados

em córregos urbanos tais como cálcio, sódio, potássio e magnésio (PAUL e MEYER, 2001).

Outro aspecto importante da urbanização é a contaminação da coluna d'água e sedimentos de córregos e rios com metais pesados. Os metais mais comumente encontrados são: zinco, cobre, cádmio, cromo, manganês, níquel e chumbo. Sendo as descargas industriais a principal fonte dessa contaminação (NEAL et al., 1997; PAUL e MEYER, 2001). Os pesticidas agrícolas também são detectados muitas vezes em altos níveis nos biomas aquáticos (USGS, 1999). Nos últimos anos, a ocorrência e o destino de antibióticos nos ambiente aquático tem sido objeto de investigações realizadas em vários países (ALDER et al., 2001; KEMPER, 2008). Diversos tipos de antimicrobianos foram encontrados em esgotos, efluentes de rios, águas superficiais, solo e até mesmo em água potável (CHEN, LI e ZHU, 2012; KRISTIANSSON et al., 2011). Esse fato se deve à instalação de indústrias farmacêuticas nos centros urbanos e principalmente ao uso indiscriminado destas substâncias na medicina humana e veterinária (SARMAH, MEYER e BOXALL, 2006).

Todo esse impacto causado pela urbanização pode ter graves consequências sobre a biodiversidade dos ecossistemas aquáticos. Com o aumento de matéria orgânica pode haver um crescimento na biomassa das algas, um decréscimo na diversidade das macrófitas e invertebrados aquáticos e uma alta mortalidade de peixes (PAUL e MEYER, 2001; WALSH et al., 2005). Muitas alterações também são sofridas na comunidade microbiana destes ecossistemas impactados e serão discutidas em seguida.

A carência no tratamento de esgoto e de efluentes é um fator que maximiza os impactos da urbanização sob os ambientes aquáticos. No Brasil, apenas 28,2% do esgoto doméstico é tratado, o que resulta no seu lançamento na rede de esgotamento pluvial, e a posterior descarga nos rios e córregos urbanos (TUCCI, 2008). A situação é ainda mais grave devido à falta de tratamento dos efluentes, o que tem criado potenciais riscos à saúde da população que é abastecida com essa água contaminada.

## 2.2. OS MICRO-ORGANISMOS EM AMBIENTES AQUÁTICOS

Os procariotos são os organismos mais abundantes na Terra, estima-se teoricamente que existam  $4-6 \times 10^{30}$  (WHITMAN, COLEMAN e WIEBE, 1998) compondo dois dos três domínios da “árvore da vida”, *Bacteria* e *Archaea*. São seres ubíquos e essenciais para a função e manutenção dos ecossistemas. Muito já foi dito sobre o papel que exercem no ambiente. Segundo Pomeroy et al. (2007) os micro-organismos representam uma grande fração da biomassa em ambientes aquáticos e quando ativos têm altas taxas metabólicas, assim são os responsáveis por dominar o fluxo de energia no planeta. Já Falkowski, Fenchel e Delong (2008) classificaram os micro-organismos como os engenheiros biogeoquímicos da vida na Terra. Estes são organismos unicelulares, mas fazem parte de comunidades extremamente complexas. O trato intestinal de invertebrados e vertebrados é um dos ambientes com maior densidade destes organismos ( $10^9-10^{11}$  células por mL do fluido intestinal), seguido pelo solo ( $10^7-10^9$  células por g) (GUAZZARONI et al., 2009). Nas águas marinhas o número de procariotos varia de 0,5 a  $5 \times 10^5$  células por mL, já em águas doce esse valor chega a  $10^6$  podendo aumentar significativamente em ambientes eutróficos (WHITMAN, COLEMAN e WIEBE, 1998).

Os micro-organismos são considerados bons indicadores da qualidade da água. A densidade bacteriana é usualmente maior em ambientes urbanos (KENZAKA et al., 2001; YAMAGUCHI, KENZAKA e NASU, 1997). Esse fato pode ser explicado pela grande entrada de matéria orgânica nesses ambientes, resultante do impacto das ações antrópica através da poluição. A urbanização pode influenciar a comunidade microbiana principalmente de duas formas: alterando a densidade e diversidade de bactérias atuante nos ciclos biogeoquímicos, em especial do nitrogênio, e através da adição de patógenos (PAUL e MEYER, 2001).

O ciclo do nitrogênio inclui vários componentes. Eucariotos contribuem diretamente para este processo, mas as maiores transformações são predominantemente feitas por procariotos (WARD, 2007). Bactéria é o grupo principal seguido por fungos e archaeas. A fixação de nitrogênio, amonificação nitrificação e denitrificação são alguns dos passos que compõem o ciclo do nitrogênio. A nitrificação é a oxidação de amônia em nitrato, este processo é dividido em dois estágios. O primeiro passo é mediado por bactérias oxidadoras de amônia (AOB), que produzem nitrito, que por sua vez é oxidado a nitrato por oxidadoras de

nitrito (NOB). *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosolobus* e *Nitrosovibrio* são geralmente aceitos como grupo AOB e *Nitrobacter*, *Nitrosococcus*, *Nitrospina* e *Nitrospira* são as NOB (HEAD et al., 1993; HERBERT, 1999; REVSBECH et al., 2006; TESKE et al., 1994). Denitrificação é a redução anaeróbica do nitrato, nitrito e óxido nítrico à gás nitrogênio, e é o maior mecanismo biológico pelo qual o nitrogênio fixado retorna para a atmosfera, solo ou água para completar o ciclo do nitrogênio (PHILIPPOT e HALLIN, 2005). Vários genes foram identificados e têm sido considerados marcadores moleculares deste ciclo. O gene *amoA* codifica a subunidade  $\alpha$  da amônia mono-oxigenase, é um importante marcador das bactérias oxidadoras de amônia já que amplificam simultaneamente o gene *amoA* das  $\beta$ - and  $\gamma$ -AOBs (MCTAVISH, FUCHS e HOOPER, 1993; SINIGALLIANO, KUHN e JONES, 1995). O gene *nrfA* codifica uma amonificadora de nitrato, enzima que catalisa a conversão do nitrito em amônia (MOHAN et al., 2004). Já o gene *napA*, marcador de denitrificação, codifica a nitrato redutase periplasmática (FLANAGAN et al., 1999). As bactérias atuantes nos processos acima citados podem sofrer modulações em consequências da urbanização já que há uma modificação da concentração dos nutrientes que elas metabolizam. Dessa maneira as bactérias passam a ter mais ou menos fonte nutricional. Poucos estudos até hoje foram realizados analisando o impacto da urbanização sobre estas bactérias. Brion e Billen (2000) observaram uma grande biomassa de bactérias nitrificantes em águas residuais não tratadas, que são despejadas em um rio urbano.

Diversos grupos de patógenos humanos são encontrados em esgotos urbanos, e são considerados contaminantes ambientais. A maioria dos patógenos pode ser removida da água através de tratamentos de esgotos, mas quando nenhum tratamento é realizado estas bactérias são eliminadas nos rios e córregos se tornando uma ameaça para a saúde pública (GIRONES et al., 2010). Wingender e Flemming (2011) fizeram uma extensa revisão sobre os biofilmes aquáticos e seu papel como reservatório de patógenos. Segundo estes autores, importantes bactérias patogênicas que podem ser transmitidas pela água, infectam o trato gastrointestinal de humanos e outros animais e são excretados com as fezes para o meio ambiente. Dentre estas podemos citar: *Salmonella enterica* (serovar Typhi, e Paratyphi Typhimurium), *Shigella* spp., *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* e variantes diarragênicas, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter* spp., *Helicobacter pylori*.

Esses patógenos têm em comum a transmissão pela ingestão de água contaminada com fezes e principalmente causam doenças gastrointestinais. Já espécies como *Bacteroides fragilis* e *Enterococcus faecalis* fazem parte da microbiota intestinal residente, porém em condições adversas (desequilíbrio homeostático e/ou quando introduzidos em áreas não colonizadas) podem se comportar como patógenos oportunistas e serem transmitidos através das águas contaminadas com esgoto doméstico e causar doenças gastrointestinais para o homem e outros animais (WEXLER, 2007). Algumas poucas bactérias patogênicas oportunistas ocorrem naturalmente no ambiente aquático e são capazes de persistirem e crescer em biofilmes e sistemas de água potável. Estas bactérias incluem *Aeromonas* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (WINGENDER e FLEMMING, 2011). Diversos estudos mostraram que as espécies citadas acima foram encontradas em rios e córregos impactados pela urbanização (GONZALEZ, PARANHOS e LUTTERBACH, 2010; JANDA e ABBOTT, 1998; SAVICHTCHEVA, OKAYAMA e OKABE, 2007; WILLEMS et al., 2011).

Um ponto importante que deve ser considerado a respeito da presença de micro-organismos potencialmente patogênicos em ambientes aquáticos é a capacidade que eles têm de expressarem seus fatores de virulência. Muitos fatores de virulência são produtos que conferem vantagens para os micro-organismos se adaptarem a seu habitat original, hospedeiro ou ambientes nos quais foram introduzidos. Alguns desses fatores são toxinas que quando em contato com um hospedeiro pode ocasionar doenças. A contaminação das águas com micro-organismos toxigênicos pode ter um grande impacto na saúde pública e no bem estar humano (VALÉRIO, CHAVES e TENREIRO, 2010). As toxinas e os produtores de toxinas podem chegar até as águas urbanas através de contaminação (por exemplo, *Clostridium* spp., *P. aeruginosa* ou *E. coli*) ou porque os sistemas aquáticos são seus habitats naturais (exemplo, *Vibrio* spp. ou *Aeromonas hydrophila*) (VALÉRIO, CHAVES e TENREIRO, 2010).

Além de incidência de bactérias patogênicas nos córregos e rios urbanizados, estes também podem ser importantes reservatórios de bactérias resistentes a antibióticos, reportado por diversos autores tais como, Auerbach, Seyfried e McMahon (2007), Baquero, Martínez e Cantón (2008), Goni-Urriza et al. (1999), Rho et al. (2011). Os antimicrobianos são drogas bem sucedidas para a melhoria da

saúde humana. Além dessa aplicação fundamental, também são amplamente utilizados no tratamento e prevenção de doenças que acometem plantas e animais (MARTINEZ, 2009). São caracterizados como compostos naturalmente produzidos por organismos como fungos, actinomicetos e outras bactérias, sendo dessa maneira ubíquos e constantes nos ambientes a baixas concentrações. Os antimicrobianos também podem ser substâncias sintéticas produzidas a partir de moléculas de antibióticos. Os micro-organismos produtores de antibióticos desenvolveram mecanismos que os tornam resistentes à ação letal do composto que eles próprios produzem (MARTINEZ, 2008). O uso indiscriminado de antimicrobianos na medicina humana e veterinária influencia a seleção e disseminação desses determinantes da resistência nos ambientes (D’COSTA, GRIFFITHS e WRIGHT, 2007).

A presença dos elementos genéticos móveis já foi identificada em bactérias ambientais e está relacionada com a transferência horizontal dos genes de resistência a antibiótico (ARG) (SILVA et al., 2007; SZCZEPANOWSKI et al., 2004; TAVIANI et al., 2008; TENNSTEDT et al., 2003; TENNSTEDT et al., 2005). É importante considerar que o aumento da diversidade e número de organismos resistentes a antimicrobianos nos ambientes urbanos também estão contribuindo para aumentar o problema de saúde pública que é instaurado com o processo de urbanização (ZHANG, ZHANG e FANG, 2009; WRIGHT, 2007). O estudo do conjunto de genes específicos de resistência a antibióticos em um ambiente é denominado resistoma. Segundo Wright (2007), o resistoma inclui elementos de resistência encontrados em bactérias patogênicas, não patogênicas e também os genes de resistência crípticos, que não são necessariamente expressos e estão presentes nos cromossomos bacterianos.

### 2.3. FERRAMENTAS DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADAS AO ESTUDO DE COMUNIDADES MICROBIANAS

Conhecer as comunidades microbianas dos diferentes ambientes e seu papel no ecossistema sempre foi um desafio para os pesquisadores. A limitação destes estudos no passado foi principalmente devido às metodologias usadas. Inicialmente as investigações eram basicamente observações microscópicas (EIKELBOOM, 1975), porém as diferentes populações bacterianas não podiam ser distinguidas. A



partir de métodos baseados em cultivo e isolamento, algumas bactérias começaram a ser identificadas, e essa metodologia foi indispensável para aumentar a compreensão a respeito de organismos específicos (PALLERONI, 1997). Entretanto, a grande maioria dos micro-organismos não pode ser facilmente cultivada. Assim essas técnicas baseadas em cultura selecionavam apenas os micro-organismos heterótrofos que melhor se adaptavam as condições de crescimento dos meios gerais de cultivo. Dessa maneira a real composição e diversidade da comunidade microbiana dos diversos ecossistemas eram subestimadas (GILBRIDE, LEE e BEAUDETTE, 2006; WARD, WELLER e BATESON, 1990). Ainda sobre a capacidade de cultivo, em quase todos os sistemas, estima-se que o número de bactérias cultiváveis é extremamente pequeno, menor que 1%. Concordando com esse baixo valor, Lemke e Leff (2006) demonstraram que em córregos a porcentagem de bactérias cultiváveis é em torno de 0,61%.

No final da década de 80, com a descrição da técnica de PCR (MULLIS e FALOONA, 1987) e com os demais avanços na biologia molecular, os estudos da comunidade microbiana ganharam um impulso. Inicialmente com a biologia molecular aliada aos métodos de cultivo, foi possível confirmar a presença de bactérias específicas nos ambientes (BÖCKELMANN et al., 2000; GRANT et al., 1996; JURETSCHKO et al., 1998; WAY et al., 1993). Este tipo de estudo tem importante valor científico até nos dias de hoje. As metodologias baseadas em PCR permitem uma identificação rápida e direta de grupos específicos de micro-organismos na comunidade (DANIELSON e COOPER, 2007). Atualmente as técnicas de amplificação são extremamente usadas em estudos de ecologia microbiana, sejam elas o próprio PCR, multiplex PCR, PCR quantitativo (qPCR) e outras variações também baseadas na amplificação de DNA como: Análise de Restrição de DNA Ribossomal Amplificado (ARDRA), Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico (RAPD) e Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) (GILBRIDE, LEE e BEAUDETTE, 2006).

Outro tipo de ferramenta molecular muito utilizada em estudo de comunidade microbiana é a técnica de FISH, baseada em hibridização de sondas para ácidos nucleicos (Figura 1). Essa técnica pode ser usada na detecção, identificação e quantificação de diferentes micro-organismos em comunidades complexas. O FISH tem sido aplicado em estudos da microbiota da água, solo, esgoto, oral e intestinal de humanos e outros animais (ARAYA et al., 2003; HUBER et al., 2004; KENZAKA

et al., 2001; MOTER e GÖBEL, 2000; SANTIAGO-VÁLZQUEZ et al., 2007). Este método também permite a detecção de formas não cultiváveis, assim como o PCR.

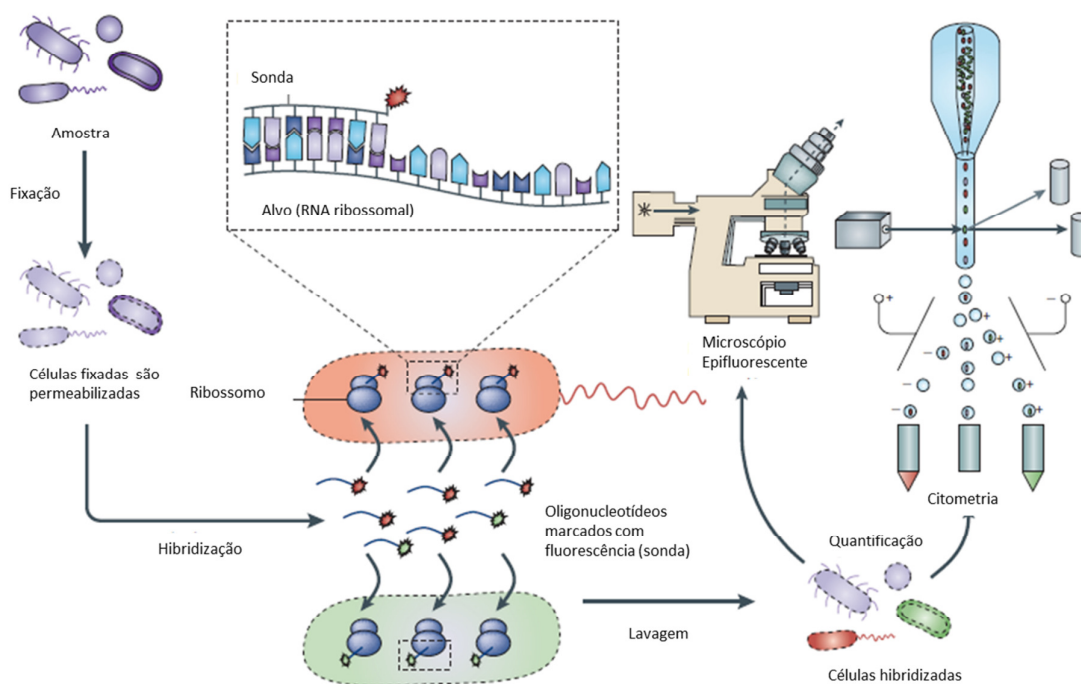


Figura 1- Esquema ilustrativo da técnica de Hibridização in situ Fluorescente (FISH). Modificada de Amann e Fuchs (2008).

As análises de marcadores genéticos também se mostrou um método importante nos estudos da diversidade e evolução bacteriana. O 16S rDNA é um importante marcador genético para bactérias e archaeas já que possui regiões extremamente conservadas e outras com alta taxa de variação entre os grupos taxonômicos (TRINGE e HUGENHOLTZ, 2008). Outros genes também podem ser utilizados como marcadores, por exemplo, os “housekeeping” genes que também apresentam uma conservação ao longo das espécies. Genes funcionais (amônia mono-oxigenase- *amoA*, RNA polimerase B- *rpoB*, metano mono-oxigenase- *pmoA*, nitrogenase- *nifH*, nitrito redutase- *nirS/nirK*, dissimilatória sulfito redutase -*dsrAB*) também têm aplicação para o estudo de subpopulações com determinadas capacidades fisiológicas (NOCKER, BURR e CAMPER, 2007).

Os estudos iniciais com marcadores genéticos foram realizados por Carl Woese no início da década de 80. Estes autores publicaram uma série de artigos no qual utilizaram a análise comparativa do gene 16S rDNA de diversos micro-

organismos cultiváveis, culminando assim em uma extensa revisão (WOESE, 1987) na qual um quadro inicial da diversidade filogenética das bactérias foi esboçado. Entretanto, apenas foram analisadas sequências de micro-organismos cultivados. Com o avanço da biologia molecular, como supracitado, foi possível a realização de amplificação por PCR dos genes de 16S rDNA de organismos não cultiváveis. A clonagem e sequenciamento deste gene impulsionaram grandes descobertas sobre a diversidade genética das comunidades microbianas em diversos ambientes. Esse avanço foi tão significativo que no ano de 2004 o GenBank continha 54.655 sequências de procariotos não cultiváveis, um número significativamente alto já que no final da década de 90 esse número não passava de 1.000 (RAPPÉ e GIOVANNONI, 2003; RIESENFELD, GOODMAN e HANDELSMAN, 2004). Hoje, o GenBank possui 3.663.909 sequências depositadas para bactérias não cultiváveis.

Todas as técnicas citadas acima são ferramentas usadas para tentar conhecer a diversidade dos micro-organismos, e muitas informações sobre a microbiota de diversos ambientes foram alcançadas com essas metodologias. Entretanto, nenhuma delas foi capaz de responder completamente e simultaneamente a duas importantes perguntas: “Quais micro-organismos estão no ambiente?” e “O que eles estão fazendo?”. Contudo, um novo ramo da ciência que une a microbiologia, genética e biologia computacional foi desenvolvido, permitindo o estudo taxonômico e funcional de comunidades microbianas, a Metagenômica.

#### 2.4. METAGENÔMICA E O SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

A definição básica para metagenômica é a análise, independente de cultivo, do genoma de todos os organismos presentes em um ambiente particular. Esse termo foi primeiramente usado e definido por Handelsman et al. (1998) em trabalhos usando clonagem randômica de fragmentos de DNA vindo do solo. Os estudos de metagenômica têm como primeira etapa a extração de DNA total da comunidade microbiana de um ou mais ambientes e posteriormente podem seguir duas estratégias metodológicas (Figura 2). O primeira baseia-se na amplificação por PCR de um único gene alvo (na grande maioria das vezes 16S rDNA), e no posterior sequenciamento dos produtos de PCR, proporcionando uma análise da gama de ortólogos diferentes para esse gene dentro de uma determinada comunidade. A segunda abordagem é resultado do sequenciamento “shotgun”, ou seja, todo o DNA

isolado da amostra é sequenciado, resultando em um perfil taxonômico e funcional da comunidade (GILBERT e DUPONT, 2011). Através dos estudos metagenômicos pode-se identificar genes comuns ou específicos no ambiente, genomas favorecidos na comunidade, novos genes, moléculas para bioprospecção, respondendo questões ecológicas e evolutivas (SIMON e DANIEL, 2011).

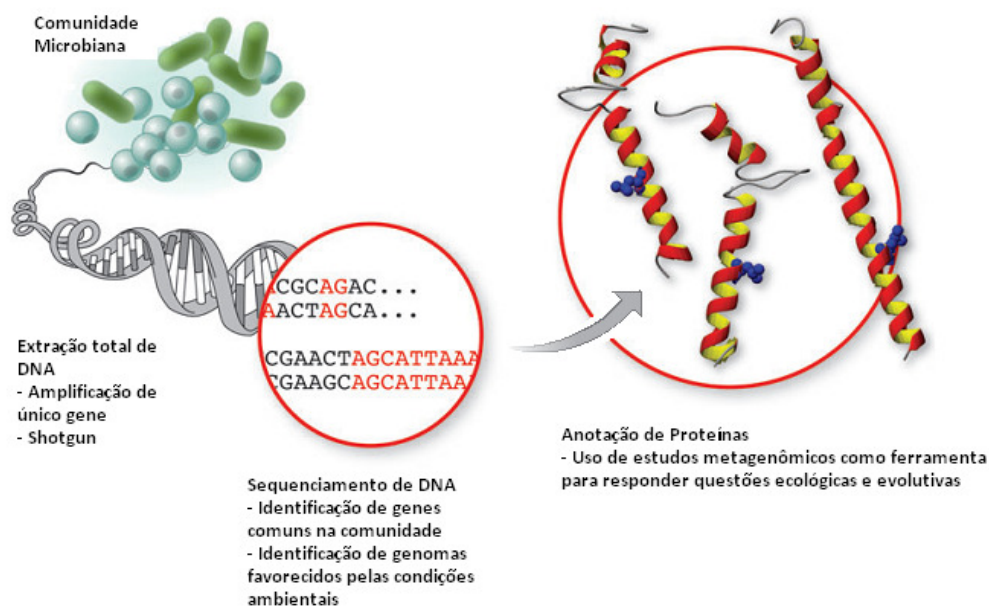


Figura 2- Esquema ilustrativo da técnica de Metagenômica. Modificado de Gilbert e Dupont (2011).

O primeiro grande projeto envolvendo metagenômica foi realizado por Venter e seus colaboradores em 2004, que fizeram um sequenciamento em larga escala de fragmentos de DNA oriundos da comunidade microbiana de todo o mar de Sargasso e de uma região do Oceano Atlântico próximo à Bermudas. O sequenciamento “shotgun” realizado por esses pesquisadores rendeu aproximadamente 1,6 bilhões de pares de base e levaram ao descobrimento de 1,2 milhões de novos genes. Um total de 794.061 genes foram similares a hipotéticos grupos proteicos conservados, cuja função é desconhecida. Esse estudo contribuiu significativamente para o aumento do número de sequências nos bancos de dados de 16S rDNA (GILBERT e DUPONT, 2011; RIESENFELD, SCHLOSS e HANDELSMAN, 2004; SLEATOR, SHORTALL e HILL, 2008; VENTER et al., 2004). A partir de então vários trabalhos têm sido realizado em diversos ecossistemas: solo (CIEŚLIŃSKI et al., 2009; DANIEL, 2005; DELMONT et al., 2011; DELMONT et al., 2012; DONATO et al., 2010; FAORO et al., 2012; FIERER et al., 2007; LEININGER et al., 2006;

RIESENFELD, SCHLOSS e HANDELSMAN, 2004), oceano (LI e QIN, 2005; PEDRÓS-ÁLIO, 2006; RUSCH et al., 2007; YOOSEPH et al., 2007), corpo humano (BAQUERO e NOMBELA, 2012; FRANK e PACE, 2008; GEVERS et al., 2012; GILL et al., 2006; MARCHESI e SHANAHAN, 2007; MARCY et al., 2007; THE HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012; TURNBAUGH et al., 2007; ZHANG et al., 2006), microbiota de vários animais (TOKUDA e WATANABE, 2007; TURNBAUGH et al., 2006; WARNECKE et al., 2007; WEGLEY et al., 2007), mangue (ANDREOTE et al., 2012) e recifes de corais (BRUCE et al., 2012). Alguns estudos também já foram realizados em ambientes impactados pela urbanização (HEMME et al., 2010; KISAND et al., 2012; KRISTIANSSON et al., 2011). Atualmente existem grandes projetos de metagenômica que envolvem consórcios de pesquisadores de todo o mundo, dentre eles destacam-se, o projeto do microbioma humano (Human Microbiome Project) e o projeto do microbioma da Terra (Earth Microbiome Project). O primeiro já está em andamento e tem como objetivo “caracterizar a comunidade microbiana encontrada em diversos sítios do corpo humano, incluindo vias nasais, cavidade oral, pele, trato gastro intestinal e trato urogenital, e analisar a importância destes micro-organismos na saúde e doença” (Human Microbiome Project, 2012). Um trabalho descrevendo detalhadamente o microbioma humano saudável foi publicado Junho de 2012. Já o projeto microbioma da Terra tem como objetivo “analisar as comunidades microbianas ao redor do mundo” (Earth Microbiome Project, 2012).

O resultado obtido nos estudos de metagenomas depende principalmente da técnica de sequenciamento utilizada. Os primeiros estudos ainda utilizaram a técnica de sequenciamento de Sanger (SANGER et al., 1977), como foi o caso do trabalho supracitado realizado por Venter e colaboradores (2004). Entretanto, o avanço nas metodologias de sequenciamento e o surgimento das plataformas de nova geração a partir do ano de 2005 revolucionaram a ciência e a metagenômica. O número de trabalhos no PubMed (maior base de dados de artigos científicos) com esse tema cresceu exponencialmente a partir do ano 2008, mostrando uma evolução dessa metodologia juntamente com as plataformas de sequenciamento de alto rendimento.

Os novos sequenciadores podem gerar várias centenas de milhares a dezenas de milhões de sequências de leitura (“reads”) em paralelo. O sequenciamento de alto rendimento pode ser realizado a partir de bibliotecas fragmentadas de um genoma específico ou metagenoma, de um conjunto de cDNA

transcrito reversamente de moléculas de RNA, ou de um conjunto de moléculas gerados de amplificação por PCR. Para todos esses casos, as sequências são geradas sem a necessidade do convencional método de clonagem gênica, que era utilizado anteriormente para separar as moléculas de DNA molde antes do sequenciamento. As plataformas de nova geração podem ser divididas em duas categorias principais. O primeiro grupo são as tecnologias baseadas em PCR, que inclui as plataformas: Roche 454 Genome Sequencer (Roche, USA), HiSeq 2000 (Illumina, USA), AB SOLiD System (Life Technologies Corp., USA) e a mais recente, IonTorrent (Life Technologies Corp., USA). O outro grupo, chamado de tecnologia de moléculas únicas, não inclui um passo inicial de amplificação e foram desenvolvidos mais recentemente: HeliScope (Helicos BioSciences Corp., USA) e PacBio system (Pacific Biosciences, USA) (SHOKRALLA et al., 2012).

Todas estas tecnologias estão contribuindo para o avanço da microbiologia e conhecimento a cerca da diversidade genética nos ambientes. Entretanto, estes aparelhos geram um volume de dados muito grande que na maioria das vezes são subaproveitados. O desafio atual é o desenvolvimento de ferramentas de bioinformática para que toda essa informação disponibilizada pelos sequenciadores possa ser interpretada.

Assim, a utilização de técnicas moleculares é de extrema importância para os estudos de ecologia microbiana. Através dessas ferramentas a comunidade microbiana de ambientes impactados por ações antrópicas, principalmente pela urbanização, pode ser conhecida, e os processos biológicos realizados pelos micro-organismos nestes ambientes, melhor compreendido.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

Conhecer a diversidade genética e funcional da comunidade microbiana de um ambiente lótico urbano.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Caracterizar físico e químicamente as águas da região urbanizada e não urbanizada do Córrego São Pedro;

- Identificar bactérias envolvidas no ciclo do nitrogênio e potencialmente patogênicas nas amostras de água do Córrego São Pedro, através das técnicas de FISH e PCR;

- Traçar o perfil taxonômico da comunidade microbiana nas regiões urbanizada e não urbanizada do Córrego São Pedro, através da metagenômica;

- Traçar o perfil funcional da comunidade microbiana nas regiões urbanizada e não urbanizada do Córrego São Pedro, através da metagenômica.

**4 CARACTERIZAÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA DE UM  
AMBIENTE LÓTICO COM FOCO EM BACTÉRIAS  
POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS E DO CICLO DO NITROGÊNIO**



## 4.1 INTRODUÇÃO

Os rios e córregos são importantes reservas de água disponível para consumo humano, vida animal, indústria e agricultura. A extensiva e crescente urbanização é uma ameaça para os ecossistemas aquáticos principalmente pela poluição e descarga de esgoto doméstico (PAUL e MEYER, 2001). A água deve atender critérios para ser considerada saudável. Estes, no passado se limitavam a parâmetros físicos e químicos (TIQUIA, 2010). No entanto, a análise das características químicas e físicas de um ecossistema torna-se insuficiente, quando o objetivo é o entendimento de sua complexidade, e os aspectos biológicos devem ser considerados. Neste sentido, muitos estudos demonstraram que o conhecimento da estrutura e dinâmica da comunidade microbiana em rios e córregos é essencial, principalmente em ambientes modificados pela ação antrópica (ARAYA et al., 2003; BÖCKELMANN et al., 2000; BRÜMMER, FEHR e WAGNER-DÖBLER, 2000; KENZAKA et al., 2001; KOSTANJŠEK et al., 2005; TIQUIA, 2010).

Estudos prévios mostraram que a urbanização está relacionada com o aumento de nutrientes nos ambientes aquáticos paralelamente, outros trabalhos demonstraram que os micro-organismos desempenham papéis essenciais nos ciclos biogeoquímicos (HOARE, 1984; MEYBECK, 1998; PAUL e MEYER, 2001; USGS, 1999; WERNICK, COOK e SCHREIER, 1998). Recentemente, alguns estudos demonstraram que a urbanização pode influenciar a densidade e diversidade de micro-organismos nitrificantes e denitrificantes nos ecossistemas impactados. A urbanização também pode ser uma fonte de bactérias patogênicas pela descarga de esgoto humana nos ambientes aquáticos (GIRONES et al., 2010). Diversas espécies de bactérias potencialmente patogênicas foram encontradas nos sistemas urbanos, o que constitui um problema de saúde pública (GONZALEZ, PARANHOS e LUTTERBACH, 2010; JANDA e ABBOTT, 1998; SAVICHTCHEVA, OKAYAMA e OKABE, 2007; WILLEMS et al., 2011).

Trabalhos recentes têm utilizado ferramentas moleculares para estudar a comunidade microbiana de ambientes aquáticos contaminados, porém não há estudos que tivessem como finalidade investigar alvos específicos envolvidos com os principais efeitos impostos pela urbanização. Assim, o objetivo deste estudo foi caracterizar a comunidade microbiana em um ambiente lótico urbano, mais

especificamente bactérias potencialmente patogênicas e aquelas envolvidas no ciclo do nitrogênio.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1. Caracterização do ambiente de estudo

O ambiente de estudo escolhido foi o córrego São Pedro que é um afluente do rio Paraibuna. Este córrego tem 13 Km de extensão e está principalmente localizado na região metropolitana da Cidade de Juiz de Fora, MG (Figura 3). O córrego possui uma represa e é responsável por suprir água para 9% da população desta cidade (ANA, 2011). Em 2004, Latuf realizou um estudo para avaliar a qualidade da água deste córrego baseada em análises de oxigênio dissolvido (OD), coliformes fecais, pH, demanda biológica de oxigênio (DBO), nitratos, fosfatos, temperatura, turbidez e sólidos totais. Concluiu-se que há alta degradação da qualidade das águas superficiais do córrego São Pedro, principalmente na região em que o córrego encontra-se localizado na área urbana, na qual há um grande lançamento de efluentes domésticos *in natura*.

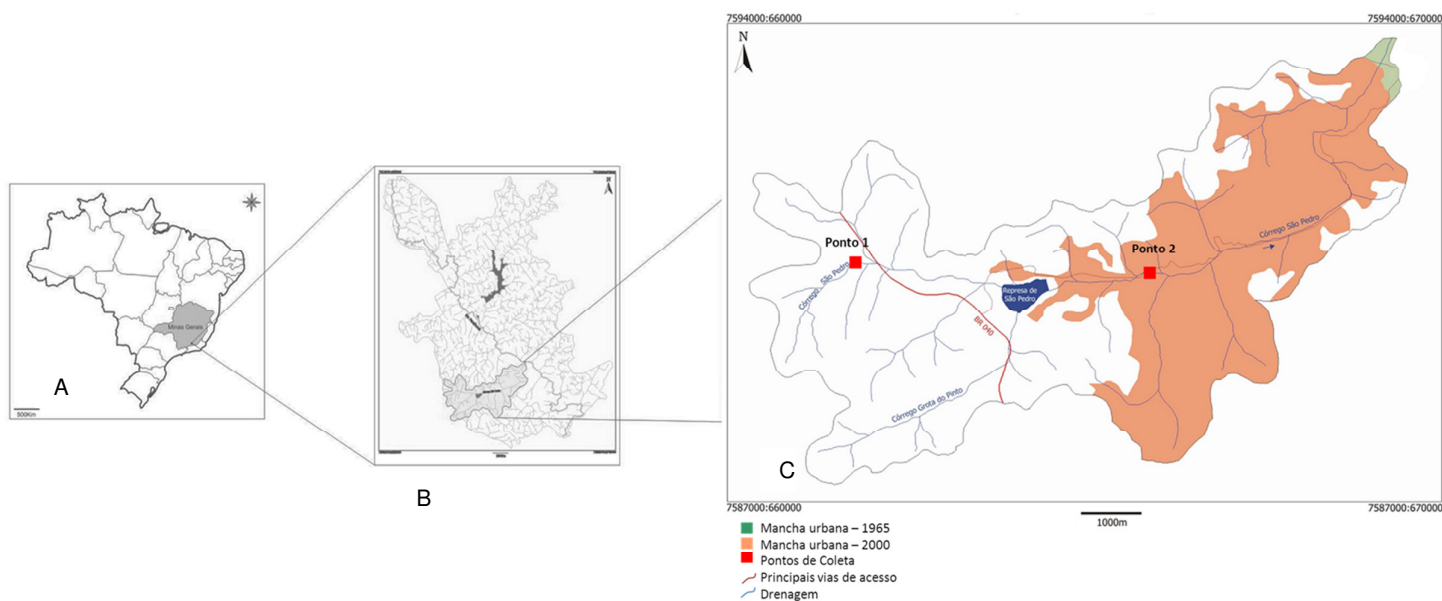


Figura 3- Localização da Bacia Hidrográfica do Córrego São Pedro (BHCSF) no município de Juiz de Fora/ Minas Gerais. A- Localização do Estado de Minas Gerais. B- Rede de drenagem da região de Juiz de Fora/MG. C- Bacia Hidrográfica do Córrego São Pedro, em destaque os pontos de coleta. (Adaptado de Latuf, 2004)

Neste trabalho foram selecionados dois pontos de estudos. O ponto 1 (661799E/7591070N) é localizado em uma região rural, sem influência da urbanização. A água neste ponto é límpida (Figura 4A). O ponto 2 (668307E/7591772N) é localizado em uma região extremamente urbana, com muitas casas em torno do córrego. A água neste ponto é escura com um forte odor (Figura 4B).



Figura 4- Pontos de amostragem do Córrego São Pedro. A- Ponto 1, região não Urbanizada. B- Ponto 2, região Urbanizada.

#### 4.2.2. Coleta

Foram coletados aproximadamente 1L e 10L de amostras de água da subsuperfície das regiões urbanizada e não urbanizada, respectivamente, do Córrego São Pedro na cidade de Juiz de Fora/MG em abril de 2010. As amostras de água foram mantidas separadamente em garrafas de 15L previamente rinsadas três vezes com a amostra de cada área.

#### 4.2.3. Análise dos parâmetros físico-químicos

A temperatura da água e o pH foram medidos no local com o aparelho Handheld meter pH 330i (WTW, Alemanha). Uma alíquota de água de cada área foi utilizada para a análise dos nutrientes dissolvidos. A quantidade de nitrito, nitrato, nitrogênio amoniacal, nitrogênio (NIT) orgânico total e fósforo (P) total foi medida

seguindo a metodologia descrita por Wetzel e Likens (1991). O valor para nitrogênio total foi calculado pela soma do nitrito, nitrato, nitrogênio amoniacal e nitrogênio orgânico total.

#### 4.2.4. Detecção de bactérias nitrificantes

Com o objetivo de identificar micro-organismos nitrificantes e marcadores moleculares de diferentes etapas do ciclo do nitrogênio, análises de PCR foram realizadas. As amostras de água (10L de água do ponto 1 e 1L do ponto 2) foram sonicadas em gelo usando o Vibra Cell VCX130PB (Sonics & Materials, USA) três vezes de 60 segundos com a amplitude de 90%, para desprender os micro-organismos das partículas. As amostras foram filtradas em filtro 3M seguido por filtração em GF/F. O filtrado foi centrifugado a 8000rpm por 15 minutos em garrafas de 500mL.

O DNA foi extraído por digestão química com fenol-clorofórmio, de acordo com Smith e Callihan (1992), porém com algumas modificações. O pellet foi ressuspenso em 500µL de solução de lise (20% Sacarose, 10mM EDTA, 40mM Tris-HCl e 1,3mg/µL lisozima) com adição de RNase (Promega Corporation, Madison, WI, USA). A solução foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente, seguida de 10 minutos a 37°C em banho-maria. SDS foi adicionado na concentração final de 0,2%, incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Ao lisado resultante foi adicionado um volume igual de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1; Sigma, St Louis, MO) e duas vezes clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado com um volume igual de Isopropanol gelado a -20°C por 30 minutos. O pellet foi lavado com etanol 70% gelado, seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 10µL de água livre de RNase e DNase. A qualidade do DNA foi checada por eletroforese em gel e quantificado por espectrofotometria em um NanoDrop ND 1000 (Thermo Scientific, DE, USA). O DNA foi armazenado à -20°C até o uso.

A Tabela 1 mostra as sequências dos oligonucleotídeos iniciadores usados para amplificar fragmentos de DNA específicos de micro-organismos relacionados ao ciclo do nitrogênio (*Nitrosomonadaceae*, *Nitrosospira*, *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *amoA* - amônia mono-oxigenase, *napA* - nitrato redutase A, *nfrA* – amonificadora de nitrato). Todos os iniciadores utilizados neste estudo já tinham sido utilizados em estudos prévios, como iniciadores para PCR ou sondas para FISH. A amplificação

da PCR foi realizada como descrito anteriormente por Amann et al. (1990); Geets et al. (2007); Hovanec et al. (1998); Mobarry et al. (1996); Mohan et al. (2004); Smith et al. (2007); Wanable, Kodama e Harayama (2001). Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% e corados com 0.5 µg de brometo de etídeo por mL de gel.

Os ensaios foram realizados em duplicata. A concentração final do DNA molde usada para todas as reações da PCR foi 20ng. Para verificar se a qualidade e quantidade de DNA extraído nas duas áreas eram semelhantes, a PCR foi realizada usando iniciadores para o domínio *Bacteria*. O controle negativo foi a reação da PCR contendo todos os reagentes necessários exceto DNA.

Tabela 1- Sequência e especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados no ensaio da PCR

Organismo/gene Alvo	Iniciador	Sequência (5'-3')	Posição	Referência
<i>Bacteria</i>	EUB338f	ACTCCTACGGGAGGCAGC	550bp	AMANN et al., 1990
	926Rr	CCCGTCAATTCMTTGGAGTTT		WANABLE et al., 2001
Nitrosomonadaceae	EUB338f	ACTCCTACGGGAGGCAGC	950bp	AMANN et al., 1990
	Nso1225r	CGCCATTGTATTACGTGTGA		MOBARRY et al., 1996
<i>Nitrospira</i>	Nsv443f	CGGAACGAAACGGTCACG	500bp	MOBARRY et al., 1996
	926Rr	CCCGTCAATTCMTTGGAGTTT		WANABLE et al., 2001
<i>Nitrospira</i>	EUB338f	ACTCCTACGGGAGGCAGC	350bp	AMANN et al., 1990
	Ntspa0685r	GGGAATCCGCGCTCCT		HOVANEC et al., 1998
<i>Nitrobacter</i>	EUB338f	ACTCCTACGGGAGGCAGC	750bp	AMANN et al., 1990
	NIT3r	CCTGTGCTCCATGCTCCG		MOBARRY et al., 1996
<i>amoA</i>	AmoAf	GGGGTTTCTACTGGTGGT	491bp	GEETS et al., 2007
	AmoAr	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		
<i>napA</i>	napA V66	TAYTTYNTNHSNAARATHATGTAYGG	415bp	SMITH et al., 2007
	napA V67	NGGRTGCATYTCNGCCATRTT		
<i>nrfA</i>	NrfAf	GCNTGYTGGWSNTGYAA	500bp	MOHAN et al., 2004
	NrfAr	TWNGGCATRTGRCARTC		
<i>Streptococcus</i>	EUB338f	ACTCCTACGGGAGGCAGC	320bp	AMANN et al., 1990
	STRr	GTGCAGAAGGGGAGAGTGG		TREBESIUS et al., 2000
<i>Enterococcus spp.</i>	ENRf	CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT	144bp	RINTILLA et al., 2004
	ENTr	ACTCGTTGTACTIONCCATTGT		

<i>Bacteroides/Prevotella</i>	BPPf	GGTGTCTGGCTTAAGTGCCAT	140bp	RINTILLA et al., 2004
<i>Porphyromonas</i>	BPPr	CGGA(C/T)GTAAGGGCCGTGC		
<i>Salmonella sp.</i>	invA139	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAA	284bp	FUKUSHIMA et al., 2003
	invA141	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC		
<i>Aeromonas Hydrophila</i>	AHCf	GAGAAGGTGACCACCAAGAACA	232bp	FUKUSHIMA et al., 2003
	AHCr	AACTGACATCGGCCTTGAACTC		
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA-1	GCGATTGATGGTGATACGGTT	276bp	FUKUSHIMA et al., 2003
	SA-2	CAAGCCTTGACGAACTAAAGC		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	OPR-1	GCTCTGGCTCTGGCTGCT	230bp	QIN et al., 2003
	OPR-2	AGGGCACGCTCGTTAGCC		
<i>Escherichia coli</i>	ECOL1	GCTTGACACTGAACATTGAG	660bp	CHOTAR et al., 2006
	ECOL2	GCACCTATCTCTTCCGCATT		
<i>E.coli</i> EPEC ( <i>eae</i> )	eae1	CTGAACGGCGATTACGCGAA	917bp	ARANDA et al., 2004
	eae2	CCAGACGATACGATCCAG		
<i>E.coli</i> EPEC ( <i>bfpA</i> )	BFP1	AATGGTGCTTGCCTTGCTGC	326bp	ARANDA et al., 2004
	BFP2	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA		
<i>E.coli</i> ETEC ( <i>elt</i> )	LTf	GGCGACAGATTATACCGTGC	450bp	ARANDA et al., 2004
	LTr	CGGTCTCTATATCCCTGTT		
<i>E.coli</i> ETEC ( <i>est</i> )	STf	ATTTTTMTTCTGTATTRTCTT	190bp	ARANDA et al., 2004
	STr	CACCCGGTACARGCAGGATT		
<i>E.coli</i> EHEC ( <i>stx1</i> )	Stx1f	ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180bp	ARANDA et al., 2004
	Stx1r	AGAACGCCCACTGAGATCATC		
<i>E.coli</i> EHEC ( <i>stx2</i> )	Stx2f	GGCACTGTCTGAACTGCTCC	255bp	ARANDA et al., 2004
	Stx2r	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		
<i>E.coli</i> EIEC ( <i>ipaH</i> )	lpaH1	GTTCCCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC	600bp	ARANDA et al., 2004
	lpaH2	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC		

Após a identificação nos microrganismos envolvidos no ciclo do nitrogênio, a técnica de FISH foi realizada com o intuito de quantificar alguns destes microrganismos presentes no ambiente. Para melhor caracterizar as áreas de estudo, também foi investigada a densidade dos micro-organismos dos domínios *Bacteria* e *Archaea* por FISH.

Como primeiro passo, foi adicionado paraformaldeído na concentração final de 2% a uma alíquota de amostra coletada. As células presentes em 1mL de água foram concentradas em filtros de polycarbonato (25mm de diâmetro, por de 0.2 $\mu$ M, Whatman). Os filtros foram armazenados a -4°C até o uso. Cada filtro foi cortado em 14 seções. Os filtros foram colocados em uma lâmina e cobertos com 40  $\mu$ L de solução de hibridização contendo as sondas coradas com CY3 na concentração final de 2,5ng/ $\mu$ L (0.9M NaCl; 20mM Tris-HCl pH 7.2; 5mM EDTA; 0.01% SDS; concentração variável de formamida). As sondas foram compradas da Operon Technologies (Alemanha). As sequências das sondas e as condições de hibridização estão na Tabela 2. Os filtros foram incubados na câmara de hibridização a 42°C por aproximadamente 12 horas. Depois, lavados com 1mL de solução de lavagem (20mM Tris-HCl pH 7.2; 10mM EDTA; 0.01% SDS; concentração variável de NaCl) pré-aquecida e incubados a 48°C por 15 minutos. Em seguida, os filtros foram corados com 100 $\mu$ L de DAPI na concentração final de 2 $\mu$ g/mL por 3 minutos à temperatura ambiente. Após corados, eles foram gentilmente lavados três vezes em etanol 80%, secos e montados sobre lâmina com uma solução de Glicerol:PBS (7:3). As células bacterianas nos filtros foram observadas em microscópio BX60 (Olympus, Japão). Os micro-organismos foram analisados em campos aleatórios em cada amostra. Para cada campo no microscópio duas categorias foram determinadas: células totais coradas com DAPI e células coradas com sondas específicas. A densidade média foi calculada assim como os desvios padrões. Todas as contagens foram corrigidas subtraindo o valor obtido no controle negativo. Os experimentos foram feitos em duplicata. Considerando que os dados são heterocedástico e que não seguem uma distribuição normal, a estatística aplicada foi Mann-Whitney (amostras independentes).

Tabela 2- Sequência e especificidade das sondas utilizadas no ensaio de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH).

Organismo Alvo	Sonda	Sequência (5'-3')	Form(%) <sup>†</sup>	NaCl (mM) <sup>‡</sup>	Referência
<i>Bacteria</i>	EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	30	102	AMANN et al., 1990
	EUB338II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	30	102	DAIMS et al., 1999
	EUB338III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	30	102	DAIMS et al., 1999
<i>Archaea</i>	Arc915	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT	20	225	STAHL et al., 1991
<i>Nitrobacter</i>	NIT3	CCTGTGCTCCATGCTCC	40	56	MOBARRY et al., 1996
Nitrospiraceae	Ntspa712	CGCCTTCGCCACCGCCTTCC	50	28	DAIMS et al., 2001
Nitrosomonadaceae	Nso 1225	CGCCATTGTATTACGTGTGA	35	80	MOBARRY et al., 1996
Controle Negativo	NON	ACTCCTACGGGAGGCAGC	30	102	WALLNER et al., 1993

#### 4.2.5. Detecção de microrganismos potencialmente patogênicos

Com o objetivo de identificar bactérias de interesse para saúde humana nas águas do ambiente estudado, a técnica da PCR foi realizada utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos para bactérias potencialmente patogênicas: *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacteroides/Prevotella/Porphyromonas*, *Salmonella*, *A. hydrophila*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e linhagens diarreagênicas de *E. coli* (Tabela 1). O DNA utilizado foi o mesmo usado para a análise das bactérias nitrificantes, e as condições de amplificação foram realizadas seguindo estudos prévios (AMANN et al., 1990; ARANDA, FAGUNDES-NETO e SCALETSKY, 2004; CHOTAR, VIDOVA e GODANY, 2006; FUKUSHIMA, TSUNOMORI e SEKI, 2003; QIN et al., 2003; RINTTILA et al., 2004; TREBESIUS et al., 2000; WANABLE, KODAMA e HARAYAMA, 2001). O controle negativo utilizado foi a reação da PCR contendo todos os componentes necessários, exceto o DNA molde. Como controle positivo, amplificações foram feitas com ATCC para as seguintes espécies: *Enterococcus faecalis*; *Salmonella enteric* subs. Enteric serovar Typhimurium; *Aeromonas hydrophila*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Bacteroides fragilis*; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; *E. coli* EPEC; *E. coli* EHEC; *E. coli* EIEC. Para a linhagem ETEC da *E. coli*, amplificação de PCR para o gene específico *elt* foi realizada e o amplicon foi purificado usando QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Inc). O fragmento de DNA



obtido foi sequenciado e comparado contra o banco de dado do NCBI para confirmar sua especificidade.

### 4.3 RESULTADOS

#### 4.3.1. Análise dos parâmetros físico-químicos

A temperatura da água foi igual a 22°C nas duas regiões e o valor de pH foi 6,8 no ponto 1 e 6,5 no ponto 2. A Tabela 3 apresenta a concentração dos nutrientes dissolvidos nas duas áreas estudadas. As quantidades de nitrito, nitrato, nitrogênio amoniacal, nitrogênio orgânico total e fósforo total foram significativamente maiores na região urbanizada. O nitrogênio total obtido também foi maior na região urbanizada, sendo na área 1 igual a 482µg/L e na área 2, 4107µg/L.

Tabela 3- Concentração de nutrientes dissolvidos nas áreas de estudo

	Nitrito (µg/L)	Nitrato (µg/L)	Nitrogênio Amoniacal (µg/L)	NIT. Org. Tot. (µg/L)	P Total (µg/L)
<b>Urbanizado</b>	29,0	558,0	1811,6	1708,0	420,6
<b>Não Urbanizado</b>	ND*	121,0	81,0	280,0	21,0

\*Não detectado

#### 4.3.2. Bactérias nitrificantes

Através da PCR, os grupos Nitrosomonadaceae e *Nitrosospira* que atuam como AOB e *Nitrosospira* (um dos grupos de NOB) foram detectados em ambas as áreas de estudo. O gênero *Nitrobacter*, que converte nitrito em nitrato, estava presente na área urbanizada, porém na região não urbanizada se mostrou abaixo do nível de detecção do ensaio. Os amplicons para os genes *amoA* (amônia mono-oxigenase), *napA* (nitrato redutase A) e *nfrA* (amonificadora de nitrato), foram mais abundantes na região urbanizada (Figura 5). Pela técnica de FISH, foi observado uma densidade significativamente maior dos grupos Nitrosomonadaceae, Nitrospiraceae, e *Nitrobacter* no ambiente urbanizado (Figura 6).

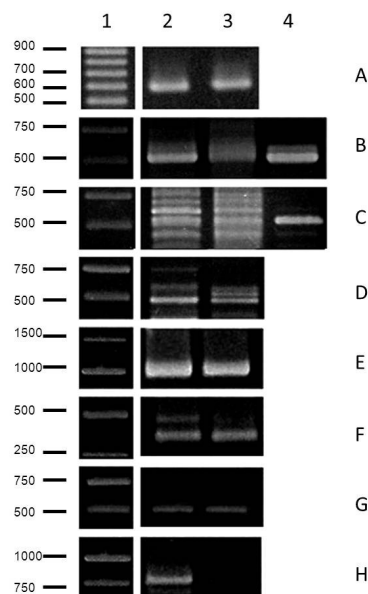


Figura 5- Identificação de marcadores moleculares do ciclo do nitrogênio e bactérias nitrificantes, por PCR. As imagens são representativas dos experimentos. A- *Bacteria*, B- *nrfA*, C- *napA*, D- *amoA*, E- Nitrosomonadaceae, F- *Nitrospira*, G- *Nitrosospira*, H- *Nitrobacter*. 1- Peso Molecular; 2- Região Urbanizada; 3- Região Não Urbanizada; 4- Controle Positivo.

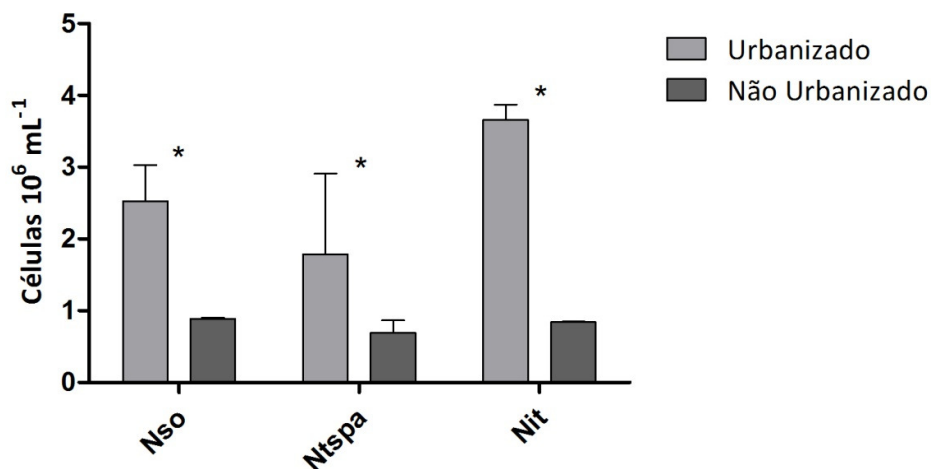


Figura 6- Densidade de micro-organismos dos domínios *Bacteria* (EUB) e *Archaea* (Arc) e dos grupos Nitrosomonadaceae (Nso), Nitrospiraceae (Ntspa), *Nitrobacter* (NIT), nas áreas não urbanizada e urbanizada. Teste estatístico Mann-Whitney.

Considerando os domínios *Bacteria* e *Archaea*, as suas densidades foram maiores na área urbanizada comparada com a área não urbanizada. A densidade para o domínio *Bacteria* na área urbanizada foi igual a  $9,48 \times 10^6$  mL<sup>-1</sup> e para *Archaea*

foi  $2,76 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  já na área não urbanizada as densidades foram  $0,80 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  e  $0,35 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  para *Bacteria* e *Archaea*, respectivamente.

#### 4.3.3. Bactérias potencialmente patogênicas

As Figuras 7 e 8 mostram os resultados da PCR específica para gêneros e espécies de patógenos humanos. O gênero *Enterococcus* sp. foi observado na região urbanizada porém estava abaixo do limite de detecção do ensaio na região não urbanizada. Os amplicons para os gêneros *Salmonella* sp., *Streptococcus* sp. e *Bacteroides/Prevotella/ Porphyromonas* foram mais acumulados também nesta área. Os mesmos resultados foram observados para as espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Em contraste, os amplicons para *Aeromonas hydrophila* estavam presentes na mesma intensidade nas duas áreas de estudo (Figura 7).

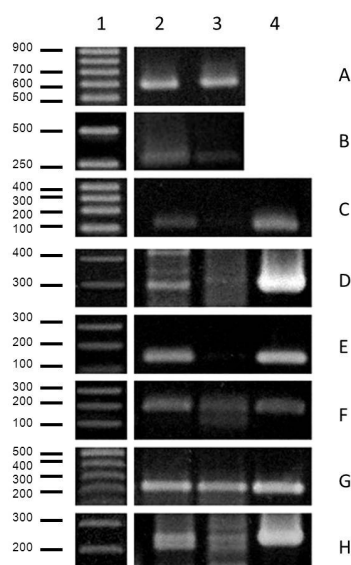


Figura 7- Identificação de bactérias potencialmente patogênicas por PCR. As imagens são representativas dos experimentos. A- *Bacteria*, B- *Streptococcus* sp., C- *Enterococcus* sp., D- *Salmonella* sp., E- *Bacteroides/Prevotella/ Porphyromonas*, F- *Pseudomonas aeruginosa*, G- *Aeromonas hydrophila*, H- *Staphylococcus aureus*. 1- Peso Molecular; 2- Região Urbanizada; 3- Região Não Urbanizada; 4- Controle Positivo.

Para *E. coli* os amplicons foram mais abundantes na região urbanizada. *E. coli* Enteropatogênica (EPEC) foi identificada como sendo *eae+*/*bfp+* nas duas áreas de estudo. *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC) foi identificada como *stx1+*/*stx2+* na

área urbanizada porém na área não urbanizada como, *stx1+/stx2-*. *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC) foi classificada como *ipaH+* nas duas áreas. Já a linhagem ETEC (*E. coli* Enterotoxigênica) foi identificada como *elt+/est-* na área urbanizada e *elt-/est-* na área não urbanizada. É importante considerar que os amplicons obtidos para todas as *E. coli* diarreagênicas estavam mais intensos na região urbanizada quando comparados com os da região não urbanizada (Figura 8).

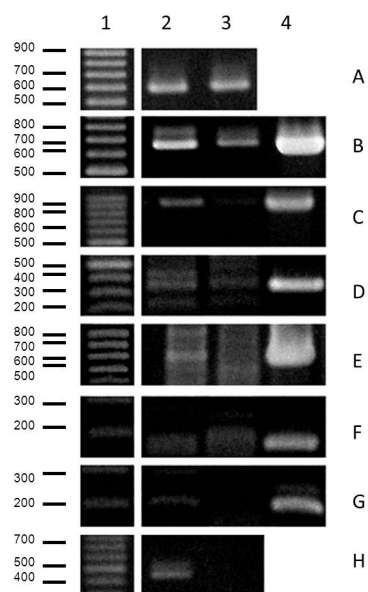


Figura 8- Identificação de Escherichia coli e linhagens diarreagênica por PCR. As imagens são representativas dos experimentos. A- Bacteria, B- *Escherichia coli*, C- *E.coli* EPEC (*eae*), D- *E.coli* EPEC (*bfpA*), E- *E.coli* EIEC (*ipaH*), F- *E.coli* EHEC (*stx1*), G- *E.coli* EHEC (*stx2*), H- *E.coli* ETEC (*elt*). 1- Peso Molecular; 2- Região Urbanizada; 3- Região Não Urbanizada; 4- Controle Positivo.

#### 4.4 DISCUSSÃO

A crescente urbanização vem causando sérios impactos nos ecossistemas aquáticos. A poluição e descarga de esgoto estão alterando a comunidade microbiana, tanto pela modulação da densidade de bactérias nitrificantes, quanto pela adição de patógenos no ambiente (PAUL e MEYER, 2001; WALSH et al., 2005). Este estudo objetivou identificar as diferenças na comunidade microbiana em duas áreas do Córrego São Pedro, influenciada pela urbanização e outra não.

A densidade de bactérias ( $1 \times 10^7$ ) obtida na região urbanizada é próxima a densidade relatada por Kenzaka et al. (2001) em outros rios poluídos que são considerados sistemas eutróficos por Yamaguchi, Kenzaka e Nasu (1997). Essa alta densidade pode ser justificada pela entrada de matéria orgânica dissolvida neste ambiente, resultado principalmente de esgoto doméstico. A alta densidade de *Archaea* no ambiente urbanizado pode ser explicada por esses micro-organismos terem capacidade de sobreviver em ambiente com altas concentrações de nutrientes (ALBERS et al., 2000), podendo estar atuando no ciclo do nitrogênio (DRIDI, RAOULT e DRANCOURT, 2011).

A quantidade de nutrientes dissolvidos obtidos na região urbanizada deste estudo é similar aos encontrados em sistemas eutróficos, já a região não urbanizada pode ser considerado um sistema preservado, de acordo com a classificação de Vollenweider e Kerekes (1980). Entretanto, é importante mencionar que essa classificação também inclui outras variáveis que não foram consideradas no presente estudo. Os valores de amônia, nitrito, nitrato, nitrogênio orgânico total e fósforo total são extremamente altos na região urbanizada quando comparada com a não urbanizada. Estes valores são similares, e em alguns casos maiores, que os valores obtidos em diferentes estudos realizados em rios e córregos urbanos (HENJUM et al., 2009; HESSEN, HENRIKSEN e SMELHUS, 1997; MEYBECK, 1998; USGS, 1999; WERNICK, COOK e SCHREIER, 1998).

Através das análises de FISH, foi observado uma alta densidade de *Nitrobacter* na área urbanizada quando comparada com a não urbanizada. O mesmo resultado foi obtido por PCR, que mostrou que este gênero estava presente apenas na área urbanizada (Figura 5 e Figura 6). A alta incidência do grupo *Nitrobacter*, está de acordo com os resultados obtidos nas análises de nutrientes. Estes dados mostraram, na área urbanizada, um nível de nitrito abaixo do detectável, e uma alta quantidade de nitrato (Tabela 3). Para o grupo Nitrospiraceae, que inclui o gênero *Nitrospira*, nenhuma diferença foi observada nos dois ambientes pelas análises de PCR (Figura 5). Juntos, estes resultados sugerem que nestes ambientes o gênero responsável por fazer a conversão de nitrito em nitrato é *Nitrobacter*. De acordo com Herbert (1999) em águas costeiras, *Nitrobacter* spp. é o principal micro-organismos que exerce essa função. A alta quantidade de nitrato comparado com nitrito nas duas áreas de estudo, especialmente na urbanizada, pode explicar a presença do gene *napA* nestes ambientes, já que a enzima codificada por esse gene precisa do

substrato nitrato para realizar sua função. Com relação a Nitrosomonadaceae, a análise de FISH mostrou uma maior densidade na área urbanizada (Figura 6). Este resultado está de acordo e explica o alto valor de nitrogênio amoniacal nessa área, já que Nitrosomonadaceae inclui o gênero *Nitrosomonas*, que é um dos grupos responsáveis pela oxidação da amônia em nitrito. A presença dos genes *amoA* e *nrfA* (Figura 5) também pode ser explicada pela alta concentração de nitrogênio amoniacal na área urbanizada já que a enzima amônia mono-oxigenase precisa do substrato amônia para realizar o processo de nitrificação e a enzima codificada pelo gene *nfrA* é responsável por suprir este nutriente no ambiente. É importante mencionar que a análise da concentração dos nutrientes e a presença de grupos ou enzimas que os metabolizam precisam ser consideradas na escala de tempo em que ocorre o metabolismo de nitrogênio.

Além de bactérias nitrificantes, este estudo investigou patógenos humanos, já que um alto número destes micro-organismos é encontrado em esgotos urbanos e podem ser considerados contaminantes ambientais. A família Enterobacteriaceae é o maior grupo de bactérias Gram-negativas encontradas no solo, água, no corpo de humanos e outros animais. Algumas espécies são patógenos e podem causar diversas doenças gastrointestinais. Um importante gênero dessa família é *Salmonella* sp.. Esse gênero é composto por duas espécies *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, e por muitos subgrupos e serotipos, e todos são capazes de causar doenças que acometem humanos. A contaminação com *Salmonella* pode ocorrer bebendo água contaminada, nadando em águas contaminadas ou comendo alimentos lavados com água contaminada (BOYD et al., 1996; HSU et al., 2011). A presença de *Salmonella* sp. em maior abundância na área urbanizada deste estudo (Figura 7), está de acordo com Gonzalez, Paranhos e Lutterbach (2010) que encontrou a prevalência deste grupo em uma lagoa brasileira que é um ecossistema urbano passando por um acelerado processo de degradação, especialmente devido à poluição. Savichtcheva, Okayama e Okabe (2007) também observou em seu estudo que *Salmonella* sp. foi o enteropatógeno mais frequente em amostras de rios com diferentes graus de poluição, amostras de lodo ativado e tratamento de água.

O micro-organismo mais estudado da família Enterobacteriaceae é a espécie *Escherichia coli*. Diversas propriedades de virulência são bem caracterizadas entre as populações de *E. coli*, diferenciando-os em linhagens comensais e patogênicas. Considerando as *E. coli* patogênicas, os determinantes de virulência são

geneticamente codificados tanto por DNA cromossomal quanto por plasmidial e bacteriófago e são representados por alguns genes: fixação e lesão (*eae*), aderência localizada (*bfpA*), mecanismo enteroinvasivo (*ipaH*), genes que codificam toxinas termolábeis (*elt*), e termoestáveis (*est*), e genes que codificam Shiga toxinas, *stx1* e *stx2* (ARANDA, FAGUNDES-NETO e SCALETSKY, 2004). A fonte de contaminação dos ambientes naturais com estes patógenos está relacionada com descarga de esgotos e com a presença de animais domésticos e selvagens, já que há evidências de que o gado, entre outros animais, é importante reservatório destes patógenos (MUNIESA et al., 2006). Diversos estudos tiveram como objetivo investigar a incidência de *E. coli* diarreagênicas em diferentes ambientes aquáticos, e a maioria deles identificaram a presença destas linhagens e de seus genes de virulência, especialmente em ambientes poluídos e urbanizados. Nossos dados (Figura 8) corroboram estes resultados prévios. A presença de EHEC e ETEC em lodos ativados e rios com diferente grau de poluição foi relatado por Savichtcheva, Okayama e Okabe (2007). O gene *stx* foi encontrado em córregos com alto percentual de urbanização, mas também em florestas preservadas (GARCÍA-ALJARO et al., 2005; HIGGINS et al., 2005; MUNIESA et al., 2006). Nossos resultados mostraram que EHEC foi genotipada como *stx1+/stx2+* na área urbanizada, entretanto, o gene *stx2* não está presente na região não urbanizada deste estudo, o que é relevante e preocupante já que se tem encontrado evidências que o gene *stx2* está comumente associado com doenças mais graves (OLIVEIRA et al., 2008). Uma interessante observação é que os mesmos patótipos também foram encontrados em estudos regionais com pombos urbanos e isolados de fezes diarreicas humanas, indicando a circulação dos mesmos genes em diferentes amostras da cidade de Juiz de Fora (GARCIA, SILVA e DINIZ, 2011; SILVA et al., 2009).

Os gêneros *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Staphylococcus* sp. são bactérias Gram-positivas com baixo conteúdo de GC, pertencentes ao filo Firmicutes. Todos estes gêneros têm espécies que são classificadas como comensais humanos, e como parte da microbiota humana residente. Entretanto, estudos tem mostrado que estas espécies podem adquirir virulência e se tornarem perigosos patógenos desenvolvendo resistência a múltiplas drogas (WILLEMS et al., 2011). Existe evidência de que estes gêneros podem também ser encontrados na água, solo e plantas (HARDIE e WHILEY, 1997). Nossos resultados (Figura 7)

indicaram a presença de *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Staphylococcus aureus* em ambientes aquáticos. He e Jiang (2005) também detectaram, usando técnicas moleculares, *Enterococcus* em águas costeiras e esgoto. *Staphylococcus aureus* não é associado com material fecal humano, mas a presença desta espécie na água sugere que este ambiente é uma potencial fonte de infecções por *S. aureus* (GOODWINA e POBUDAB, 2009).

Outros grupos que também fazem parte da microbiota humana normal são as bactérias anaeróbica *Bacteroides* sp., *Prevotella* sp. e *Porphyromonas* sp. (WEXLER, 2007). Como os Cocos Gram-positivos, podem desenvolver virulência e se tornarem importantes patógenos para humanos. Nossos resultados mostraram a presença destes micro-organismos na água, principalmente na área submetida à urbanização. Diferentes estudos têm usado micro-organismos do gênero *Bacteroides* como indicadores de poluição fecal (BERNHARD e FIELD, 2000; BOEHM et al., 2003; FIKSDAL et al., 1985; KREADER, 1995). Os *Bacteroides* spp. são importantes indicadores, e mais sensíveis que coliformes, já que podem ser encontrados em grandes quantidades em humanos. Outra característica importante da contaminação com *Bacteroides* é que como são anaeróbios obrigatórios, o alto nível desses micro-organismos na água é indicio de contaminação recente (FIKSDAL et al., 1985).

O gênero *Aeromonas* está envolvido com doenças que acometem humanos e outros animais (JANDA e ABBOTT, 1998; PRIDGEON et al., 2011). A espécie *Aeromonas hydrophila*, foi encontrada nas duas áreas de estudo (Figura 7). Este resultado era esperado, pois estes micro-organismos são primariamente aquáticos (PABLOS et al., 2010) e como já foi reportado por Scoaris e colaboradores (2008), *Aeromonas hydrophila* foi encontrada em água da torneira e até mesmo em água mineral. *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria de vida livre ubíqua no ambiente, é outro patógeno humano importante. Essa espécie pode ser encontrada tanto em ambiente oligotrófico quanto em ambientes com elevada quantidade de nutrientes (MENA e GERBA, 2009), o que está de acordo com o presente trabalho. Os resultados mostraram que *Pseudomonas aeruginosa* estava presente na área não urbanizada que possui baixos valores de nutrientes, mas estava em maior abundância na área urbanizada que é considerada um sistema eutrófico. Garcia-Armisen et al. (2011) mostraram recentemente a incidência de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a múltiplos antibióticos em rios contaminados com esgoto.



#### 4.5 CONCLUSÕES

- As concentrações dos nutrientes: nitrito, nitrato, nitrogênio amoniacal, nitrogênio orgânico total e fósforo total foram significativamente maiores na região urbanizada.

- Mudança na estrutura da comunidade microbiana imposta pelas ações antrópicas.

- Houve maior incidência de micro-organismos envolvidos no ciclo do nitrogênio na região urbanizada do córrego.

- Houve maior incidência de micro-organismos potencialmente patogênicos para seres humanos e outros animais na região urbanizada do córrego.

**5 ANÁLISE METAGENÔMICA DA COMUNIDADE MICROBIANA DE  
UM AMBIENTE LÓTICO COMPARANDO AS REGIÕES URBANIZADA  
E NÃO URBANIZADA**

## 5.1. INTRODUÇÃO

A seção anterior reiterou que o processo de urbanização modifica a comunidade microbiana de ecossistemas aquáticos. Os resultados obtidos mostraram que há maior incidência de micro-organismos nitrificantes e patógenos humanos nas águas poluídas, o que pode ser explicado pelo aumento dos nutrientes dissolvidos e pela descarga de esgoto doméstico na área urbanizada. Entretanto, estes resultados foram obtidos utilizando como estratégia metodológica organismos candidatos e, portanto foram realizadas análises específicas o que não possibilitou investigar como as alterações provocadas pela urbanização interferem de maneira mais ampla na composição e função dos micro-organismos nestes ambientes.

A metagenômica tem se tornado uma importante ferramenta na caracterização da comunidade dos micro-organismos nos ecossistemas devido a sua habilidade de prover informações a cerca da diversidade, distribuição e potencial metabólico dos seus diferentes membros (HUGENHOLTZ e TYSON, 2008). Essa metodologia tem facilitado o conhecimento de diversos microbiomas tais quais, oceano (KIRCHMAN, COTTRELL e LOVEJOY, 2010; RUSCH et al., 2007; VENTER et al., 2004), corpo humano (BAQUERO e NOMBELA, 2012; GEVERS et al., 2012; THE HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012) e solo (DELMONT et al., 2011; DELMONT et al., 2012; FAORO et al., 2012), especialmente devido às plataformas de sequenciamento de nova geração. Alguns estudos foram realizados em ecossistemas de água doce, e puderam avaliar a diversidade microbiana nestes ambientes bem como quais os grupos microbianos predominantes, e identificaram importantes genes como marcadores das alterações ambientais (BESEMER et al., 2012; DINSDALE et al., 2008; GHAI et al., 2011; KRISTIANSSON et al., 2011; SMITH et al., 2012). Entretanto, nenhum estudo ainda foi realizado em córregos ou rios ameaçados pela urbanização.

Sendo assim, nesta etapa, nossos objetivos incluíram a caracterização do perfil taxonômico e funcional da comunidade microbiana das regiões urbanizada e não urbanizada de um ambiente lótico.

## 5.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1. Coleta

Foram coletados aproximadamente 6L e 12L de amostras de água da subsuperfície das regiões urbanizada e não urbanizada, respectivamente, do Córrego São Pedro na cidade de Juiz de Fora/MG em dezembro de 2010. Os pontos de coleta foram os mesmos indicados na seção anterior (Figura 3 e Figura 4). As amostras de água foram mantidas separadamente em garrafa de 15L previamente rinsadas três vezes com a amostra de cada área.

### 5.2.2 Extração de DNA

As amostras de água foram submetidas a tratamento ultrasônico em gelo pelo uso de sonicador (Vibra Cell VCX130PB Sonics & Materials, USA) três vezes de 60 segundos com amplitude de 90% para desprender os micro-organismos das partículas. As amostras foram filtradas em filtro 3M, seguida por filtração em GF/F. O filtrado foi centrifugado a 8000rpm por 15 minutos em garrafas de 500mL e o pellet resultante foi armazenado a -20°C até a extração de DNA ser realizada.

O DNA microbiano total foi extraído usando *PowerMax Soil DNA Isolation Kit* (MoBio, USA) seguindo as instruções do fabricante. A qualidade e quantidade do DNA foram verificadas através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e espectrofotômetro (NanoDrop Technologies, USA).

### 5.2.3. Sequenciamento e análises

Aproximadamente 500ng de cada amostra de DNA metagenômico foram submetidos ao pirosequenciamento no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC, Petrópolis) usando a plataforma 454 GS-FLX *Titanium* (Roche, USA) de acordo com o método de Margulies et al. (2005). O DNA de cada amostra constituiu um quarto da placa utilizada no sequenciamento. Os “reads” obtidos foram filtrados para remover sequências curtas e com qualidade Phred menor ou igual a 20 usando o software Lucy (CHOU e HOLMES, 2001). Para a eliminação de artefatos, que são “reads” replicados artificialmente, e para minimizar a superestimação dos dados, o software 454 *Replicates* (GOMEZ-ALVAREZ, TEAL e SCHMIDT, 2009) foi

utilizado. As sequências resultantes foram depositadas no servidor MG-RAST (*The Metagenomics RAST*) (MEYER et al., 2008), porém ainda não se tornaram públicas. O código de acesso das sequências no NCBI é SRA051287.

#### 5.2.4. Perfil taxonômico

O perfil taxonômico foi obtido primeiramente por um BLASTN e BLASTX de todas as sequências resultantes contra os bancos de dados NCBI-NT e NCBI-NR, respectivamente, sendo o corte utilizado para “e-value”  $\leq 1e-5$ . Os resultados foram visualizados no MEGAN v4.0 (MetaGenome ANalyzer software) (HUSON et al., 2011), através do algoritmo LCA (Último ancestral comum) com os seguintes parâmetros: *min-score*: 60; *min-support*: 15; *top-percent*: 10. As sequências correspondentes ao 16S rDNA também foram utilizadas na classificação taxonômica. Estas sequências foram extraídas de cada conjunto de dados utilizando o software Meta-RNA (HUANG, GILNA e LI, 2009). A classificação das sequências do 16S rDNA foi realizada com o auxílio do software Classifier v2.5 (COLE et al., 2008) contra o banco de dados RDPII (Ribossomal Database Project) e um limite de confiança de 50% foi utilizado. Análises realizadas no sistema automatizado MG-RAST também foram consideradas para o perfil taxonômico. Esse sistema conduziu buscas (blastx) contra o banco de dados SEED com max e-value:  $1e-5$ , min % identity: 60.

#### 5.2.5. Perfil funcional

A classificação funcional foi conduzida usando BLASTX (e-value  $\leq 1e-5$ ) contra o banco de dados NCBI-NR. O resultado gerado foi carregado no programa MEGAN v4.0, e a classificação foi obtida usando os bancos de dados KEGG e SEED. Comparações com o banco de dados SEED também foram realizadas pelo servidor MG-RAST. Para as análises dos subsistemas gênicos virulência, resposta ao estresse, metabolismo de DNA, RNA e proteína foram utilizados os resultados gerados através do banco de dados SEED e para metabolismo de metano, nitrogênio e enxofre utilizamos os resultados gerados pelo banco de dados KEGG.

As sequências atribuídas aos agrupamentos gênicos virulência, resposta ao estresse, metabolismo de nitrogênio, metabolismo de enxofre, metabolismo de

metano, metabolismo de proteína, metabolismo de RNA, metabolismo de DNA foram extraídos do conjunto de dados usando MEGAN v4.0 com o intuito de identificar os grupos taxonômicos que contribuíram com genes codificadores de proteínas atuantes em cada um desses subsistemas. As sequências extraídas foram comparadas ao banco de dados NCBI-NR usando BLASTX (e-value  $\leq 1e-5$ ) e posteriormente classificadas usando novamente o MEGAN v4.0, como descrito por Andreote et al. (2012).

#### 5.2.6. Análise estatística

Para determinar as diferenças estatisticamente significativas entre as duas amostras, o programa estatístico STAMP (Statistical Analysis of Metagenomic Profiles) (PARKS e BEIKO, 2010) foi utilizado. O teste realizado foi o exato de Fisher, que é apropriado para amostras grandes de metagenomas. O método de intervalo de confiança foi assintótico, também indicado para amostras grandes e a *posteriori* foi realizada uma correção pelo método Benjamini-Hochberg FDR, para minimizar a presença de falsos positivos.

### 5.3 RESULTADOS

Alguns dos resultados apresentados a seguir foram exportados de softwares cujo idioma oficial é o inglês sendo assim alguns gráficos estarão nesse idioma.

#### 5.3.1 Característica geral das sequências de DNA obtidas através do sequenciamento

Os resultados que apresentam as características gerais das sequências de DNA obtidas no sequenciamento encontram-se na Tabela 4. Parte das sequências foram excluídas pela qualidade ou por serem consideradas artefatos, totalizando 66.790 para o metagenoma urbanizado e 90.856 para o não urbanizado. Entretanto, um número representativo foi utilizado nas análises.

Tabela 4- Número e características das seqüências de DNA obtidas através do Sequenciamento

	<b>Urbanizado</b>	<b>Não Urbanizado</b>
<b>Total de reads</b>	309.146	311.297
<b>Reads usados</b>	242.356	220.441
<b>Tamanho reads</b>	300±88	329±98
<b>Percentual de GC</b>	54 ± 10%	56 ± 9%
<b>Total de Bases</b>	72.777.521 pb	72.662.818 pb
<b>Seqüência 16S</b>	475	206

A curva de rarefação (Figura 9) é um parâmetro que permite estimar a amostragem obtida. As curvas de rarefação resultantes não atingiram o platô, mas perto de 100% houve uma tendência de estabilização. Ou seja, a amostragem realizada está próxima de ser completamente representativa do ambiente. Pode-se observar que as curvas são muito próximas entre si, chegando quase à sobreposição. Isto indica que a riqueza de espécies é semelhante nestes ambientes.

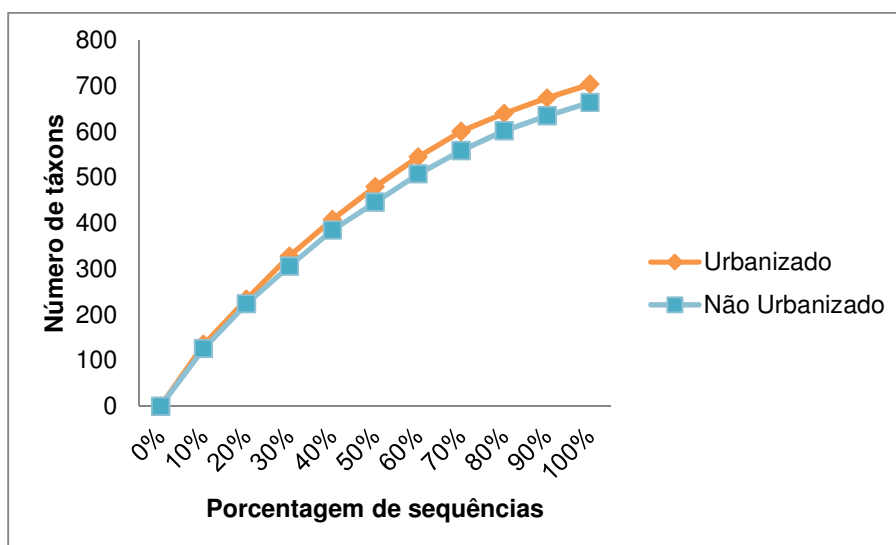


Figura 9- Curva de rarefação obtida através do programa Megan.

### 5.3.2. Perfil Taxonômico

Considerando as sequências anotadas (72,9% e 53,3% no metagenoma urbanizado e não urbanizado, respectivamente) pelo software MEGAN v4.0, ambos os metagenomas apresentaram como maior domínio *Bacteria* (99,2% e 96,3%), contendo uma pequena fração de *Archaea* (0,3% e 2,9%). O percentual para vírus e eucariotos foi baixo também para os dois metagenomas (Figura 10).

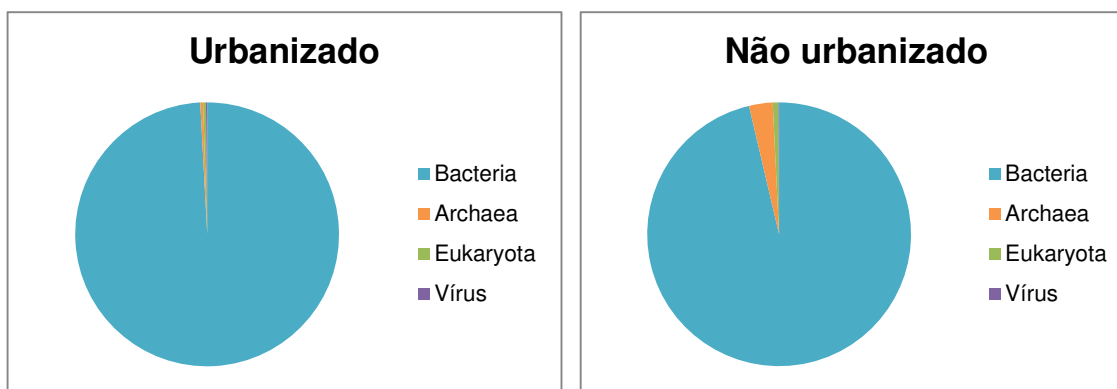


Figura 10- Porcentagem das sequências anotadas para os domínios *Bacteria*, *Archaea*, *Eukaryota* e vírus nos metagenomas urbanizado e não urbanizado.

Um total de 681 sequências parciais do gene 16S rDNA foram obtidos nos metagenomas, sendo 475 do urbanizado e 206 do não urbanizado (Tabela 4). A classificação taxonômica obtida através das sequências 16S rDNA e através de todos os “reads” analisados foi similar no metagenoma urbanizado (Figura 11). Entretanto, no metagenoma não urbanizado a comparação entre os dois conjuntos de dados foi divergente devido ao alto número de bactérias não classificadas (33,3%) obtido pela análise de 16S rDNA (Figura 11).



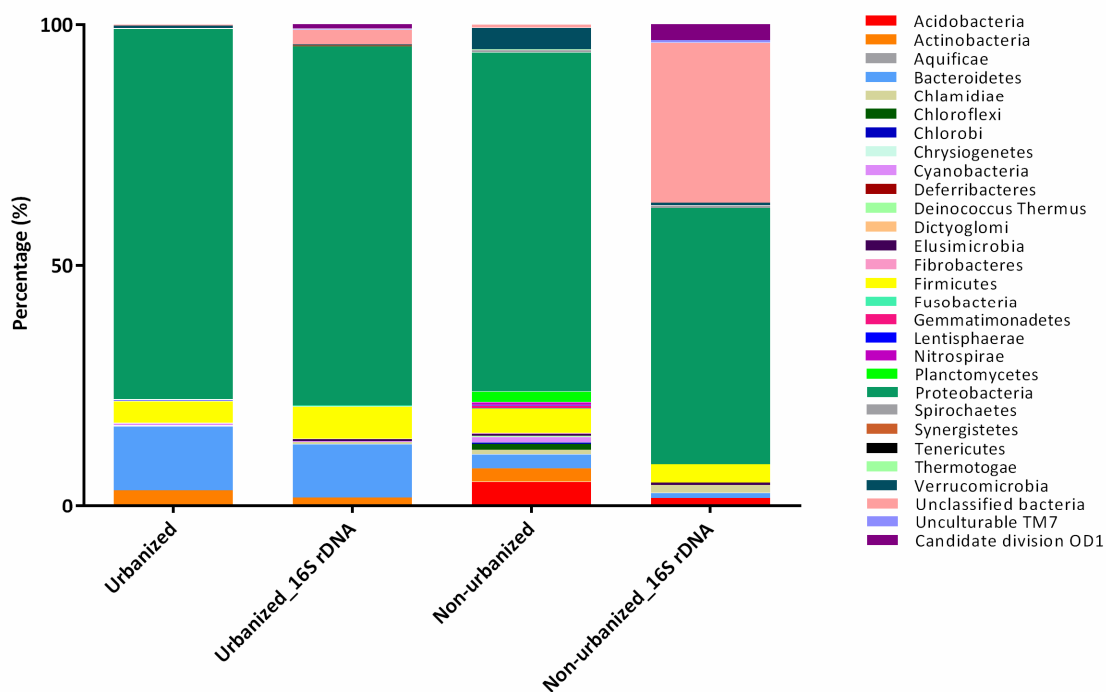


Figura 11- Porcentagem das sequências anotadas para os Filos nos metagenomas urbanizado e não urbanizado.

Considerando a análise de todos os “reads”, Proteobacteria foi o filo mais prevalente em ambos metagenomas (77,1% no urbanizado e 70,6% no não urbanizado), e foi seguida por Bacteroidetes (13,2%), Firmicutes (4,5%), Actinobacteria (3,1%), no urbanizado e Firmicutes (5%), Acidobacteria (5%), Verrucomicrobia (4,5%), no não urbanizado (Figura 11). Considerando o filo mais prevalente, Proteobacteria, foi observado uma alta incidência da divisão Betaproteobacteria seguida por Gammaproteobacteria no metagenoma urbanizado e Alphaproteobacteria no metagenoma não urbanizado (Figura 12). É importante mencionar que a região não urbanizada teve uma distribuição taxonômica mais equitativa entre os filios (Figura 11).

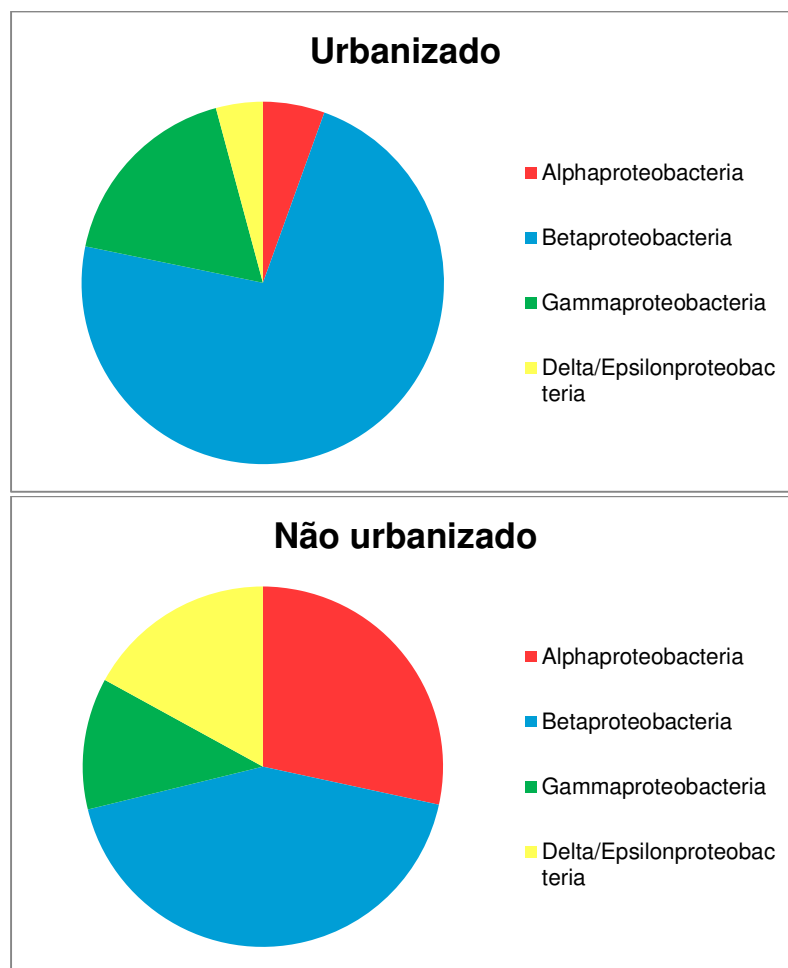


Figura 12- Porcentagem de sequências anotadas para as Classes de Proteobacteria nos metagenomas urbanizado e não urbanizado.

A afiliação taxonômica das sequências em gêneros bacterianos mostrou uma importante diferença estatística entre os dois ambientes (Figura 13). Considerando o metagenoma urbanizado, os gêneros prevalentes foram *Burkholderia* (com diferença entre as proporções nos dois metagenomas de 7,93%), *Escherichia* (7,86%), *Shigella* (4,56%), *Bacteroides* (3,49%), *Acidovorax* (2,64%), *Salmonella* (2,04%), *Acinetobacter* (1,83%), *Polynucleobacter* (1,54%), *Vibrio* (1,48%), *Yersinia* (1,4%), *Pseudomonas* (1,28%), *Albidiferax* (1,13%) (Figura 13). No metagenoma não urbanizado os gêneros mais abundantes foram *Candidatus Solibacter* (2,32%), *Geobacter* (2,01%), *Bradyrhizobium* (1,7%), *Magnetospirillum* (1,51%), *Rhodopseudomonas* (1,42%), *Opitutus* (1,28%), *Anaeromyxobacter* (1,28%) (Figura 13).

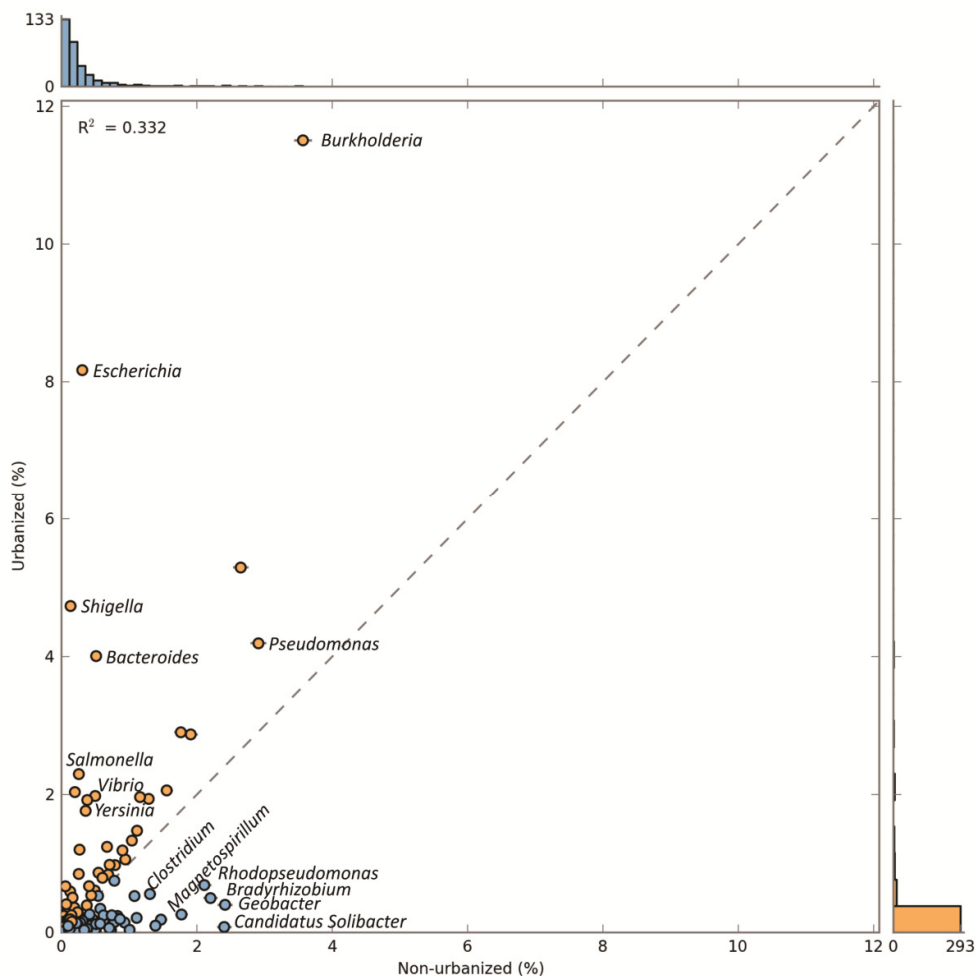


Figura 13- Gêneros com diferença estatística entre os metagenomas urbanizado e não urbanizado, obtido pelo programa STAMP.

Após a classificação filogenética dos filos dominantes, foram analisados os genomas com maior abundância de hits em cada um dos metagenomas. A Tabela 5 mostra os resultados obtidos no metagenoma urbanizado. As espécies mais abundantes pertencem aos grupos Gammaproteobacteria, Betaproteobacteria e Bacteroidetes, sendo *Escherichia coli* a mais prevalente (Tabela 5). Além disso, foi observado que algumas espécies, consideradas potenciais patógenos para humanos e outros animais, tiveram uma grande abundância de hit neste metagenoma, incluindo *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica*, *Burkholderia cenocepacia*, *Bacteroides fragilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae* e *Vibrio cholera* (Tabela 5). Também considerando a patogenicidade dos metagenomas, o urbanizado teve maior índice de acordo com os atributos ecológicos classificados

pelo MEGAN (Figura 14). Já no metagenoma não urbanizado as espécies prevalentes estão representadas na Tabela 6. A espécie mais abundante foi *Candidatus Solibacter usitatus* e afiliação taxonômica das espécies prevalentes foram para os grupos Acidobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e Deltaproteobacteria (Tabela 6). Nove espécies foram compartilhadas entre os dois metagenomas (*Burkholderia pseudomallei*, *Acidovorax* sp. JS42, *Albidiferax ferrireducens*, *Polaromonas* sp. JS666, *Acidovorax citrulli*, *Delftia acidovorans*, *Dechloromonas aromatica*, *Verminephrobacter eiseniae*, *Methylibium petroleiphilum*) (Tabelas 5 e 6). É importante mencionar que os valores para abundância de hits obtidos no metagenoma urbanizado foram maiores do que no metagenoma não urbanizado.

Tabela 5- Genomas predominantes no metagenoma urbanizado, obtidos pelo MG-RAST

<b>Grupo taxonômico</b>	<b>Genoma predominante</b>	<b>Abundância de hits</b>
Gammaproteobacteria	<i>Escherichia coli</i>	95361
Betaproteobacteria	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	85608
Betaproteobacteria	<i>Burkholderia mallei</i>	64842
Betaproteobacteria	<i>Acidovorax</i> sp. JS42	38579
Gammaproteobacteria	<i>Shigella flexneri</i>	35730
Betaproteobacteria	<i>Albidiferax ferrireducens</i>	33915
Betaproteobacteria	<i>Polaromonas</i> sp. JS666	32912
Gammaproteobacteria	<i>Salmonella enterica</i>	26749
Betaproteobacteria	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	23682
Betaproteobacteria	<i>Acidovorax citrulli</i>	23365
Betaproteobacteria	<i>Delftia acidovorans</i>	22938
Betaproteobacteria	<i>Dechloromonas aromatica</i>	22633
Betaproteobacteria	<i>Polynucleobacter necessarius</i>	22440
Bacteroidetes	<i>Bacteroides fragilis</i>	21798
Gammaproteobacteria	<i>Acinetobacter baumannii</i>	18358
Betaproteobacteria	<i>Verminephrobacter eiseniae</i>	17242
Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17061
Gammaproteobacteria	<i>Shigella dysenteriae</i>	16297
Gammaproteobacteria	<i>Vibrio cholerae</i>	15644
Betaproteobacteria	<i>Methylibium petroleiphilum</i>	15567

Tabela 6- Genomas predominantes no metagenoma não urbanizado, obtidos pelo MG-RAST

Grupo taxonômico	Genoma predominante	Abundância de hits
Acidobacteria	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i>	2552
Alphaproteobacteria	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	2240
Betaproteobacteria	<i>Polaromonas sp. JS666</i>	1980
Betaproteobacteria	<i>Albidiferax ferrireducens</i>	1872
Betaproteobacteria	<i>Acidovorax sp. JS42</i>	1487
Betaproteobacteria	<i>Dechloromonas aromatica</i>	1368
Betaproteobacteria	<i>Acidovorax citrulli</i>	1327
Betaproteobacteria	<i>Delftia acidovorans</i>	1232
Betaproteobacteria	<i>Verminephrobacter eiseniae</i>	1185
Betaproteobacteria	<i>Methylibium petroleiphilum</i>	1104
Acidobacteria	<i>Candidatus Koribacter versatilis</i>	1068
Alphaproteobacteria	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	968
Alphaproteobacteria	<i>Bradyrhizobium sp. BTAi1</i>	875
Deltaproteobacteria	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	875
Betaproteobacteria	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	871
Deltaproteobacteria	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	841
Betaproteobacteria	<i>Azoarcus sp. BH72</i>	840
Betaproteobacteria	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	769
Betaproteobacteria	<i>Cupriavidus pinatubonensis</i>	759
Betaproteobacteria	<i>Ralstonia solanacearum</i>	747

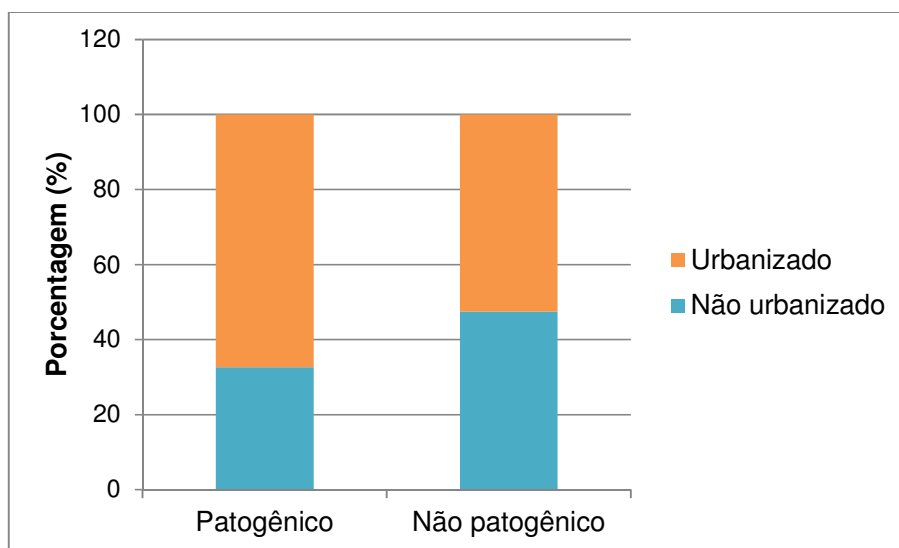


Figura 14- Porcentagem de micro-organismos patogênicos e não patogênicos nos metagenomas urbanizado e não urbanizado, obtido através do MEGAN.

### 5.3.3. Perfil Funcional

Do total das sequências metagenômicas, 72,7% da área urbanizada e 52,9% do não urbanizado continham proteínas preditas com funções conhecidas, de acordo com MG-RAST. Assim, o total de sequências sem função definida para o metagenoma urbanizado foi de 27,3% e um valor mais alto foi observado no metagenoma não urbanizado, 53,8%. As sequências com funções conhecidas foram classificadas em subsistemas de acordo com banco SEED (Figura 15). Os cinco subsistemas mais abundantes foram Metabolismo de Proteína (13% e 12,2% para urbanizado e não urbanizado, respectivamente), Carboidratos (11,4% e 11,5%), Aminoácidos e Derivados (10,6% e 10,2%), Cofatores, Vitaminas, Grupos Prostéticos e Pigmentos (8,2% e 8,3%) e Metabolismo de RNA (6,6% e 6,1%). As análises com STAMP determinaram diferenças estatisticamente significativas para os subsistemas: Divisão e Ciclo Celular, Metabolismo de DNA, Transporte de Membrana, Aquisição e Metabolismo de Ferro, Metabolismo de Proteína, Virulência, Ácidos Graxos, Lipídios e Isoprenóides, Resposta ao Estresse, Metabolismo de RNA, Motilidade e Quimiotaxia, Metabolismo de Nitrogênio, Aminoácidos e derivados, Metabolismo de Compostos Aromáticos, Fotossíntese, Dormência e Esporulação, Fagos, Profagos, Elementos de Transposição e Plasmídeos, Metabolismo de Enxofre, Metabolismo Secundário, Parede Celular e Cápsula (Figura 15). É importante considerar que a proporção de sequências para todos os subsistemas teve apenas poucas variações entre os metagenomes, porém o número absoluto de sequências foi maior no metagenoma urbanizado.

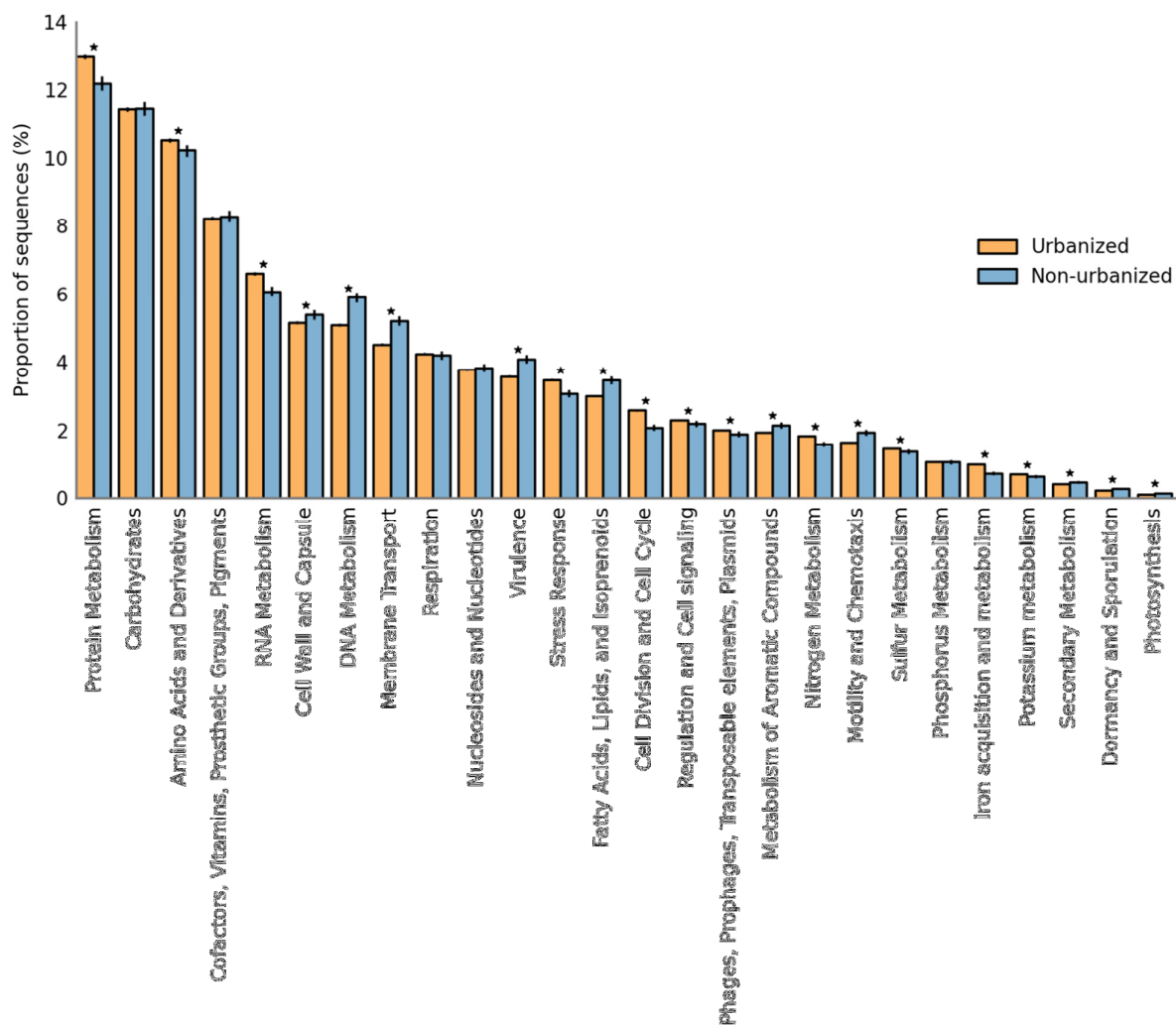


Figura 15- Classificação funcional nos subsistemas gênicos (SEED) para os metagenomas urbanizado e não urbanizado, obtido pelo MG-RAST. Valores em proporção de seqüências.

Considerando o banco de dados KEGG, 30,1% e 24,3% das seqüências dos metagenomas urbanizado e não urbanizado, respectivamente, foram classificadas nas categorias gênicas (Figura 16). Aproximadamente 60% das seqüências classificadas estão relacionadas com metabolismo, com uma alta ocorrência de seqüências para Metabolismo de Aminoácidos, Metabolismo de Carboidratos, Metabolismo de Energia (Fosforilação Oxidativa, Metabolismo de Metano, Nitrogênio e Enxofre), Metabolismo de Nucleotídeos e Metabolismo de Cofatores e Vitaminas. A categoria de Processamento da Informação Genética (Replicação e Reparo, Transcrição e Tradução), foi representada por 16,7% das seqüências classificadas no metagenoma urbanizado e 18,4% no não urbanizado. Processamento da Informação Ambiental (Transporte de Membrana, Tradução de Sinal) foi

representado por 15,3% e 14,8% nos metagenomas urbanizado e não urbanizado, respectivamente. As categorias gênicas com diferença significativa entre os metagenomas foram Transporte de Membrana, Metabolismo de Cofatores e Vitaminas, Tradução, Replicação e Reparo, Crescimento e Morte Celular, Doenças Infecciosas, Sistema Circulatório e Doenças do Sistema Imune (Figura 17).

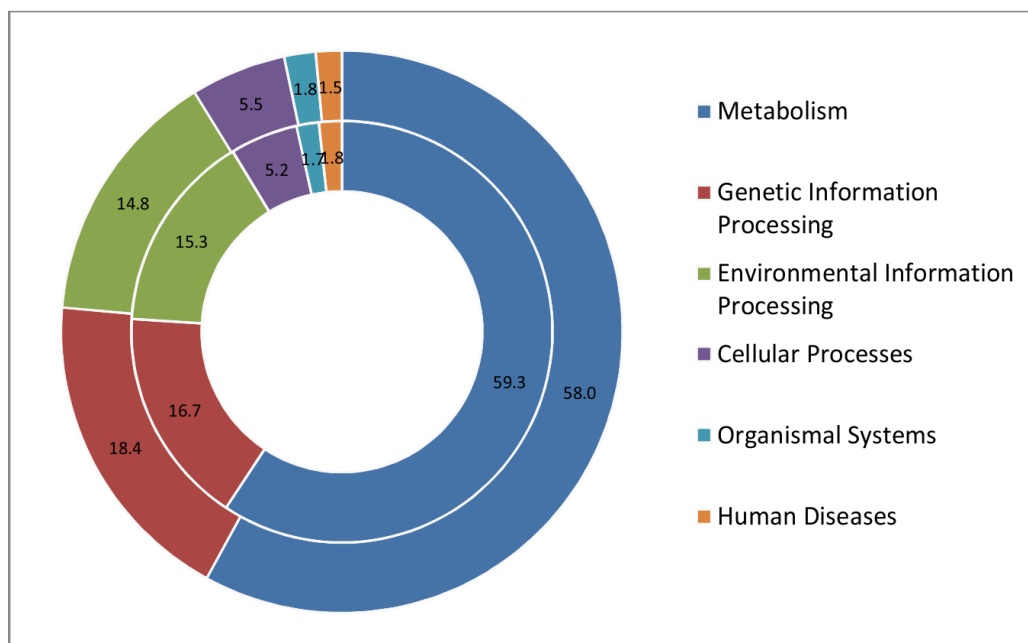


Figura 16- Classificação funcional nas categorias gênicas do KEGG, obtido pelo MG-RAST. Círculo interno- Metagenoma urbanizado. Círculo externo- Metagenoma Não urbanizado. Valores em proporção das sequências.



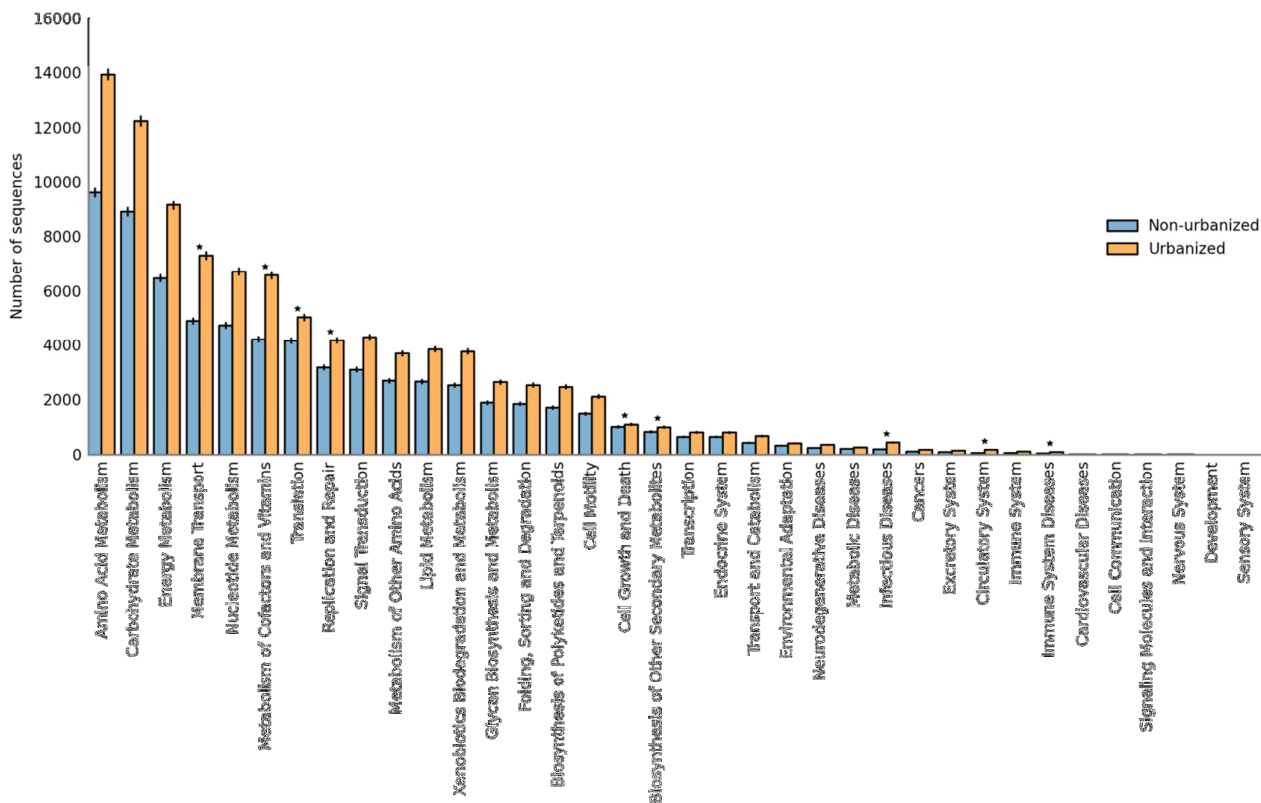


Figura 17- Classificação funcional nas categorias gênicas (KEGG) para os metagenomas urbanizado e não urbanizado, obtido pelo MEGAN. Valores em número de seqüências.

A descarga de compostos xenobióticos nas águas é uma das principais consequências do fenômeno de urbanização, portanto, foram analisadas especificamente as seqüências presentes na categoria de metabolismo o que permitiu identificar as transformações biogeoquímicas que possivelmente estavam sendo executadas pelos micro-organismos nesses ambientes. Adicionalmente, devido à alta incidência de micro-organismos potencialmente patogênicos no ambiente urbanizado (Figura 7 e 8, Figura 13 e 15 e Tabela 5 ), também foi investigado a possível virulência desses micro-organismos e a maneira como respondem à situação de estresse. Sendo assim, as análises seguintes focaram nas categorias funcionais, obtidas pelos bancos de dado KEGG e SEED, que pudessem ser relevantes para o processo de urbanização e estatisticamente diferente entre os dois ambientes, sendo elas: genes “housekeeping” (metabolismo de proteína, RNA e DNA), virulência, resposta ao estresse e metabolismo de energia (metano, nitrogênio e enxofre).

**Genes “housekeeping”** - O Metabolismo de Proteína representou o maior número de sequência/proporção em ambos os metagenomas (Figura 15). Este subsistema foi dividido em biossíntese de proteínas (ribossomo SSU bacteriano, aminoacetilação de tRNA) e processamento e modificação de proteínas. O metagenoma urbanizado teve maior número de sequências relacionados com essas funções (Figura 18A e APÊNDICE A). Considerando o metabolismo de RNA, a maioria das sequências foram classificadas em processamento e modificação de RNA (metilação RNA, processamento de tRNA) seguido por transcrição (RNA polimerase bacteriana, fatores de transcrição) e novamente um maior número de sequências estavam presente no metagenoma urbanizado (Figura 18B e APÊNDICE B). Para o metabolismo de DNA, também houve maior número de sequências anotadas no metagenoma urbanizado para replicação, reparo de DNA e proteínas estruturais de DNA (Figura 18C e APÊNDICE C).

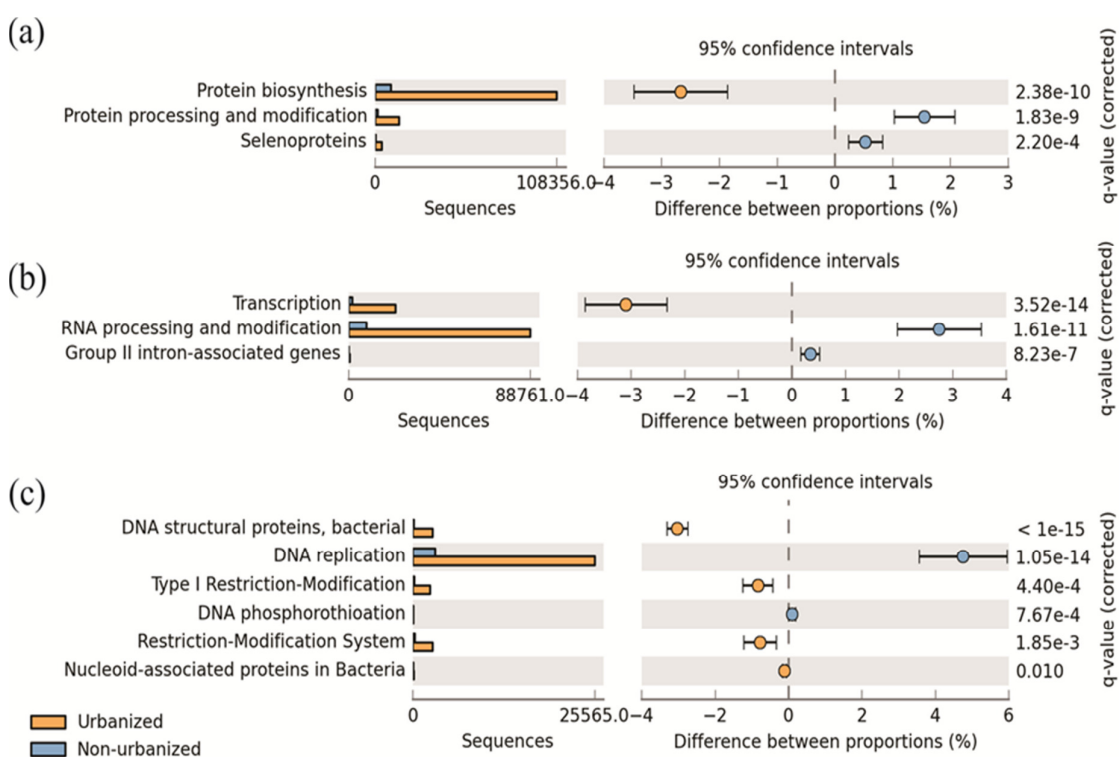


Figura 18- Classificação das sequências metagenômicas (urbanizada e não urbanizada) nos subsistemas Metabolismo de Proteína (A) Metabolismo de RNA (B) e Metabolismo de DNA (C), obtidos através do SEED.

**Virulência e Resposta ao Estresse** - Houve um número aumentado de sequências classificadas para resistência a antibióticos e compostos tóxicos no

metagenoma urbanizado (Figura 19A). Também houve um grande número de sequências que codificam proteínas como fosfato acetiltransferase, proteína de resistência a cobalto-zinco-cádmio, sistema de efluxo de cátion, sistema de efluxo RND (APÊNDICE D). Considerando a resposta ao estresse, houve um grande número de sequências classificadas como choque térmico (“heat shock”), estresse ácido e periplasmático no metagenoma urbanizado (Figura 19B) e houve uma abundância de peroxidases, chaperona, fatores sigma, arginina descarboxilase (APÊNDICE E).

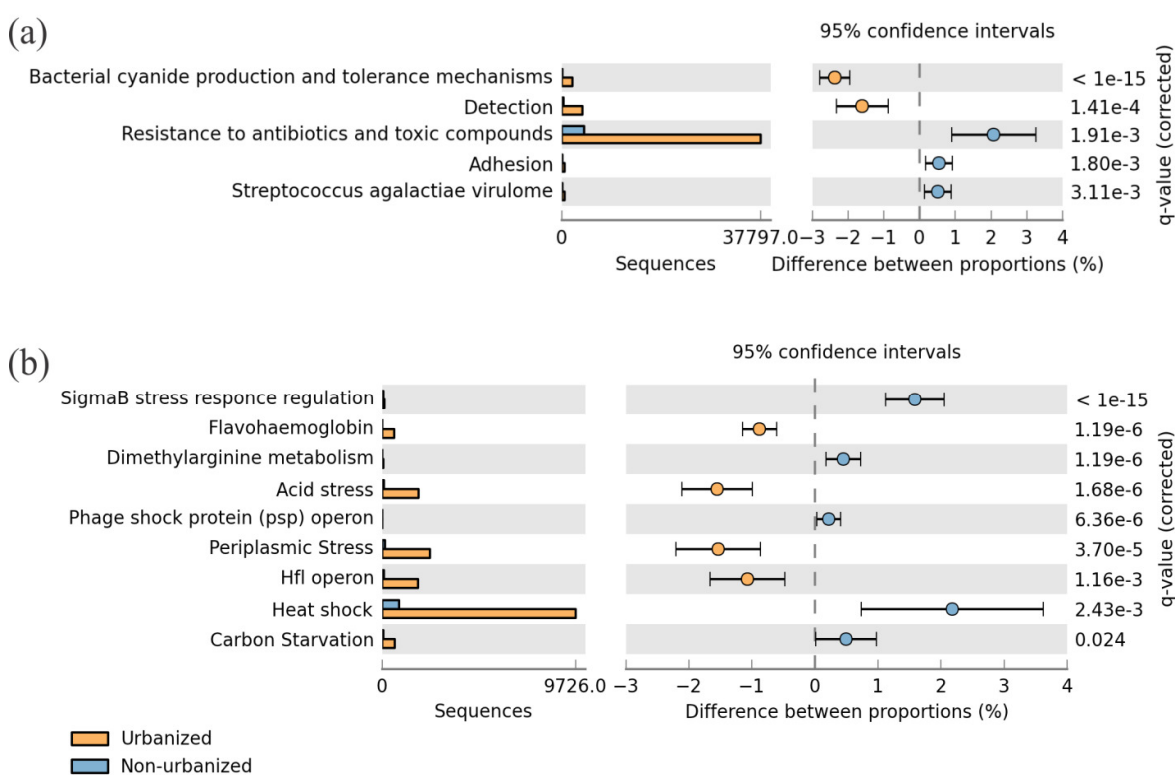


Figura 19- Classificação das sequências metagenômicas (urbanizada e não urbanizada) nos subsistemas Virulência (A) e Resposta ao Estresse (B), obtidos através do SEED.

**Metabolismo de energia (metano, nitrogênio e enxofre)** - No metabolismo de metano, a biossíntese do metano vindo do formaldeído e a conversão do formaldeído em compostos com 3 e 2 carbonos (C2 e C3) foram representados por sequências anotadas nos dois metagenomas. Entretanto, houve maior número de sequências codificando enzimas envolvidas com a oxidação do formaldeído, vindo do metano, em CO<sub>2</sub> como fonte de energia, no metagenoma urbanizado (Tabela 7). Os passos que compõem o metabolismo do nitrogênio foram observados nos dois

metagenomas, porém um maior número de sequências relacionadas aos principais processos do ciclo do nitrogênio (amonificação, nitrificação e denitrificação) foi observado no metagenoma urbanizado (Tabela 8). Considerando o metabolismo de enxofre, a anotação das sequências relevantes para esse metabolismo revelou a presença de genes envolvidos à conversão de sulfato em adenililsulfato e a posterior geração de H<sub>2</sub>S vindo do sulfito. A conversão de H<sub>2</sub>S em acetato também foi representada. Esses últimos processos tiveram maior número de sequências anotadas no metagenoma urbanizado (Tabela 9).

Tabela 7- Sequências anotadas para metabolismo de metano no metagenoma urbanizado e não urbanizado, obtido através do KEGG.

Via	Urbanizado	Não urbanizado
Acetate -> Acetyl-CoA	151	133
Acetyl-CoA -> Pyruvate	20	62
Pyruvate -> Phosphoenolpyruvate	145	113
2- Phospho-D-glycerato -> Phosphoenolpiruvato	111	99
2- Phospho-D-glycerato -> 3-Phospho-D-glycerato	136	121
Oxalacetate -> L-Malate	60	47
3-Phospho-D-glycerato -> 3-Phosphonooxypiruvato	92	94
D-Fructose-1,6-biphosphate -> Dihydroxyacetone-phosphate	83	36
D-Fructose-1,6-biphosphate -> D-Fructose-6-phosphate	58	28
D-Fructose-6-phosphate -> D-Fructose-1,6-biphosphate	54	83
D-Fructose-6-phosphate -> D-Arabino-Hex-3-ulose 6-phosphate	1	3
Dihydroxyacetone -> Dihydroxyacetone-phosphate	1	1
D-Xilulose-5P -> D-Glyceraldeyde-3P	1	7
D-Arabino-Hex-3-ulose 6-phosphaten -> Formaldehyde	3	5
Phosphoenolpyruvate -> Oxaloacetate	135	54
Oxaloacetate -> L-Malate	60	47
L-Malate -> Malyl-CoA	2	2
Glyoxylate -> Glicine	10	30
Glicine -> L-Serine	108	95
L-Serine -> Hydroxypyruvate	10	30
Hydroxypyruvate -> D-Glycerate	21	7
D-Glycerate -> 2- Phospho-D-glycerato	12	6
5,10-Methylene-tetrahydrofolate -> 5-Methyl-tetrahydrofolate	59	31
Trimethylamine -> Dimethylanine	1	0
Trimethylamine -> Trimethylamine N-oxide	1	1
Methylamine -> Formaldehyde	7	4
Acetyl-CoA -> CO	0	1
CO -> CO <sub>2</sub>	54	95
CO <sub>2</sub> -> CO	0	17
CO <sub>2</sub> -> Formyl-Methanofuran(MFR)	8	23

Formate -> CO <sub>2</sub>	289	159
H <sup>+</sup> -> H <sub>2</sub>	11	5
H <sub>2</sub> -> H <sup>+</sup>	17	12
Formyl-MFR -> N5-Formyl-THMPT	1	4
Formaldeyde -> Formate	1	1
S-Hydroxy-methyl-glutathione -> S-Formyl-glutathione	32	15
S-Formyl-glutathione -> Formate	9	4
5,10- Methenyl-THMPT -> N5-Formyl-THMPT	0	4
5,10- Methenyl-THMPT -> 5,10- Methylene-THMPT	0	1
3-Phosphono-oxypyruvate -> 3-Phospho-serine	79	30
3-Phospho-serine -> L-Serine	65	19
5,10- Methylene-THMPT -> 5- Methyl-THMPT	2	8
Acetate -> Acetylphosphate	82	38
Acetylphosphate -> Acetyl-CoA	95	27
5- Methyl-THMPT -> Methyl- CoM	0	8
Phosphoenolpyruvate -> (2R)-Phosphosulfolactate	1	0
(2R)-Phosphosulfolactate -> (2R)-3-Sulfolactate	5	1
(2R)-3-Sulfolactate -> 3-Sulfopyruvate	1	2
3-Sulfopyruvate -> Sulfoacetaldeyde	0	7
Methyl- CoM -> Methane	3	6
Methane -> Methanol	13	4
Methanol -> Formaldehyde	72	38
Methanol -> Formaldehyde	56	28

Tabela 8- Sequências anotadas para metabolismo de nitrogênio no metagenoma urbanizado e não urbanizado, obtido através do KEGG.

Via	Urbanizado	Não urbanizado
Ammonia -> Carbamoyl-P	5	3
Cyanate -> Carbamate	6	3
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -> CO <sub>2</sub>	90	38
Ammonia -> Cyclic amidines	15	9
Ammonia -> Glycine	56	45
Ammonia -> α Amino acids	8	9
Ammonia -> α Amino acids	0	5
Ammonia -> α Amino acids	27	29
Ammonia -> α Amino acids	0	1
Ammonia -> α Amino acids	94	33
L-aspartate -> Ammonia	4	0
L-aspartate -> Ammonia	35	19
L-aspartate -> L-asparagine	6	0
L-asparagine -> Ammonia	50	19
Ammonia -> L-Glutamate	46	39
Ammonia -> L-Glutamate	30	25
Ammonia -> L-Glutamate	20	9
Ammonia -> L-Glutamine	197	120
Ammonia -> L-Glutamine	5	4
Ammonia -> L-Glutamine	4	0

L-Glutamine -> L-Glutamate	317	233
L-Glutamine -> L-Glutamate	317	233
L-Glutamine -> L-Glutamate	73	148
L-Glutamine -> L-Glutamate	118	51
$\alpha$ Amino acids -> Ammonia	10	18
$\alpha$ Amino acids -> Ammonia	25	17
Nitriles -> Ammonia	25	15
Formamide -> Ammonia	6	1
Hydroxylamine -> Ammonia	13	4
Hydroxylamine -> Nitrite	0	3
Nitrate -> Nitrite	2	3
Nitrate -> Nitrite	233	88
Nitrite -> Ammonia	94	32
Nitrite -> Ammonia	4	13
Nitrite -> Ammonia	5	3
Nitrite -> Nitric oxide	13	7
Nitric oxide -> Dinitrogen oxide	51	25
Dinitrogen oxide -> Nitrogen	9	8
Nitrogen -> Ammonia	46	27

Tabela 9- Sequências anotadas para metabolismo de enxofre no metagenoma urbanizado e não urbanizado, obtido através do KEGG.

Via	Urbanizado	Não urbanizado
Sulfate -> Adenylylsulfate (APS)	138	80
Adenylylsulfate (APS) -> 3'-Phosphoadenylylsulfate (PAPS)	15	29
3'-Phosphoadenylylsulfate (PAPS) -> Adenosine 3',5'-bisphosphate	0	3
3'-Phosphoadenylylsulfate (PAPS) -> Sulfite	34	22
Sulfite -> Adenylylsulfate	3	5
Sulfite -> Sulfate	6	1
Sulfite -> Sulfate	13	5
Sulfite -> H <sub>2</sub> S	101	44
Sulfite -> H <sub>2</sub> S	6	1
L-Serina -> O-Acetyl-L-Serina	64	34
O-Acetyl-L-Serina -> Acetato	121	95
L-Homoserine -> O-Acetyl-L-Homoserine	87	51
L-Homoserine -> O-Succinyl-L-Homoserine	6	5
O-Succinyl-L-Homoserine -> Cystathionine	12	22
Cystathionine -> L-Homocysteine	25	17

A Figura 20 ilustra as etapas das vias metabólicas do metano, nitrogênio e enxofre que foram representadas nos metagenomas urbanizado e não urbanizado, e retrata as interações que ocorreram entre estas vias e vias de metabolismo de outros compostos. No ciclo do nitrogênio a conversão da formamida em amônia libera o formato que é um dos compostos centrais do metabolismo do metano, ele

atua como intermediário da conversão do formaldeído em  $\text{CO}_2$ . Já o composto L-serina, com importância no ciclo do enxofre para a formação do acetato na presença sulfeto de hidrogênio, é um subproduto da via da serina que está inserida no metabolismo de metano.

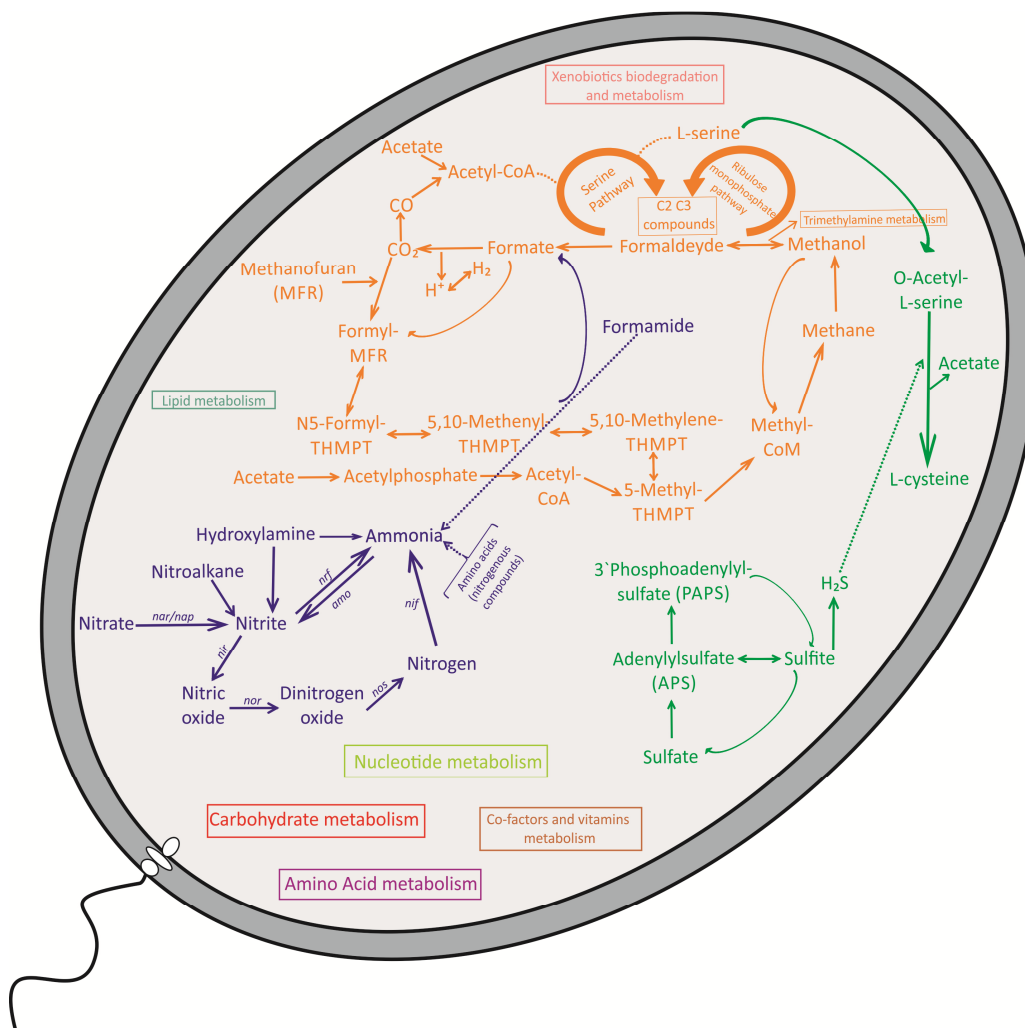


Figura 20- Vias do Metabolismo de Metano, Nitrogênio e Enxofre representando ambos os metagenomas, obtido do KEGG.

#### 5.3.4. Classificação taxonômica dos subsistemas funcionais

Com o objetivo de identificar quais são os organismos que estão contribuindo com os principais subsistemas gênicos que são influenciados pelo processo de urbanização, foi analisada a classificação taxonômica das sequências anotadas para os genes “housekeeping” (metabolismo de proteína, RNA e DNA), virulência,

resposta ao estresse e metabolismo de energia (metano, nitrogênio e enxofre) (Figura 21 e 22).

No metagenoma urbanizado foram identificados 19 grupos taxonômicos contribuindo com os subsistemas gênicos, sendo que Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Bacteroidetes foram os mais representados em todos os subsistemas exceto para resposta ao estresse que teve Betaproteobacteria como o mais representado seguido por Gamma e Alphaproteobacteria (Figura 21 e APÊNDICE F). É importante ressaltar o grande número de sequências (14187) filiadas à Betaproteobacteria. Os resultados também mostraram que o subsistema virulência representou a maior proporção de sequências para os grupos Gammaproteobacteria e Bacteroidetes. Os genes “housekeeping” e codificadores de proteínas pertencentes ao subsistema virulência foram representados na maioria dos grupos e dentre eles se distribuíram de maneira homogênea. Os filos Chlorobi, Spirochaetes, Viridiplantae, Planctomycetes, Acidobacteria, Chlamydiae e Chloroflexi representaram poucas sequências em apenas poucos subsistemas.

Já no metagenoma não urbanizado foram identificados 24 grupos taxonômicos contribuindo para os subsistemas gênicos (Figura 22 e APÊNDICE F). As classes Beta, Alpha e Deltaproteobacteria contribuíram com o maior número de sequências para metabolismo de RNA, proteína e nitrogênio, virulência e resposta ao estresse. Já os subsistemas metabolismo de DNA e enxofre foram representados por Beta, Alpha e Gammaproteobacteria. Para o metabolismo de metano foi observado Beta e Alphaproteobacteria seguido por Euryarcheota. Diferentemente do metagenoma urbanizado, o filo Euryarcheota teve uma alta representatividade nos subsistemas, principalmente nos genes “housekeeping” e no metabolismo de metano. Vale considerar também que a classe Epsilonproteobacteria foi representada apenas no metabolismo de proteína, o que não ocorreu no metagenoma urbanizado no qual essa classe foi representada de maneira mais homogênea em todos os subsistemas. Assim como no metagenoma urbanizado, os genes “housekeeping” e virulência tiveram uma representatividade similar na maioria dos grupos taxonômicos. Os grupos com poucas sequências foram Opisthokonta, Deinococcus-Thermus, Viridiplantae, Epsilonproteobacteria, Chlorobi, Spirochaetes, Gemmatimonadetes e Thaumarchaeota, sendo que Opisthokonta, Deinococcus-Thermus, Gemmatimonadetes, Thaumarchaeota e Nitrospirae foram exclusivos do metagenoma não urbanizado.



## Urbanizado

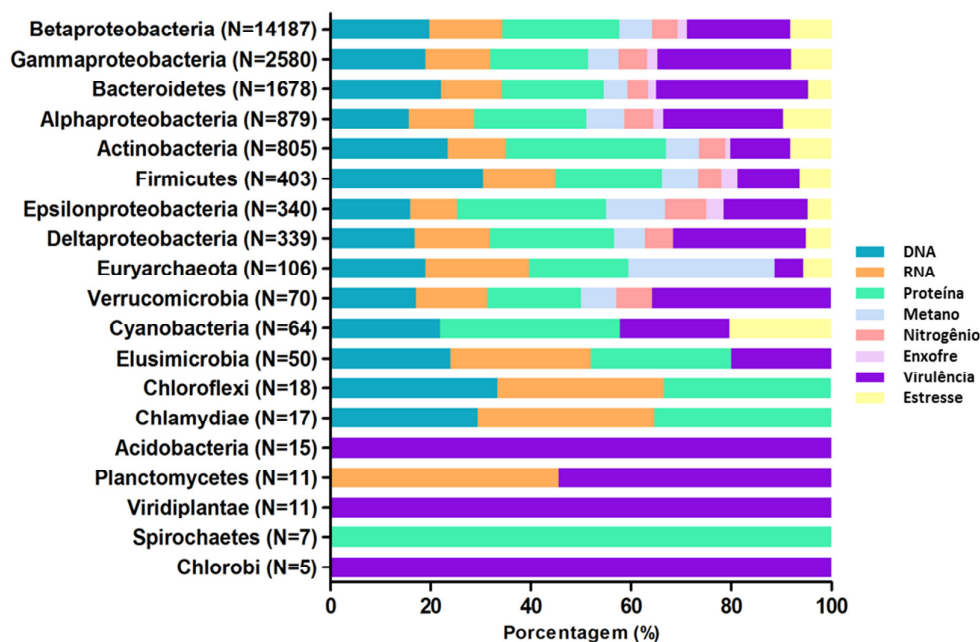


Figura 21- Contribuição dos diferentes grupos taxonômicos para os subsistemas gênicos mais relevantes (Metabolismo de DNA, RNA, Proteína, Metano, Nitrogênio, Enxofre, Virulência e Resposta ao Estresse) no metagenoma urbanizado.

## Não urbanizado

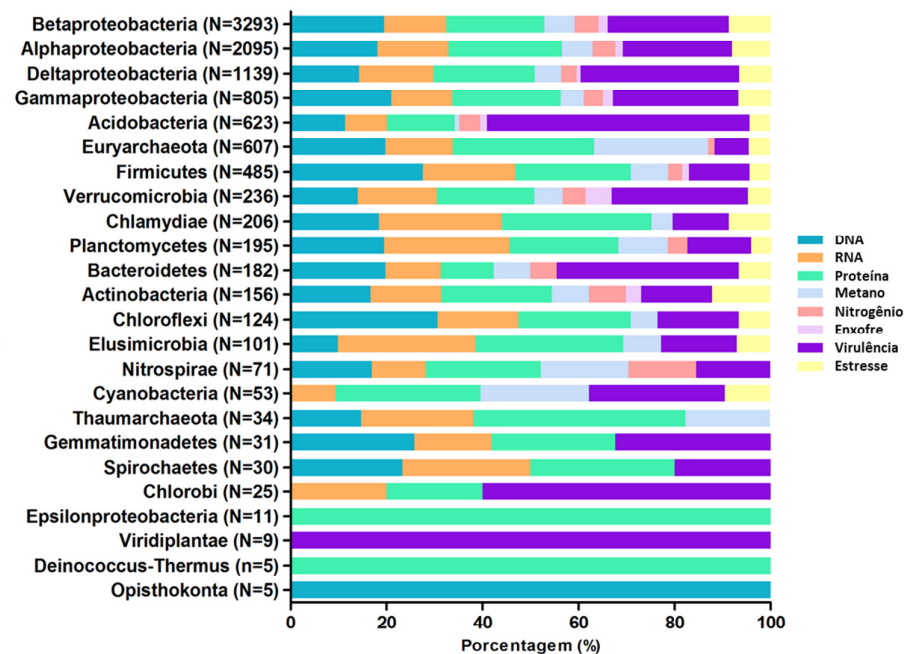


Figura 22- Contribuição dos diferentes grupos taxonômicos para os subsistemas gênicos mais relevantes (Metabolismo de DNA, RNA, Proteína, Metano, Nitrogênio, Enxofre, Virulência e Resposta ao Estresse) no metagenoma não urbanizado.

#### 5.4. DISCUSSÃO

O processo de urbanização associado a ações antrópicas representa importante ameaça para os ecossistemas aquáticos já que esse recurso está sendo reduzido devido à poluição (UNESCO, 2003). A descarga de compostos xenobióticos, como principal consequência do fenômeno de urbanização, altera as características biológicas desses ambientes levando a modificações na comunidade microbiana. Alguns estudos já investigaram o impacto da urbanização nos ecossistemas de água doce, porém eles focaram na poluição química (NEAL et al., 1997; PAUL e MAYER, 2001), modificação de nutrientes (HENJUM et al., 2009; HESSEN, HENRIKSEN e SMELHUS, 1996; HOARE, 1984; KROON et al., 2012; MEYBECK, 1998; USGS, 1999; WERNICK, COOK e SCHREIER, 1998), densidade de micro-organismos (KENZAKA et al., 2001; YAMAGUCHI, KENZAKA e NASU, 1997) e contaminação com patógenos (GONZALEZ, PARANHOS e LUTTERBACH, 2010; HIGGINS et al., 2005; SAVICHTCHEVA, OKAYAMA e OKABE, 2007). Até o momento, um estudo que apresente uma descrição global de como a urbanização afeta a comunidade microbiana não foi realizado. Assim o presente trabalho utilizou a metodologia de metagenômica, a fim de apresentar um perfil taxonômico e funcional detalhado dos micro-organismos de uma área poluída comparando-os com a área preservada de um córrego urbano.

O ambiente aquático é dominado por micro-organismos, considerando a biomassa e biodiversidade (WHITMAN, COLEMAN e WIEBE, 1998; ZINGER, GOBET e POMMIER, 2012). As bactérias são os procariotos mais abundantes e mais estudados destes ecossistemas. Nossos resultados mostraram a prevalência desse domínio nos metagenomas aquático urbanizado e não urbanizado (Figura 10). O predomínio de *Bacteria* não é exclusivo de ambientes aquáticos (ELOE et al., 2011; GHAI et al., 2011; KISAND et al., 2012; KRISTIANSSEN et al., 2011; VENTER et al., 2004; SMITH et al. 2012), tendo sido também observado em estudos metagenômicos de outros ambientes como mangue (ANDREOTE et al., 2012), solo (DELMONT et al., 2012), corpo humano (THE HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012) e recifes de corais (BRUCE et al., 2012). As *Archaea* são organismos considerados extremófilos devido a sua capacidade de habitar locais com altas temperaturas, salinidade e acidez, já que possuem modificações na sua membrana celular que permite a sobrevivência nesses ambientes adversos

(ALBERS et al., 2000). Entretanto, usando metodologias independentes de cultivo, archaeas também já foram encontradas em ambientes não extremos e até mesmo associadas ao corpo humano (cavidade bucal e trato gastrointestinal) e podem desempenhar papel importante nos ciclos biogeoquímicos ou na manutenção do equilíbrio homeostático do hospedeiro, como outros componentes da microbiota residente (AUGUET, BARBERAN e CASAMAYOR, 2010; BORREL et al., 2012; DELONG, 1998; DRIDI, RAOULT e DRANCOURT, 2011). Nossos resultados corroboram com esses estudos já que *Archaea* representou 2,9% dos micro-organismos identificados no metagenoma não urbanizado (Figura 10), embora seu papel ecológico não tenha sido evidenciado.

É importante mencionar que houve uma porcentagem significativa de sequências nos dois metagenomas estudados que não foi similar a nenhuma informação depositada nos bancos de dados. Esse valor foi maior no metagenoma não urbanizado (aproximadamente 47%) indicando um potencial para a bioprospecção de genes e descoberta de novos organismos. Essa informação reforça a necessidade de estudos taxonômicos da comunidade microbiana já que uma grande diversidade de micro-organismos ainda é desconhecida. Entretanto, este não foi o foco do nosso estudo.

Uma diferença entre os táxons dominantes das regiões urbanizadas e não urbanizadas do córrego foi observada. Ambos tiveram a prevalência do filo Proteobacteria, porém divergiram com relação aos outros filios (Figura 11). A prevalência de Proteobacteria está de acordo com estudos anteriores que mostram que esse é um dos grupos microbianos mais bem-sucedidos do planeta, sendo um filo muito estudado (RAPPÉ e GIOVANONI, 2003; STACKEBRANDT, MURRAY e TRUPER, 1988). No metagenoma urbanizado as classes Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria tiveram um grande número de sequências anotadas, assim como os filios Bacteroidetes, Firmicutes e Actinobacteria (Figura 11 e 12). Estes grupos taxonômicos possuem bactérias tipicamente aquáticas do mesmo modo que os filios Acidobacteria e Verrucomicrobia, que foram os predominantes do metagenoma não urbanizado (Figura 11). Estudos já relataram a presença desses grupos em rios (GHAJ et al., 2011; KRISTIANSSON et al., 2010), lagos (FERRER et al., 2011; ZWART et al., 2002), águas salinas (ELOE et al., 2011; KISAND et al., 2012; KIRCHMAN, COTTRELL e LOVEJOY, 2010) e aquíferos (HEMME et al., 2010; SMITH et al., 2012).

Entretanto, a diferença observada entre os dois metagenomas pode ser explicada pelo processo de urbanização. Sabe-se que através da urbanização uma grande quantidade de esgoto não tratado com fezes de humanos e outros animais bem como compostos xenobióticos são despejados em ambientes lóticos (PAUL e MEYER, 2001). Todos os grupos super-representados no metagenoma urbanizado (Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes) são membros da microbiota humana de outros animais, especialmente do trato gastrointestinal (GILL et al., 2006; QIN et al., 2010; THE HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012), e podem estar presentes na água através do despejo de esgoto nesse ambiente. Assim, a pressão seletiva exercida pelo esgoto descarregado nas águas urbanas pode estar sendo a responsável por selecionar estes micro-organismos que foram super-representados no ambiente urbanizado. Outro resultado que indica a ação de forças evolutivas no ambiente urbanizado é a especificidade desse metagenoma. Houve um grande número de sequências anotadas para poucos filos especializados no metagenoma urbanizado, como Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes. Ao contrário do que ocorreu no metagenoma não urbanizado, no qual houve uma distribuição equitativa de quase todos os filos bacterianos (exceto para a grande prevalência de Proteobacteria) (Figura 11).

Ainda considerando o perfil taxonômico dos metagenomas aquáticos, foram avaliados os gêneros com diferença significativa entre os ambientes, bem como as espécies prevalentes de cada um deles. No metagenoma não urbanizado, os gêneros mais anotados foram *Geobacter*, *Candidatus Solibacter*, *Bradyrhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Magnetospirillum* e *Clostridium* (Figura 13), estes são membros dos grupos Acidobacteria, Deltaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Firmicutes, e são caracterizados como bactérias de vida livre, amplamente distribuídos do solo a sedimentos aquáticos (FLIES, PEPLIES E SCHÜLER, 2005; GAGE, 2004; LARIMER et al., 2004; MAHADEVAN, PALSSON e LOVLEY, 2011). O resultado das espécies prevalentes (Tabela 6) corrobora com o dado dos gêneros enriquecidos, que compartilham os mesmos grupos taxonômicos. As espécies e os gêneros super-representados no ambiente não urbanizado, bem como os micro-organismos comuns entre os dois ambientes estudados são ubíquos em água e solo e possuem a importante característica de atuarem na manutenção dos ecossistemas. É importante considerar que a área não urbanizada do córrego é

próxima a nascente e nesse local a água é rasa e está em constante mistura com o solo. Assim, essa observação corrobora com os resultados obtidos de que micro-organismos nessa área são tipicamente encontrados em solos e sedimentos.

Além disso, nossos resultados mostraram alta incidência de gêneros e espécies com grande potencial patogênico no ambiente urbanizado. Os gêneros enriquecidos *Burkholderia*, *Escherichia*, *Shigella*, *Bacteroides*, *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Vibrio* (Figura 13) tem pelo menos, uma espécie que foi mais abundante no ambiente urbanizado (Tabela 5). A maioria dessas bactérias está relacionada com doenças que afetam seres humanos e outros animais. *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* e *Shigella dysenteriae* são membros da família *Enterobacteriaceae* e compartilham algumas características importantes, fazem parte da microbiota gastrointestinal de mamíferos e outros animais, mas também podem ser encontrados na água e solo (HSU et al., 2011; NATARO e KAPER, 1998). Muitos estudos chegaram a resultados similares, mostrando a incidência desses potenciais patógenos em ambientes aquáticos com diferentes níveis de impacto pela urbanização, inclusive através da técnica de PCR muitos desses micro-organismos já foram identificados nessa mesma área de estudo, como abordado na seção 4 (GARCÍA-ALJARO et al., 2005; GONZALEZ, PARANHOS e LUTTERBACH, 2010; HIGGINS et al., 2005; IBEKWE, MURINDA e GRAVES, 2011; KUMAR, TRIPATHI, e GARG, 2012; MUNIESA et al., 2006; SAVICHTCHEVA, OKAYAMA e OKABE, 2007; WALTERS, THEBO e BOEHM, 2011). Outro membro da microbiota residente humana que foi mais abundante no ambiente urbanizado são os *Bacteroides* (bastonetes Gram negativos anaeróbios obrigatórios tipicamente intestinais, predominantes no cólon). Sua presença em altos níveis na água pode ter relação com o fenômeno do enriquecimento do ambiente com dejetos intestinais humanos e de animais domésticos. Além disso, devido à sua característica anoxibiótica a viabilidade destas bactérias, consideradas os anaeróbios mais frequentemente associados a infecções anaeróbias em seres humanos, nos ambientes aquáticos indica contaminação recente (FIKSDAL et al., 1985; WEXLER, 2007).

Ainda outros potenciais patógenos observados com alta frequência no ambiente urbanizado foram *Burkholderia mallei*, *Burkholderia cenocepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Vibrio Cholerae*. Estas bactérias podem ser encontradas em diferentes nichos ecológicos, porém em

contato com hospedeiros potenciais e quando expressando fatores de virulência podem causar severas doenças para humanos (COENYE e LIPUMA, 2003; MCCONNELL, ACTIS e PACHÓN, 2012; VALÉRIO, CHAVES e TENREIRO, 2010). Assim, os resultados desse estudo indicam que esses micro-organismos com importância para a saúde humana e que foram mais abundantes no ambiente urbanizado podem ser oriundos do escoamento urbano. Segundo a UNESCO (2003), áreas urbanas sem gestão de resíduos se tornam ambientes perigosos para a vida, sendo uma ameaça para a saúde da população já que esse ambiente pode atuar como reservatório para a aquisição de patógenos. Anualmente 5 milhões de mortes ocorrem devido a essas doenças sendo que 50% são causadas por infecções bacterianas intestinais (FENWICK, 2006; SCHWARZENBACH et al., 2006). Ressalta-se ainda que muitas dessas espécies já foram relacionadas com resistência a múltiplas drogas antimicrobianas (GARCIA-ARMISEN et al., 2011; MCCONNELL, ACTIS e PACHÓN, 2012; SACK et al., 1997; SOUZA et al., 2000; YU et al., 2012).

Um dado importante associado à potencial patogenicidade dos micro-organismos amostrados pela análise do metagenoma do ambiente urbanizado, foi a anotação de muitas sequências relacionadas a virulência microbiana (Figura 19A, APÊNDICE D). Dentre essas sequências destaca-se o agrupamento de genes relacionados à resistência a antibióticos e compostos tóxicos. Houve muitas sequências codificadoras dos determinantes da resistência a antimicrobianos (beta-lactamase, DNA girase, topoisomerase, sistemas de efluxo RND, proteínas de resistência acriflavina) (APÊNDICE D). As proteínas beta-lactamases foram o primeiro mecanismo descrito de resistência a penicilina. Essas enzimas tem a capacidade de clivar o anel  $\beta$ -lactâmico desse antibiótico levando a sua inativação (SALYERS e WHITT, 2005). A grande incidência de DNA girases e topoisomerasas IV pode sugerir resistência a quinolonas já que mutações nessas proteínas fazem com que o mecanismo de ação das quinolonas seja afetado conferindo resistência a esse antibiótico (WONG e KASSEN, 2011). As proteínas de resistência acriflavina são sistemas de efluxo de drogas pertencente à superfamília RND. Esses sistemas estão associados com resistência a múltiplos antibióticos em bactérias patogênicas gram-negativas como exemplo *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa* e *Salmonella entérica* (SEEGER et al., 2008). Zhang e seus colaboradores (2009) fizeram uma ampla revisão na qual

relatam diversos estudos que identificaram micro-organismos resistentes à antimicrobianos em ambiente aquático bem como a presença dos genes que conferem essa resistência. Alguns estudos metagenômicos também foram realizados com o objetivo de caracterizar o resistoma de ambientes aquáticos (KRISTIANSSON et al., 2011; ZHANG, ZHANG e YE, 2011). Mais uma vez nossos resultados enfatizam o risco que a contaminação das águas com escoamento urbano acarreta para a saúde da população. Estes sugerem que os micro-organismos potencialmente patogênicos encontrados no ambiente urbanizado possuem genes relacionadas com virulência, já que muitas sequências relacionadas a virulência foram anotadas para esse ambiente. Essas sequências foram principalmente filiadas a Betaproteobacterias, Gammaproteobacterias e Bacteroidetes (Figura 21 e APÊNDICE F). Como já foi reportado as bactérias patogênicas encontradas nesse metagenoma fazem parte desses grupos taxonômicos (Figura 11 e Tabela 6).

Na análise do subsistema gênico virulência, também foi possível identificar grande número de sequências relacionadas com resistência a metais, como cobalto, zinco e cádmio, assim como sistemas de efluxo de cátions (APÊNDICE D) que são normalmente associados ao efluxo de cobre e prata (FRANKE et al., 2003). Vários estudos sugerem que a contaminação por metais em ambientes naturais pode ter um papel importante na manutenção e proliferação de genes codificadores de proteínas relacionadas a resistência aos antibióticos através dos fenômenos de co-resistência (diferentes genes de resistência com localização próxima no genoma, formando as chamadas ilhas de resistência) ou resistência cruzada (o mesmo gene responsável por resistência a metais e antibióticos) (ALONSO, SANCHEZ e MARTÍNEZ, 2001; BAKER-AUSTIN et al., 2006). Dessa maneira, a pressão seletiva exercida pelos antibióticos não precisa necessariamente estar ocorrendo no ambiente para que os genes da resistência se disseminem. Assim, os resultados indicam que o problema de saúde pública relacionado à urbanização desse córrego pode estar sendo potencializado.

As bactérias têm colonizado com sucesso vários nichos do planeta e nesse conjunto vasto de ambientes são expostas a diversas condições de estresse ambiental como mudanças na temperatura, pH, osmolaridade, radiação, concentrações de nutrientes e toxinas. A descarga de esgoto e compostos xenobióticos pode então, ser considerada uma condição de estresse no ambiente

urbanizado do córrego, já que, como mostrado anteriormente, há uma alteração na concentração de nutrientes nesse ambiente que acarretou uma mudança na microbiota local com relação à região não urbanizada. Essa pressão seletiva pode levar a permanência de genes cujos produtos são necessários para a sobrevivência das bactérias ao estresse (MARLES-WRIGHT e LEWIS, 2007). No metagenoma urbanizado foi observado grande número de sequências codificando fatores sigmas, catalases, peroxidases e chaperonas (APÊNDICE E). Os fatores sigmas são os reguladores chave para a resposta a qualquer tipo de estresse em *E. coli* e outras Gammaproteobacteria (WEBER et al., 2005; HENGGE, 2009). Já as catalases e peroxidases estão associadas ao estresse oxidativo (ZAMOCKY, FURTMÜLLER e OBINGER, 2008) enquanto as chaperonas ao estresse térmico, e também à alterações de pressão osmótica, salinidade e ácidos orgânicos (LINDQUIST e CRAIG, 1988; SUGIMOTO, ABDULLAH-AL-MAHIN e SONOMOTO, 2008). Considerando o ambiente urbanizado, os genes relacionados ao estresse estão presentes principalmente nos grupos taxonômicos Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Bacteroidetes (Figura 21), que no caso são os predominantes nesse ambiente. Sabe-se que na ausência de pressão seletiva os genes ambientalmente irrelevantes podem ser perdidos facilmente (FALKOWSKI, FENCHEL e DELONG, 2008). Dessa forma os resultados desse estudo sugerem que a pressão seletiva exercida pelo esgoto e compostos xenobióticos no ambiente estão selecionando as bactérias que possuem genes relacionados à resposta ao estresse o que as permitem estar presentes nessa condição ambiental.

As análises metagenômicas indicaram que a comunidade microbiana do ambiente urbanizado é adaptada às condições geoquímicas impostas pela urbanização, como evidenciado pela presença de genes de resposta ao estresse e também pela maior abundância de genes relacionados com metabolismo de nutrientes (metano, nitrogênio e enxofre) (Tabelas 7, 8 e 9 e APÊNDICE E). Uma das características mais bem estudadas dos micro-organismos é a sua atuação na ciclagem biogeoquímica de compostos crucial para o funcionamento de ecossistema (WHITMAN, COLEMAN e WIEBE, 1998). É importante considerar que no ambiente não urbanizado também houveram sequências anotadas para o metabolismo metano, nitrogênio e enxofre, porém os processos “chave” tiveram maior abundância de sequências no metagenoma urbanizado (Tabelas 7, 8 e 9).



O metabolismo de metano está incluído no ciclo global do carbono e é realizado principalmente por micro-organismos metanotróficos e metanogênicos. Os metanogênicos produzem metano como subproduto metabólico e são um grupo de anaeróbios estritos pertencentes ao filo Euryarchaeota do domínio *Archaea*. Estes micro-organismos são muito encontrados em sedimentos de lagos de água doce (BASTVIKEN et al., 2008; BORREL et al., 2011). Nossos resultados demonstraram que no ambiente não urbanizado foram detectadas muitas sequências do filo Euryarchaeota contribuindo com o metabolismo do metano, sugerindo que as archaeas têm contribuição efetiva no ciclo desse nutriente, o que corrobora com estudos prévios. (Figura 22). Também houve sequências representando o processo de metanogênese nos dois metagenomas. Entretanto quando há um aumento de matéria orgânica dissolvida (como no ambiente urbanizado), o processo de metanogênese é facilitado (BORREL et al., 2011). Já os micro-organismos metanotróficos consomem o metano como única fonte de carbono. A oxidação do metano pode ser um processo aeróbico ou anaeróbico. Os micro-organismos aeróbicos envolvidos são membros dos filos Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Verrucomicrobia (WARD et al., 2004; BORREL et al., 2011). Mais uma vez nossos resultados estão de acordo com estudos prévios já que houve um acúmulo de sequências codificando enzimas envolvidas com a oxidação do formaldeído, vindo do metano, em CO<sub>2</sub> no metagenoma urbanizado. Dessa maneira pode-se inferir que alguns micro-organismos estão usando este nutriente (abundante como consequência da urbanização) como única fonte de energia. Também foi possível detectar que as sequências relacionadas com o metabolismo de metano, estão vindo, em ambos os ambientes, dos filos supracitados (Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria e Verrucomicrobia) (Figura 21 e 22). Dessa maneira, a ação de micro-organismos metanotróficos tem uma importância significativa na redução da quantidade deste gás liberado na atmosfera da Terra já que os níveis de metano têm aumentado ao longo dos últimos 300 anos, e é discutido que isto é principalmente devido à atividade antrópica (WARD et al., 2004).

Considerando o metabolismo do nitrogênio, muitas sequências relacionadas às diferentes etapas do ciclo foram obtidas nos dois metagenomas. Porém, os processos principais (amonificação, nitrificação e desnitrificação) foram representados em maior número no metagenoma urbanizado. Estes resultados estão de acordo com os obtidos através da técnica da PCR no qual marcadores moleculares desses

processos e bactérias relacionadas ao ciclo do nitrogênio foram mais abundantes no ambiente urbanizado. Juntos, esses dados reforçam a atuação dos micro-organismos na metabolização dos compostos nitrogenados nos ambientes de estudo principalmente na área urbanizada. Como já foi relatado, nesse ambiente há um acúmulo de nutrientes dissolvido devido à descarga de matéria orgânica vinda principalmente dos esgotos domésticos e escoamento urbano, e esse acúmulo diferencial de nutrientes entre os dois ambientes está sendo um agente modulador da comunidade microbiana. Hemme e seus colaboradores (2010) também realizaram um estudo metagenômico de águas contaminadas, porém com metais pesados, e evidenciaram uma alta incidência de genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio.

Outro ciclo biogeoquímico representado nos metagenomas estudados foi o ciclo do enxofre, que está intimamente relacionado com os ciclos de carbono e nitrogênio. Os micro-organismos desempenham função importante no metabolismo de enxofre, já que o sulfato é assimilado como nutriente e reduzido a sulfito, o qual é incorporado a enzimas e aminoácidos contendo enxofre. As reações de redução e oxidação são extremamente importantes para a geração de energia metabólica. A redução dissimilatória de sulfato é um processo muito estudado e é realizado por micro-organismos redutores de sulfato (“sulfate-reducing microorganism”- SRM), membros do domínio *Bacteria* e *Archaea* (MUYZER e STAMS, 2008; ZHOU et al., 2011). Nossos resultados indicaram que o processo de redução do sulfato para  $H_2S$  foi representado em maior número no metagenoma urbanizado como forma de produção energética. O alto teor de matéria orgânica nesse ambiente pode justificar a maior representação dessa etapa do ciclo do enxofre no metagenoma urbanizado. Os resultados também mostraram que alguns filos bacterianos contribuíram com sequências relacionadas a esses processos, porém nenhuma sequência classificada no metabolismo de enxofre teve origem de micro-organismos do domínio *Archaea*.

Estudos anteriores mostraram que para sobreviverem às condições adversas impostas pela urbanização, seja através da síntese de fatores relacionados a virulência ou à resposta ao estresse, ou seja através da metabolização dos nutrientes em excesso no ambiente os micro-organismos precisam aumentar sua síntese proteica o que pode levar ao aumento da síntese de DNA e RNA (HUMAYUN, 1998; KRAMER, 2010; THAO e ESCALANTE-SEMERENA, 2011). Os resultados obtidos no perfil funcional do metagenoma urbanizado estão de acordo

com esses estudos já que houve maior acúmulo de genes “housekeeping” nesse ambiente quando comparado com o não urbanizado (Figura 18). É importante considerar também que estes genes estão representados em grandes quantidades nos grupos taxonômicos de maior prevalência no metagenoma urbanizado (Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria e Bacteroidetes) (Figura 21). Porém como são genes constitutivos essenciais para a vida dos micro-organismos (KREBS, GOLDSTEIN e KILPATRICK, 2011) também estão presente nos outros filos representados (Figura 21), bem como no metagenoma não urbanizado, mas em quantidade menor (Figura 18 e 22). Ainda relevante é a maior representação de genes relacionados com o reparo do DNA no metagenoma urbanizado. Esse pode ser mais um dos mecanismos usados pelos micro-organismos para diminuir ou anular os efeitos danosos do processo de urbanização sobre a comunidade microbiana.

## 5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo mostrou pela primeira vez a análise comparativa do perfil taxonômico e funcional da comunidade microbiana de um córrego que sofre com os impactos da urbanização. Os resultados puderam esclarecer e servem como um alerta de como as ações antrópicas modificam a dinâmica da comunidade microbiana e pode ser prejudicial à saúde humana. Dessa forma, este estudo enfatiza a necessidade de políticas públicas que minimizem a descarga de esgotos não tratados em águas urbanas, e que conscientizem a população das graves consequências que a poluição pode acarretar à vida humana.

## 5.6. CONCLUSÕES

- O ambiente não urbanizado possui uma distribuição relativamente homogênea dos grupos bacterianos com a predominância de Proteobacteria.

- O ambiente urbanizado é mais especializado, com muitas sequências concentradas nos filos como Proteobacteria (em abundância Betaproteobacteria e Gammaproteobacteria), Bacteroidetes e Firmicutes.

- Houve o predomínio de gêneros e espécies relacionados com patogenicidade no ambiente urbanizado.

- O perfil funcional sugeriu que os micro-organismos destes ambientes estão atuando no metabolismo de metano, nitrogênio e enxofre, principalmente na região urbanizada na qual grande número de sequências, codificadoras de proteínas que atuam nestes processos, foram identificadas.

- Foi possível observar que genes relacionados à virulência (resistência a antimicrobianos e metais) e resposta ao estresse estão disseminados no ambiente urbanizado, bem como os genes “housekeeping” que podem estar sendo essenciais para a sobrevivência nas condições adversas impostas pela urbanização.

## REFERÊNCIAS

Agência Nacional das Águas – ANA. Conjuntura dos Recursos Hídricos no Brasil. **Informe 2011**. 112 p.

ALBERS, S.V.; VAN DE VOSSENBERG, J.L.; DRIESSEN, A.J.; KONINGS, W.N. 2000. Adaptations of the archaeal cell membrane to heat stress. **Front Bioscience**, **5**: D813e20.

ALDER, A.C.; MCADELL, C.S.; GOLET, E.M.; IBRIC, S.; MOLNAR, E.; NIPALES, N.S.; GIGER, W.; 2001. Occurrence and fate of flouroquinolone, macrolide, and sulfanamide antibiotics during wastewater treatment and in ambient waters in Switzerland. **ACS Symposium Series**, **791**: 56-69.

ALONSO, A.; SÁNCHEZ, P.; MARTÍNEZ, J.L. 2001. Environmental selection of antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiology**, **3(1)**: 1-9.

AMANN, R.I.; BINDER, B.J.; OLSON, R.J.; CHISHOLM, S.W.; DEVEREUX, R.; STAHL, D.A. 1990. Combination of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations. **Applied and Environmental Microbiology**, **56**: 1919-1925.

AMANN, R.; FUCHS, B.M. 2008. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. **Nature Reviews Microbiology**, **6**: 339-348.

ANDREOTE, F.D.; JIMÉNEZ, D.J.; CHAVES, D.; DIAS, A.C.F.; LUVIZOTTO, D.M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELLA, C.C.; LOPEZ, M.V.; BAENA, S.; TAKETANI, R.T.; MELO, I.S. 2012. The microbiome of brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **PLoS ONE**, **7(6)**: e38600.

ARANDA, K.R.S.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETSKY, I.C.A. 2004. Evaluation of multiplex pcrs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, **42**: 5849-5853.

ARAYA, R.; TANI, K.; TAKAGI, N.; NASU, M. 2003. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent *in situ* hybridization and DGGE analysis. **FEMS Microbiology Ecology**, **43**: 111-119.

AUERBACH, E.A.; SEYFRIED, E.E.; MCMAHON, K.D. 2007. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. **Water Research**, **41**: 1143-1151

AUGUET, J.C.; BARBERAN, A.; CASAMAYOR, E.O. 2010. Global ecological patterns in uncultured Archaea. **The ISME Journal**, **4**: 182-190.

BAKER-AUSTIN, C.; WRIGHT, M.S.; STEPANAUSKAS, R.; MCARTHUR, J.V. 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. **TRENDS in Microbiology**, **14(4)**: 176-182.

BAQUERO, F.; NOMBELA, C. 2012. The microbiome as a human organ. **Clinical Microbiology and Infection**, **18**: 2-4.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J.L.; CANTÓN, R. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, **19**: 260-265.

BASTVIKEN, D.; COLE, J.J.; PACE, M.L.; VAN DE BOGERT, M.C. 2008. Fates of methane from different lake habitats: Connecting whole-lake budgets and CH<sub>4</sub> emissions. **Journal of Geophysical Research**, **113**: 1-13.

BERNHARD, A.E.; FIELD, K.G. 2000. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S Ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. **Applied and Environmental Microbiology**, **66(4)**: 1587-1594.

BESEMER, K.; PETER, H.; LOGUE, J.B.; LANGENHEDER, S.; LINDSTRÖM, E.S.; TRANVIK, L.J.; BATTIN, T.J. 2012. Unraveling assembly of stream biofilm communities. **The ISME Journal**, **6**: 1459-1468.

BÖCKELMANN, U.; MANZ, W.; NEU, T.R.; SZEZYK, U. 2000. Characterization of the microbial community of lotic organic aggregates ('river snow') in the Elbe River of Germany by cultivation and molecular methods. **FEMS Microbiology Ecology**, **33**: 157-170.

BOEHM, A.B.; FUHRMAN, J.A.; MRSE, R.D.; GRANT, S.B. 2003. Tiered approach for identification of a human fecal pollution source at a recreational beach: Case study at Avalon Bay, Catalina Island, California. **Environmental Science & Technology**, **37**: 673-680.

BOOTH, B.D. 2005. Challenges and prospects for restoring urban streams: a perspective from the Pacific Northwest of North America. **Journal North American Benthological Society**, **24**: 724-737.

BORREL, G.; JÉZÉQUEL, D.; BIDERRE-PETIT, C.; MOREL-DESROSIERS, N.; MOREL, J-P.; PEYRET, P.; FONTY, G.; LEHOURS, A-C. 2011. Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems. **Research in Microbiology**, **162**: 832-847.

BORREL, G.; LEHOURS, A.C.; CROUZET, O.; JÉZÉQUEL, D.; ROCKNE, K.; KULCZAK, A.; DUFFAUD, E.; JOBLIN, K.; FONTY, G. 2012. Stratification of Archaea in the deep sediments of a freshwater meromictic lake: vertical shift from methanogenic to uncultured archaeal lineages. **PLoS ONE**, **7(8)**: e43346.

BOYD, E.F.; WANG, F.S.; WHITTAM, T.S.; SELANDER, R.K. 1996. Molecular Genetic Relationships of the Salmonellae. **Applied and Environmental Microbiology**, **62(3)**: 804-808.

BRION, N.; BILLEN, G. 2000. Wastewater as a source of nitrifying bacteria in river systems: the case of the River Seine downstream from Paris. **Water Resources Research**, **34**: 3213-3221.

BRUCE, T.; MEIRELLES, P.M.; GARCIA, G.; PARANHOS, R.; REZENDE, C.E.; MOURA, R.L.; FILHO, R.F.; CONI, E.O.C.; VASCONCELOS, A.T.; FILHO, G.A.; HATAY, M.; SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R.; DINSDALE, E.; THOMPSON, F.L. 2012. Abrolhos bank reef health evaluated by means of water quality, microbial diversity, benthic cover, and fish biomass data. **PLoS ONE**, **7(6)**: e36687.

BRÜMMER, I.H.M.; FEHR, W.; WAGNER-DÖBLER, I. 2000. Biofilm Community Structure in Polluted Rivers: Abundance of Dominant Phylogenetic Groups over a Complete Annual Cycle. **Applied and Environmental Microbiology**, **66(7)**: 3078-3082.

CHEN, H.; LI, X.; ZHU, S. 2012. Occurrence and distribution of selected pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments: a comparative study of regions in China with different urbanization levels. **Environmental Science and Pollution Research**, **19**: 2381-2389.

CHOTAR, M.; VIDOVA, B.; GODANY, A. 2006. Development of specific and rapid detection of bacterial pathogens in dairy products by PCR. **Folia Microbiologica (Praha)**, **51**:639-646.

CHOU, H.H.; HOLMES, M.H. 2001. DNA sequence quality trimming and vector removal. **Bioinformatics**, **17**: 1093-1104.

CIEŚLIŃSKI, H.; BIAŁKOWSKAA, A.; TKACZUK, K.; DŁUGOŁECKA, A.; KUR, J.; TURKIEWICZ, M. 2009. Identification and molecular modeling of a novel lipase from an Antarctic soil metagenomic library. **Polish Journal of Microbiology**, **58**: 199-204.

COENYE, T.; LIPUMA, J.J. 2003. Molecular epidemiology of Burkholderia species. **Frontiers in Bioscience**, **8**: 55-67.

COLE, J.R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R.J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A.S.; MCGARRELL, D.M.; MARSH, T.; GARRITY, G.M.; TIEDJE, J.M. 2008. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, **37**: D141-D145.

DAIMS, H., NIELSEN, J.L.; NIELSEN, P.H.; SCHLEIFER, K.H.; WAGNER, M. 2001. In situ characterization of Nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. **Applied and Environmental Microbiology**, **67(11)**: 5273-5284.

DANIEL, R. 2005. The metagenomics of soil. **Nature Reviews Microbiology**, **3**: 470-478.

DANIELSON, R.E.; COOPER, R.C. 2007. Detection of Bacterial Pathogens in Wastewater and Sludge. In: HURST, C.J., CRAWFORD, R.L., GARLAND, J.L., LIPSON, D.A., MILLS, A.L. AND STETZENBACH, L.D. **Manual of Environmental Microbiology** Washington: American Society for Microbiology.

D'COSTA, V.M.; GRIFFITHS, E.; WRIGHT, G.D. 2007. Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. **Current Opinion in Microbiology**, **10**: 481-489.

DELMONT, T.O.; ROBE, P.; CECILLON, S.; CLARK, I.M.; CONSTANCIAS, F.; SIMONET, P.; HIRSCH, P.R.; VOGEL, T.M. 2011. Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity. **Applied and Environmental Microbiology**, **77(4)**: 1315-1324.

DELMONT, T.O.; PRESTAT, E.; KEEGAN, K.P.; FAUBLADIER, M.; ROBE, P.; CLARK, I.M.; PELLETIER, E.; HIRSCH, P.R.; MEYER, F.; GILBERT, J.A.; PASLIER, D.L.; SIMONET, P.; VOGEL, T.M. 2012. Structure, fluctuation and magnitude of a natural grassland soil metagenome. **The ISME Journal**, **6**: 1677-1687.

DELONG, E.F. 1998. Everything in moderation: Archaea as 'non-extremophiles'. **Current Opinion in Genetics & Development**, **8**: 649-654.

DINSDALE, E.A.; EDWARDS, R.A.; HALL, D.; ANGLY, F.; BREITBART, M.; BRULC, J.M.; FURLAN, M.; DESNUES, C.; HAYNES, M.; LI, L.; MCDANIEL, L.; MORAN, M.A.; NELSON, K.E.; NILSSON, C.; OLSON, R.; PAUL, J.; BRITO, B.R.; RUAN, Y.; SWAN, B.K.; STEVENS, R.; VALENTINE, D.L.; THURBER, R.V.; WEGLEY, L.; WHITE, B.A.; ROHWER, F. 2008. Functional metagenomic profiling of nine biomes. **Nature**, **452**: 629-633.

DONATO, J.J.; MOE, L.J.; CONVERSE, B.J.; SMART, K.D.; BERKLEIN, F.C.; MCMANUS, P.S.; HANDELSMAN, J. 2010. Metagenomic analysis of apple orchard soil reveals antibiotic resistance genes encoding predicted bifunctional proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, **76(13)**: 4396-440.

DRIDI, B.; RAOULT, D.; DRANCOURT, M. 2011. Archaea as emerging organisms in complex human microbiomes. **Anaerobe**, **17**: 56-63.

EIKELBOOM, D.H. 1975. Filamentous organisms observed in activated sludge. **Water Research**, **9**: 365-388.

ELOE, E.A.; FADROSH, D.W.; NOVOTNY, M.; ALLEN, L.Z.; KIM, M.; LOMBARDO, M.-J.; YEE-GREENBAUM, J.; YOOSEPH, S.; ALLEN, E.E.; LASKEN, R.; WILLIAMSON, S.J.; BARTLETT, D.H. 2011. Going deeper: Metagenome of a hadopelagic microbial community. **PLoS ONE**, **6**: e20388.

FALKOWSKI, P.G.; FENCHEL, T.; DELONG, E.F. 2008. The microbial engines that drive Earth's biogeochemical cycles. **Science**, **320**: 1034-1039.

FAORO, H.; GLOGAUER, A.; COUTO, G.H.; SOUZA, E.M.; RIGO, L.U.; CRUZ, L. M.; MONTEIRO, R.A.; PEDROSA, F.O. 2012. Characterization of a new Acidobacteria-derived moderately thermostable lipase from a Brazilian Atlantic Forest soil metagenome. **FEMS Microbiology Ecology**, **81**: 386-394



FENWICK, A. 2006. Waterborne infectious diseases – Could they be consigned to history? **Science**, **313**: 1077-1081.

FERRER, M.; GUAZZARONI, M-E.; RICHTER, M.; GARCÍA-SALAMANCA, A.; YARZA, P.; SUÁREZ-SUÁREZ, A.; SOLANO, J.; ALCAIDE, M.; VAN DILLEWIJN, P.; MOLINA-HENARES, M.A.; LÓPEZ-CORTÉS, N.; AL-RAMAHI, Y.; GUERRERO, C.; ACOSTA, A.; EUGENIO, L.I.; MARTÍNEZ, V.; MARQUES, V.; ROJO, F.; SANTERO, E.; GENILLOUD, O.; PÉREZ-PÉREZ, J.; ROSSELLÓ-MÓRA, R.; RAMOS, J.L. 2011. taxonomic and functional metagenomic profiling of the microbial community in the anoxic sediment of a sub-saline shallow lake (Laguna de Carrizo, Central Spain). **Microbial Ecology**, **62**: 824-837.

FIERER, N.; BREITBART, M.; NULTON, J.; SALAMON, P.; LOZUPONE, C.; JONES, R.; ROBESON, M.; EDWARDS, R.A.; FELTS, B.; RAYHAWK, S.; KNIGHT, R.; ROHWER, F.; JACKSON, R.B. 2007. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, **73(21)**: 7059-7066.

FIKSDAL, L.; MAKI, J.S.; LACROIX, S.J.; STALEY, J.T. 1985. Survival and detection of bacteroides spp., prospective indicator Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, **49(1)**: 148-150.

FLANAGAN, D.A.; GREGORY, L.G.; CARTER, J.P.; KARAKAS-SEM, A.; RICHARDSON, D.J.; SPIRO, S. 1999. Detection of genes for periplasmic nitrate reductase in nitrate respiring bacteria and in community DNA. **FEMS Microbiology Letters**, **177**: 263-270.

FLIES, C.B.; PEPLIES, J.; SCHÜLER, D. 2005. Combined approach for characterization of uncultivated magnetotactic bacteria from various aquatic environments. **Applied and Environmental Microbiology**, **71(5)**: 2723-2731.

FRANK, D.N.; PACE, N.R. 2008. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. **Current Opinion Gastroenterology**, **24**: 4-10.

FRANKE, S.; GRASS, G.; RENSING, C.; NIES, D.H. 2003. Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, **185(13)**: 3804-3812.

FUKUSHIMA, H.; TSUNOMORI, T.; SEKI, R. 2003. Duplex real-time SYBR Green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools. **Journal of Clinical Microbiology**, **41**: 5134-5146.

GAGE, D.J. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing Rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, **68(2)**: 280-300.

GARCIA, P.G.; SILVA, V.L.; DINIZ, C.G. 2011. Occurrence and antimicrobial drug susceptibility patterns of commensal and diarrheagenic Escherichia coli in fecal microbiota from children with and without acute diarrhea. **Journal of Microbiology**, **49**: 46–52.

GARCÍA-ALJARO, C.; MUNIESA, M.; BLANCO, J.E.; BLANCO, M.; BLANCO, J.; JOFRE, J.; BLANCH, A.R. 2005. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. **FEMS Microbiology Letters**, **246**: 55-65.

GARCIA-ARMISEN, T.; VERCAMMEN, V.; PASSERAT, J.; TRIEST, D.; SERVAIS, P.; CORNELIS, P. 2011. Antimicrobial resistance of heterotrophic bacteria in sewage-contaminated rivers. **Water Research**, **45**: 788-796.

GEETS, J.; COOMAN, M.; WITTEBOLLE, L.; HEYLEN, K.; VANPARYS, B.; DEVOS, P.; VERSTRAETE, W.; BOON, N. 2007. Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **75**: 211-221.

GEVERS, D.; KNIGHT, R.; PETROSINO, J.F.; HUANG, K.; MCGUIRE, A.L.; BIRREN, B.W.; NELSON, K.E.; WHITE, O.; METHE, B.A.; HUTTENHOWER, C. 2012. The Human Microbiome Project: A Community Resource for the Healthy Human Microbiome. **PLoS Biology**, **10(8)**: e1001377.

GHAI, R.; RODRIGUEZ-VALERA, F.; MCMAHON, K.D.; TOYAMA, D.; RINKE, R.; OLIVEIRA, T.C.S.; GARCIA, J.V.; MIRANDA, F.P.; HENRIQUE-SILVA, F. 2011. Metagenomics of the Water Column in the Pristine Upper Course of the Amazon River. **PLoS ONE**, **6**: e23785.

GILBERT, J.A.; DUPONT, C.L. 2011. Microbial Metagenomics: Beyond the Genome. **Annual Review of Marine Science**, **3**: 347-371.

GILBRIDE, K.A.; LEE, D.Y.; BEAUDETTE, L.A. 2006. Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. **Journal of Microbiological Methods**, **66**: 1-20.

GILL, S.R.; POP, M.; DEBOY, R.T.; ECKBURG, P.B.; TURNBAUGH, P.J.; SAMUEL, B.S.; GORDON, J.I.; RELMAN, D.A.; FRASER-LIGGETT, C.M.; NELSON, K.E. 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. **Science**, **312**: 1355-1359.

GILLER, P.S.; MALMQVIST, B. **The biology of stream and rivers**. New York: Oxford University Press, 1998.

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

GOMEZ-ALVAREZ, V.; TEAL, T. K.; SCHMIDT, T. M. 2009. Systematic artifacts in metagenomes from complex microbial communities. **The ISME Journal**, **3**: 1314-1317.

GONI-URRIZA, M.; CAPDEPUY, M.; ARPIN, C.; RAYMOND, N.; CAUMETTE, P.; QUENTIN, C. 2000. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteriaceae and Aeromonas spp. **Applied and Environmental Microbiology**, **66(1)**: 125-132.

GONZALEZ, A.M.; PARANHOS, R.; LUTTERBACH, M.S. 2010. Relationships between fecal indicators and pathogenic microorganisms in a tropical lagoon in Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, **164**: 207-219.

GOODWINA, K.D.; POBUDA, M. 2009. Performance of CHROMagar™ Staph aureus and CHROMagar™ MRSA for detection of Staphylococcus aureus in seawater and beach sand – Comparison of culture, agglutination, and molecular analyses. **Water Research**, **43**: 4802-4811.

GRANT, S.B.; PENDROY, C.P.; MAYER, C.L.; BELLIN, J.K; PALMER, C.J. 1996. Prevalence of Enterohemorrhagic Escherichia coli in Raw and Treated Municipal Sewage. **Applied and Environmental Microbiology**, **62**: 3466-3469.

Guazzaroni, M-E.; Beloqui, A.; Golyshin, P.N.; Ferrer, M. 2009. Metagenomics as a new technological tool to gain scientific knowledge. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, **25**: 945-954.

HANDELSMAN, J.; RONDON, M.R.; BRADY, S.F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R.M. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, **5**: 245-249.

HARDIE, J.M.; WHILEY, R.A. 1997. Classification and overview of the genera Streptococcus and Enterococcus. **The Society for Applied Bacteriology Symposium**, **26**: 1S-11S

HE, J.W.; JIANG, S. 2005. Quantification of Enterococci and Human Adenoviruses in Environmental Samples by Real-Time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, **71(5)**: 2250-2255.

HEAD, J.M.; HIRNS, W.D.; EMBLEY, T.M; MCCARTHY, A.J.; SAUNDE, J.R. 1993. The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16s ribosomal RNA gene sequences. **Journal of General Microbiology**, **139**: 1147-1153.

HEMME, C.L.; DENG, Y.; GENTRY, T.J.; FIELDS, M.W.; WU, L.; BARUA, S.; BARRY, K.; TRINGE, S.G.; WATSON, D.B.; HE, Z.; HAZEN, T.C.; TIEDJE, J.M.; RUBIN, E.M.; ZHOU, J. 2010. Metagenomic insights into evolution of a heavy metal-contaminated groundwater microbial community. **The ISME Journal**, **4**: 1-13.

HENGGE, R. 2009. Proteolysis of  $\sigma^S$  (RpoS) and the general stress response in Escherichia coli. **Research in Microbiology**, **160**: 667-676.

HENJUM, M.B.; HOZALSKI, R.M.; WENNEN, C.R.; ARNOLDA, W.; NOVAK, P.J. 2009. Correlations between in situ sensor measurements and trace organic pollutants in urban streams. **Journal of Environment Monitoring**, **12**: 225-233.

HERBERT, R.A. 1999. Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. **FEMS Microbiology Review**, **23**: 563-590.

HESSEN, D.O.; HENRIKSEN, A.; SMELHUS, A.M. 1997. Seasonal fluctuations and diurnal oscillations in nitrate of a Heathland Brook. **Water Research**, **31**: 1813-1817.

HIGGINS, J.A.; BELT, K.T.; KARNS, J.S.; RUSSELL-ANELLI, J.; SHELTON, D. R. 2005. tir- and stx-positive *Escherichia coli* in stream waters in a metropolitan area. **Applied and Environmental Microbiology**, **71(5)**: 2511-2519.

HOARE, R.A. 1984. Nitrogen and phosphorus in Rotorua urban streams. **New Zealand Journal Marine Freshwater Research**, **18**: 451-454.

HOVANEC, T.A.; TAYLOR, L.T.; BLAKIS, A.; DELONG, E.F. 1998. Nitrospira-Like Bacteria Associated with Nitrite Oxidation in Freshwater Aquaria. **Applied and Environmental Microbiology**, **64(1)**: 258-264.

HSU, B.M.; HUANG, K.H.; HUANG, S.W.; TSENG, K.C.; SU, M.J.; LIN, W.C.; JI, D.D.; SHIH, F.C.; CHEN, J.L.; KAO, P.M. 2011. Evaluation of different analysis and identification methods for *Salmonella* detection in surface drinking water sources. **Science of Total Environment**, **409**: 4435-4441.

HUANG, Y.; GILNA, P.; LI, W. 2009. Identification of ribosomal RNA genes in metagenomic fragments. **Bioinformatics**, **25(10)**: 1338-1340.

HUBER, I.; SPANGGAARD, B.; APPEL, K.F.; ROSSEN, L.; NIELSEN, T.; GRAM, L. 2004. Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Journal of Applied Microbiology**, **96**: 117-132.

HUGENHOLTZ, P.; TYSON, G.W. 2008. Metagenomics. **Nature**, **455**: 481-483.

HUMAYUN, M.Z. 1998. SOS and Mayday: multiple inducible mutagenic pathways in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, **30(5)**: 905-910.

HUSON, D.H.; MITRA, S.; WEBER, N.; RUSCHEWEYH, H.; SCHUSTER, S.C. 2011. Integrative analysis of environmental sequences using MEGAN4. **Genome Research**, **21**: 1552-1560.

IBEKWE, A.M.; MURINDA, S.E.; GRAVES, A.K. 2011. Microbiological evaluation of water quality from urban watersheds for domestic water supply improvement. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, **8**: 4460-4476.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Tendências Demográficas: Uma análise dos resultados da amostra do Censo Demográfico 2010. **Estudos e Pesquisas Informação Demográfica Socioeconômica**.

- JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. 1998. Evolving Concepts Regarding the Genus *Aeromonas*: An Expanding Panorama of Species, Disease Presentations, and Unanswered Questions. **Clinical Infectious Diseases**, **27**: 332-344.
- JURETSCHKO, S.; TIMMERMANN, G.; SCHMID, M.; SCHLEIFER, K.H.; POMMERENING-ROSER, A.; KOOPS, H.P.; WAGNER, M. 1998. Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. **Applied and Environmental Microbiology**, **64(8)**: 3042-3051.
- KEMPER, N. 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological Indicators**, **8**: 1-13.
- KENZAKA, T.; YAMAGUCHI, N.; PRAPAGDEE, B.; MIKAMI, E.; NASU, M. 2001. Bacterial community composition and activity in urban rivers in Thailand and Malaysia. **Journal of Health Science**, **47**: 353-361.
- KIRCHMAN, D.L.; COTTRELL, M.T.; LOVEJOY, C. 2010. The structure of bacterial communities in the western Arctic Ocean as revealed by pyrosequencing of 16S rRNA genes. **Environmental Microbiology**, **12**: 1132-1143
- KISAND, V.; VALENTE, A.; LAHM, A.; TANET, G.; LETTIERI, T. 2012. Phylogenetic and functional metagenomic profiling for assessing microbial biodiversity in environmental monitoring. **PLoS ONE**, **7(8)**: e43630.
- KOSTANJŠEK, R.; LAPANJE A.; DROBNE, D.; PEROVIĆ, S.; PEROVIĆ, A.; ZIDAR, P.; ŠTRUS, J.; HOLLERT, H.; KARAMAN, G. 2005. Bacterial Community structure analyses to assess pollution of water and sediments in the lake Shkodra/Skadar, Balkan Peninsula. **Environmental Science & Pollution Research**, **12**: 361-368.
- KRÄMER, R. 2010. Bacterial stimulus perception and signal transduction: Response to osmotic stress. **The Chemical Record**, **10**: 217-229.
- KREADER, C.A. 1995. Design and evaluation of bacteroides DNA probes for the specific detection of human fecal pollution. **Applied and Environmental Microbiology**, **61(4)**: 1171-1179.
- KREBS, J.E.; GOLDSTEIN, E.S.; KILPATRICK, S.T. Genome sequences and gene numbers. In: KREBS, J.E.; GOLDSTEIN, E.S.; KILPATRICK, S.T. **Lewin's Genes X**. 10<sup>th</sup> e.d. Sudbury: Jones and Bartlett Publisher, 2011. p. 118-138.
- KRISTIANSSON, E.; FICK, J.; JANZON, A.; GRABIC, R.; RUTGERSSON, C.; WEIJDEGA, B.; SODERSTROM, H.; LARSSON, D.G.J. 2011. Pyrosequencing of antibiotic-contaminated river sediments reveals high levels of resistance and gene transfer elements. **PLoS ONE**, **6(2)**: e17038.
- KROON, F.J.; KUHNERT, P.M.; HENDERSON, B.L.; WILKINSON, S.N.; KINSEY-HENDERSON, A.; ABBOTT, B.; BRODIE, J.E.; TURNER, R.D.R. 2012. River loads of suspended solids, nitrogen, phosphorus and herbicides delivered to the Great Barrier Reef lagoon. **Marine Pollution Bulletin**, **65**: 167-181.

- KUMAR, S.; TRIPATHI, V.R.; GARG, S.K. 2012. Physicochemical and microbiological assessment of recreational and drinking waters. **Environmental Monitoring and Assessment**, **184**: 2691-2698.
- LATUF, M.O. 2004. Diagnostic study of the São Pedro's creek waters, Juiz de Fora town, Minas Gerais state, Brazil. **Geografia**, **13**: 21-55.
- LARIMER, F.W.; CHAIN, P.; HAUSER, L.; LAMERDIN, J.; MALFATTI, S.; DO, L.; LAND, M.L.; PELLETIER, D.A.; BEATTY, T.; LANG, A.S.; TABITA, R.; GIBSON, J.L.; HANSON, T.E.; BOBST, C.; TORRES, J.L.T.; PERES, C.; HARRISON, F.H.; GIBSON, J.; HARWOOD, C.S. 2004. Complete genome sequence of the metabolically versatile photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas palustris*. *Nature Biotechnology*, **22**: 55-61.
- LEININGER, S.; URICH, T.; SCHLOTTER, M.; SCHWARK, L.; QI, J.; NICOL, G.W.; PROSSER, J.I.; SCHUSTER, S.C.; SCHLEPER, C. 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. **Nature**, **442**: 806-809.
- LEMKE, M.J.; LEFF, L.G. 2006. Culturability of Stream Bacteria Assessed at the Assemblage and Population Levels. **Microbial Ecology**, **51**: 365-374.
- LI, X.; QIN, L. 2005. Metagenomics-based drug discovery and marine microbial diversity. **Trends in Biotechnology**, **23**: 539-543.
- LINDQUIST, S.; CRAIG, E.A. 1988. The heat-shock proteins. **Annual Review of Genetics**, **22**: 631-677.
- MAHADEVAN, R.; PALSSON, B.Ø.; LOVLEY, D.R. 2011. In situ to in silico and back: elucidating the physiology and ecology of *Geobacter* spp. using genome-scale modeling. **Nature Reviews Microbiology**, **9**: 39-50.
- MARCHESI, J.; SHANAHAN, F. 2007. The normal intestinal microbiota. **Current Opinion Infectious Diseases**, **20**: 508-513.
- MARCY, Y.; OUVENERY, C.; BIK, E.M.; LOSEKANN, T.; IVANOVA, N.; MARTIN, H.G.; SZETO, E.; PLATT, D.; HUGENHOLTZ, P.; RELMAN, D.A.; QUAKE, S.R. 2007. Dissecting biological "dark matter" with single-cell genetic analysis of rare and uncultivated TM7 microbes from the human mouth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **104**: 11889-11894.
- MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; ATTIYA, S.; BADER, J. S.; BEMBEN, L. A. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, **437**: 376-380.
- MARLES-WRIGHT, J.; LEWIS, R.J. 2007. Stress responses of bacteria. **Current Opinion in Structural Biology**, **17**: 755-760.
- MARTINEZ, J.L. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. **Science**, **321**: 365-367.

MARTINEZ, J.L. 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, **157**: 2893-2902.

MCCONNELL, M.J.; ACTIS, L. PACHÓN, J. 2012. Acinetobacter baumannii: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. **FEMS Microbiology Reviews**, Early View: 1-16.

MCTAVISH, H.; FUCHS, J.A.; HOOPER, A.B. 1993. Sequence of the Gene Coding for Ammonia Monooxygenase in Nitrosomonas europaea **Journal of Bacteriology**, **175**: 2436-2444.

MENA, K.D.; GERBA, C.P. 2009. Risk assessment of Pseudomonas aeruginosa in water. **Reviews of Environmental Contamination & Toxicology**, **201**: 71-115.

METSON, G.S.; HALE, R.L.; IWANIEC, D.M.; COOK, E.M.; CORMAN, J.R.; GALLETI, C.S.; CHILDERS, D.L. 2012. Phosphorus in Phoenix: a budget and spatial representation of phosphorus in an urban ecosystem. **Ecological Applications**, **22(2)**: 705-721.

MEYBECK, M. 1998. Man and river interface: multiple impacts on water and particulates chemistry illustrated in the Seine river basin. **Hydrobiologia**, **373**: 1-20.

MEYER, F.; PAARMANN, D.; D'SOUZA, M.; OLSON, R.; GLASS, E. M.; KUBAL, T.; PACZIAN, M. 2008. The metagenomics RAST server - a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. **BMC Bioinformatics**, **9(386)**: 1-8.

MOBARRY, B.K.; WAGNER, M.; URBAIN, V.; RITTMANN, B.E.; STAHL, D.A. 1996. Phylogenetic Probes for Analyzing Abundance and Spatial Organization of Nitrifying Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, **62(6)**: 2156-2162.

MOHAN, S.B.; SCHMID, M.; JETTEN, M.; COLE, J. 2004. Detection and widespread distribution of the nrfA gene encoding nitrite reduction to ammonia, a short circuit in the biological nitrogen cycle that competes with denitrification. **FEMS Microbiology Ecology**, **49**: 433-443.

MOTER, A.; GOBEL, U.B. 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, **41**: 85-112.

MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods Enzymology**, **155**: 335-350.

MUNIESA, M.; JOFRE, J.; GARCIA-ALJARO, C.; BLANCH, A.R. 2006. Occurrence of Escherichia coli O157:H7 and other Enterohemorrhagic Escherichia coli in the environment. **Environmental Science and Technology**, **40**: 7141-7149.

MUYZER, G.; STAMS, A.J.M. 2008. The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, **6**: 441-454.

- NATARO, J.P.; KAPER, J.B. 1998. Diarrheagenic Escherichia coli. **Clinical Microbiology Reviews**, **11(1)**: 142-201.
- NEAL, C.; ROBSON, A.J.; JEFFERY, H.A.; HARROW, M.L.; NEAL, M.; SMITH, C.J.; JARVIE, H.P. 1997. Trace element inter-relationships for the Humber rivers: inferences for hydrological and chemical controls. **The Science of the Total Environment**, **194**: 321-343.
- NOCKER, A.; BURR, M.; CAMPER, A.K. 2007. Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. **Microbial Ecology**, **54**: 276-289.
- OLIVEIRA, M.G.; BRITO, J.R.F.; GOMES, T.A.T.; GUTH, B.E.C.; VIEIRA, M.A.M.; NAVES, Z.V.F.; VAZ, T.M.I.; IRINO, K. 2008. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing Escherichia coli serotypes in food-producing animals in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, **127**: 139-146.
- PABLOS, M.; REMACHA, M.A.; RODRÍGUEZ-CALLEJA, J.M.; SANTOS, J.A.; OTERO, A.; GARCÍA-LÓPEZ, M.L. 2010. Identity, virulence genes, and clonal relatedness of Aeromonas isolates from patients with diarrhea and drinking water. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, **29**:1163-72.
- PARKS, D.H.; BEIKO, R.G. 2010. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. **Bioinformatics**, **26**: 715-721.
- PAUL, M.J.; MEYER, J.L. 2001. Streams in the urban landscape. **Annual Review Ecology Systematic**, **32**: 333-365.
- PEDRÓS-ÁLIO, C. 2006. Genomics and marine microbial ecology. **International Microbiology**, **9**: 191-197.
- PHILIPPOT, L., HALLIN, S. 2005. Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. **Current Opinion Microbiology**, **8**: 234-239.
- POMEROY, L.R.; WILLIAMS, P.J.; AZAM, F.; HOBBIE, J.E. 2007. The Microbial Loop. **Oceanography**, **20**: 28-33.
- PRIDGEON, J.W.; KLESIOUS, P.H.; MU, X.; CARTER, D.; FLEMING, K.; XU, D.; SRIVASTAVA, K.; REDDY, G. 2011. Identification of unique DNA sequences present in highly virulent 2009 Alabama isolates of Aeromonas hydrophila. **Veterinary Microbiology**, **152**: 117-125.
- QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K.S.; MANICHANH, C.; NIELSEN, T.; PONS, N.; LEVENEZ, F.; YAMADA, T.; MENDE, D.R.; LI, J.; XU, J.; LI, S.; LI, D.; CAO, J.; WANG, B.; LIANG, H.; ZHENG, H.; XIE, Y.; TAP, J.; LEPAGE, P.; BERTALAN, M.; BATTO, J.M.; HANSEN, T.; PASLIER, D.L.; LINNEBERG, A.; NIELSEN, H.B.; PELLETIER, E.; RENAULT, P.; SICHERITZ-PONTEN, T.; TURNER, K.; ZHU, H.; YU, C.; LI, S.; JIAN, M.; ZHOU, Y.; LI, Y.; ZHANG, X.; LI, S.; QIN, N.; YANG, H.; WANG, J.; BRUNAK, S.; DORÉ, J.; GUARNER, F.; KRISTIENSEN, K.;



PEDERSEN, O.; PARKHILL, J.; WEISSENBACH, J.; METAHIT CONSORTIUM, BORK, P.; EHRLICH, S.D.; WANG, J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. **Nature**, **464**: 59-67.

QIN, X.; EMERSON, J.; STAPP, J.; STAPP, L.; ABE, P.; BURNS, J.L. 2003. Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, **41**: 4312-4317.

RAPPÉ, M.S.; GIOVANNONI, S.J. 2003. The uncultured microbial majority. **Annual Reviews Microbiology**, **57**: 369-394.

REVSBECH, N.P.; RISGAARD-PETERSEN, N.; SCHRAMM, A.; NIELSEN, L.P. 2006. Nitrogen transformations in stratified aquatic microbial ecosystems. **Antonie Van Leeuwenhoek**, **90**: 361-375.

RHO, H.; SHIN, B.; LEE, O.; CHOI, Y.; LEE, J.; RHO, J. 2011. Antibiotic resistance profile of bacterial isolates from animal farming aquatic environments and meats in a peri-urban community in South Korea. **World Academy of Science, Engineering and Technology**, **60**: 688-693.

RIESENFELD, C.S.; GOODMAN, R.M.; HANDELSMAN, J. 2004. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiology**, **6**: 981-989.

RIESENFELD, C.S.; SCHLOSS, P.D.; HANDELSMAN, J. 2004. METAGENOMICS: Genomic Analysis of Microbial Communities. **Annual Review of Genetics**, **38**: 525-552.

RINTTILA, T.; KASSINEN, A.; MALINEN, E.; KROGIUS L.; PALVA, A. 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. **Journal of Applied Microbiology**, **97**: 1166-1177.

RUSCH, D.B.; HALPERN, A.L.; SUTTON, G.; HEIDELBERG, K.B.; WILLIAMSON, S.; YOOSEPH, S.; WU, D.; EISEN, J.A.; HOFFMAN, J.M.; REMINGTON, K.; BEESON, K.; TRAN, B.; SMITH, H.; BADEN-TILLSON, H.; STEWART, C.; THORPE, J.; FREEMAN, J.; ANDREWS-PFANNKOCHE, C.; VENTER, J.E.; LI, K.; KRAVITZ, S.; HEIDELBERG, J.F.; UTTERBACK, T.; ROGERS, Y.H.; FALCÓN, L.I.; SOUZA, V.; BONILLA-ROSSO, G.; EGUIARTE, L.E.; KARL, D.M.; SATHYENDRANATH, S.; PLATT, T.; BIRMINGHAM, E.; GALLARDO, V.; TAMAYO-CASTILLO, G.; FERRARI, M.R.; STRAUSBERG, R.L.; NEALSON, K.; FRIEDMAN, R.; FRAZIER, M.; VENTER, J.C. 2007. The Sorcerer II global ocean sampling expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific. **PLoS Biology**, **5**: 398-431.

SACK, R.B. RAHMAN, M.; YUNUS, M.; KHAN, E.H. 1997. Antimicrobial Resistance in Organisms Causing Diarrheal Disease. **Clinical Infectious Diseases**, **24**: S102-S105.

- SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. Antibiotics that inhibit bacterial cell wall synthesis. In: SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. **Revenge of the microbes**. How bacterial resistance is undermining the antibiotic miracle. 1 e.d. Washington: ASM Press, 2005, p.51-65.
- SANGER, F.; AIR, G.M.; BARRELL, B.G.; BROWN, N.L.; COULSON, A.R.; FIDDES, J.C.; HUTCHISON III, C.A.; SLOCOMBE, P.M.; SMITH, M. 1977. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. **Nature**, **265**: 687-695.
- SANTIAGO-VÁLZQUEZ, L.Z.; BRUCK, T.B.; BRUCK, W.M.; DUQUE-ALARCÓN, A.P.; MCCARTHY, P.J.; KERR, R.G. 2007. The diversity of the bacterial communities associated with the azooxanthellate hexacoral *Cirripathes lutkeni*. **The ISME Journal**, **1**: 654-659.
- SARMAH, A.K.; MEYER, M.T.; BOXALL, A.B.A. 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, **65**: 725-759.
- SAVITCHCHEVA, O.; OKAYAMA, N.; OKABE, S. 2007. Relationships between *Bacteroides* 16S rRNA genetic markers and presence of bacterial enteric pathogens and conventional fecal indicators. **Water Research**, **41**: 3615-3628.
- SCHWARZENBACH, R.P.; ESCHER, B.I.; FENNER, K.; HOFSTETTER, T.B.; JOHNSON, C.A.; VON GUNTEN, U.; WEHRLI, B. 2006. The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems. **Science**, **313**: 1072-1077.
- SCOARIS, D.O.; COLACITE, J.; NAKAMURA, C.V.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B.A.A.; FILHO, B.P.D. 2008. Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from drinking water. **Antonie van Leeuwenhoek** **2008**, **93**:111-122.
- SEEGER, M.A.; DIEDERICHS, K.; EICHER, T.; BRANDSTÄTTER, L.; SCHIEFNER, A.; VERREY, F.; POS, K.M. 2008. The AcrB efflux pump: conformational cycling and peristalsis lead to multidrug resistance. **Current Drug Targets**, **9**: 729-749.
- SHOKRALLA, S.; SPALL, J.L.; GIBSON, J.F.; HAJIBABAEI, M. 2012. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. **Molecular Ecology**, **21**: 1794-1805.
- SILVA, M.F.; VAZ-MOREIRA, I.; GONZALEZ-PAJUELO, M.; NUNES, O.C.; MANAIA, C.M. 2007. Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant. **FEMS Microbiology Ecology**, **60**: 166-176.
- SILVA, V.L.; NICOLI, J.R.; NASCIMENTO, T.C.; DINIZ, C.G. 2009. Diarrheagenic *Escherichia coli* strains recovered from urban pigeons (*Columba livia*) in Brazil and their antimicrobial susceptibility patterns. **Current Microbiology**, **59**: 302-308.
- SLEATOR, R.D.; SHORTALL, C.; HILL, C. 2008. Metagenomics. **Letters in Applied Microbiology**, **47**: 361-366.

SMITH, C.J.; CALLIHAN, D.R. 1992. Analysis of rRNA restriction fragment length polymorphisms from *Bacteroides* spp. and *Bacteroides fragilis* isolates associated with diarrhea in humans and animals. **Journal of Clinical Microbiology**, **30**: 806-812.

SMITH, C.J.; NEDWELL, D.B.; DONG, L.F.; OSBORN, A.M. 2007. Diversity and Abundance of Nitrate Reductase Genes (*narG* and *napA*), Nitrite Reductase Genes (*nirS* and *nrfA*), and Their Transcripts in Estuarine Sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, **73(11)**: 3612-3622.

SMITH, R.J.; JEFFRIES, T.C.; ROUDNEW, B.; FITCH, A.J.; SEYMOUR, J.R.; DELPIN, M.W.; NEWTON, K.; BROWN, M.H.; MITCHELL, J.G. 2012. Metagenomic comparison of microbial communities inhabiting confined and unconfined aquifer ecosystems. **Environmental Microbiology**, **14**: 240-253.

SIMON, C.; DANIEL, R. 2011. Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. **Applied and Environmental Microbiology**, **77**: 1153-1161.

SINIGALLIANO, C.D.; KUHN, D.N.; JONES, R.D. 1995. Amplification of the *amoA* gene from diverse species of ammonium-oxidizing bacteria and from an indigenous bacterial population from seawater. **Applied of Environment Microbiology**, **61**: 2702-2704.

SOUZA, W.G.S.; AVELAR, K.L.S.; ANTUNES, L.C.M.; LOBO, L.A.; DOMINGUES, R.M.C.P.; FERREIRA, M.C.S. 2000. Resistance profile of *Bacteroides fragilis* isolated in Brazil. Do they shelter the *cfiA* gene? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **45**: 475-481.

STACKEBRANDT, E.; MURRAY, R.G.E.; TRUPER, H.G. 1988. Proteobacteria classis nov. a name for the phylogenetic taxon that includes the "Purple Bacteria and their relatives". **International Journal of Systematic Bacteriology**, **38(3)**: 321-325.

STAHL, D.A.; AMANN, R. Development and application of nucleic acid probes. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester, M. John Wiley & Sons Ltd, 1991.

SUGIMOTO, S.; ABDULLAH-AL-MAHIN; SONOMOTO, K. 2008. Molecular chaperones in lactic acid bacteria: Physiological consequences and biochemical properties. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, **106(4)**: 324-336.

SZCZEPANOWSKI, R.; KRAHN, I.; LINKE, B.; GOESMANN, A.; PUHLER, A. 2004. Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system. **Microbiology**, **150**: 3613-3630.

TAVIANI, E.; CECCARELLI, D.; LAZARO, N.; BANI, S.; CAPPUCINELLI, P. 2008. Environmental *Vibrio* spp., isolated in Mozambique, contain a polymorphic group of

- integrative conjugative elements and class 1 integrons. **FEMS Microbiology Ecology**, **64**: 45-54.
- TENNSTEDT, T.; SZCZEPANOWSKI, R.; BRAUN, S.; PUHLER, A.; SCHLUTER, A. 2003. Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. **FEMS Microbiology Ecology**, **45**: 239-252.
- TENNSTEDT, T.; SZCZEPANOWSKI, R.; KRAHN, K.; PUHLER, A.; SCHLUTER, A. 2005. Sequence of the 68,869 bp IncP-1a plasmid pTB11 from a waste-water treatment plant reveals a highly conserved backbone, a Tn402-like integron and other transposable elements. **Plasmid**, **53**: 218-238.
- TESKE, A.; ALM, E.; REGAN, J.M.; TOZE, S.; RITTMANN, B.E.; STAHL, D.A. 1994. Evolutionary Relationships among Ammonia- and Nitrite-Oxidizing Bacteria. **Journal of Bacteriology**, **176**: 6623-6630.
- THAO, S.; ESCALANTE-SEMERENA, J.C. 2011. Control of Protein Function by Reversible N $\epsilon$ -lysine Acetylation in Bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, **14(2)**: 200-204.
- THE HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM. 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, **486**: 207-214.
- TIQUIA, S.M. 2010. Metabolic diversity of the heterotrophic microorganisms and potential link to pollution of the Rouge River. **Environmental Pollution**, **158**: 1435-1443.
- TOKUDA, G.; WATANABE, H. 2007. Hidden cellulases in termites: revision of an old hypothesis. **Biology Letters**, **3**: 336-339.
- TREBESIU, K.; LEITRITZ, L.; SCHUBERT, K.A.S.; AUTENRIETH, I.B.; HEESEMANN, J. 2000. Culture independent and rapid identification of bacterial pathogens in necrotising fasciitis and streptococcal toxic shock syndrome by Fluorescence in situ hybridization. **Medical Microbiology and Immunology**, **188**: 169-175.
- TRINGE, S.G.; HUGENHOLTZ, P. 2008. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. **Current Opinion in Microbiology**, **11**: 442-446.
- TUCCI, C.E.M. 2008. Águas urbanas. **Estudos Avançados**, **22 (63)**: 97-112.
- TUNDISI, J.G. 2003. Recursos Hídricos. **MultiCiência**, **1**: 1-15.
- TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E.; HAMADY, M.; FRASER-LIGGETT, C.M.; KNIGHT, R.; GORDON, J.I. 2007. The human microbiome project. **Nature**, **449**: 804-810.
- TURNBAUGH, P.J.; LEY, R.E.; MAHOWALD, M.A.; MAGRINI, V.; MARDIS, E.R.; GORDON, J.I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, **444**: 1027-1031.

UNESCO, 2003. Water for People, Water for Life: The United Nations World Water Development Report. UNESCO Publishing. Paris/ Berghahn Books, Oxford.

US GEOL. SURV. 1999. The quality of our nation's waters—nutrients and pesticides. **USGS Circular, 1225**.

VALÉRIO, E.; CHAVES, S.; TENREIRO, R. 2010. Diversity and impact of prokaryotic toxins on aquatic environments: A review. **Toxins, 2**: 2359-2410.

VENTER, J.C.; REMINGTON, K.; HEIDELBERG, J.F.; HALPERN A.L.; RUSCH, D.; EISEN, J.A.; WU, D.; PAULSEN, I.; NELSON, K.E.; NELSON, W.; FOUTS, D.E.; LEVY, S.; KNAP, A.H.; LOMAS, M.W.; NEALSON, K.; WHITE, O.; PETERSON, J.; HOFFMAN, J.; PARSONS, R.; BADEN-TILLSON, H.; PFANNKOCH, C.; ROGERS, Y.H.; SMITH, H.O. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science, 304**: 66-74.

VOLLENWEIDER, R.; KEREEKES, J. 1980. The loading concept as basis for controlling eutrophication philosophy and preliminary results of the OECD programme on eutrophication. **Progress in Water Technology, 12**: 5-38.

WALLNER, G.; AMANN, R.; BEISKER, W. 1993. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. **Cytometry, 14**: 136-143.

WALSH, C.J.; ROY, A.H.; FEMINELLA, J.W.; COTTINGHAM, P.D.; GROFFMAN, P.M.; MORGAN II, R.P. 2005. The urban stream syndrome: current knowledge and the search for a cure. **Journal North American Benthological Society, 24**: 706-723.

WALTERS, S.P.; THEBO, A.L.; BOEHM, A.B. 2011. Impact of urbanization and agriculture on the occurrence of bacterial pathogens and stx genes in coastal waterbodies of central California. **Water Research, 45**: 1752-1762.

WARD, B.B. 2007. Nitrogen Cycling in Aquatic Environments. In **Manual of Environmental Microbiology** ed. HURST, C.J.; CRAWFORD, R.L.; GARLAND, J.L.; LIPSON, D.A.; MILLS, A.L.; STETZENBACH, L.D. pp. 511-522. Washington: American Society for Microbiology.

WARD, D.M.; WELLER, R.; BATESON, M.M. 1990. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature, 345**: 63-65.

WARD, N.; LARSEN, O.; SAKWA, J.; BRUSETH, L.; KHOURI, H.; DURKIN, A.C.; DIMITROV, G.; JIANG, L.; SCANLAN, D.; KANG, K.H.; LEWIS, M.; NELSON, K.E.; METHÉ, B.; WU, M.; HEIDELBERG, J.F.; PAULSEN, I.T.; FOUTS, D.; RAVEL, J.; TETTELIN, H.; REN, Q.; READ, T.; DEBOY, R.T.; SESHADRI, R.; SALZBERG, S.L.; JENSEN, H.B.; BIRKELAND, N.K.; NELSON, W.C.; DODSON, R.J.; GRINDHAUG, S.H.; HOLT, I.; EIDHAMMER, I.; JONASEN, I.; VANAKEN, V.; UTTERBACK, T.; FELDBLYUM, T.V.; FRASER, C.M.; LILLEHAUG, J.R.; EISEN, J.A. 2004. Genomic

insights into methanotrophy: The complete genome sequence of *Methylococcus capsulatus* (bath). **PLoS Biology**, **2(10)**: e303.

WARNECKE, F.; LUGINBUHL, P.; IVANOVA, N.; GHASSEMIAN, M.; RICHARDSON, T.H. 2007. Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. **Nature**, **450**: 560-565.

WANABLE, K.; KODAMA, Y.; HARAYAMA, S. 2001. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. **Journal of Microbiological Methods**, **44**: 253-262.

WAY, J.S.; JOSEPHSON, K.L.; PILLAI, S.D.; ABBASZADEGAN, M.; GERBA, C.P.; PEPPER, I.L. 1993. Specific Detection of *Salmonella* spp. by Multiplex Polymerase Chain Reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, **59**: 1473-1479.

WEBER, H.; POLEN, T.; HEUVELING, J.; WENDISCH, V.F.; HENGGE, R. 2005. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*:  $\sigma^S$ -dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. **Journal of Bacteriology**, **187(5)**: 1591-1603.

WEGLEY, L.; EDWARDS, R.; RODRIGUEZ-BRITO, B.; LIU, H.; ROHWER, F. 2007. Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. **Environmental Microbiology**, **9**: 2707-2719.

WERNICK, B.G.; COOK, K.E.; SCHREIER, H. 1998. Land use and stream water nitrate-n dynamics in an urban-rural fringe watershed. **Journal American Water Research Association**, **34**: 639-650.

WETZEL, R.G.; LIKENS, G.E. **Limnological Analyses**. Springer-Verlag, 1991.

WEXLER, H.M. 2007. Bacteroides: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. **Clinical Microbiology Reviews**, **20**: 593-621.

WHITMAN, W.B.; COLEMAN, D.C.; WIEBE, W.J. 1998. Prokaryotes: The unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **95**: 6578-6583.

WINGENDER, J.; FLEMMING, H.C. 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, **214**: 417-423.

WILLEMS, R.J.; HANAGE, W.P.; BESSEN, D.E.; FEIL, E.J. 2011. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Review**, **35**: 872-900.

WOESE, C.R. 1987. Bacterial Evolution. **Microbiological Reviews**, **51**: 221-271.

WONG, A.; KASSEN, R. 2011. Parallel evolution and local differentiation in quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, **157**: 937-944.

WRIGHT, G.D. 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. **Nature Reviews Microbiology**, **5**: 175-186.

YAMAGUCHI, N.; KENZAKA, T.; NASU, M. 1997. Rapid in situ enumeration of physiologically active bacteria in river waters using fluorescent probes. **Microbes and Environments**, **12**: 1-8.

YOUSEPH, S.; SUTTON, G.; RUSCH, D.B.; HALPERN, A.L.; WILLIAMSON, S.J.; REMINGTON, K.; EISEN, J.A.; HEIDELBERG, K.B.; MANNING, G.; LI, W.; JAROSZEWSKI, L.; CIEPLAK, P.; MILLER, C.S.; LI, H.; MASHIYAMA, S.T.; JOACHIMIAK, M.P.; VAN BELLE, C.; CHANDONIA, J.M.; SOERGEL, D.A.; ZHAI, Y.; NATARAJAN, K.; LEE, S.; RAPHAEL, B.J.; BAFNA, V.; FRIEDMAN, R.; BRENNER, S.E.; GODZIK, A.; EISENBERG, D.; DIXON, J.E.; TAYLOR, S.S.; STRAUSBERG, R.L.; FRAZIER, M.; VENTER, J.C. 2007. The Sorcerer II global ocean sampling expedition: expanding the universe of protein families. **PLoS Biology**, **5**: e16.

YU, L.; ZHOU, Y.; WANG, R.; LOU, J.; ZHANG, L.; LI, J.; BI, Z.; KAN, B. 2012. Multiple Antibiotic Resistance of *Vibrio cholerae* Serogroup O139 in China from 1993 to 2009. **PLoS ONE**, **7(6)**: e38633.

ZINGER, L.; GOBET, A.; POMMIER, T. 2012. Two decades of describing the unseen majority of aquatic microbial diversity. **Molecular Ecology**, **21**: 1878-1896.

ZAMOCKY, M.; FURTMÜLLER, P.G.; OBINGER, C. 2008. Evolution of catalases from bacteria to humans. **Antioxid Redox Signal**, **10(9)**: 1527-1548.

ZHANG, T.; BREITBART, M.; LEE, W.H.; RUN, J.Q.; WEI, C.L.; SOH, S.W.; HIBBERD, M.L.; LIU, E.T.; ROHWER, F.; RUAN, Y. 2006. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses. **PLoS Biology**, **4**: e3.

ZHANG, X.; ZHANG, T.; FANG, H.H.P. 2009. Antibiotic resistance genes in water environment. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **82**: 397-414

ZHANG, T.; ZHANG, X.; YE, L. 2011. Plasmid metagenome reveals high levels of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in activated sludge. **PLoS ONE**, **6(10)**: e26041.

ZHOU, J.; HE, Q.; HEMME, C.L.; MUKHOPADHYAY, A.; HILLESLAND, K.; ZHOU, A.; HE, Z.; NOSTRAND, J.D.V.; HAZEN, T.C.; STAHL, D.A.; WALL, J.D.; ARKIN, A.P. 2011. How sulphate-reducing microorganisms cope with stress: lessons from systems biology. **Nature Reviews Microbiology**, **9**: 452-466.

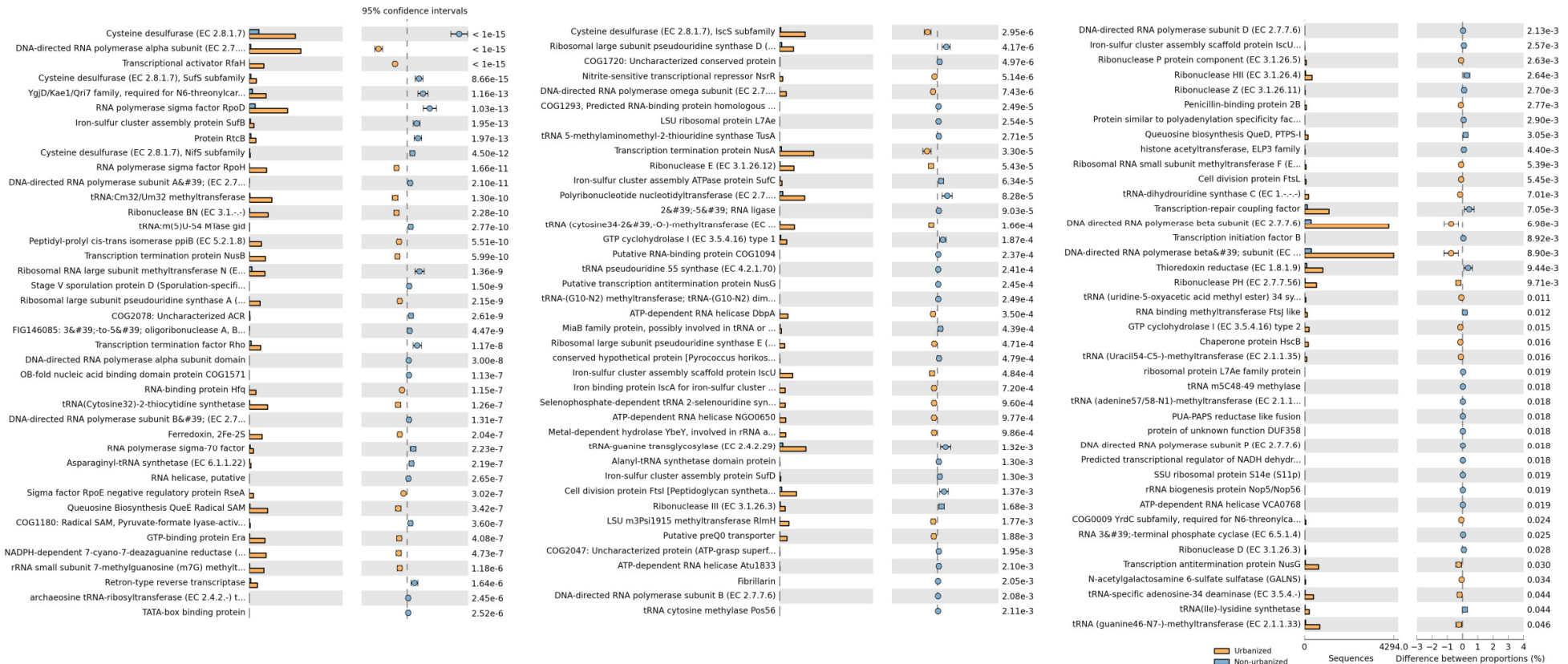
ZWART, G.; CRUMP, B.C.; AGTERVELD, M.P.K.; HAGEN, F.; HAN, S.K. 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. **Aquatic Microbial Ecology**, **28**: 141-155.

### APÊNDICE A – Sequências anotadas para o Subsistema gênico Metabolismo de Proteína no metagenoma urbanizado e não urbanizado

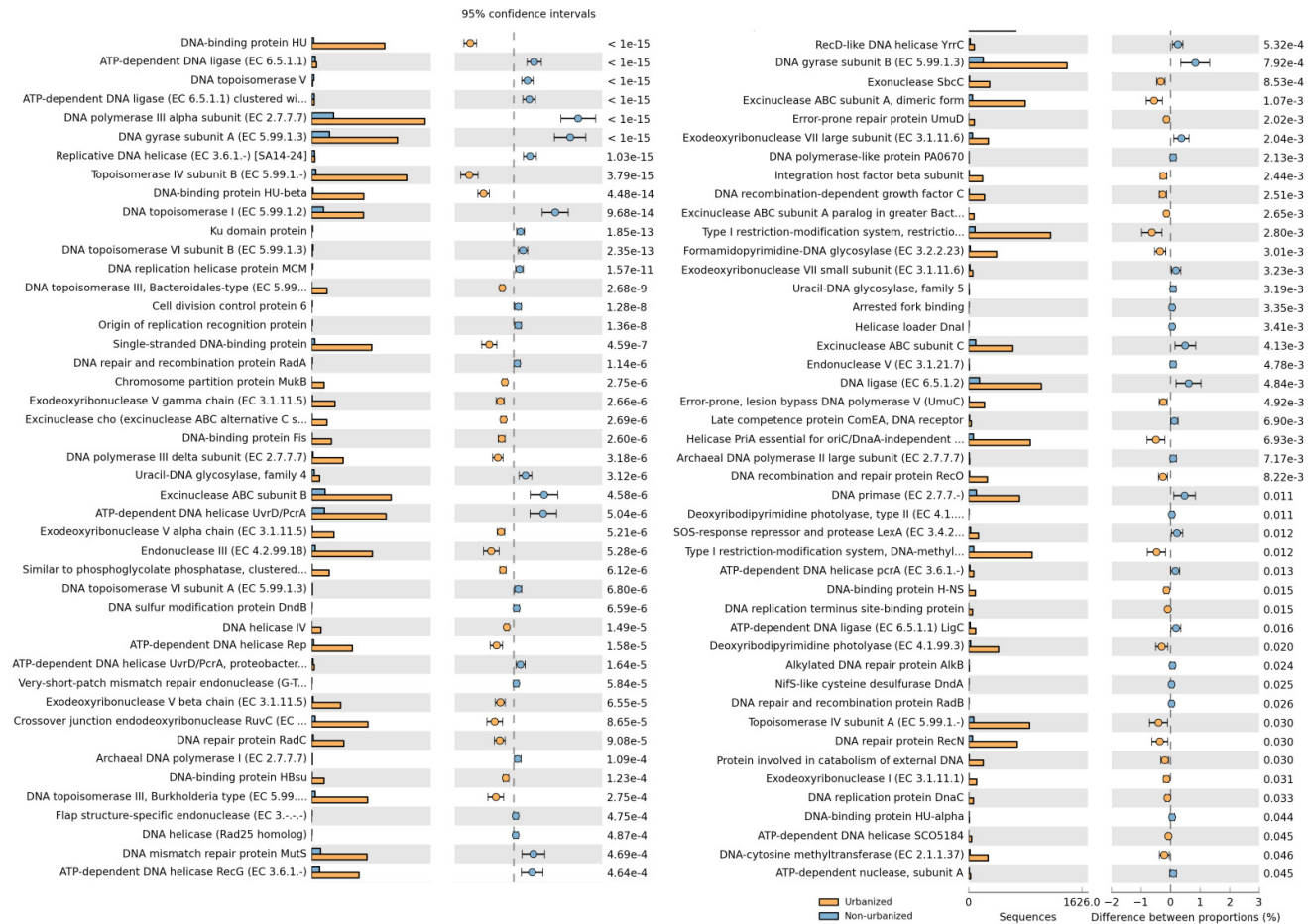




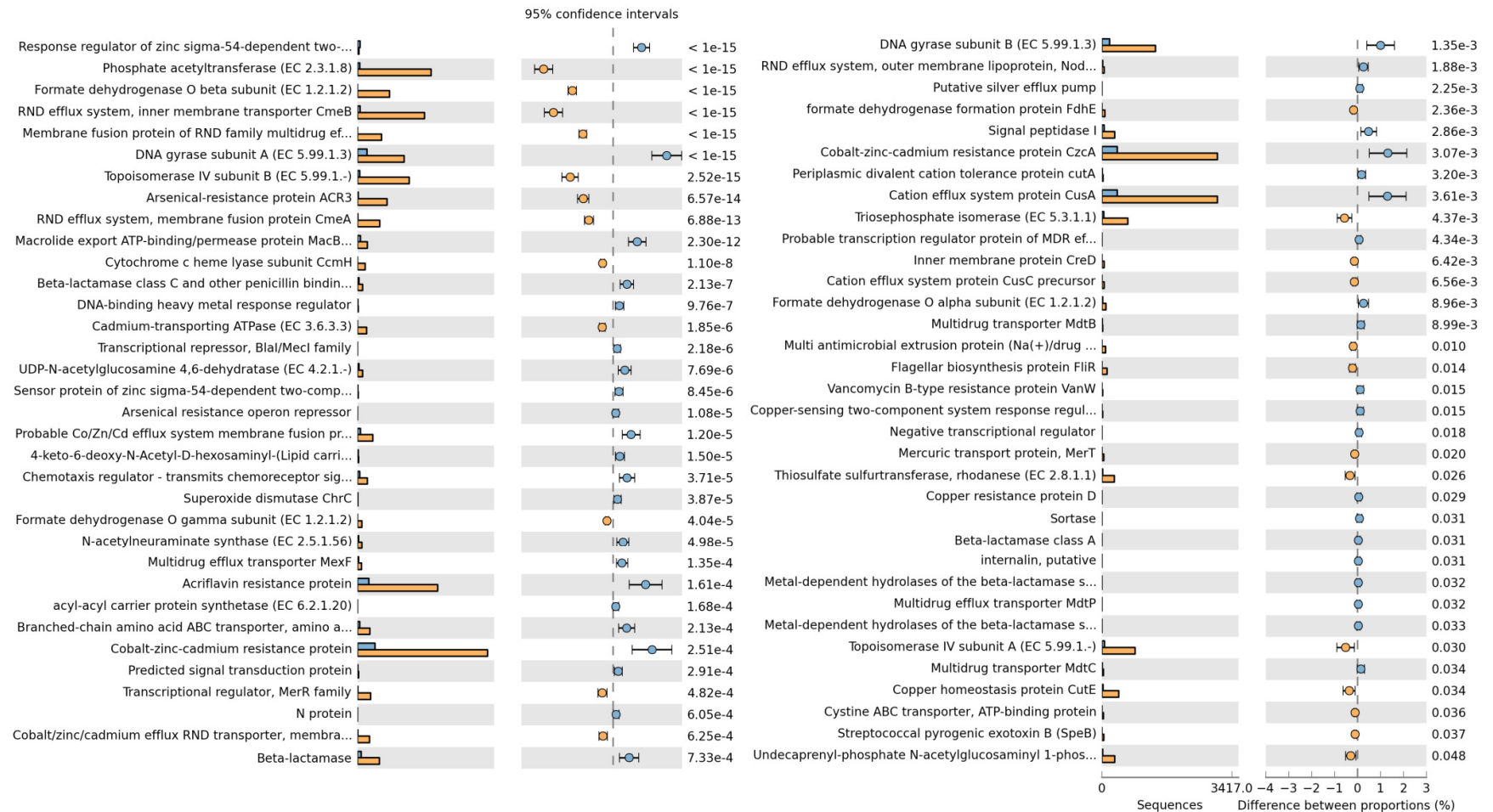
## APÊNDICE B – Sequências anotadas para o Subsistema gênico Metabolismo de RNA no metagenoma urbanizado e não urbanizado



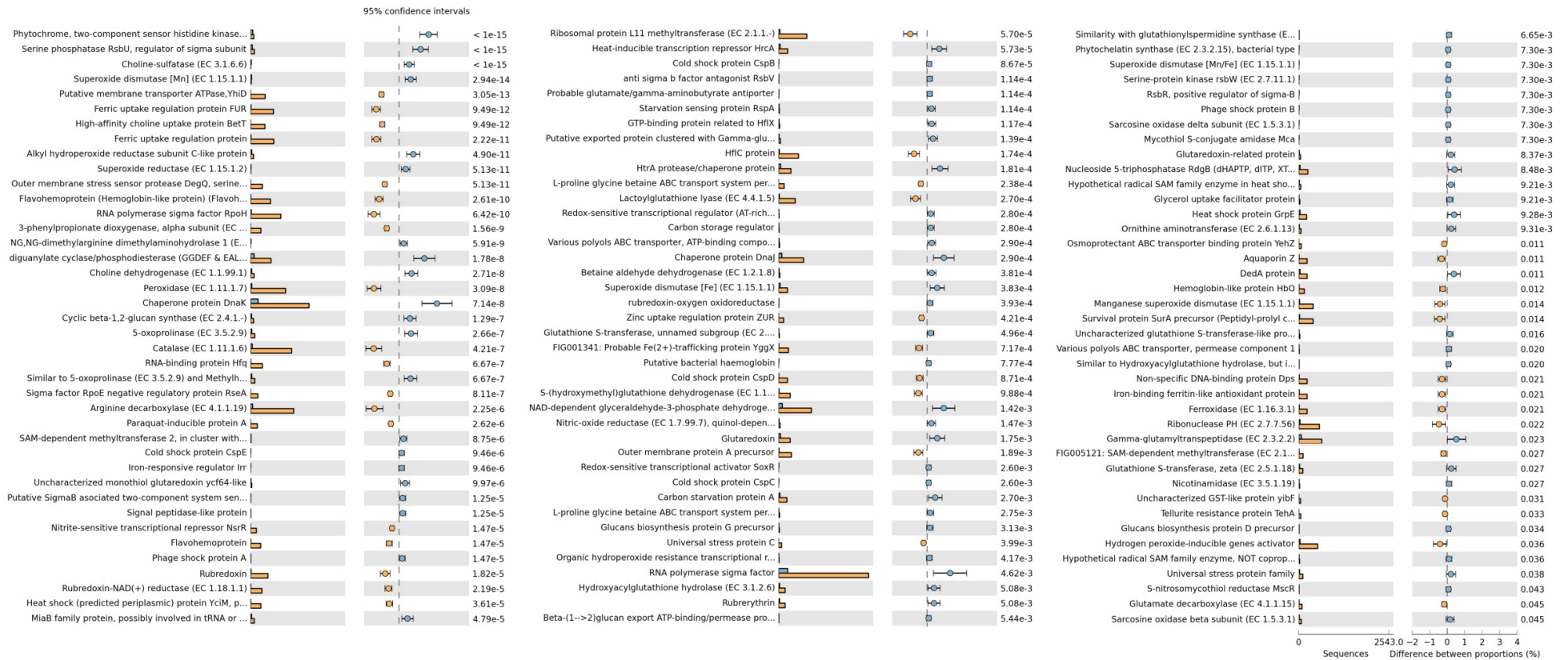
## APÊNDICE C – Sequências anotadas para o Subsistema gênico Metabolismo de DNA no metagenoma urbanizado e não urbanizado



## APÊNDICE D – Sequências anotadas para o Subsistema gênico Virulência no metagenoma urbanizado e não urbanizado



## APÊNDICE E – Sequências anotadas para o Subsistema gênico Resposta ao Estresse no metagenoma urbanizado e não urbanizado



APÊNDICE F – Número de sequências obtidas pela classificação taxonômica dos subsistemas metabolismo de DNA, RNA, Proteína, Metano, Nitrogênio, Enxofre, Virulência e Resposta ao Estresse nos metagenomas urbanizado e não urbanizado

Grupos Taxonômicos	Urbanizado								Não Urbanizado							
	DNA	RNA	Proteína	Metano	Nitrogênio	Enxofre	Virulência	Estresse	DNA	RNA	Proteína	Metano	Nitrogênio	Enxofre	Virulência	Estresse
Betaproteobacteria	2788	2070	3318	917	726	274	2917	1177	643	429	671	207	164	63	831	285
Gammaproteobacteria	488	335	505	154	147	55	688	208	169	102	182	39	32	17	210	54
Bacteroidetes	369	203	342	79	68	27	508	77	36	21	20	14	10	0	69	12
Alphaproteobacteria	137	115	197	67	51	17	211	84	380	311	495	134	101	32	477	165
Actinobacteria	188	93	258	53	43	8	96	66	26	23	36	12	12	5	23	19
Firmicutes	123	58	86	29	19	13	50	25	134	93	117	38	14	7	61	21
Epsilonproteobacteria	54	32	101	40	28	12	57	16	0	0	11	0	0	0	0	0
Deltaproteobacteria	57	51	84	21	19	0	90	17	163	176	240	63	36	9	377	75
Euryarchaeota	20	22	21	31	0	0	6	6	120	85	179	144	8	0	44	27
Verrucomicrobia	12	10	13	5	5	0	25	0	33	39	48	14	11	13	67	11
Cyanobacteria	14	0	23	0	0	0	14	13	0	5	16	12	0	0	15	5
Elusimicrobia	12	14	14	0	0	0	10	0	10	29	31	8	0	0	16	7
Chloroflexi	6	6	6	0	0	0	0	0	38	21	29	7	0	0	21	8
Chlamydiae	5	6	6	0	0	0	0	0	38	53	64	9	0	0	24	18
Acidobacteria	0	0	0	0	0	0	15	0	71	54	88	6	27	9	341	27
Planctomycetes	0	5	0	0	0	0	6	0	38	51	44	20	8	0	26	8
Viridiplantae	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	9	0
Spirochaetes	0	0	7	0	0	0	0	0	7	8	9	0	0	0	6	0
Chlorobi	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5	5	0	0	0	15	0
Gemmatimonadetes	0	0	0	0	0	0	0	0	8	5	8	0	0	0	10	0
Nitrospirae	0	0	0	0	0	0	0	0	12	8	17	13	10	0	11	0
Thaumarchaeota	0	0	0	0	0	0	0	0	5	8	15	6	0	0	0	0
Opisthokonta	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0
Deinococcus-Thermus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0

**APÊNDICE G – Artigo aceito para publicação na revista Brazilian Journal of Biology****Characterization of the microbial community in a lotic environment to assess the effect of pollution on nitrifying and potentially pathogenic bacteria**

Julliane Dutra Medeiros<sup>a\*</sup>, Laryssa Xavier Araújo<sup>a</sup>, Vânia Lucia da Silva<sup>b</sup>, Cláudio Galuppo Diniz<sup>b</sup>, Dionéia Evangelista Cesar<sup>a</sup>, Alessandro Del’Duca<sup>c</sup> and Cíntia Marques Coelho<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departament of Biology, Institute of Biological Science, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil. Zip Code: 36036-900. Phone/Fax: 55 32 2102-3206.

<sup>b</sup>Departament of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Science, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil. Zip Code: 36036-900. Phone/Fax: 55 32 2102-3213.

<sup>c</sup>Federal Institute of Southeastern of Minas Gerais, Campus Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil, Postal Code 36080-001. Phone/Fax: 55 32 4009-3007.

Key-words: lotic environment, urbanization, pollution, nitrifying microbes, pathogenic

Bactéria.

Palavras-chave: ambiente lótico, urbanização, poluição, micro-organismos nitrificantes, bactéria patogênica.

(With 4 Figures)

Running title: Microbial community in a lotic environment

\*Corresponding author: ju\_dm@hotmail.com

## Abstract

This study aimed to investigate microbes involved in the nitrogen cycle and potentially pathogenic bacteria from urbanized and non-urbanized sites of the São Pedro stream. Water samples were collected from two sites. The dissolved nutrient content was analyzed. PCR and FISH analysis were performed to identify and quantify microbes involved in the nitrogen cycle. To identify potentially pathogenic bacteria, PCR was also carried out. Higher concentration of dissolved nutrients and the presence of *Bacteria* in the urbanized area indicated a eutrophic system. Considering the nitrifying microbes, the genus *Nitrobacter* was found, especially in the urbanized area, and may act as the principal bacteria in converting nitrite into nitrate at this site. The molecular markers *napA*, *amoA*, and *nfrA* were more accumulated at the urbanized site, justifying the higher content of nutrients metabolized by these enzymes. Finally, high abundance of amplicons from *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides/Prevotella/Porphyromonas*, *Salmonella*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and the diarrheagenic lineages of *E. coli* were observed at the urbanized site. These results indicate a change in the structure of the microbial community imposed by anthropic actions. The incidence of pathogenic bacteria in natural environments is of particular importance to public health, emphasizing the need for sewage treatment to minimize the environmental impacts associated with urbanization.

## Caracterização da comunidade microbiana em um ambiente lótico para acessar o efeito da poluição em bactérias nitrificantes e potencialmente patogênicas

### Resumo

Este estudo objetivou investigar os micro-organismos envolvidos no ciclo do nitrogênio e bactérias potencialmente patogênicas das áreas urbanizadas e não urbanizadas do Córrego São Pedro. Amostras de água foram coletadas dos dois locais. O teor de nutriente dissolvido foi avaliado. Análises de PCR e FISH foram realizadas para identificar e quantificar os micro-organismos envolvidos no ciclo do nitrogênio. Para identificar bactérias potencialmente patogênicas, PCR também foi utilizado. Altas concentrações de nutrientes dissolvidos e a presença de *Bacteria* na área urbanizada indicaram um sistema eutrófico. Considerando os micro-organismos nitrificantes, o gênero *Nitrobacter* foi encontrado, especialmente na área urbanizada, e pode estar atuando como a principal bactéria convertendo nitrito em nitrato nessa área. Os marcadores moleculares *napA*, *amoA*, e *nfrA* foram mais acumulados na área urbanizada, justificando o alto teor dos nutrientes metabolizados por essas enzimas. Finalmente, alta abundância de amplicons de *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides/Prevotella/Porphyromonas*, *Salmonella*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e linhagens diarragênicas de *E.*

*coli* foram observados na área urbanizada. Estes resultados indicaram uma mudança na estrutura da comunidade microbiana imposta pelas ações antropogênicas. A incidência de bactérias patogênicas em ambientes naturais é de particular importância para a saúde pública, enfatizando a necessidade de tratamentos de esgoto para minimizar os impactos ambientais associados com a urbanização.

## 1. Introduction

Rivers and streams drain an area of approximately 150 million km<sup>2</sup> and are important reserves of water available for human consumption, animal life, agriculture, and industry. Therefore, there is a dire need to conserve this resource (Kenzaka et al., 2001). Yet, in the modern world, extensive and growing urbanization poses a threat to the ecosystem of streams, either through pollution or factors associated with the discharge of sewage. This phenomenon has been called “urban stream syndrome”, and was extensively discussed by Paul and Meyer (2001).

Water systems must meet certain criteria to be considered healthy. In the past, these included only physicochemical parameters (Murray et al., 2001). Indeed, several studies have shown that urbanization increases the concentration of some nutrients, such as nitrogen, ammonia, nitrate, oxygen, and phosphorus, and is responsible for pH changes in rivers and streams (Hoare, 1984; Meybeck, 1998; Wernick et al., 1998). However, the analysis of the chemical and physical characteristics of an ecosystem becomes limited when the objective is the understanding of its complexity as the biological components should also be taken into account. In this regard, many studies have demonstrated that knowledge of the structure and dynamics of the microbial community in rivers and streams is essential, mainly due to their role in several biogeochemical cycles. This is especially important for environments modified by anthropogenic action (Böckelmann et al., 2000; Kenzaka et al., 2001; Tiquia, 2010).

Considering first the global nitrogen cycle, nitrification and denitrification are important steps. Microorganisms are essentially the group that mediates these processes; bacteria are the major players, followed by fungi and archaea. The nitrifying bacteria include a number of genera. *Nitrosomonas* and *Nitrospira* are generally known as ammonia oxidizing bacteria (AOB), while *Nitrobacter* and *Nitrospira* are nitrite oxidizing bacteria (NOB) (Head et al., 1993; Teske et al., 1994; Herbert, 1999). Since it has been shown that urbanization is related to an augmentation in nitrogen, ammonium and nitrate levels (Hoare, 1984; Meybeck, 1998; Wernick et al., 1998) one can hypothesize that it could influence the density and diversity of nitrifying and denitrifying microbes in impacted ecosystems.



In addition, urbanization can be a source of pathogenic bacteria through the discharge of human sewage into water environments (Girones et al., 2010). Through the monitoring of microbes in water, is possible to identify potential pathogens. Species such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* (including diarrheagenic *E. coli*), *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp., and *Bacteroides* sp. have been found in urbanized systems, and the vast majority of these are associated with the fecal material of humans and other animals (Savichtcheva et al., 2007; Gonzalez et al., 2010; Willems et al., 2011). Therefore, it is acknowledged that the presence of these groups in water environments constitutes a potential health hazard.

In spite of the great impact that urbanization imposes on the microbial community in freshwater, the determination of microbial composition has been a great challenge to microbial ecologists. Conventional methods based on microbiological culture cannot provide a representative composition of the microbial community (Böckelmann et al., 2000). Alternatively, molecular biology techniques can be used. Although several studies have used molecular tools to study the microbial community in polluted freshwater, to the best of our knowledge, few of those targeted group-specific bacteria that have been shown to be involved in the main effects posed by urbanization (He and Jiang, 2005; Muniesa et al., 2006; Savichtcheva et al., 2007; Gonzalez et al., 2010). Thus, the aim of this study was to investigate microbes from the nitrogen cycle and potentially pathogenic bacteria at urbanized and non-urbanized sites along a stream that receive discharge of domestic sewage and does not have appropriated wastewater management. Our finds contribute to understanding the anthropogenic impacts on aquatic ecosystems.

## **2. Material and Methods**

*2.1. Study area and sample collection-* The São Pedro stream is located in the city of Juiz de Fora, Brazil, and is responsible for supplying water to approximately 10% of the population of this city. A part of the stream that passes through the city is polluted, especially due to the discharge of domestic sewage (Latuf, 2004). A previous study in this area that analyzed chemical and biological parameters indicated that the São Pedro stream can be divided in two distinct sites and that this difference may be caused by anthropic actions through the urbanization process (G. Alfenas et al. pers. comm.). Approximately 1 L and 10 L of water samples from the subsurface at the urbanized and non-urbanized sites, respectively, of the São Pedro Stream located in Juiz de Fora, Brazil, were collected in April 2010. The water temperature was 22°C. The water pH at the urbanized site was 6.5 and at the non-urbanized site it was 6.8. The water samples were kept separately in a 15 L bottle previously rinsed

three times with a sample from each site. The studied sites had been previously characterized (G. Alfenas et al. pers. comm.). Site 1(661799E/7591070N) is an urban area with homes nearby. At this point, the water has an unpleasant odor and very dark color. The site 2 (668307E/7591772N) is located in a rural area in a farming region with clean and clear water.

*2.2. Analysis of physicochemical parameters* - An aliquot of water from each site was used to analyze the dissolved nutrients. The concentration of nitrite, nitrate, ammonium nitrogen, total organic nitrogen, and total phosphorus were measured following the methodology described by Wetzel and Likens (1991). The total nitrogen content was calculated as a sum of the concentration of nitrite, nitrate, ammonium nitrogen, and total organic nitrogen.

*2.3. Detection of nitrifying bacteria* - In order to identify nitrifying microbes and molecular markers of the different steps of the nitrogen cycle, PCR analyses were performed. The collected water samples were sonicated on ice using a Vibra Cell VCX130PB (Sonics & Materials, U.S.A) three times for 60 seconds, at an amplitude of 90%. The samples were filtered using a 3M filter in order to eliminate insects and small leaves, followed by GF/F filter to eliminate zooplankton and phytoplankton. The filtered water was centrifuged at 8000 rpm for 15 minutes in 500 mL bottles.

DNA was extracted by chemical digestion with phenol-chloroform, according to Smith and Callihan (1992) with some modification. Briefly, the pellet was resuspended in 500  $\mu$ L of lysis solution (20% sucrose, 10 mM EDTA, 40 mM Tris-HCl and 1.3 mg/ $\mu$ L lysozyme) plus RNase (Promega Corporation, Madison, WI, U.S.A). The solution was incubated for 20 minutes at room temperature, followed by 10 minutes at 37°C in a water bath. SDS was added to a final concentration of 0.2% and incubated 30 minutes at room temperature. The resulting lysate was extracted once with equal volumes of phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1; Sigma, St Louis, MO) and twice with chloroform:isoamylalcohol (24:1). Finally, nucleic acids were precipitated with an equal volume of cold isopropanol at -20°C for 30 minutes. The pellet was washed with cold 70% ethanol, air dried and resuspended in 1  $\mu$ L of RNase and DNase-free water. DNA integrity was checked by agarose gel electrophoresis and quantified spectrophotometrically in a NanoDrop ND 1000 instrument (Thermo Scientific, DE, USA). The DNA was stored at -20°C until use.

Table 1 shows the primers sequences used to amplify specific DNA fragments from microbes related to the nitrogen cycle (Nitrosomonadaceae, *Nitrosospira*, *Nitrospira*, *Nitrobacter*, *amoA* - ammonia

monooxygenase, *napA* - nitrate reductase A, *nfrA* - nitrate ammonification). PCR amplifications were carried out as previously described since all the primers used in this study were fully characterized in previous studies, in which they were used as primers or fluorescent *in situ* hybridization (FISH) probes (Amann et al., 1990; Mobarry et al., 1996; Hovanec et al., 1998; Wanable et al., 2001; Mohan et al., 2004; Geets et al., 2007; Smith et al., 2007). The PCR products were separated by electrophoresis on a 1% agarose gel and visualized by staining with 0.5 µg of ethidium bromide per mL of gel.

(Insert Table 1)

The assays were performed at least in duplicate. The final concentration of DNA template of all PCR reactions was 20ng. To verify if the quantity and quality of the DNA extracted from both sites were comparable, PCR analysis was performed using primers for the domain *Bacteria* (positive control). The negative control was the PCR reaction containing all components needed to perform this analysis, except for DNA.

After the identification of microbes involved in the nitrogen cycle, FISH analysis was carried out in order to quantify some of the microbes in the environment. For better characterize our studied areas, we also investigated the density of the domains *Bacteria* and *Archaea* through FISH analysis. As the first step, 20% (w/v) paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) was added to an aliquot of the collected sample to a final concentration of 2%. Then, the cells were concentrated from the water sample (1.0mL) on polycarbonate filters (25 mm in diameter, pore size 0.2 µm, Whatman). The filters were placed on glass slides and covered with 40 µL of hybridization solution containing the probes at a final concentration of 2.5 ng/µL (0.9 M NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 7.2; 5 mM EDTA; 0.01% SDS; a variable concentration of formamide). The probe sequences and hybridization conditions are given in Table 2. The filters were incubated in a hybridization chamber at 42°C overnight. Then, they were transferred to a 96-well plate with 1 mL of pre-warmed washing solution (20 mM Tris-HCl pH 7.2; 10 mM EDTA; 0.01% SDS; a variable concentration of NaCl) and incubated at 48°C for 15minutes. Filters were labeled with 100 µL of DAPI at a final concentration of 2µg/mL for 3 minutes at room temperature. Subsequently, they were gently washed three times with 80% ethanol, dried on paper and mounted on glass slides using a glycerol:PBS (7:3) solution. Bacterial cells on the filter sections were observed using a BX60 microscope (Olympus, Japan). The microbes were analyzed in 10 random fields for each probe from each sample. For each microscopic field, two categories were determined: total DAPI-stained cells and cells stained with the specific probe. From all the fields analyzed, the mean abundance and standard deviations were calculated. All counts were corrected by subtracting the counts obtained with the negative control probe. The

experiments were performed in duplicate. Considering that the data are heteroscedastic and not normalized, the Mann-Whitney test (independent samples) was applied for statistical analysis.

(Insert Table 2)

*2.4. Detection of potentially pathogenic bacteria* - In order to identify bacteria of human health interest in the water of the studied environments, PCR analyses were performed using primers for potentially pathogenic bacteria: *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacteroides/Prevotella/Porphyromonas*, *Salmonella*, *A. hydrophila*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and diarrheagenic lineages of *E. coli* (see Table 1). The DNA used was the same as that used for the nitrifying bacteria analyses, and PCR amplifications were carried out as previously described by (Amann et al., 1990; Trebesius et al., 2000; Wanable et al., 2001; Fukushima et al., 2003; Qin et al., 2003; Aranda et al., 2004; Rinttila et al., 2004; Chotar et al., 2006). The negative control was the PCR reaction containing all the components needed to perform this analysis, except DNA. As the positive control, PCR amplifications were carried out on DNA extracted from a reference culture of the bacterial group targeted by the primer. For the lineage ETEC of *E. coli*, PCR amplification specific for the gene *elt* was carried out and its amplicon was purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Inc.). The DNA fragment obtained was sequenced and blasted against the nucleotide database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) to confirm its specificity.

### 3. Results

*3.1. Analysis of physicochemical parameters* - The concentration of dissolved nutrients is shown in Table 3. The concentration of nitrite, nitrate, ammonium nitrogen, total organic nitrogen, and total phosphorus were higher in the urbanized area. The total nitrogen obtained in the urbanized area was 4.107 mg/L; this concentration was 0.482 mg/L in the non-urbanized area.

(Insert Table 3)

*3.2. Nitrifying bacteria* - Through PCR analyses shown in Figure 1, the groups Nitrosomonadaceae and *Nitrosospira* that function as AOB and *Nitrospira* (one of the NOB groups) were detected in both areas of study. Bacteria of the genus *Nitrobacter*, which convert nitrite into nitrate, were present at urbanized area and in the non-urbanized area were less than the detection limit of our assay. The genes *amoA*, *napA*, and *nfrA*, important molecular markers of the nitrogen cycle, were present in both areas; however, the amplicons were more abundant in the urbanized area (see Figure 1). Through FISH analysis, it was observed that the groups

Nitrosomonadaceae, Nitrospiraceae, and *Nitrobacter* had significantly higher abundance in the urbanized area (see Figure 2).

(Insert Figure 1)

Considering the domains *Bacteria* and *Archaea*, the abundance of *Bacteria* was significantly higher in the urbanized area ( $9.48 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) compared to the non-urbanized area ( $0.80 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ); for the domain *Archaea*, the abundance was  $2.76 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  in the urbanized area and  $0.35 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$  in the non-urbanized area.

(Insert Figure 2)

3.3. *Potentially pathogenic bacteria* - The Figure 3 and 4 show the results of PCR using primers specific for genera and species of already known human pathogens. The genera *Enterococcus sp.* was present in the urbanized area and was less than the detection limit of our assay in the non-urbanized area. The amplicons for the genera *Salmonella sp.*, *Streptococcus sp.*, and *Bacteroides/Prevotella/Porphyromonas* were much more accumulated in the urbanized area. The same results were observed for the species *P. aeruginosa* and *S. aureus*. In contrast, the amplicons for *A. hydrophila* were present at the same intensity at both sites (as shown in Figure 3).

(Insert Figure 3)

For *E. coli*, the amplicons were more abundant in the urbanized area. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) was identified according to the genotype *eae+/bfp+* in both studied areas. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) was identified according to the genotype *stx1+/stx2+* only in the urbanized area and *stx1+/stx2-* in the non-urbanized area. Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) was classified as *ipaH+* in the two areas and the strain ETEC (enterotoxigenic *E. coli*) was identified according to the genotype *elt+/est-* in the urbanized area and *elt-/est-* in the non-urbanized area. It is important to mention that the amplicons obtained for all the diarrheagenic *E. coli* were more intense at the urbanized site when compared to the non-urbanized site (see Figure 4).

(Insert Figure 4)

#### 4. Discussion

Increasing urbanization has had serious impacts on freshwater ecosystems. The pollution and discharge of sewage are altering the microbial community, either by modulation of the density of nitrifying bacteria or by the addition of pathogens to the environment (Paul and Meyer, 2001; Walsh et al., 2005; Girones et al., 2010). The study presented here attempted to identify the differences in the microbial community at two sites along the São Pedro stream, one influenced by urbanization and the other not.

The abundance of bacteria ( $1 \times 10^7$ ) obtained in the urbanized area of study was in agreement with Kenzaka et al. (2001) and within the range reported for other polluted rivers that were considered eutrophic systems by Yamaguchi et al. (1997). This high abundance can be justified by the influx of organic material in this environment, resulting from domestic sewage. The high abundance of *Archaea* in the urbanized area can be explained since these microbes can easily survive in environments with a higher content of nutrients and could be active in the recycling of nitrogen (Dridi et al., 2011).

The concentration of dissolved nutrients obtained in this study in the urbanized area also corroborated with classifying this area as an eutrophic system since this classification is within the range of nutrients found at this site. In contrast, the concentration of dissolved nutrients observed in the non-urbanized is in agreement with the values of a preserved system according to the classification of Vollenweider and Kerekes (1980). However, it is important to mention that this classification also include analyses of other variables. The values of the ammonia, nitrite, nitrate, total organic nitrogen, and total phosphorus were extremely high in the urbanized area compared to the non-urbanized one. Those values are similar, or in some cases higher, than the values obtained in different studies performed on rivers and streams in urbanized areas (Meybeck, 1998; Wernick et al., 1998; Henjum et al., 2010).

Nitrogen fixation, ammonification, nitrification, and denitrification are some of the steps that comprise the nitrogen cycle, these are realized by bacteria and archaea. Focusing on bacteria, nitrification, the first step, is mediated by ammonia oxidizing bacteria (AOB) that produce nitrite, which in turn is oxidized to nitrate by nitrite oxidizers (NOB) (Herbert, 1999). The *amoA* gene codifies the  $\alpha$ -subunit of ammonia monooxygenase, therefore, it is an important molecular marker for ammonia oxidizing bacteria because it can simultaneously amplify the *amoA* gene in  $\beta$ - and  $\gamma$ -AOB (McTavish et al., 1993; Sinigalliano et al., 1995). The periplasmic nitrite reductase, codified by the gene *nrfA*, catalyzes the conversion of nitrite to ammonia, and has also been used as a molecular marker (Mohan et al., 2004). Denitrification is an anaerobic cycle comprised of the reduction of nitrate, nitrite, and nitric oxide to nitrous oxide or nitrogen gas (Philippot and Hallin, 2005). An important molecular marker of this process is the gene *napA* which encodes for the periplasmic nitrate reductase (Flanagan, 1999).

PCR analysis showed that the group *Nitrobacter*, was less than the detection limit of our assay in the non-urbanized area. This result corroborates with FISH analysis, through which we observed a higher abundance of *Nitrobacter* in the urbanized area compared to the non-urbanized site (as shown in Figure 1 and 2). The high density of the *Nitrobacter* group is in agreement with the data of dissolved nutrients; these results

showed, at the urbanized site, a low level of nitrite which was below the detection level, and a high quantity of nitrate (see Table 3). For the group Nitrospiraceae, which includes the genus *Nitrospira*, no difference was observed between the two habitats by PCR analysis (see Figure 1). These results suggest that, in these habitats, the genus responsible for converting nitrite into nitrate is *Nitrobacter*. According to Herbert (1999), in shallow coastal systems, *Nitrobacter* spp. is the principal organism that exerts this function. The high amount of nitrate compared to nitrite in both studied areas, especially the urbanized one, could explain the presence of the *napA* gene in these environments since the enzyme codified by this gene needs its substrate (nitrate) to perform its function. The majority of the Nitrosomonadaceae group was observed in the urbanized area, according to FISH analysis (as shown in Figure 2). This result is in agreement with and explains the extremely high amount of ammonium nitrogen found in this area, since Nitrosomonadaceae, including the genus *Nitrosomonas*, is one of the groups responsible for oxidizing ammonia to nitrite. The presence of the *amoA* and *nrfA* genes could also be explained by the high amount of ammonium nitrogen in the urbanized area since the enzyme ammonium monooxygenase needs its substrate (ammonium nitrogen) to perform the nitrification process; the gene *nrfA* is responsible for supplying this nutrient to the environment. It is important to mention that the analysis of the nutrient content and the presence of the group or enzyme that metabolizes it must be considered within the timescale of nutrient metabolism.

In addition to the nitrifying bacteria, our study also investigated bacteria with important clinical interests that are potential human pathogens, since a high number of these microbes are found in urban sewage and may be considered environmental contaminants. Most of those pathogens can be removed from the water by a sewage treatment but, when no treatment is performed, these pathogens can be discharged into effluents and can be a threat to public health (Girones, 2010). In Brazil, a country under development, non-treated sewage is a major cause of water pollution. The family Enterobacteriaceae is a major group of Gram negative bacteria, found in soil, water, humans, and other animals. Some species of this group are pathogens and could cause disease, mainly gastroenteritis. An important genus of this family is the genus *Salmonella*. It is composed of two species, *Salmonella enterica* and *Salmonella bongori*, with many subgroups and serovars, all of which are capable of causing human illness. Contamination with *Salmonella* could occur through drinking contaminated water, swimming in contaminated water, or eating food washed with contaminated water (Boyd et al., 1996; Hsu et al., 2011). The presence of *Salmonella* sp. in more abundance in the urbanized area of this study (Fig. 3) is in agreement with the findings of Gonzalez et al. (2010), indicating a high prevalence of *Salmonella* sp. in the Brazilian Lagoon that is an urban ecosystem undergoing accelerated degradation especially due to pollution.

Savichtcheva et al. (2007) also found that *Salmonella* sp. was the most frequently detected enteropathogen in samples of rivers with different levels of pollution, as well as in samples of sludge and wastewater treatment.

Finally, we considered the most studied organisms in the Enterobacteriaceae family, *E. coli*. Several virulence properties are well-characterized among *E. coli* populations, differentiating them from commensal and pathogenic strains. Considering the pathogenic *E. coli*, these virulence determinants are genetically encoded either by chromosomal, plasmid, or bacteriophage DNA and are represented by selected genes such as *eae* (attaching and effacing lesions), *bfpA* (localized adherence), *ipaH* (enteroinvasive mechanism), the genes encoding heat-labile toxin (*elt*), and heat-stable toxin (*est*), and the genes encoding the Shiga toxins, *stx1* and *stx2* (Aranda et al., 2004). The source of contamination of natural environments with these pathotypes are related to sewage discharges and wild or domestic animals since there is evidence that cattle, among other animals, are the most important reservoir of these pathogens (Muniesa et al., 2006). Several studies have aimed at investigating the incidence of diarrhegenic *E. coli* in different water environments, and the majority of them have demonstrated that these lineages and the related virulence genes are present in urbanized and polluted environments. Our data (see Figure 4) confirm these findings. The presence of EHEC and ETEC in sludge and rivers with different degrees of pollution was detected by Savichtcheva et al. (2007). The *stx* genes were found in different streams with high urbanization and also in preserved forest (García-Aljaro et al., 2005; Higgins et al., 2005; Muniesa et al., 2006). Our results show that EHEC was genotyped as *stx1*<sup>+</sup>/*stx2*<sup>+</sup> at the urbanized site; however the *stx2* gene was less than the detection limit in the non-urbanized area of the study, which is relevant and worrisome since the *stx2* gene is believed to be commonly associated with more severe illnesses (Oliveira et al., 2008). An interesting observation is that the same pathotypes were also found in regional studies with urban pigeons and isolates from human diarrheic feces, indicating the circulation of the same genes in different samples from the city of Juiz de Fora (Silva et al., 2009; Garcia et al., 2011).

The genera *Enterococcus*, *Streptococcus*, and *Staphylococcus* are low-GC Gram-positive bacteria belonging to the phylum Firmicutes. All these genera have species that are classified as human commensals, and as such are part of the normal human microbial community. However, studies have shown that under adverse conditions (uncolonized areas or imbalanced homeostasis) these species can behave as opportunistic pathogens and became virulent and resistant to multiple antibiotics (Willems et al., 2011). There is evidence that these genera can be also found in water, soil, and plants (Hardie and Whiley, 1997). Our results (see Figure 3) indicate the presence of *Enterococcus* sp., *Streptococcus* sp., and *S. aureus* in a water environment. He and Jiang (2005) also detected, using molecular techniques, the presence of *Enterococcus* in coastal waters and sewage. *S. aureus*



is not associated with the fecal material of humans, but the presence of this species in water suggests that this environment is a potential source of community-acquired *S. aureus* infections (Goodwina and Pobudab, 2009).

Other groups that are part of the normal human microbiota are the anaerobic bacteria *Bacteroides* sp., *Prevotella* sp., and *Porphyromonas* sp. (Wexler, 2007). As well as Gram-positive cocci, they can develop virulence and became important human pathogens. Our results show the presence of these microbes in a water environment especially in the area subjected to urbanization (see Figure 3). Different studies have used the microbes of the genus *Bacteroides* as fecal pollution indicators (Bernhard and Field, 2000; Boehm et al., 2003). *Bacteroides* spp. are important indicators, and are more sensitive than coliforms, since they can be found in greater quantities on humans. Another important characteristic of contamination with *Bacteroides* is, as this bacteria is an obligate anaerobe, a high level in water indicates recent contamination (Fiksdal et al., 1985).

The genera *Aeromonas* is involved in several diseases in humans and other animals. *A.* was found in both study areas (see Figure 3). This result was expected because these microbes are primarily aquatic organisms and, as reported by Scoaris et al. (2008), *A. hydrophila* can be found in treated and non-treated water. *P. aeruginosa*, a free-living bacteria ubiquitous in the environment, is another potential human pathogen. This species can be found either in oligotrophic environments or in high nutrient environments (Mena and Gerba, 2009), which is in agreement with our data. Our results show that *P. aeruginosa* was present in the non-urbanized area with poor nutrients, but it was more abundant in the urbanized area considered a eutrophic system. Garcia-Armisen et al. (2011) have recently shown the incidence of *P. aeruginosa* resistant to multiple antibiotics in rivers contaminated with sewage.

In conclusion, our study presents a comparison of the community composition of a polluted and preserved stream focusing on nitrifying bacteria and pathogens that impact the health of humans and other animals. This study is important for alerting the population and the government about the problems associated with the discharge of untreated sewage in running and preserved waters. The results show a major incidence of nitrifying and potentially pathogens at the polluted site, which is influenced by urbanization, especially by the discharge of sewage. These findings indicate a change in the structure of the microbial community imposed by anthropic actions. The survival and persistence of pathogenic bacteria in natural environments is of particular importance to public health. Our results emphasize the need for sewage treatment and policies to minimize the environmental impacts associated with urbanization.

#### **Acknowledgements**

The research described in this manuscript was supported by a grant from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Brazil. Special thanks go to members of the Laboratório de Ecologia Aquática from Universidade Federal de Juiz de Fora for crucial support with the nutrient content analyses.

## References

AMANN, RI., BINDER, BJ., OLSON, RJ., CHISHOLM, SW., DEVEREUX, R. and STAHL, DA., 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied Environmental Microbiology*, vol. 56, p. 1919-1925.

ARANDA, KRS., FAGUNDES-NETO, U. and SCALETSKY, ICA., 2004. Evaluation of multiplex PCRs for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, vol.42, p. 5849-5853. doi:10.1128/JCM.42.12.5849-5853.2004

BERNHARD, AE. and FIELD, KG., 2000. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S Ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Applied Environmental Microbiology*, vol.66, p. 1587-1594. doi:10.1128/AEM.66.4.1587-1594.2000

BÖCKELMANN, U., MANZ, W., NEU, TR. and SZEWZYK, U., 2000. Characterization of the microbial community of lotic organic aggregates ('river snow') in the Elbe River of Germany by cultivation and molecular methods. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 33, p.157-170

BOEHM, AB., FUHRMAN, JA., MRSE, RD. and GRANT, SB., 2003. Tiered approach for identification of a human fecal pollution source at a recreational beach: Case study at Avalon Bay, Catalina Island, California. *Environmental Science & Technology*, vol. 37, p. 673-680.

BOYD, EF., WANG, FS., WHITTAM, TS. and SELANDER, RK., 1996. Molecular genetic relationships of the Salmonellae. *Applied Environmental Microbiology*, vol. 62 p. 804-808.

CHOTAR, M., VIDOVA, B. and GODANY, A., 2006. Development of specific and rapid detection of bacterial pathogens in dairy products by PCR. *Folia Microbiologica (Praha)*, vol. 51, p. 639-646.

DAIMS, H., NIELSEN, JL., NIELSEN, PH., SCHLEIFER, KH. and WAGNER, M., 2001. In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Applied Environmental Microbiology*, vol. 67, p. 5273-5284.

DRIDI, B., RAOULT, D. and DRANCOURT, M., 2011. Archaea as emerging organisms in complex human microbiomes. *Anaerobe*, vol. 17, p. 56-63.

FIKSDAL, L., MAKI, JS., LACROIX, SJ. and STALEY, JT., 1985. Survival and detection of bacteroides spp., prospective indicator Bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, vol. 49, p.148-150.

FLANAGAN, DA., GREGORY, LG., CARTER, JP., KARAKAS-SEM, A., RICHARDSON, DJ. and SPIRO, S., 1999. Detection of genes for periplasmic nitrate reductase in nitrate respiring bacteria and in community DNA. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 177, p. 263-270.

FUKUSHIMA, H., TSUNOMORI, T. and SEKI, R., 2003. Duplex real-time Sybr Green PCR assays for detection of 17 species of food- or waterborne pathogens in stools. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, p. 5134-5146.

GARCÍA-ALJARO, C., MUNIESA, M., BLANCO, JE., BLANCO, M., BLANCO, J., JOFRE, J. and BLANCH, AR., 2005. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from aquatic environments. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 246, p. 55-65.

GARCIA-ARMISEN, T., VERCAMMEN, V., PASSERAT, J., TRIEST, D., SERVAIS, P. and CORNELIS, P., 2011. Antimicrobial resistance of heterotrophic bacteria in sewage-contaminated rivers. *Water Research*, vol. 45, p.788-796.

GARCIA, PG., SILVA, VL. and DINIZ, CG., 2011. Occurrence and antimicrobial drug susceptibility patterns of commensal and diarrheagenic *Escherichia coli* in fecal microbiota from children with and without acute diarrhea. *The Journal of Microbiology*, vol. 49, p.46-52.

GEETS, J., COOMAN, M., WITTEBOLLE, L., HEYLEN, K., VANPARYS, B., DE-VOS, P., VERSTRAETE, W. and BOON, N., 2007. Real-time PCR assay for the simultaneous quantification of nitrifying and denitrifying bacteria in activated sludge. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 75, p. 211-221.

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

GONZALEZ, AM., PARANHOS, R. and LUTTERBACH, MS., 2010. Relationships between fecal indicators and pathogenic microorganisms in a tropical lagoon in Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 164, p. 207-219.

GOODWINA, KD. and POBUDA, M., 2009. Performance of CHROMagar™ *Staph aureus* and CHROMagar™ MRSA for detection of *Staphylococcus aureus* in seawater and beach sand – Comparison of culture, agglutination, and molecular analyses. *Water Research*, vol. 43, p. 4802-4811.

HARDIE, JM. and WHILEY, RA., 1997. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Society for Applied Bacteriology symposium*, vol. 26, p.1S-11S.

- HE, JW. and JIANG, S., 2005. Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by real-time PCR. *Applied Environmental Microbiology*, vol. 71, p. 2250-2255.
- HEAD, JM., HIORNS, WD., EMBLEY, TM., MCCARTHY, AJ. and SAUNDE JR., 1993. The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *Journal of General Microbiology*, vol. 139, p. 1147-1153.
- HENJUM, MB., HOZALSKI, RM., WENNEN, CR., ARNOLDA, W. and NOVAK, PJ., 2010. Correlations between in situ sensor measurements and trace organic pollutants in urban streams. *Journal of Environmental Monitoring*, vol. 12, p. 225-233.
- HERBERT, RA., 1999. Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 23, p. 563-590.
- HIGGINS, JA., BELT, KT., KARNIS, JS., RUSSELL-ANELLI, J. and SHELTON, DR., 2005. tir- and stx-positive *Escherichia coli* in stream waters in a metropolitan area. *Applied Environmental Microbiology*, vol. 71, p. 2511-2519.
- HOARE, RA., 1984. Nitrogen and phosphorus in Rotorua urban streams. *New Zealand Journal of Marine & Freshwater Research*, vol. 18, p. 451-454.
- HOVANEK, TA., TAYLOR, LT., BLAKIS, A. and DELONG, EF., 1998. Nitrospira-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria. *Applied Environmental Microbiology*, vol. 64, p. 258-264.
- HSU, BM., HUANG, KH., HUANG, SW., TSENG, KC., SU, MJ., LIN, WC., JI, DD., SHIH, FC., CHEN, JL. and KAO, PM., 2011. Evaluation of different analysis and identification methods for *Salmonella* detection in surface drinking water sources. *Science of the Total Environment*, vol. 409, p. 4435-4441.
- KENZAKA, T., YAMAGUCHI, N., PRAPAGDEE, B., MIKAMI, E. and NASU, M., 2001. Bacterial community composition and activity in urban rivers in Thailand and Malaysia. *Journal of Health Science*, vol. 47, p. 353-361.
- Latuf, MO., 2004. Diagnostic study of the São Pedro's creek waters, Juiz de Fora town, Minas Gerais state, Brazil. *Geografia*, vol. 13, p. 21-55.
- MCTAVISH, H., FUCHS, JA. and HOOPER, AB., 1993. Sequence of the gene coding for ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *Journal of Bacteriology*, vol. 175, p. 2436-2444.
- MENA, KD. and GERBA, CP., 2009. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology*, vol. 201, p.71-115.

- MEYBECK, M., 1998. Man and river interface: multiple impacts on water and particulates chemistry illustrated in the Seine river basin. *Hydrobiology*, vol. 373, p.1-20.
- MOBARRY, BK., WAGNER, M., URBAIN, V., RITTMANN, BE. and STAHL, DA., 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, vol. 62, p.2156-2162.
- MOHAN, SB., SCHMID, M., JETTEN, M. and COLE, J., 2004. Detection and widespread distribution of the nrfA gene encoding nitrite reduction to ammonia, a short circuit in the biological nitrogen cycle that competes with denitrification. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 49, p. 433–443.
- MUNIESA, M., JOFRE, J., GARCIA-ALJARO, C. and BLANCH, AR., 2006. Occurrence of Escherichia coli O157:H7 and other Enterohemorrhagic Escherichia coli in the environment. *Environmental Science and Technology*, vol. 40, p. 7141-7149.
- MURRAY, KS., FISHER, LE., THERRIEN, J., GEORGE, B. and GILLESPIE, J., 2001. Assessment and use of indicator bacteria to determine sources of pollution to an urban river. *Journal of Great Lakes Research*, vol. 27, p. 220-229.
- OLIVEIRA, MG., BRITO, JRF., GOMES, TAT., GUTH, BEC., VIEIRA, MAM., NAVES, ZVF., VAZ, TMI. and IRINO, K., 2008. Diversity of virulence profiles of Shiga toxin-producing Escherichia coli serotypes in food-producing animals in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 127, p. 139-146.
- PAUL, MJ. and MEYER, JL., 2001. Streams in the urban landscape. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, vol. 32, p. 333-365.
- PHILIPPOT, L. and HALLIN, S., 2005. Finding the missing link between diversity and activity using denitrifying bacteria as a model functional community. *Current Opinion in Microbiology*, vol. 8, p. 234-239.
- QIN, X., EMERSON, J., STAPP, J., STAPP, L., ABE, P. and BURNS, JL., 2003. Use of Real-Time PCR with multiple targets to identify Pseudomonas aeruginosa and other nonfermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 41, p. 4312-4317.
- RINTTILA, T., KASSINEN, A., MALINEN, E., KROGIUS, L. and PALVA, A., 2004. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 97, p. 1166-1177.
- SAVICHTCHEVA, O., OKAYAMA, N. and OKABE, S., 2007. Relationships between Bacteroides 16S rRNA genetic markers and presence of bacterial enteric pathogens and conventional fecal indicators. *Water Research*, vol. 41, p. 3615-3628.

SCOARIS, DO., COLACITE, J., NAKAMURA, CV., UEDA-NAKAMURA, T., FILHO, BAA. and FILHO, BPD., 2008. Virulence and antibiotic susceptibility of *Aeromonas* spp. isolated from drinking water. *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 93, p. 111-122.

SILVA, VL., NICOLI, JR., NASCIMENTO, TC. and DINIZ, CG., 2009. Diarrheagenic *Escherichia coli* strains recovered from urban pigeons (*Columba livia*) in Brazil and their antimicrobial susceptibility patterns. *Current Microbiology*, vol. 59, p. 302-308.

SINIGALLIANO, CD., KUHN, DN. and JONES, RD., 1995. Amplification of the *amoA* gene from diverse species of ammonium-oxidizing bacteria and from an indigenous bacterial population from seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, p. 2702-2704.

SMITH, CJ. and CALLIHAN, DR., 1992. Analysis of rRNA Restriction Fragment Length Polymorphisms from *Bacteroides* spp. and *Bacteroides fragilis* Isolates Associated with Diarrhea in Humans and Animals. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 30, p. 806-812.

SMITH, CJ., NEDWELL, DB., DONG, LF. and OSBORN, AM., 2007. Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG* and *napA*), nitrite reductase genes (*nirS* and *nrfA*), and their transcripts in estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, p. 3612-3622

STAHL, DA., AMANN, R., 1991. Development and application of nucleic acid probes. In: GOODFELLOW, M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons Ltd.

TESKE, A., ALM, E., REGAN, JM., TOZE, S., RITTMANN, BE. and STAHL, DA., 1994. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *Journal of Bacteriology*, vol. 176, p. 6623-6630.

TIQUIA, SM., 2010. Metabolic diversity of the heterotrophic microorganisms and potential link to pollution of the Rouge River. *Environmental Pollution*, vol. 158, p. 1435-1443.

TREBESIOUS, K., LEITRITZ, L., SCHUBERT, KAS., AUTENRIETH, IB. and HEESEMANN, J., 2000. Culture independent and rapid identification of bacterial pathogens in necrotising fasciitis and streptococcal toxic shock syndrome by Fluorescence in situ hybridization. *Medical Microbiology and Immunology*, vol. 188, p. 169-175.

VOLLENWEIDER, R., KERKES, J., 1980. The loading concept as basis for controlling eutrophication philosophy and preliminary results of the OECD programme on eutrophication. *Progress in water technology*, vol. 12, p. 5-38.

WALLNER, G., AMANN, R. and BEISKER, W., 1993. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*, vol. 14, p. 136-143.

WALSH, CJ., ROY, AH., FEMINELLA, JW., COTTINGHAM, PD., GROFFMAN, PM. and MORGAN, IRP., 2005. The urban stream syndrome: current knowledge and the search for a cure. *Journal of the North American Benthological Society*, vol. 24, p. 706-723.

WANABLE, K., KODAMA, Y. and HARAYAMA, S., 2001. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. *Journal of Microbiological Methods*, vol. 44, p. 253-262.

WERNICK, BG., COOK, KE. and SCHREIER, H., 1998. Land use and streamwater nitrate-n dynamics in an urban-rural fringe watershed. *Journal of the American Water Research Association*, vol. 34, p. 639-650.

WETZEL, RG. and LIKENS, GE., 1991. *Limnological Analyses*. Springer-Verlag.

WEXLER, HM., 2007. Bacteroides: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 20, p. 593-621.

WILLEMS, RJL., HANAGE, WP., BESSEN, DE. and FEIL, EJ., 2011. Population biology of Gram-positive pathogens: high-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 35, p. 872-900.

YAMAGUCHI, N., KENZAKA, T. and NASU, M., 1997. Rapid in situ enumeration of physiologically active bacteria in river waters using fluorescent probes. *Microbes and Environment*, vol. 12, p. 1-8.

Table 1- Sequence of primers used for PCR analysis on this study.

Target organism/gene	Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon	Reference
<i>Bacteria</i>	EUB338f	ACTCCTACGGGAGGCAGC	550bp	Amann et al. 1990
	926Rr	CCCGTCAATTCMTTGTGAGTTT		Wanable et al. 2001
Nitrosomonadaceae	EUB338f	ACTCCTACGGGAGGCAGC	950bp	Amann et al. 1990
	Nso1225r	CGCCATTGTATTACGTGTGA		Mobarry et al. 1996
<i>Nitrospira</i>	Nsv443f	CGGAACGAAACGGTCACG	500bp	Mobarry et al. 1996
	926Rr	CCCGTCAATTCMTTGTGAGTTT		Wanable et al. 2001
<i>Nitrospira</i>	EUB338f	ACTCCTACGGGAGGCAGC	350bp	Amann et al. 1990
	Ntspa0685r	GGGAATTCCGCGCTCCT		Hovanec et al. 1998
<i>Nitrobacter</i>	EUB338f	ACTCCTACGGGAGGCAGC	750bp	Amann et al. 1990
	NIT3r	CCTGTGCTCCATGCTCCG		Mobarry et al. 1996
<i>amoA</i>	amoAf	GGGGTTTCTACTGGTGGT	491bp	Geets et al. 2007
	amoAr	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC		
<i>napA</i>	napA V66	TAYTTYTNSNAARATHATGTAYGG	415bp	Smith et al. 2007
	napA V67	NGGRTGCATYTCNGCCATRTT		
<i>nrfA</i>	nrfAf	GCNTGYTGGWSNTGYAA	500bp	Mohan et al. 2004
	nrfAr	TWNGGCATRTGRCARTC		
<i>Streptococcus</i>	EUB338f	ACTCCTACGGGAGGCAGC	320bp	Amann et al. 1990
	STRr	GTGCAGAAGGGGAGAGTGG		Trebesius et al. 2000
<i>Enterococcus spp.</i>	ENRf	CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT	144bp	Rinttila et al. 2004
	ENTr	ACTCGTTGTACTTCCCATTGT		
<i>Bacteroides/Prevotella</i>	BPPf	GGTGTGCGCTTAAGTGCCAT	140bp	Rinttila et al. 2004
<i>Porphyromonas</i>	BPPr	CGGA(C/T)GTAAGGGCCGTGC		
<i>Salmonella sp.</i>	invA139	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAA	284bp	Fukushima et al. 2003
	invA141	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC		
<i>Aeromonas hydrophila</i>	AHCf	GAGAAGGTGACCACCAAGAACA	232bp	Fukushima et al. 2003
	AHCr	AACTGACATCGGCCTTGAACTC		
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA-1	GCGATTGATGGTGATACGGTT	276bp	Fukushima et al. 2003
	SA-2	CAAGCCTTGACGAATAAAGC		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	OPR-1	GCTCTGGCTCTGGCTGCT	230bp	Qin et al. 2003
	OPR-2	AGGGCACGCTCGTTAGCC		
<i>Escherichia coli</i>	ECOL1	GCTTGACACTGAACATTGAG	660bp	Chotar et al. 2006
	ECOL2	GCACTTATCTCTTCCGCATT		
<i>E.coli</i> EPEC ( <i>eae</i> )	eae1	CTGAACGGCGATTACGCGAA	917bp	Aranda et al. 2004
	eae2	CCAGACGATACGATCCAG		
<i>E.coli</i> EPEC ( <i>bfpA</i> )	BFP1	AATGGTGCTTGCCTTGCTGC	326bp	Aranda et al. 2004
	BFP2	GCCGCTTTATCCAACCTGGTA		
<i>E.coli</i> ETEC ( <i>elt</i> )	LTF	GGCGACAGATTATACCGTGC	450bp	Aranda et al. 2004
	LTr	CGTCTCTATATCCCTGTT		



<i>E.coli</i> ETEC ( <i>est</i> )	STf	ATTTTTMTTCTGTATTRTCTT	190bp	Aranda et al. 2004
	STr	CACCCGGTACARGCAGGATT		
<i>E.coli</i> EHEC ( <i>stx1</i> )	Stx1f	ATAAATCGCCATTTCGTTGACTAC	180bp	Aranda et al. 2004
	Stx1r	AGAACGCCACTGAGATCATC		
<i>E.coli</i> EHEC ( <i>stx2</i> )	Stx2f	GGCACTGTCTGAAACTGCTCC	255bp	Aranda et al. 2004
	Stx2r	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		
<i>E.coli</i> EIEC ( <i>ipaH</i> )	IpaH1	GTTCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC	600bp	Aranda et al. 2004
	IpaH2	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC		

Table 2- Sequence of Oligonucleotide probes used for Fluorescence *in situ* hybridization on this study.

Target organism	Probe	Sequence (5'-3')	Form(%) <sup>†</sup>	NaCl (mM) <sup>‡</sup>	Reference
<i>Bacteria</i>	EUB338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	30	102	Amann et al. 1990
	EUB338II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	30	102	Daims et al. 2001
	EUB338III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	30	102	Daims et al. 2001
<i>Archaea</i>	Arc915	GTGCTCCCCCGCCAATTCTT	20	225	Stahl et al. 1991
Nitrospiraceae*	Ntspa712	CGCCTTCGCCACCGGCCTTCC	50	28	Daims et al. 2001
Nitrosomonadaceae	Nso 1225	CGCCATTGTATTACGTGTGA	35	80	Mobarry et al. 1996
<i>Nitrobacter</i>	NIT3	CCTGTGCTCCATGCTCC	40	56	Mobarry et al. 1996
Negative Control	NON	ACTCCTACGGGAGGCAGC	30	102	Wallner et al. 1993

\* For this probe a competitor of NIT3 was used

<sup>†</sup> Formamide concentration in hybridization buffer.<sup>‡</sup> Sodium chloride concentration in washing buffer.

Table 3- Concentration of Nutrients (mg/L) dissolved on the studied areas.

	Nitrite (mg/L)	Nitrate (mg/L)	Ammonium nitrogen (mg/L)	Total Org. NIT. (mg/L)	Total P (mg/L)
<b>Non Urbanized</b>	ND*	0.121	0.081	0.28	0.021
<b>Urbanized</b>	0.029	0.558	1.811	1.708	0.420

\*Not detected

## Figure Legends

Figure 1- Identification of molecular markers of the nitrogen cycle and nitrifying bacteria by PCR analysis. The images are representative of the experiments. A- *Bacteria*, B- *nrfA*, C- *napA*, D- *amoA*, E- Nitrosomonadaceae, F- *Nitrospira*, G- *Nitrosospira*, H- *Nitrobacter*. 1- Molecular Mass Marker; 2- Site 1; 3- Site 2; 4- Positive Control.

Figure 2- Density of bacteria from groups Nitrosomonadaceae (Nso), Nitrospiraceae (Ntspa), *Nitrobacter* (NIT) in urbanized and non-urbanized areas by FISH analysis.

Figure 3- Identification of pathogenic bacteria by PCR analysis. The images are representative of the experiments. A- *Bacteria*, B- *Streptococcus sp.*, C- *Enterococcus sp.*, D- *Salmonella sp.*, E- *Bacteroides/Prevotella/Porphyromonas*, F- *Pseudomonas aeruginosa*, G- *Aeromonas hydrophila*, H- *Staphylococcus aureus*. 1- Molecular Mass Marker; 2- Site 1; 3- Site 2; 4- Positive Control.

Figure 4- Identification of *Escherichia coli* and diarrheagenic lineages by PCR analysis. The images are representative of the experiments. A- *Bacteria*, B- *Escherichia coli*, C- *E. coli* EPEC (*eae*), D- *E. coli* EPEC (*bfpA*), E- *E. coli* EIEC (*ipaH*), F- *E. coli* EHEC (*stx1*), G- *E. coli* EHEC (*stx2*), H- *E. coli* ETEC (*elt*). 1- Molecular Mass Marker; 2- Site 1; 3- Site 2; 4- Positive Control.

Fig. 1

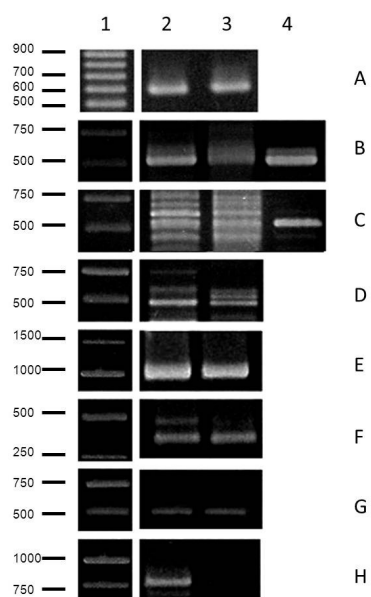


Fig. 2

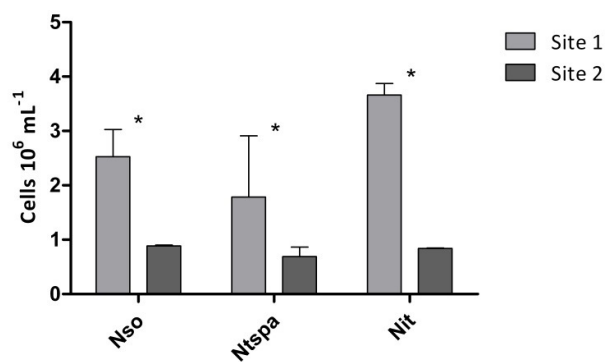


Fig. 3

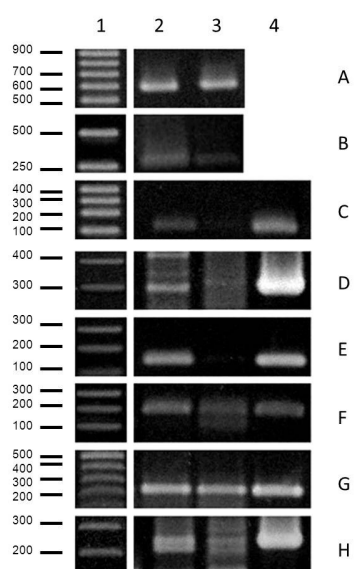


Fig.4

