UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia
Programa de Pós-graduação em Microbiologia

Lainy Ana Siqueira de Oliveira

Avaliação da toxicidade da água e da patogenicidade de bactérias entéricas isoladas do lago artificial Lagoa da Pampulha, Minas Gerais, utilizando o modelo invertebrado *Caenorhabditis elegans*

Belo Horizonte
2022

Lainy Ana Siqueira de Oliveira

Avaliação da toxicidade da água e da patogenicidade de bactérias entéricas isoladas do lago artificial Lagoa da Pampulha, Minas Gerais, utilizando o modelo invertebrado *Caenorhabditis elegans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Dra. Viviane de Souza Alves

Co-orientador: Dr. Henrique Cesar Pereira Figueiredo

Belo Horizonte

2022

043 Oliveira, Lainy Ana Siqueira de.
Avaliação da toxicidade da água e da patogenicidade de bactérias entéricas isoladas do lago artificial Lagoa da Pampulha, Minas Gerais, utilizando o modelo invertebrado *Caenorhabditis elegans* [manuscrito] / Lainy Ana Siqueira de Oliveira. – 2022.
90 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Viviane de Souza Alves. Co-orientador: Dr. Henrique Cesar Pereira Figueiredo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Lagoa. 3. Microbioma Gastrointestinal. 4. Toxicidade. 5. *Caenorhabditis elegans*. I. Alves, Viviane de Souza. II. Figueiredo, Henrique Cesar Pereira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579

Ficha Catalográfica elaborada por Fabiane C M Reis CRB 6 2680

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **LAINY ANA SIQUEIRA DE OLIVEIRA**

Nº REGISTRO: 2020714773

Às 10:00 horas do dia **28 de junho de 2022**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Luiz Henrique Rosa (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Marcelo Henrique Otenio (Embrapa Gado de Leite /Juiz de Fora - MG), a Profa. Dra. Viviane de Souza Alves – Orientadora e o Prof. Dr. Henrique Cesar Pereira Figueiredo – Coorientador, para julgar o trabalho final **"Avaliação da toxicidade da água e da patogenicidade de bactérias entéricas isoladas do lago artificial Lagoa da Pampulha, Minas Gerais, utilizando o modelo invertebrado *Caenorhabditis elegans*"**, da aluna **Lainy Ana Siqueira de Oliveira**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Dra. Viviane de Souza Alves - orientadora, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 28 de junho de 2022

Membros da banca:

Prof. Dr. Luiz Henrique Rosa

Dr. Marcelo Henrique Otenio

De acordo:

Profa. Dra. Viviane de Souza Alves

(Orientadora)

Prof. Dr. Henrique Cesar Pereira Figueiredo

(Coorientador)

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza

(Coordenadora do Programa de Pós-graduação

em Microbiologia)

Documento assinado eletronicamente por **Daniele da Gloria de Souza**, **Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 28/06/2022, às 14:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Luiz Henrique Rosa**, **Professor do Magistério Superior**, em 28/06/2022, às 17:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Viviane de Souza Alves**, **Professora do Magistério Superior**, em 29/06/2022, às 09:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Henrique Otenio**, **Usuário Externo**, em 30/06/2022, às 08:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Henrique Cesar Pereira Figueiredo**, **Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 01/07/2022, às 09:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1455431** e o código CRC **E1380A8B**.

Referência: Processo nº 23072.242348/2021-67 SEI nº 1455431

Dedico às minhas famílias: àquela na qual nasci e aos Gonçalves.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos meus amigos espirituais por serem o meu sustento além da matéria.

À professora Dra. Viviane Alves, pela orientação, pela assistência, pela paciência e pelas inúmeras tentativas de me acalmar diante dos diversos problemas no meio desse percurso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que tornou o meu mestrado financeiramente viável.

À Mariana, minha companheira de laboratório, que fez das coletas momentos divertidos e que diminuía a solidão do laboratório sempre que estava presente, com toda sua agitação e prosa.

Aos meus colegas de outros laboratórios que muito me auxiliaram com os ensaios, com as discussões, com os ouvidos atentos e disposição para ajudar sempre que as coisas se apertavam um pouco mais. Em especial aqueles com quem tive mais contato e maior proximidade: Geise, Ana Carol, Amanda, Júlio, Renan e Manuzinha, sem vocês tudo seria mais difícil.

Às professoras Samantha e Paula, ao professor Luiz (UFOP) e à Jaque, pelas colaborações e auxílio. Ao professor Henrique (Escola de Veterinária) pela identificação das minhas bactérias e pela co-orientação. Ao Julio (Escola de Veterinária) por toda atenção, paciência e pelas análises dos isolados.

À Débora e ao Tiago, por todo apoio, presteza, atenção e competência nos meus contatos com a secretaria. Em especial agradeço pela forma humanizada e delicada com a qual as minhas necessidades foram tratadas.

A todos os profissionais do ICB, aos da manutenção e limpeza, aos vigilantes e porteiros, pessoas que fizeram parte do meu cotidiano e com as quais tive bons relacionamentos durante esses dois anos.

À Adenice, minha querida psicóloga, que me acompanhou desde o início do mestrado, viu de perto as dores e alegrias de cada momento, acolhendo e trabalhando comigo as minhas complexidades. Por me ajudar a lidar com a minha saúde mental durante esse período extremamente desafiador, o seu trabalho tornou essa jornada possível e suportável.

Ao Jorge, o amor que tive a sorte de encontrar nessa vida, pela compreensão dos meus momentos de medo e ansiedade, pelo apoio e incentivo, por fazer questão de estar presente e

acompanhar esse processo de perto. Por todo afeto e bom humor, por trazer leveza à vida e por ser o meu lugar confortável e seguro.

À minha irmã Lohis, pela amizade de sempre, por cada vez que me ouviu e acolheu nas horas de dúvida e dificuldade, pelo choro compartilhado, pelo abraço confortável, pela forma como encaramos tragédias com humor. Por cada vez que demos boas risadas e nos divertimos nos momentos mais leves.

À minha mãe Rosilane, que sempre priorizou os meus estudos e incentivou o meu avanço em cada etapa da minha vida acadêmica. Por demonstrar todo orgulho que sente de mim, por todo esforço para me garantir tudo que estivesse ao seu alcance. Pelas preces e palavras de incentivo e apoio.

A todos que, de alguma forma, estiveram em meu caminho durante esse período e que deixaram em mim suas marcas.

“É justo que muito custe o que muito vale.”
Teresa D’Ávila

RESUMO

A Lagoa da Pampulha é um importante e poluído lago artificial de Belo Horizonte em que há a prática de pesca e o contato de pessoas com o seu interior. O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos das águas e a potencial patogenicidade de bactérias isoladas do lago, empregando o modelo *Caenorhabditis elegans*. A partir da água coletada de 4 pontos ao longo da Lagoa da Pampulha e de um ponto do Rio do Bicudo (corpo d'água saudável), foram avaliados seus efeitos tóxicos na sobrevivência, na fertilidade e no desenvolvimento do verme. A sobrevivência dos vermes mantidos por 24 horas nas amostras foi mensurada a partir do ensaio colorimétrico utilizando MTT. A fertilidade e desenvolvimento foram avaliados a partir da contagem da progênie de adultos expostos e do tempo de desenvolvimento dessa progênie mantida nas amostras. Também foi feita a semeadura das águas e o isolamento de bactérias em Ágar MacConkey e a identificação por MALDI-ToF. Foi avaliada a sobrevivência do *C. elegans* (N2 e KU25) após a infecção pelas bactérias isoladas da Lagoa da Pampulha (19 isolados), do Rio do Bicudo (3 isolados), 2 bactérias de linhagens de referência (*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 e *Citrobacter freundii* ATCC 8090) e *Escherichia coli* OP50 (controle negativo). Os vermes infectados foram contados (vivos e mortos) a cada 48 horas por 16 dias. Na avaliação da toxicidade, verificou-se que não houve diferença significativa entre as amostras, entretanto houve redução de fertilidade (cerca de 50%) nos vermes expostos às águas da Lagoa da Pampulha, quando comparados aos vermes expostos apenas a M9 (tampão fisiológico do *C. elegans*). Observou-se que a Lagoa da Pampulha apresentou densidade bacteriana maior que a amostra controle (390 UFC/ml), sendo heterogênea ao longo dos pontos, maior no início do lago (22.500 UFC/ml) e menor próximo ao vertedouro (1.530 UFC/ml), devido ao efeito diluidor. Também verificou-se que não houve diferença significativa na sobrevivência do *C. elegans* infectados pelas bactérias isoladas da Lagoa da Pampulha ou do Rio do Bicudo, em que a linhagem N2 apresentou LT_{50} média de 14 dias e KU25 apresentou LT_{50} média de 10 dias. Os isolados ambientais diminuíram a LT_{50} do *C. elegans* (N2) em relação à OP50 (de 16 para 14 dias), enquanto as linhagens de referência *E. aerogenes* ATCC 13048 e *C. freundii* ATCC 8090 levaram a menor LT_{50}, respectivamente, 12 e 8 dias. Deste modo, conclui-se que as águas da Lagoa da Pampulha, quando comparadas às águas do Rio do Bicudo, apresentaram pouco efeito tóxico para o *C. elegans* e as bactérias isoladas das amostras ambientais não impactaram na sobrevivência do *C. elegans* KU25 e impactaram pouco na sobrevivência do N2. Os resultados podem sugerir que as abordagens empregadas para a recuperação da qualidade da

Lagoa estão apresentando resultados positivos, porém deve-se considerar que o contato com ela envolve riscos para a saúde humana, porque apresenta elevada densidade de bactérias que são patógenos oportunistas e apresenta efeitos tóxicos para o organismo modelo.

Palavras-chave: Lagoa da Pampulha. Bactérias entéricas. Toxicidade. *Caenorhabditis elegans*.

ABSTRACT

Lagoa da Pampulha is an important and polluted artificial lake in Belo Horizonte, where fishing is practiced and people come into contact with the waters. The present work aimed to evaluate the water toxic effects and the potential pathogenicity of bacteria isolated from the lake, using the *Caenorhabditis elegans* model. From the water collected from 4 points along the Lagoa da Pampulha and from a point in the Rio do Bicudo (healthy water body), its toxic effects on worm survival, fertility and development were evaluated. The survival of the worms kept for 24 hours in the samples was measured through the colorimetric assay using MTT. Fertility and development were evaluated by counting the progeny of exposed adults and the developmental time of these progeny kept in the samples. Samples were also seeded and bacteria isolated on MacConkey Agar and identification by MALDI-ToF was performed. Was evaluated the *C. elegans* (N2 and KU25) survival after infection by bacteria isolated from Lagoa da Pampulha (19 isolates), Rio do Bicudo (3 isolates), 2 bacteria from reference strains (*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 and *Citrobacter freundii* ATCC 8090) and *Escherichia coli* OP50 (negative control). Infected worms were counted (live and dead) every 48 hours for 16 days. In the evaluation of toxicity, it was found that there was no significant difference between the samples, however there was a reduction in fertility (about 50%) in worms exposed to Lagoa da Pampulha waters, when compared to worms exposed only to M9 (physiological buffer of the *C. elegans*). It was observed that Lagoa da Pampulha had a higher bacterial density than the control sample (390 CFU/ml), being heterogeneous along the points, higher at the beginning of the lake (22,500 CFU/ml) and lower near the spillway (1,530 CFU/ml), due to the dilution effect. It was also verified that there was no significant difference in the survival of *C. elegans* infected by bacteria isolated from Lagoa da Pampulha or Rio do Bicudo, in which the N2 strain had an average LT_{50} of 14 days and KU25 had an average LT_{50} of 10 days. The environmental isolates decreased the LT_{50} of *C. elegans* (N2) in relation to the OP50 (from 16 to 14 days), while the reference strains *E. aerogenes* ATCC 13048 and *C. freundii* ATCC 8090 led to the lowest LT_{50}, respectively, 12 and 8 days. It is concluded that the Lagoa da Pampulha waters had low toxic effect to *C. elegans* when compared to the Rio do Bicudo waters and the bacteria isolated from the environmental samples did not impact the *C. elegans* KU25 survival and had low impact on N2 survival. The results may suggest that the approaches applied to restore the lake quality are showing positive results. However it must be considered that contact with it involves risks to human

health, because it has a high density of bacteria that are opportunistic pathogens and have toxic effects to the model organism.

Keywords: Lagoa da Pampulha. Enteric bacteria. Toxicity. *Caenorhabditis elegans*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classes de enquadramento dos corpos de água doce e seus principais usos permitidos	**20**
Figura 2	Corpo hídrico eutrófico com camada de algas	**23**
Figura 3	Ciclo de vida do *Caenorhabditis elegans* a 22°C	**30**
Figura 4	Vista parcial da Lagoa da Pampulha antes de ser degradada, com banhistas, embarcações e o cassino ao fundo	**34**
Figura 5	Bacia hidrográfica da Pampulha localizada nos municípios de Belo Horizonte e Contagem	**35**
Figura 6	Pontos de amostragem na Lagoa da Pampulha	**41**
Figura 7	Ponto de amostragem no Rio do Bicudo	**41**
Figura 8	Pontos de coleta das amostras da Lagoa da Pampulha	**42**
Figura 9	Ponto de coleta da amostra controle: Rio do Bicudo	**42**
Figura 10	Instrumento utilizado para realizar as coletas	**43**

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	No ensaio colorimétrico usando MTT há perda de linearidade quando o tempo de incubação é maior que 24 horas. (A) ensaio colorimétrico do MTT usando apenas o M9, as amostras e suas diluições, sem vermes, com tempo de incubação de 24h, (B) 48h ou (C) 72h	**50**
Gráfico 2	O tempo do ensaio colorimétrico não altera a absorbância do branco utilizando M9	**51**
Gráfico 3	As amostras de água da Lagoa da Pampulha em seu estado natural (A), diluída dez vezes (B) ou diluída 100 vezes (C) não apresentaram toxicidade para o *C. elegans* quando comparadas às águas do Rio do Bicudo (ensaio de redução do MTT)	**53**
Gráfico 4	Não há diferença na fertilidade entre o *C. elegans* exposto às amostras de água da Lagoa da Pampulha ou à amostra controle (Rio do Bicudo). Quando comparados aos vermes mantidos em tampão M9, há redução da fertilidade dos vermes expostos às amostras dos pontos P1, P3 e P4 da Lagoa da Pampulha	**54**
Gráfico 5	Os isolados ambientais e as linhagens de referência levaram à redução da sobrevivência do *C. elegans* N2 (LT_{50})	**60**
Gráfico 6	As bactérias isoladas não impactaram na sobrevivência do *C. elegans* KU25 (LT_{50})	**61**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

®	Símbolo de marca registrada comercial
%	Porcentagem
µL	Microlitro
ATCC	“American Type Culture Collection”
CGC	“*Caenorhabditis* Genetics Center”
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Copasa	Companhia de Saneamento de Minas Gerais
DMSO	Dimetilsulfóxido
FUdR	Fluorodeoxiuridina
IGAM	Instituto Mineiro de Gestão das Águas
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
LB	Luria-Bertani
LT50	Tempo Letal para 50% da população
MALDI-TOF-MS	“Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry" (Espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz associada ao tempo de voo)
MAP	“Mitogen-Activated Protein” (Proteína Ativada por Mitógenos)
MHAB	Museu Histórico Abílio Barreto
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
NCBI	“National Center for Biotechnology Information” (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)
NGM	“Nematode Growth Medium” (Meio de Cultura para Nematódeos)
PCR	“Polymerase Chain Reaction” (Reação em Cadeia da Polimerase)
pH	Potencial de Hidrogênio
PROPAM	Programa de Recuperação e Desenvolvimento Ambiental da Bacia da Pampulha
spp.	Espécies

SUMÁRIO

1 Introdução **19**
1.1 Qualidade dos corpos d'água 19
1.2 Contaminação de corpos d'água 21
1.2.1 Matéria orgânica 22
1.2.2 Compostos organossintéticos 23
1.2.3 Metais pesados 24
1.2.4 Microrganismos patogênicos 24
1.3 Bactérias entéricas 25
1.3.1 Família *Enterobacteriaceae* 25
Gênero *Enterobacter* 26
Gênero *Kluyvera* 27
Gênero *Citrobacter* 27
1.3.2 Família *Morganellaceae* 28
Gênero *Providencia* 28
1.3.3 Família *Aeromonadaceae* 28
Gênero *Aeromonas* 28
1.4 *Caenorhabditis elegans* como modelo de infecção e toxicidade 29
1.5 Uso do MALDI-TOF-MS para a identificação de bactérias 31
1.6 Lagoa da Pampulha 33

2 Justificativa **37**

3 Objetivos **39**
3.1 Objetivo Geral 39
3.2 Objetivos Específicos 39

4 Material e Métodos **39**
4.1 Localidade 40
4.2 Coleta das amostras de água e processamento inicial 40
4.3 Cultivo e manutenção de *C. elegans* 43
4.3.1 Sincronização de *C. elegans* 44
4.4 Ensaio de toxicidade utilizando *C. elegans* 44
4.4.1 Sobrevivência de larvas em estágio L1 44
4.4.2 Fertilidade e desenvolvimento 45
4.5 Isolamento e identificação das bactérias 45
4.6 Ensaios de avaliação da patogenicidade utilizando *C. elegans* 46

5 Resultados e Discussão **48**
5.1 Dados meteorológicos 48
5.2 Avaliação da toxicidade da água da Lagoa da Pampulha sobre o *C. elegans* 49
5.2.1 Sobrevivência do *C. elegans* em estágio L1 49

5.2.2 Fertilidade e desenvolvimento 53
5.3 Isolamento e identificação das bactérias 54
5.3.1 MALDI-ToF-MS e Sequenciamento 56
5.4 Avaliação da patogenicidade das bactérias 59
6 Conclusões **63**
REFERÊNCIAS **65**
APÊNDICES **73**

1 Introdução

1.1 Qualidade dos corpos d'água

A água é essencial para a manutenção da vida humana, sendo diversos os usos que se faz desse recurso, como abastecimento doméstico, abastecimento industrial, irrigação, dessedentação animal, geração de energia, navegação, recreação, pesca, diluição de efluentes e preservação da fauna e flora (MS, 2006). Para os diversos usos da água tem-se necessidade de diferentes padrões de qualidade, uma vez que as características e a quantidade da água disponível para o uso humano estão amplamente relacionadas com as condições de saúde (LIBÂNIO et al., 2005). Principalmente em locais em que há deficiência dos serviços de saneamento, a água pode tornar-se veículo de enfermidades, especialmente doenças entéricas transmitidas por via oral-fecal a partir da ingestão de água contaminada com microrganismos patogênicos (PAIVA e DE SOUZA, 2018). Além da contaminação microbiológica, também há a contaminação da água por agentes químicos nocivos à saúde humana, como metais pesados, agrotóxicos, desinfetantes, toxinas e substâncias mutagênicas (ANA, 2013). O contato com vetores de doenças que habitam ou se desenvolvem em corpos hídricos é também uma via de desenvolvimento de doenças que está relacionada com a água, além disso há ainda o acesso a quantidade insuficiente do recurso, que pode levar as pessoas ao hábito de estocá-lo de forma inadequada e pode também inviabilizar as práticas adequadas de higiene (MS, 2006; FUNASA, 2004).

Os parâmetros físicos, químicos e biológicos de potabilidade definem se a água é segura para o consumo humano e no Brasil são estabelecidos pela Portaria de nº 888/2021 do Ministério da Saúde (BRASIL, 2021). No território nacional as águas são classificadas de acordo com a qualidade exigida para o seu uso principal, conforme a Resolução CONAMA nº 357/2005 (BRASIL, 2005). A classificação ou enquadramento de um corpo d'água ou de um trecho dele, possibilita o monitoramento e a fiscalização do uso dos recursos hídricos, além de permitir o estabelecimento de metas de qualidade de acordo com o uso pretendido e assim direcionar ações a fim de atingir a classificação desejada (MACHADO et al., 2019). Para o enquadramento dos corpos hídricos de água continental (Figura 1) existem cinco classes, são elas em ordem decrescente de qualidade e considerando apenas os principais usos humanos: (i) a classe especial, destinada ao abastecimento para o consumo humano (após desinfecção); (ii) a classe 1, destinada ao abastecimento para o consumo humano (após tratamento simplificado), à recreação de contato primário e à irrigação de hortaliças e frutas que são

consumidas cruas; (iii) a classe 2, destinada ao abastecimento para o consumo humano (após tratamento convencional), à recreação de contato primário, à irrigação de hortaliças e árvores frutíferas, além de vegetação de áreas que possam ter contato direto com humanos, à aquicultura e pesca; (iv) a classe 3, destinada ao abastecimento para o consumo humano (após tratamento convencional ou avançado), à pesca amadora e à recreação de contato secundário; e (v) a classe 4, destinada à navegação (BRASIL, 2005).

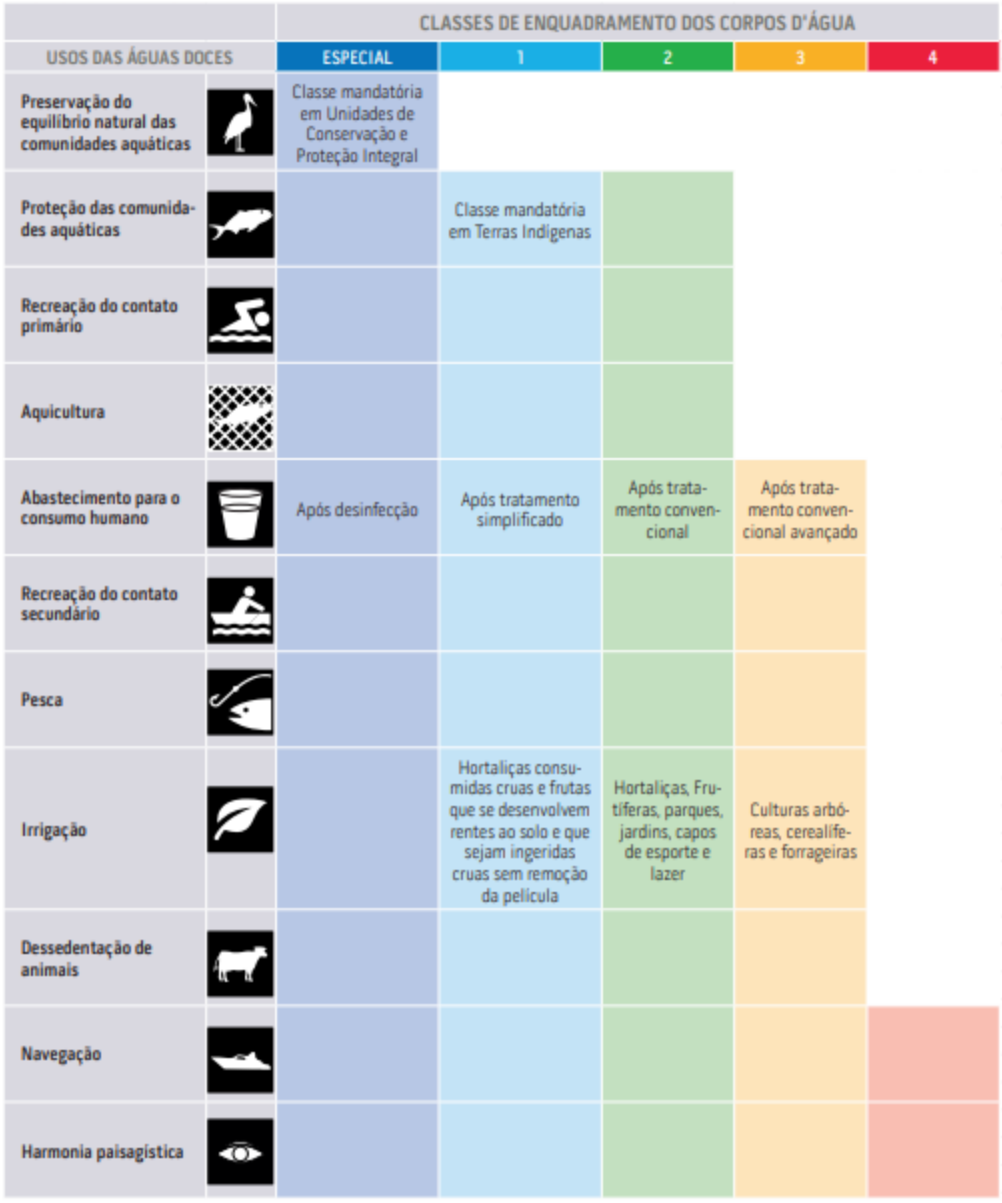


Figura 1 - Classes de enquadramento dos corpos de água doce e seus principais usos permitidos (ANA, 2020)

1.2 Contaminação de corpos d'água

Os impactos que a degradação de corpos hídricos tem sobre a saúde humana são complexos e variados, sendo alguns mais fáceis de observar, como a manifestação das doenças de veiculação hídrica clássicas ou as manifestações agudas do contato humano com rejeitos industriais destinados incorretamente - cefaleias, náuseas, irritações na pele e pulmões, a reduções das funções neurológicas e hepáticas. Entretanto existem outros potenciais impactos como os distúrbios genéticos decorrentes da exposição a contaminantes genotóxicos, tal qual é observado em outros seres vivos encontrados nos ambientes aquáticos degradados (MORAES e JORDÃO, 2002).

A poluição dos corpos hídricos é decorrente de fenômenos que levam a alterações que comprometem o seu uso, podendo ocorrer a partir da introdução de elementos, naturais ou artificiais, estranhos ao meio ou a partir de alterações na proporção ou nas características de elementos que o compõem. Diferentes atividades humanas podem poluir os corpos d'água, como a agricultura, atividades industriais, produção de energia, mineração, disposição inadequada de esgotos domésticos (MS, 2006; ANA, 2013; FUNASA, 2006).

Alguns dos principais fenômenos poluidores da água são: (i) o assoreamento, que consiste na redução da profundidade do corpo d'água devido ao acúmulo de material; (ii) a eutrofização, caracterizada pela disponibilidade excessiva de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, favorecendo o crescimento descontrolado de cianobactérias e plantas aquáticas; (iii) a acidificação, que é a diminuição do pH prejudicial à manutenção das formas de vida aquáticas, geralmente decorrente de chuvas ácidas ou contaminação por compostos químicos; (iv) alteração da temperatura, em que o aumento da temperatura de um corpo d'água reduz os níveis de oxigênio dissolvido e também pode alterar as funções biológicas, prejudicando a reprodução e o crescimento dos organismos aquáticos; (v) a alteração da salinidade, uma vez que o aumento da concentração de sais geralmente não é bem tolerada pela biota de água doce, bem como a introdução de sais de composição química estranha ao meio, também pode ser prejudicial; (vi) as alterações hidrológicas, como a retirada de água do corpo hídrico, prejudicando o seu uso a jusante devido a redução da vazão e também alterando a sua qualidade em decorrência da diminuição da sua capacidade diluidora; e (vii) a contaminação, que consiste na introdução de elementos que provocam alterações prejudiciais aos usos dos

corpos hídricos, como matéria orgânica, compostos organossintéticos, metais pesados e microrganismos patogênicos (MS, 2006; ANA, 2013; FUNASA, 2006).

1.2.1 Matéria orgânica

Os ambientes aquáticos saudáveis possuem a capacidade de assimilar uma quantidade limitada de matéria orgânica introduzida, a partir do processo de autodepuração, de modo que o corpo d'água alcança novamente o equilíbrio. A contaminação dos corpos hídricos com grandes quantidades de matéria orgânica tem como principal origem o despejo de esgotos domésticos ou de resíduos de indústrias que processam matéria orgânica e está intimamente relacionado com o crescimento populacional não planejado. Quando há o despejo de matéria orgânica nos corpos hídricos, em quantidade superior à capacidade de autodepuração, os microrganismos promovem sua oxidação consumindo o oxigênio dissolvido, o que leva à morte dos seres aquáticos aeróbios, traz prejuízos estéticos e liberação de odor, em decorrência do aumento da decomposição anaeróbica (VALENTE et al., 1997; MS, 2006). A maior parte da matéria orgânica despejada sedimenta formando o lodo no fundo dos corpos d'água, onde a concentração de oxigênio dissolvido é baixa havendo predomínio da decomposição anaeróbica com produção de gases e aumento da acidez, o que também prejudica a manutenção da biota (KREVŠ e KUČINSKIENĖ, 2018). Outra consequência do despejo de matéria orgânica é a eutrofização (Figura 2), com o crescimento excessivo de cianobactérias - que em algumas condições são produtoras de toxinas prejudiciais à fauna, a flora e ao homem - e de plantas aquáticas oportunistas, adaptadas às novas condições do meio, com o predomínio de poucas espécies, havendo, portanto redução da biodiversidade. A eutrofização contribui para a redução dos níveis de oxigênio uma vez que a quantidade excessiva de plantas impede que o oxigênio atmosférico alcance a água, além disso a decomposição dessas plantas, quando mortas, leva também ao consumo de oxigênio, havendo posteriormente a decomposição anaeróbica, que também contribui com a piora da qualidade da água (LE MOAL et al, 2019).

Figura 2 - Corpo hídrico eutrófico com camada de algas (RODRIGUES, 2019)

1.2.2 Compostos organossintéticos

A introdução no mercado e o uso cotidiano dos compostos organossintéticos, como medicamentos, produtos de higiene, pesticidas e agrotóxicos, trouxe diversos benefícios e comodidades para os humanos. Entretanto, durante o processo de produção, uso ou descarte, esses compostos podem se tornar poluentes do ambiente, trazendo riscos para a fauna, a flora e a saúde humana (DE PÁDUA, et al., 2009). A grande variedade desses compostos e as diferentes vias pelas quais podem alcançar os corpos hídricos, geram grande preocupação. As interações desses compostos no ambiente aquático são desconhecidas e dentre eles incluem, defensivos agrícolas sabidamente genotóxicos, substâncias neurotóxicas, desreguladores endócrinos, compostos farmacêuticos ativos, além dos poluentes orgânicos persistentes - compostos tóxicos caracterizados pela capacidade de resistir à degradação no ambiente e de se acumular na cadeia alimentar (JONES e DE VOOGT, 1999). Outro problema relacionado com a variedade desses compostos é o desconhecimento de todos os possíveis contaminantes organossintéticos que devem ser considerados tanto para regulamentar o seu descarte e o tratamento dos esgotos, quanto para definir os níveis seguros que podem estar presentes nos corpos hídricos e o potencial risco à saúde humana após exposição a eles em diferentes níveis (DE PÁDUA, et al., 2009; SUTHERLAND e RALPH, 2019).

1.2.3 Metais pesados

Diferentes fontes contribuem para a contaminação de corpos d'água por metais pesados, como rejeitos industriais e agrícolas, escoamentos urbanos, estações de tratamento de esgoto e lixões domésticos (ATLI e CANLI, 2010). Uma vez presentes em níveis aumentados no ambiente aquático, os metais pesados podem bioacumular nos organismos da biota do corpo hídrico e biomagnificar ao longo da cadeia alimentar, visto que não são biodegradáveis, prejudicando a fauna, a flora e oferecendo riscos à saúde humana, principalmente pela ingestão de pescados contaminados (JAISWAL et al, 2018).

No organismo humano, alguns metais pesados são necessários em quantidades muito pequenas, sendo adquiridos a partir da dieta, enquanto outros não possuem função biológica conhecida (JAISWAL et al, 2018; JAISHANKAR et al., 2014). Os metais pesados oferecem riscos à saúde porque podem interferir em processos bioquímicos atuando no lugar de elementos naturalmente presentes no organismo e podem alterar processos metabólicos, apresentando toxicidade em diferentes níveis. Os efeitos tóxicos da exposição aos metais pesados dependem de fatores como o tipo de exposição - aguda ou crônica - a via de absorção, o elemento e a quantidade absorvida. Os prejuízos à saúde humana variam desde efeitos agudos, como alteração na composição sanguínea e danos ao funcionamento de importantes órgãos - cérebro, pulmões, rins, fígado - até efeitos crônicos, como processos degenerativos físicos, musculares e neurológicos, com características que se assemelham às de doenças como esclerose múltipla, distrofia muscular, doença de Parkinson e doença de Alzheimer. Além disso, a exposição repetida e prolongada aos metais pesados também está relacionada ao surgimento de neoplasias (JAISHANKAR et al., 2014).

1.2.4 Microrganismos patogênicos

Diferentes microrganismos fazem parte dos ecossistemas aquáticos, incluindo eucariotos, procariotos e partículas virais, com grande diversidade de espécies. Em ambientes hídricos saudáveis esses microrganismos são importantes para a produção primária (fitoplânctons) e para a decomposição de matéria orgânica e reciclagem de nutrientes (ZINGER et al., 2012). Os corpos hídricos poluídos sofrem alterações na composição e diversidade da sua microbiota, de acordo com os contaminantes recebidos.

Diferentes microrganismos reconhecidamente patogênicos e potencialmente patogênicos podem contaminar as águas e representar riscos para a saúde humana. Dentre os principais microrganismos relacionados às doenças entéricas de veiculação hídrica, encontram-se protozoários: *Cryptosporidium hominis*/*parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis*, *Toxoplasma gondii*; vírus: Adenovírus, Enterovírus, Hepatite A, Hepatite E, Norovírus, Rotavírus, Sapovirus; bactérias: *Campylobacter coli, Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* patogênica (ASHBOLT, 2015; MS, 2018). Além das doenças entéricas, também existem as doenças causadas pela inalação de aerossóis contendo microrganismos como Adenovírus, Enterovírus, *Legionella pneumophila*, Micobactérias não tuberculosas, *Naegleria fowleri*, e as doenças causadas pelo contato de pele e mucosas com microrganismos como *Acanthamoeba* spp., *Burkholderia pseudomallei*, *Leptospira* spp., Micobactérias não tuberculosas, *Schistosoma mansoni* (WHO, 2011).

1.3 Bactérias entéricas

1.3.1 Família *Enterobacteriaceae*

Apesar de algumas espécies serem naturalmente encontradas no intestino de humanos e outros animais, a família das enterobactérias possui membros que são importantes patógenos humanos, causando enfermidades intestinais e extra intestinais. A família é composta por mais de 150 espécies, que estão distribuídas em diferentes ambientes, como água, solo, plantas e animais, sendo que algumas espécies estão relacionadas com importantes implicações clínicas (KANG et al., 2018; BRASIL, 2013b).

A qualidade microbiológica da água, rotineiramente é avaliada a partir de microrganismos indicadores, como os coliformes termotolerantes, que são empregados para apontar contaminação fecal, representada pela presença de *Escherichia coli*, apesar de também compreenderem bactérias de origem não fecal. Além dos coliformes termotolerantes, o isolamento de *E. coli* também é utilizado para sinalizar a contaminação por material fecal, uma vez que é a principal bactéria encontrada nas fezes, de fácil isolamento e identificação, apresenta boa sobrevivência na água e normalmente está ausente em águas não contaminadas (WHO, 2011; BRASIL, 2005). Desse modo, a presença de *E. coli* na água aponta para a possibilidade da presença de outras bactérias entéricas e, portanto, de importantes patógenos. Algumas enterobactérias são transmitidas pela água e causam principalmente gastroenterite,

mas também podem causar outras manifestações e apresentar complicações graves como, bacteremia, convulsões febris, hiponatremia, hipoglicemia, megacólon tóxico, encefalite, artrite reativa, síndrome hemolítico urêmica. Dentre essas bactérias destacam-se *E. coli* diarreiogênicas, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. e *Yersinia enterocolitica* (DESHMUKH et al., 2016; FHOGARTAIGH e EDGEWORTH, 2009).

A contaminação de corpos hídricos por microrganismos potencialmente nocivos para a saúde humana pode ser verificada em diferentes tipos de estudos, tanto a partir da avaliação de coliformes termotolerantes, quanto por meio do isolamento e identificação dos patógenos (GIRARDI et al., 2019; DALLA et al., 2015; BUZELLI e CUNHA-SANTINO, 2013). Um estudo avaliou a qualidade da água de reservatórios do semiárido potiguar nos períodos seco e chuvoso. Dentre os isolados 73,2% foram identificados como pertencentes à família das enterobactérias, sendo mais frequentes as espécies *Escherichia coli*, *Enterobacter* complexo *cloacae* e *Klebsiella pneumoniae* (NASCIMENTO et al., 2016). Enquanto outro trabalho cujo objetivo também era o de avaliar a qualidade da água de reservatórios utilizados para o consumo humano e atividades de pesca, evidenciou a contaminação por *Escherichia coli*. O trabalho também verificou os efeitos da exposição de animal modelo à água do reservatório, revelando a sua inadequabilidade para o consumo humano (LEME et al., 2018).

Gênero *Enterobacter*

Bactérias do gênero *Enterobacter* estão presentes em diferentes ambientes, como solo e água, e algumas espécies são endofíticas ou consideradas fitopatógenos para várias espécies de plantas. Também são parte da microbiota intestinal de humanos e outros animais. Dentre os membros do gênero, apenas algumas espécies estão envolvidas em casos de infecções hospitalares e surtos, sendo que essas espécies fazem parte do grupo ESKAPE (acrônimo para: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.), que compreende as bactérias que são descritas como as principais causas de infecções nosocomiais resistentes (DAVIN-REGLI, LAVIGNE e PAGÈS, 2019).

Em ambiente hospitalar essas bactérias são comumente resistentes a múltiplas drogas, apresentam resistência intrínseca a alguns antimicrobianos e facilidade em adquirir elementos genéticos móveis contendo genes de resistência e virulência. As espécies *E. aerogenes*, *E. cloacae* e *E. hormaechei* são as que mais causam infecções em pacientes em cuidados

intensivos e pacientes imunocomprometidos, uma vez que são patógenos oportunistas bem adaptados a diferentes antimicrobianos (DAVIN-REGLI, LAVIGNE e PAGÈS, 2019).

Gênero *Kluyvera*

As espécies desse gênero não são patógenos comuns, havendo poucos registros de casos de infecções por esses agentes. A espécie mais comum é a *Kluyvera ascorbata*, que coloniza o trato gastrointestinal, urinário e respiratório de humanos, mas pode ser um patógeno oportunista. Essa bactéria pode ser encontrada no solo, na água, no esgoto, no ambiente hospitalar e em alimentos de origem animal (SARRIA, VIDAL, e KIMBROUGH III, 2001).

As infecções causadas por *Kluyvera* spp. não estão associadas à idade, sendo que em crianças já foram descritas diferentes acometimentos, incluindo infecção do trato urinário, diarréia, peritonite, meningite e sepse neonatal, infecção de pele e tecidos moles, pneumonia e gastrite enfisematosa. Há também relatos de infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos, especificamente doença diarreica em adultos com neutropenia (BALLAL et al., 2021).

Gênero *Citrobacter*

O gênero é composto por 11 espécies, sendo que a maioria das infecções em humanos são causadas pelas espécies *C. koseri* e *C. freundii*. As bactérias desse gênero são comumente encontradas em água, solo e alimentos, e podem colonizar o trato gastrointestinal de humanos e outros animais. Apesar de colonizar o trato gastrointestinal e ser considerado pouco virulento, esse gênero pode causar diferentes infecções como no trato urinário, respiratório, intra abdominal, pele e tecidos moles, olhos, ossos, corrente sanguínea e sistema nervoso central. As espécies de *Citrobacter* também estão relacionadas com a ocorrência de importantes surtos nosocomiais (DEVECI e COBAN, 2014)

1.3.2 Família *Morganellaceae*

Gênero *Providencia*

O gênero *Providencia*, antes pertencente à família *Enterobacteriaceae* foi novamente classificado passou a pertencer à família *Morganellaceae*, suas espécies não são agentes comuns em infecções nosocomiais e quando acometem esses pacientes, causam principalmente, infecções do trato urinário. Podem causar também pneumonia, meningite, endocardite, infecções de feridas e de corrente sanguínea. Isolados de *Providencia* já foram recuperados de garganta, períneo, axila, fezes, ferida, urina e sangue. Há relatos também de espécies causando diarréia, principalmente em crianças. As infecções causadas por espécies desse gênero têm impacto significativo na morbidade, mortalidade e tratamento dos pacientes. Um aspecto importante dos patógenos desse gênero é sua resistência intrínseca a alguns antibacterianos, tornando mais difícil o seu tratamento (O'HARA, BRENNER e MILLER, 2000; ABDALLAH e BALSHI, 2018; ADEOLU et al., 2016)

Dentre as bactérias do gênero, a *P. alcalifaciens* é a principal espécie relatada como causadora de diarréia, estando associada a casos em crianças e também casos de diarreia do viajante, sendo a via de transmissão a ingestão de alimento contaminado. Essa espécie é comumente encontrada no solo, água e esgoto e foi isolada de diferentes animais, como galinhas, cães e vacas (SHAH, ODOYO e ICHINOSE, 2019)

1.3.3 Família *Aeromonadaceae*

Gênero *Aeromonas*

O gênero *Aeromonas* possui pouco mais de 30 espécies conhecidas, trata-se de um patógeno oportunista emergente, que infecta e coloniza diferentes hospedeiros. A espécie dominante é a *A. hydrophila,* porém outras espécies, como *A. caviae* e *A. sobria* também foram isoladas de fezes humanas e fontes de água. Bactérias desse gênero são comumente encontradas, em ambientes aquáticos, sendo um importante patógeno de peixes, mas também podem estar presentes em alimentos como vegetais, laticínios e carnes (PESSOA et al., 2019; CABRAL, 2010).

Em humanos, essas bactérias podem causar infecções no trato gastrointestinal, especialmente em crianças menores de cinco anos, idosos e pessoas imunossuprimidas, que se não tratado pode evoluir para manifestações sistêmicas. Espécies de *Aeromonas* também podem causar infecções de tecidos moles, do sistema hepatobiliar, do sistema ósseo, causar manifestações oculares, respiratórias e nas articulações. As vias de infecção são por ingestão de água ou alimento contaminados ou por contato do microrganismo com a pele não intacta, não havendo transmissão de pessoa a pessoa (PESSOA et al., 2019; CABRAL, 2010).

1.4 *Caenorhabditis elegans* como modelo de infecção e toxicidade

Os estudos das doenças humanas são importantes para a compreensão dos elementos responsáveis por causar as patologias e da forma como é estabelecida a interação entre o organismo e os agentes causais, visando estabelecer limites seguros para exposição e desenvolver estratégias de prevenção, tratamento e cura. O uso de animais não humanos como modelos para a investigação de processos biológicos é necessário e permite responder a questionamentos complexos nos campos da fisiologia, farmacologia e patologia (GUIMARÃES et al., 2016).

Apesar de serem indispensáveis, as experimentações animais apresentam alguns fatores que dificultam a sua prática, como as questões éticas envolvidas, principalmente no uso de animais sencientes (DE ÁVILA e VALADARES, 2019), o custo para a obtenção e manutenção dos animais, o tempo gasto para a realização dos experimentos. Diante desses fatores, cada vez mais são buscados e utilizados métodos alternativos para reduzir, refinar e substituir o uso de animais, com o uso de estratégias para o direcionamento das investigações (DOKE e DHAWALE, 2015). Uma abordagem utilizada é a hierarquização de metodologias - do *in vitro* para o *in vivo*, do uso de animais menos complexos para animais mais complexos - em que são feitas fases de triagem para que o emprego dos animais só se dê em etapas indispensáveis, quando o objeto investigado já está mais bem caracterizado, expondo os animais a testes com possibilidades reduzidas de sofrimento (PRESGRAVE et al., 2010). Algumas ferramentas estão disponíveis para o direcionamento das investigações, como análises de biologia computacional, uso de culturas de células e tecidos, emprego de microrganismos modelo e de modelos animais não mamíferos (DI VENTURA et al., 2006; JEAN-QUARTIER et al., 2018; DOKE e DHAWALE, 2015).

O *C. elegans* é um nematódeo de vida livre, inicialmente proposto como modelo para o estudo do desenvolvimento animal e neurobiologia por Sydney Brenner (BRENNER, 1973;

CORSI et al., 2015). Desde então, a sua biologia tem sido detalhadamente estudada, sendo descobertas diversas e crescentes possibilidades de aplicações do modelo, que permitem desde estudos de processos biológicos básicos até aplicações de relevância médica (ARTAL-SANZ et al., 2006; KALETTA e HENGARTNER, 2006).

O nematódeo se estabeleceu como importante animal modelo alternativo, apresentando características que tornam seu uso interessante, como ciclo de vida curto (Figura 3), corpo pequeno e transparente, elevada capacidade de reprodução, fácil manutenção e manipulação, pode ser estocado por longos períodos, não oferece riscos para o manipulador, além de não necessitar de grande infraestrutura para o seu uso e manutenção (CORSI et al., 2015; MARKAKI e TAVERNARAKIS, 2020). O modelo já está bem caracterizado, possui sistemas reprodutor, nervoso, digestivo e musculatura, apresenta comportamentos complexos, seu genoma é conhecido, sendo que muitos dos seus genes possuem homólogos em mamíferos (APFELD e ALPER, 2018). Existem ainda, diversas cepas mutantes disponíveis para o uso em pesquisas, bem como protocolos padronizados (STIERNAGLE, 1999). Todos esses fatores contribuem para o amplo espectro de aplicações possíveis para o modelo, como em testes de ação farmacológica e toxicidade de compostos (O'REILLY et al., 2014; HUNT, 2017), estudos das funções de genes em doenças (MARKAKI e TAVERNARAKIS, 2020), investigação da relação microrganismo-hospedeiro (KUMAR et al., 2019) e estudos de neurobiologia (ZHEN e SAMUEL, 2015).

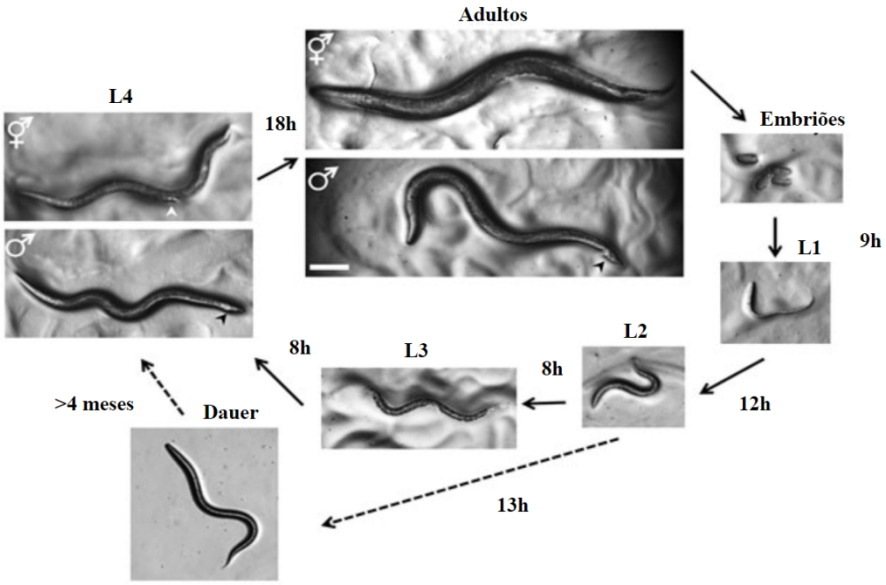


Figura 3 - Ciclo de vida do *Caenorhabditis elegans* a 22°C. Os tempos são relativos ao momento da fertilização (Adaptado de CORSI et al., 2015; ALTUN e HALL, 2009)

O organismo é uma ferramenta intermediária entre os modelos mais simples, como cultura de células, e os modelos animais clássicos, como os mamíferos, sendo especialmente vantajosa por apresentar processos complexos que são conservados em humanos e por ser facilmente modificado para se adequar a necessidades experimentais. O verme mostrou ser um bom modelo para predição de toxicidade de compostos, sendo uma ferramenta adequada para o *screening* de toxicidade de substâncias, com grande sensibilidade também para a avaliação da qualidade de corpos hídricos e da toxicidade do solo (CLAVIJO et al., 2016; HUNT, 2017; GAO et al., 2018). É também útil para a avaliação da virulência de bactérias, uma vez que diversos patógenos humanos também são capazes de infectar o *C. elegans* e causar sua morte, de modo que a avaliação da sobrevivência do nematódeo nos ensaios permite inferir sobre a virulência das bactérias (COUILLAULT e EWBANK, 2002).

1.5 Uso do MALDI-TOF-MS para a identificação de bactérias

Os métodos clássicos para a identificação de bactérias consistem no seu isolamento e cultivo em meios de cultura, seguido da observação de características fenotípicas e realização de testes bioquímicos, o que geralmente demanda de 18 a 48 horas. Os métodos convencionais de identificação apresentam boa sensibilidade e baixo custo, mas apresentam como desvantagem a demora na obtenção do resultado, o que pode ser impactante, principalmente em contexto de diagnóstico clínico (ANGELETTI, 2017).

Além dos métodos convencionais para identificação bacteriana, outros estão disponíveis e são empregados, apresentando algumas vantagens de acordo com o objetivo da sua aplicação. A maioria dos métodos não convencionais apresenta como principais desvantagens, o custo mais elevado, a necessidade de profissional treinado e equipamentos ou insumos específicos para a sua execução (SINGHAL et al., 2015).

Alguns exemplos de métodos não convencionais para a identificação de bactérias que podem ser utilizados são: (i) os métodos imunológicos, que são rápidos e além de permitir detectar o microrganismo também detecta suas toxinas, entretanto necessitam de grande quantidade de antígenos e estão disponíveis para poucos microrganismos; (ii) a hibridização *in situ* por fluorescência, permite a rápida identificação diretamente de esfregaços, sua principal limitação é a disponibilidade de sondas e microscópio de fluorescência; (iii) a PCR em tempo real ou a PCR do tipo multiplex, são rápidas, sensíveis, específicas e podem detectar mais de um patógeno necessitando de pouco processamento prévio; (iv) o sequenciamento de DNA ribossômico é uma técnica bastante útil para identificar

microrganismos fastidiosos ou não cultiváveis; (v) o sistema de microarranjos é utilizado para fazer uma triagem de diversos patógenos; (vi) amplificação isotérmica mediada por loop é uma técnica semelhante à PCR, não necessitando de equipamento termociclador, entretanto é de custo elevado; (vii) a metagenômica é uma técnica útil para a detecção randômica de microrganismos em uma amostra, sendo que requer um tempo maior para análise dos resultados (SINGHAL et al., 2015).

A espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz associada ao tempo de voo (MALDI-TOF-MS) é um método que permite obter um perfil protéico de microrganismos. Os perfis obtidos são específicos e fornecem um tipo de assinatura que possibilita a identificação a partir da comparação com espectros de referência de um banco de dados (ANGELETTI, 2017; SINGHAL et al., 2015).

A espectrometria de massa (MS) é uma técnica analítica desenvolvida na década de 1900 e empregada inicialmente na Química, fundamenta-se na mensuração da razão massa/carga (m/z) de compostos químicos após a sua ionização. O desenvolvimento da técnica de ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) permitiu a aplicação da espectrometria de massa também para moléculas biológicas maiores, uma vez que é capaz de ionizá-las de forma branda, sem alterar significativamente a sua integridade (SINGHAL et al., 2015).

Para identificar microrganismos por meio da MALDI-TOF-MS é necessário preparar a amostra, que pode ser uma pequena massa da colônia do microrganismo ou um extrato protéico, já que a extração aumenta sensibilidade da técnica, sendo imprescindível para alguns isolados. A amostra deve ser misturada a uma matriz orgânica, após secar a mistura cristaliza-se. Um feixe de laser, geralmente de nitrogênio, é incidido sobre a mistura e a matriz absorve sua energia, convertendo-a em energia térmica. Uma parte da matriz aquece rapidamente e é vaporizada juntamente com a amostra. O processo de dessorção (remoção do analito para a fase gasosa) e ionização a partir do laser gera íons mono-protonados dos componentes da amostra (SINGHAL et al., 2015; MURRAY, 2012).

Os íons são acelerados, em um tubo a vácuo, em um potencial fixo onde são separados de acordo com a razão massa/carga. Os íons acelerados atingem um detector e são medidos pelo analisador de tempo de voo (TOF), que mensura a massa do analito de acordo com o tempo que levou para percorrer o tubo e atingir o detector. De acordo com as informações do tempo de voo, é gerado um espectro característico dos analitos (biomarcadores) da amostra. O perfil de biomarcadores é comparado com os perfis de

microrganismos bem caracterizados, que estão disponíveis em um banco de dados (SINGHAL et al., 2015; MURRAY, 2012).

Através de softwares e algoritmos, os dados obtidos nas análises geram como resultado a identificação do microrganismo associada a um escore de confiança, que permite interpretar a identificação. A depender do microrganismo e das condições de análise é possível identificar a nível de gênero, espécie, subespécie ou ainda distinguir linhagens (ANGELETTI, 2017).

Algumas características tornam a técnica de MALDI-TOF-MS interessante para a identificação de microrganismos, especialmente de patógenos. Como vantagens do método pode-se destacar: (i) rapidez, a maioria das análises podem ser realizadas em menos de uma hora, o que reduz significativamente o tempo entre o recebimento da amostra e a identificação do microrganismo, além de possibilitar a análise de muitos isolados em um único dia; (ii) abrangência, a técnica não depende de alvos específicos para identificar um microrganismo; (iii) sensibilidade, um sinal pode ser gerado a partir de amostras com menos de 10^4 microrganismos; (iv) robustez, espectros de microrganismos de mesma espécie possuem subconjunto de picos - em sua maioria correspondem à proteínas ribossômicas - que são conservados ainda que sob diferentes condições experimentais, permitindo sua adequada identificação; (v) atualizações, o banco de dados pode ser alimentado com novos espectros e bancos de dados personalizados podem ser criados, aumentando assim, as chances de se discriminar um isolado desconhecido (ANGELETTI, 2017).

1.6 Lagoa da Pampulha

A Lagoa da Pampulha é um lago artificial localizado em Belo Horizonte, construído entre 1936 e 1938 a partir do represamento de águas do Ribeirão Pampulha e outros afluentes. A construção da barragem tinha a finalidade de garantir o abastecimento de água em Belo Horizonte, que estava em crescente urbanização e controlar as cheias do Ribeirão Pampulha, uma vez que o aeroporto da cidade foi construído ao seu lado, estando sujeito a inundações periódicas. O lago tinha ainda o propósito de prestar-se para a prática de esportes náuticos e modernizar a paisagem do antigo Arraial de Santo Antônio da Pampulha. Acompanhando a Lagoa, com o propósito de alavancar o turismo e o lazer moderno na cidade, formaram o complexo da Pampulha um cassino para jogos, a Casa do Baile para danças, um clube para esportes náuticos e uma igreja. Durante as décadas de 1940 e 1950 a região configurou-se

como um lugar de convívio social e de divertimento (Figura 4), sendo liberada a pesca aos domingos para o lazer dos trabalhadores (VIANA, 2013).

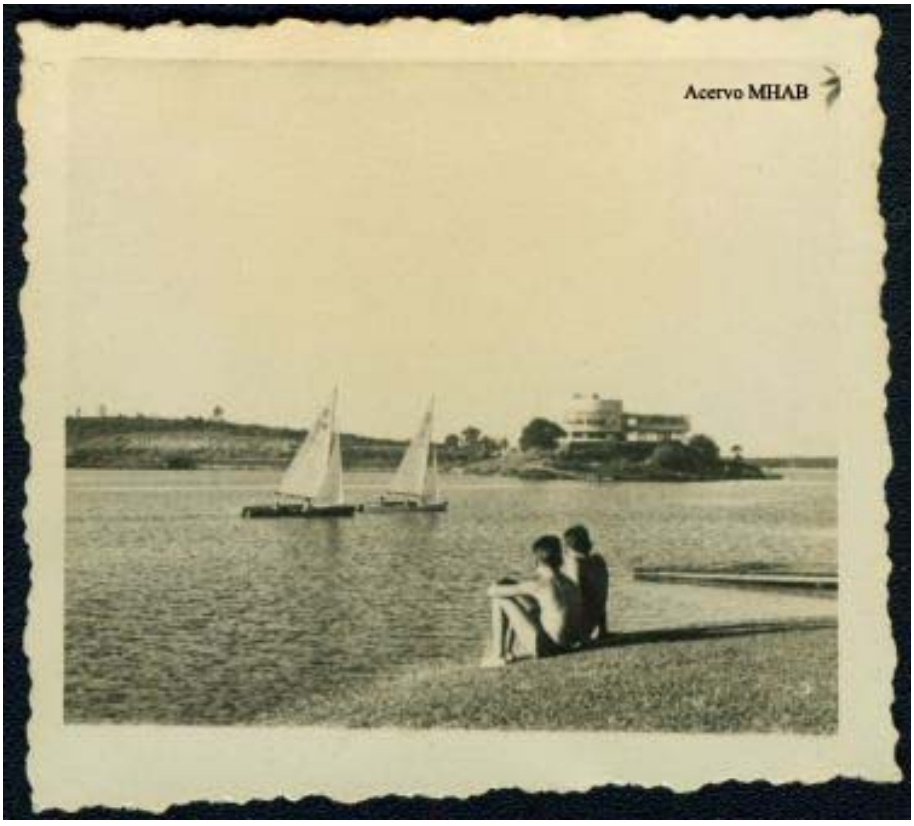


Figura 4 - Vista parcial da Lagoa da Pampulha antes de ser degradada, com banhistas, embarcações e o cassino ao fundo (ESCRITÓRIO DE HISTÓRIAS, 2009 - Foto do acervo MHAB)

A partir do final da década de 1940 a Lagoa passou a apresentar sinais de eutrofização e assoreamento, sendo que em 1968 foi proibido o uso da água para quaisquer finalidades, já que se encontrava bastante poluída (VIANA, 2013). Com a intensificação da urbanização, os afluentes da Lagoa passaram a receber esgotos doméstico e industrial clandestinos, além de resíduos sólidos despejados por moradores e carregados pelas chuvas.

Diante dos impactos sofridos pela Lagoa, o movimento ambientalista e a manifestação popular, motivaram a criação e implantação do Programa de Recuperação e Desenvolvimento Ambiental da Bacia da Pampulha (PROPAM), em 1997 e que foi instituído como lei municipal, em Belo Horizonte, em 2005. Os objetivos do PROPAM envolviam, além da recuperação da Bacia da Pampulha ao nível de enquadramento classe 2, o desenvolvimento ambiental, urbano e econômico (MOREIRA et al., 2020).

A bacia hidrográfica da Pampulha (Figura 5) é muito maior que a área do reservatório, compreendendo cerca de 96 km^2 entre os municípios de Belo Horizonte e Contagem, por isso

são múltiplas e distintas as fontes de poluição do lago (PINTO-COELHO et al., 2012; IGAM, 2019). O município de Contagem contribui com o maior volume de esgoto clandestino, o que levou a Copasa a realizar obras que ampliaram a coleta e tratamento da Bacia Hidrográfica da Pampulha de 87% para 95%, em 2017 (PARREIRAS, 2019).

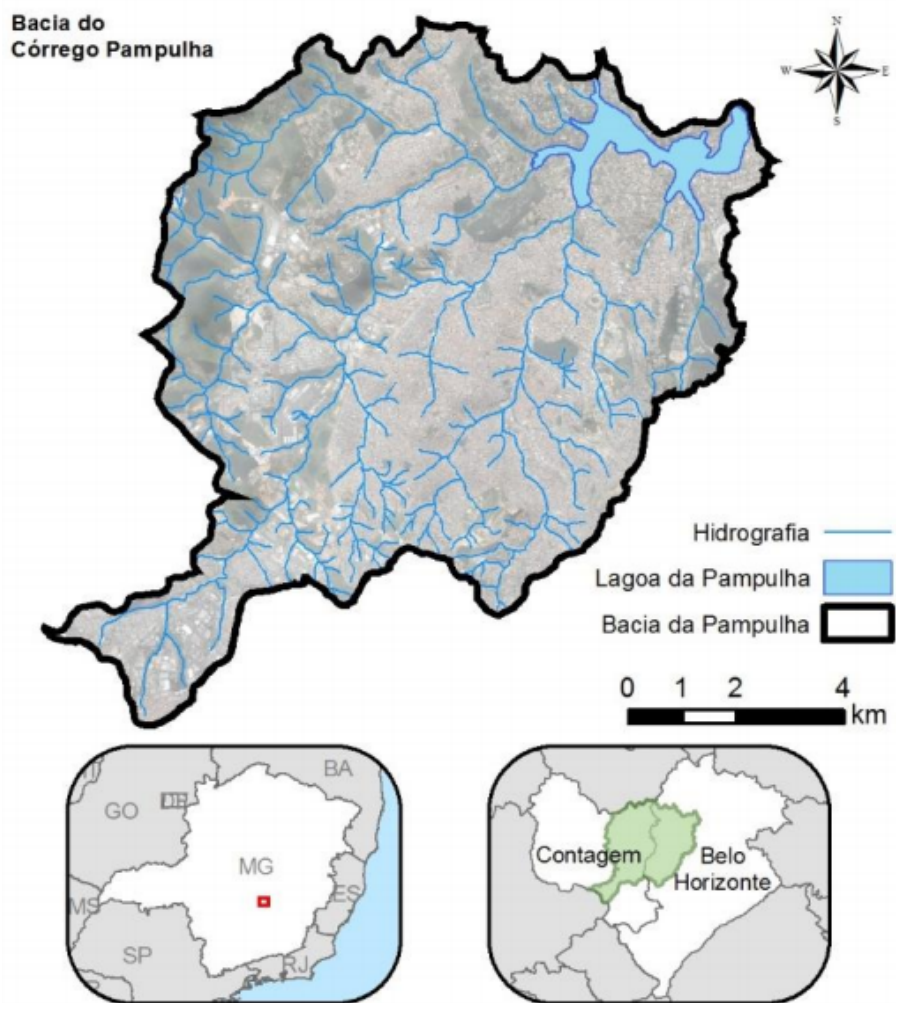


Figura 5 - Bacia hidrográfica da Pampulha localizada nos municípios de Belo Horizonte e Contagem (LAGOA, 2019)

Apesar das estratégias empregadas para a recuperação da Bacia Hidrográfica da Pampulha, incluindo a expansão do sistema de esgotamento, monitoramento das águas, ações de educação ambiental, fiscalização, articulação entre a Copasa e o Município de Contagem, restaurar e manter a qualidade das águas da Lagoa é um desafio. As águas do lago sofrem os constantes impactos decorrentes do processo de urbanização que ocorre no entorno de sua bacia e contribui com fontes de poluição. Diante do cenário apresentado, tornou-se necessário que as ações de tratamento e manutenção sejam contínuas (BELO HORIZONTE, 2020).

Dentre as diversas ações implementadas a partir do PROPAM, houve a criação, em 2013, do Programa de Recuperação da Bacia Hidrográfica da Pampulha: Pampulha Viva, tendo como um dos objetivos a despoluição das águas da Lagoa da Pampulha (BELO HORIZONTE, 2020). A partir do programa, desde 2015 ocorre o tratamento das águas do interior do lago a partir da aplicação de dois remediadores: Phoslock®, uma argila ionicamente modificada, que remove os íons fosfato do meio, diminuindo o processo de eutrofização; e Enzilimp®, um biorremediador composto por uma mistura de bactérias, que degradam a matéria orgânica e de origem fecal (LUCENA, 2011; COPETTI et al., 2016; FURTADO et al., 2019; IGAM, 2019).

Considerando os primeiros usos da Lagoa da Pampulha para práticas recreativas, uma parcela da população passou uma importante parte das suas vidas usufruindo das águas do lago, sendo que para alguns os hábitos foram mantidos. Apesar da baixa qualidade das águas da lagoa, da aparência desagradável e do mau odor, existem ainda pessoas que fazem o uso inadequado do corpo hídrico, principalmente com a prática da pesca para consumo, mas também há casos de contato primário (PARREIRAS, 2016; VIEGAS, 2016; COSTA, 2018; PAES, 2020). Os riscos para as pessoas que se expõem às águas da lagoa ou consomem seus pescados são variados, incluindo ingestão de metais pesados, contração de doenças de veiculação hídrica, potencial exposição a cianotoxinas e até mesmo possíveis acidentes com jacarés que habitam o lago (LOPES, 2019).

2 Justificativa

A Lagoa da Pampulha é um cartão postal da cidade de Belo Horizonte, com grande importância histórica, turística, cultural, arquitetônica, paisagística e ecológica. O espelho d'água está ao centro do Conjunto Arquitetônico da Pampulha, que é Patrimônio Cultural da Humanidade, havendo, portanto, grande interesse, investimento e esforço para a sua recuperação e manutenção. Inaugurado na década de 1940, com o processo de intensa urbanização e crescimento populacional, o lago passou a receber de seus afluentes grandes cargas de poluição, com o despejo de esgotos doméstico e industrial clandestinos, além de resíduos sólidos. Ao longo dos anos muitos esforços e investimentos têm sido empregados em estratégias para a sua recuperação, com a expectativa de até mesmo retomar algum dia as práticas de esportes nas suas águas. No entanto as tentativas de limpeza e recuperação não serão capazes de devolver a qualidade das águas sem que haja a interrupção das fontes poluidoras, sendo essa a maior dificuldade acerca dos esforços para a recuperação do lago.

Atualmente o uso do espelho d'água é destinado apenas para fins de composição paisagística e para o amortecimento de enchentes, no entanto a prática da pesca para consumo é comum, havendo também o contato esporádico de pessoas com as águas. Além de impactos ecológicos, com prejuízos para a biota local, a poluição das águas do lago oferece riscos para a saúde humana, com possível transmissão de doenças de veiculação hídrica, ingestão de metais pesados e outras substâncias tóxicas.

Está previsto que as águas doces de classe 3 - classe estabelecida como meta pela Prefeitura de Belo Horizonte - não devem apresentar efeito tóxico agudo e crônico aos organismos aquáticos, o que deve ser comprovado por meio de ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos, análises de bioacumulação e efeitos endócrinos ou outros métodos cientificamente reconhecidos. Em Minas Gerais o monitoramento da qualidade das águas é realizado pelo Instituto Mineiro de Gestão das Águas (IGAM), sendo que os ensaios de ecotoxicidade são realizados apenas para algumas estações da rede básica de monitoramento, não incluindo a Lagoa da Pampulha. Os parâmetros utilizados para a avaliação atual das condições das águas da Lagoa carecem de ensaios de toxicidade ou ecotoxicidade, que possam assegurar sua real qualidade para o uso pretendido (classe 3).

Algumas bactérias entéricas podem ser transmitidas por meio de água contaminada, causando principalmente gastroenterite, podendo haver, no entanto, outras manifestações e graves complicações. A avaliação da qualidade microbiológica da água, rotineiramente é feita por meio da quantificação de coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*, que indicam a

possibilidade da presença de outras bactérias entéricas e, portanto, de importantes patógenos. Esses parâmetros de avaliação não fornecem informações quanto a identificação e caracterização das bactérias patogênicas presentes.

O organismo modelo *C. elegans* é uma boa ferramenta já empregada na avaliação da qualidade de águas, uma vez que a interação dos poluentes com o organismo vivo permite evidenciar, com sensibilidade, potenciais riscos que não são previstos a partir de outros parâmetros. O organismo também é utilizado para a avaliação da patogenicidade de bactérias, uma vez que diversos patógenos humanos também são capazes de infectar o *C. elegans* e causar sua morte, de modo que a avaliação da sobrevivência do nematódeo nos ensaios permite inferir sobre a patogenicidade das bactérias.

Estudos que possam caracterizar a lagoa em diferentes aspectos são interessantes, dada a importância do lago e os esforços pela sua recuperação. O presente trabalho visa avaliar a toxicidade das águas da Lagoa da Pampulha, além da presença e patogenicidade de bactérias entéricas, por meio de ensaios com o organismo modelo *C. elegans*, contribuindo para uma caracterização mais completa da qualidade das águas do lago e dos potenciais riscos do seu uso para a saúde humana.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Isolar, identificar e avaliar a patogenicidade de bactérias entéricas potencialmente patogênicas isoladas de amostras de água da Lagoa da Pampulha e do Rio do Bicudo e verificar a toxicidade dessas amostras empregando o modelo invertebrado *Caenorhabditis elegans*.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar bactérias entéricas presentes nas amostras;
- Avaliar os efeitos tóxicos das amostras de água dos corpos hídricos a partir de ensaios empregando o modelo *C. elegans*;
- Avaliar a sobrevivência de *C. elegans* após infecção pelas bactérias isoladas da Lagoa da Pampulha e do Rio do Bicudo.

4 Material e Métodos

4.1 Localidade

A Lagoa da Pampulha é um reservatório urbano de cerca de 2 km^2 de área localizado em Belo Horizonte, Minas Gerais (19º51’09”S 43º58’42”W), sua bacia hidrográfica possui uma área de 96 km^2 em que 57% está localizada em Contagem e 43% em Belo Horizonte (PINTO-COELHO et al., 2012; IGAM, 2019). O reservatório conta com oito tributários diretos e faz parte da bacia hidrográfica do Ribeirão do Onça, que é afluente do Rio das Velhas (DE LIMA et al., 2016).

O Rio do Bicudo, com cerca de 148 Km de extensão, é afluente do Rio das Velhas, tem sua bacia, com cerca de 2.274,48 km² de área, localizada nos municípios de Corinto e Morro das Garças, Minas Gerais (18°13'47.4"S 44°33'43.0"W). O rio conta com seis rios tributários principais e pertence à classe 1 de enquadramento. (AGÊNCIA PEIXE VIVO, 2019)

Os dados meteorológicos da Lagoa da Pampulha foram coletados a partir da estação Belo Horizonte (Pampulha) A521 e do Rio do Bicudo a partir da estação Curvelo A538, que são as mais próximas dos respectivos corpos d’água. Os dados foram obtidos por meio do site do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) e correspondem às informações dos respectivos dias e horários das coletas, exceto do Rio do Bicudo, em que a coleta foi realizada às 9:00 e os dados disponíveis são de 12:00.

4.2 Coleta das amostras de água e processamento inicial

As amostras foram coletadas, no dia 28/09/2021, pela manhã entre 8:00 e 10:00, em quatro pontos ao longo da Lagoa da Pampulha (Figuras 6 e 8), o primeiro ponto (P1) no início do lago (19°51'03.7"S 43°59'10.5"W), onde chegam os primeiros córregos, o segundo ponto (P2), de localização mais central (19°51'03.5"S 43°58'54.3"W), no qual o lago já recebeu as águas dos córregos que o alimentam, o terceiro (P3) próximo aos vertedouros (19°50'40.1"S 43°58'04.2"W), e o quarto ponto (P4) próximo à chegada de um córrego (córrego Tijuco) (19°51'33.2"S 43°58'54.1"W). Os pontos de coleta foram selecionados para abranger as condições de diferentes pontos da extensão do lago, sem haver a necessidade do uso de embarcações para realizar as coletas. Além da Lagoa da Pampulha, também foi realizada a coleta de uma amostra de um corpo hídrico saudável, o Rio do Bicudo, localizado no

município de Corinto, Minas Gerais (18°13'47.4"S 44°33'43.0"W) (Figuras 9 e 7). A coleta no Rio do Bicudo foi feita no dia 12/10/2021 às 9:00 da manhã.

Figura 6: Pontos de amostragem na Lagoa da Pampulha (Adaptado de Google Maps)

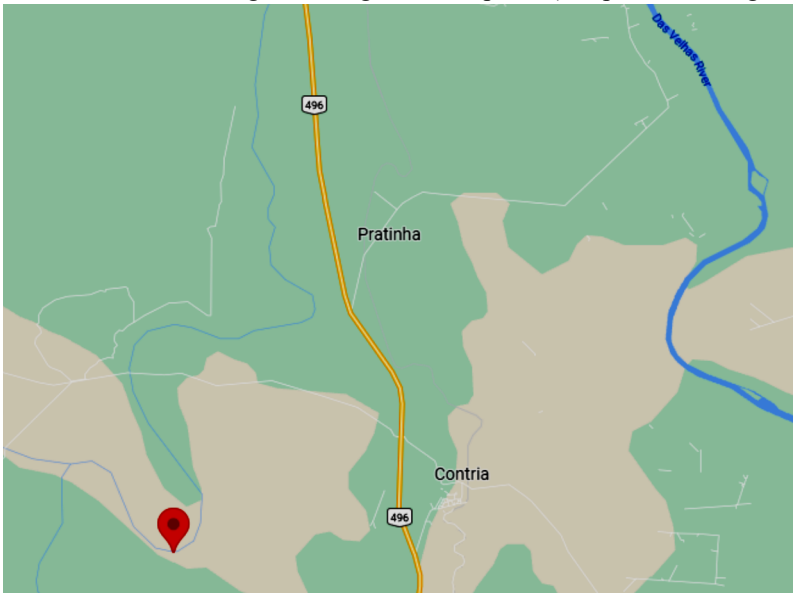


Figura 7: Ponto de amostragem no Rio do Bicudo (Adaptado de Google Maps)

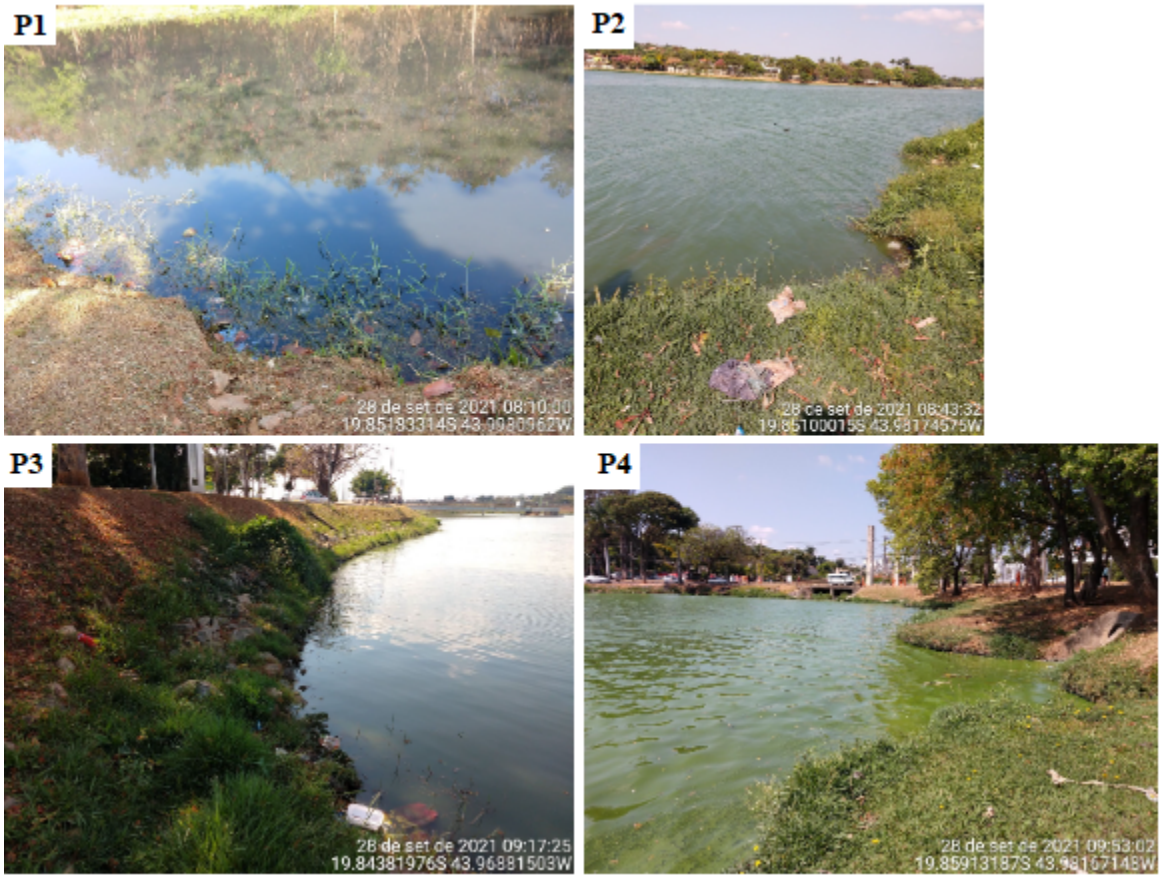


Figura 8 - Pontos de coleta das amostras da Lagoa da Pampulha (Arquivo próprio)

Figura 9 - Ponto de coleta da amostra controle: Rio do Bicudo (Arquivo próprio)

As coletas foram realizadas às margens dos corpos d'água, utilizando tubos para centrífuga estéreis adaptados a uma haste de PVC (Figura 10). Foi feita a medição da temperatura da água no momento da coleta, submergindo um termômetro químico por cerca de 3 minutos. As amostras foram transportadas até o laboratório em caixas de isopor contendo gelo e foram armazenadas sob refrigeração (entre 2 e 8 °C) até o momento da execução dos ensaios (máximo de 10 horas).

Figura 10 - Instrumento utilizado para realizar as coletas

Foi feita a filtração simples das amostras, para retirada de sólidos grosseiros, em condições estéreis, utilizando papel de filtro comum. As amostras foram aliquotadas, foi feita a medição de pH (potenciômetro HANNA INSTRUMENTS, modelo HI2221–02), uma alíquota foi congelada para os ensaios posteriores e outra foi empregada para o isolamento das bactérias.

4.3 Cultivo e manutenção de *C. elegans*

Os nematódeos utilizados para os ensaios de sobrevivência e toxicidade foram das linhagens selvagem N2 Bristol e hipersensível a infecções KU25 (nocaute para p38 MAP-quinase), gentilmente cedidas pelo CGC (*Caenorhabditis* Genetics Center). A manutenção dos vermes foi feita em meio NGM sólido (meio “Nematode Growth Medium” - NaCl - 3,0 g; peptona - 2,5 g; ágar - 17,0 g; tampão KPO_4 1M - 25 ml ; $MgSO_4$ 1M - 1ml; $CaCl_2$ 1M - 1 ml; solução etanólica de colesterol 5mg/ml - 1 ml e água para 1 L) semeado

com *Escherichia coli* OP50, também obtida do CGC, incubadas entre 16 e 25 °C (STIERNAGLE, 1999).

4.3.1 Sincronização de *C. elegans*

Para a obtenção de vermes no primeiro estágio larval (L1), foi feita a sincronização, em que vermes adultos grávidos e ovos foram lavados das placas de NGM com tampão M9 (KH_2PO_4 - 3,0 g; Na_2HPO_4 - 6,0 g; NaCl - 5,0 g; $MgSO_4$ 1 M - 1 ml e água para 1 L) e coletados em tubo de centrífuga de 15 ml. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, foi acrescentado de 1,0 a 1,5 ml da solução de sincronização (água - 0,5 ml; NaOH 1 M - 2,5 ml; hipoclorito de sódio 4% - 1,0 ml), seguida de agitação para dissolução dos vermes adultos e liberação dos ovos. Após a dissolução dos vermes, foi adicionado tampão M9 para interromper a lise e em seguida os ovos foram lavados por três vezes utilizando o mesmo tampão. Os ovos foram mantidos em solução tampão M9, sob agitação constante, por cerca de 18 horas, para que ocorresse a eclosão e fossem obtidos os vermes em estágio L1, uma vez que o tampão não fornece as condições necessárias para o desenvolvimento e mudança de estágio larval. (PORTA-DE-LA-RIVA, 2012)

4.4 Ensaio de toxicidade utilizando *C. elegans*

4.4.1 Sobrevivência de larvas em estágio L1

A avaliação dos efeitos tóxicos das amostras de água foi realizada a partir da avaliação da viabilidade das larvas (N2 em estágio L1) após exposição às amostras e às diluições (em M9) de 10 e 100 vezes. O ensaio foi realizado utilizando microplaca de poliestireno de 96 poços de fundo chato, em cada poço foi adicionado 200 µl da amostra ou das diluições ou do tampão M9 (controle) juntamente com 20 µl de suspensão de vermes numa concentração de 9 a 11 vermes por ul, 0,4 µl de Nistatina (10 mg/ml) e 1,0 µl de Cloranfenicol (34 mg/ml), em seguida as placas foram incubadas à 20±2°C. Foram realizados ensaios com diferentes períodos de exposição das larvas às amostras, em que foram avaliados os efeitos após 24h, 48h e 72h de exposição.

Após o período de incubação, a viabilidade dos vermes expostos foi avaliada a fim de mensurar a sobrevivência dos nematódeos, por meio de ensaio colorimétrico de metabolização de MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] - Sigma).

Foram retirados, cuidadosamente, 100 µl de sobrenadante e em seguida foram adicionados 10 µl de MTT (5 mg/ml) em cada poço, o sistema foi gentilmente agitado e incubado à 20±2°C por 18 h. Durante o tempo de incubação, as células dos vermes que estiverem metabolicamente ativas são capazes de absorver o MTT e reduzi-lo pela succinato desidrogenase, no interior da mitocôndria, a formazan, que é um produto insolúvel de cor púrpura. Dado o tempo de incubação, o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e em seguida foram adicionados 100 µl de DMSO (Dimetilsulfóxido) e o sistema foi agitado, a fim de solubilizar os cristais de formazan. As placas foram incubadas por 2 horas e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan Spectrum, Thermo Fisher Scientific) em comprimento de onda de 575 nm.

4.4.2 Fertilidade e desenvolvimento

Os vermes (N2) sincronizados em L1 foram mantidos, à 25±2°C, em NGM e alimentados com *E. coli* OP50, até atingirem o estágio L4 de desenvolvimento. O ensaio foi realizado em placa de poliestireno de fundo chato de 24 poços, em cada poço foi adicionado 1,0 ml da amostra ou do tampão M9 (controle), juntamente com 100 µl de suspensão de *E. coli* OP50, 1 a 3 larvas (L4), 2 µl de Nistatina (10 mg/ml) e 5 µl de Cloranfenicol (34 mg/ml), em seguida as placas foram incubadas à 20±2°C.

Os poços foram observados a cada 24 horas para verificar se houve morte de vermes e observar a presença de ovos. Após a visualização dos primeiros ovos no poço controle, cerca de 48 h após o início do ensaio, os vermes adultos foram retirados, os ovos e as larvas L1 foram contados em todos os poços para mensurar a fertilidade. A placa foi novamente incubada a 20±2°C e a progênie foi observada todos os dias até os vermes tornarem-se adultos, quando o ensaio foi encerrado.

4.5 Isolamento e identificação das bactérias

Para o isolamento das bactérias, foi realizada a diluição seriada das amostras em água destilada estéril, obtendo-se diluições de 10 e 100 vezes. Foi realizada a semeadura, por espalhamento em superfície, de 100 uL de cada amostra e suas diluições em placas de ágar MacConkey (BD Difco, EUA). As placas foram incubadas a 35±2°C por 18-24h e foi realizada a contagem do número de colônias. Foram isoladas, ao acaso, de 5 a 6 colônias de diferentes morfotipos de cada ponto de coleta, a partir das placas que apresentaram o

crescimento de colônias isoladas, para prosseguir com a identificação e os ensaios de patogenicidade.

Para a identificação, as bactérias isoladas foram submetidas à análise por espectrometria de massa (MALDI-ToF-MS) (espectrômetro FlexControl MicroFlex LT - Bruker Daltonics). Foi realizado o repique de cada isolado em ágar LB (meio "Luria-Bertani" - Triptona - 10,0 g; NaCl - 10,0 g; Extrato de levedura - 5,0 g; Ágar bacteriológico - 15,0 g e água para 1 L) e as placas foram incubadas a 35±2°C por 18h. A partir dos subcultivos, uma colônia de cada isolado foi aplicada sobre um poço da placa de aço inox. Em cada poço contendo bactérias foi adicionado 1 µl de ácido fórmico a 70% e 1 µl da matriz, uma solução saturada de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA), o sistema foi seco ao ar e as análises foram processadas.

Para os isolados pertencentes ao gênero *Aeromonas* e foi realizada a identificação a nível de espécie por meio da amplificação (PCR convencional), análise dos fragmentos amplificados (equipamento de eletroforese QIAxcel® Advanced System - QIAGEN) e sequenciamento dos genes alvo *recA*, *gyrB* e *rpoD* (sequenciador ABI 3500 Genetic Analyzer - Thermo Fisher Scientific), uma vez que para esse gênero bacteriano, não é adequado discriminar as espécies por meio das análises por MALDI-ToF de forma confiável. As identificações de todos os isolados, realizadas por espectrometria e por sequenciamento, foram processadas pelo Laboratório AQUAVET - Sanidade de animais aquáticos (Escola de Veterinária - UFMG).

A extração do DNA dessas bactérias foi feita pelo método de fervura simples modificado: a partir de um subcultivo dos isolados em ágar LB, uma massa de bactérias, que corresponde a cerca de uma alça calibrada de 10uL, foi suspensa em 1ml de água deionizada estéril. A suspensão contida em tubo para centrífuga foi submersa em água fervente por 15 minutos e em seguida centrifugada a 14.000 rpm, à 4°C por 12 minutos. O sobrenadante foi coletado em novo tubo para centrífuga e mantido congelado (-20°C) até o momento do ensaio de amplificação.

4.6 Ensaios de avaliação da patogenicidade utilizando *C. elegans*

Para avaliar a patogenicidade das bactérias isoladas das amostras de água, foram conduzidos ensaios de sobrevivência do *C. elegans* das linhagens N2 e KU25. Os vermes sincronizados em L1 foram mantidos em ágar NGM e alimentados com *E. coli* OP50, até

atingirem o estágio L4. Uma colônia de cada bactéria empregada no ensaio foi inoculada em 5 ml de caldo LB e incubada por 18 h à 25±2°C.

Após alcançarem o estágio L4 de desenvolvimento, os vermes foram lavados das placas utilizando o tampão M9 e coletados em tubos para centrífuga de 15 ml. Foi feita a centrifugação a 2000 x g por 2 minutos, o sobrenadante foi descartado e os vermes foram lavados quatro vezes utilizando o tampão M9. Ao término das lavagens, foi feita a suspensão dos vermes em M9 (10 a 15 vermes em 10 ul).

Em placas de 24 poços contendo 1 ml de ágar NGM foram semeadas as bactérias ou *E. coli* OP50 (controle). Em cada placa foram adicionadas de 10 a 15 larvas em estágio L4 de *C. elegans* N2 ou KU25, juntamente com 5 µL de Fluorodeoxiuridina (FUdR) (50 µg/ml), que é capaz de provocar a esterilidade do verme sem prejudicar seu desenvolvimento e envelhecimento. Foi feita a observação em microscópio e a contagem de vermes vivos e mortos a cada 48h durante 16 dias.

5 Resultados e Discussão

Todos os resultados devem ser avaliados e interpretados levando em consideração que as coletas foram realizadas de forma única para cada ponto amostral, tratando-se portanto, de resultados pontuais, que retratam as condições das águas nos momentos das coletas. A extensão da Lagoa da Pampulha apresenta heterogeneidades observadas nos monitoramentos realizados pelo IGAM, havendo variações nos parâmetros monitorados, tanto em relação aos pontos amostrais quanto em relação ao período de coleta (LOPES et al., 2019).

5.1 Dados meteorológicos

Na tabela (Tabela 1) abaixo estão descritos a temperatura das amostras medidas no momento da coleta e os dados meteorológicos obtidos por meio do site do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), a partir das estações mais próximas aos locais de amostragem, correspondem às informações dos respectivos dias e horários das coletas, exceto do Rio do Bicudo, em que a coleta foi realizada às 9:00 e os dados disponíveis são de 12:00. A partir dos dados coletados pode-se observar que não há diferença marcante entre a Lagoa da Pampulha e o Rio do Bicudo em relação aos parâmetros avaliados, tornando possível comparar os resultados dos demais ensaios.

Tabela 1 - Temperatura e pH das amostras e dados meteorológicos dos pontos amostrais nos dias das coletas

Local	Temperatura da amostra (°C)	pH	Temperatura ambiente (°C)	Umidade (%)	Chuva (mm)
C	23	7,30	-[1]	50	0
P1	22	7,14	21,1	66	0
P2	24	7,37	23,4	59	0
P3	23	7,33	23,4	59	0
P4	25	7,60	25,4	51	0

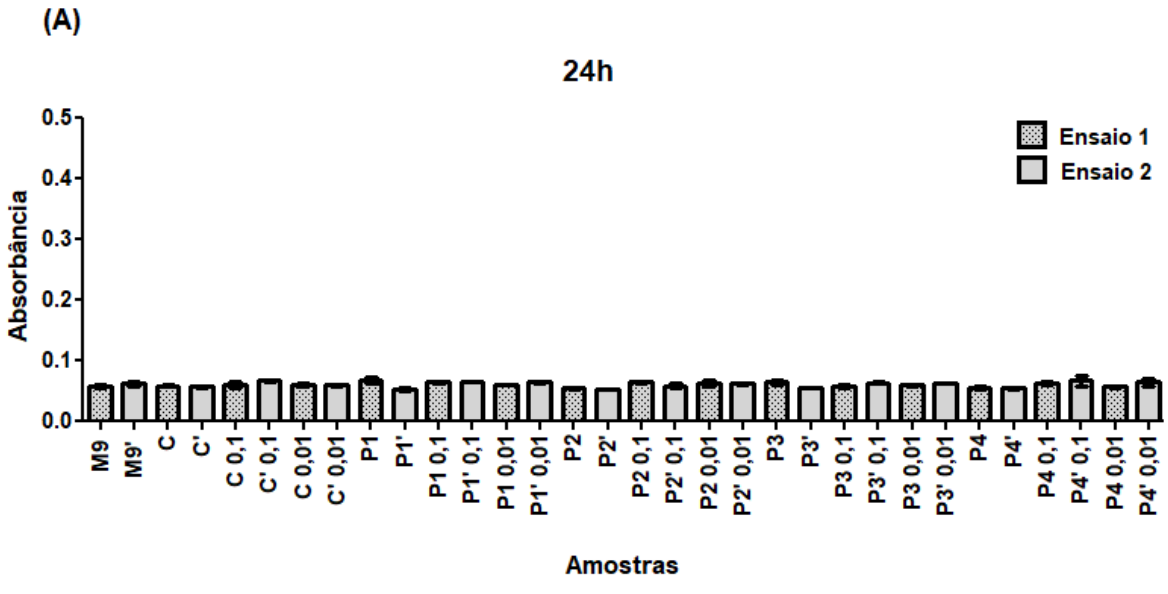
[1] Informação não disponível para o horário da coleta, a temperatura ambiente às 12:00 era de 27°C

5.2 Avaliação da toxicidade da água da Lagoa da Pampulha sobre o *C. elegans*

5.2.1 Sobrevivência do *C. elegans* em estágio L1

A sobrevivência do *C. elegans* (N2) em estágio L1 exposto às amostras de água foi estimada a partir do ensaio de metabolização do MTT, que permite avaliar a viabilidade dos vermes. O ensaio foi realizado em três intervalos de tempo de exposição, 24h, 48h e 72h, entretanto apenas os resultados de 24h de exposição foram considerados para avaliar os efeitos das águas na sobrevivência do verme. Os gráficos obtidos a partir dos ensaios de 48h e 72h, cujos resultados não serão considerados nessa discussão, encontram-se no Apêndice C.

Para todas as amostras, os procedimentos foram realizados na presença e na ausência dos vermes, a fim de se obter o branco de cada amostra e de cada diluição. A partir da leitura da absorbância dos brancos, observou-se que apenas as amostras incubadas por 24h não apresentaram diferença entre as leituras. Quando aumenta-se o tempo de incubação das amostras (48h e 72h) há perda da linearidade e o branco passa a apresentar leituras erráticas (Gráficos 1A, 1B e 1C). Os gráficos apresentam as leituras feitas a partir de dois ensaios independentes, em que se observa, nos tempos de 48h e 72h, variação das absorbâncias sem que haja a metabolização do MTT pelo *C. elegans*.



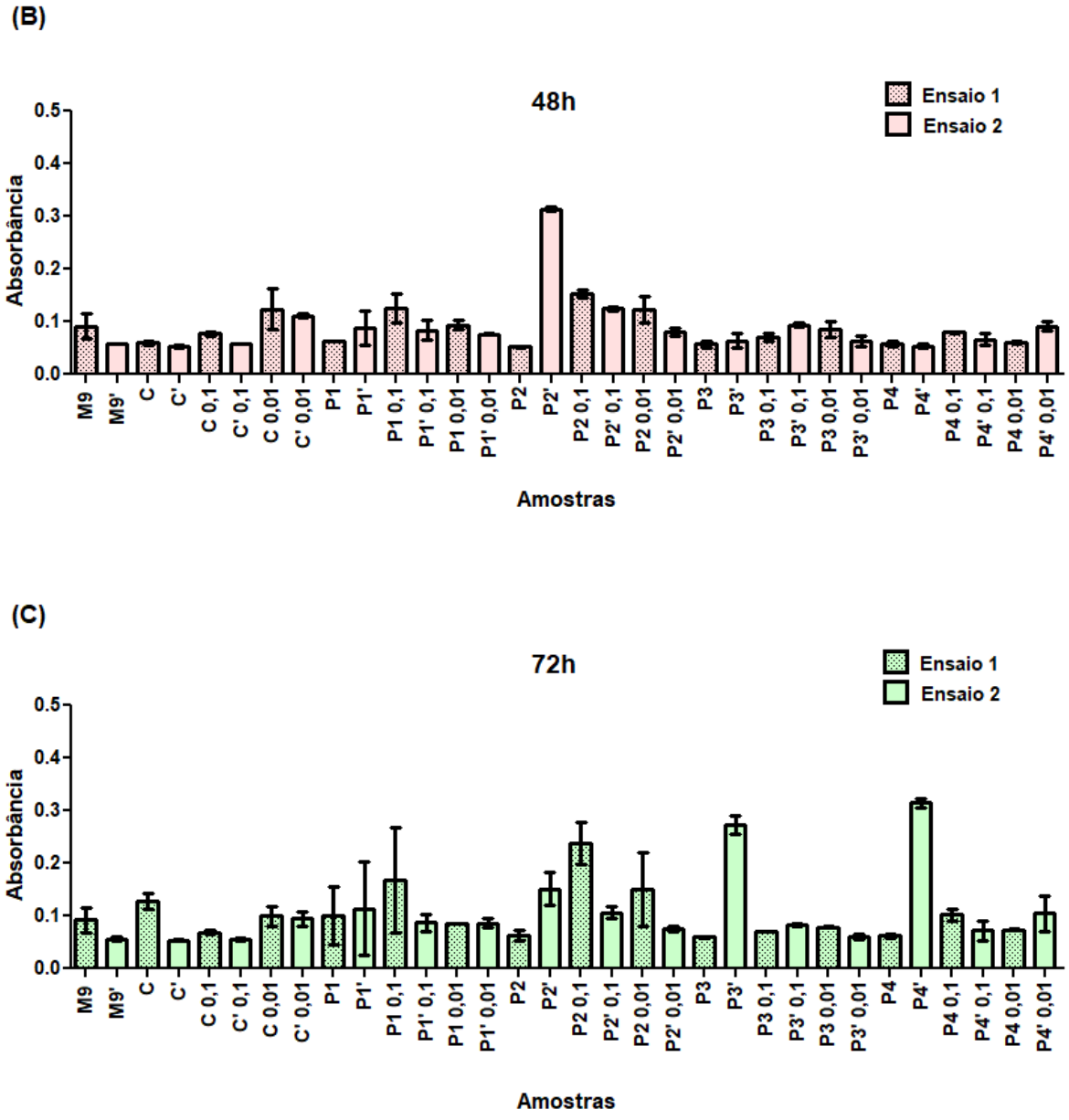


Gráfico 1 - No ensaio colorimétrico usando MTT há perda de linearidade quando o tempo de incubação é maior que 24 horas. (A) ensaio colorimétrico do MTT usando apenas o M9, as amostras e suas diluições, sem vermes, com tempo de incubação de 24h, (B) 48h ou (C) 72h.

As diferenças de absorbância entre as amostras na ausência de vermes pode indicar a presença de fatores ou elementos interferentes nas amostras, uma vez que tal variação não é observada quando o ensaio é realizado utilizando M9 (Gráfico 2). A avaliação da redução do MTT é comumente empregada para mensurar a viabilidade do *C. elegans* e assim acessar informações sobre a toxicidade de substâncias (JAMES e DAVEY, 2007; YELLURKAR et al., 2021). Alguns compostos e condições experimentais podem interferir nos resultados do ensaio de viabilidade celular empregando MTT. São interferentes quaisquer compostos

químicos que possam levar à redução do MTT a formazan, além de extratos de plantas e compostos polifenólicos. Além de haver vegetação no entorno e interior dos corpos hídricos, em todas as amostras coletadas havia a presença de folhas e galhos, que foram retirados apenas por filtração simples. Deve-se considerar ainda, que as amostras possuem composição complexa, não sendo possível definir os possíveis compostos ou fatores que podem causar a interferência observada. Portanto, conclui-se que, apesar de o método ser adequado para a avaliação da toxicidade de substâncias puras, ao avaliar os efeitos de amostras complexas, como amostras ambientais, deve-se atentar se a composição da amostra não leva a falsos resultados ou ainda optar por outro método de análise.

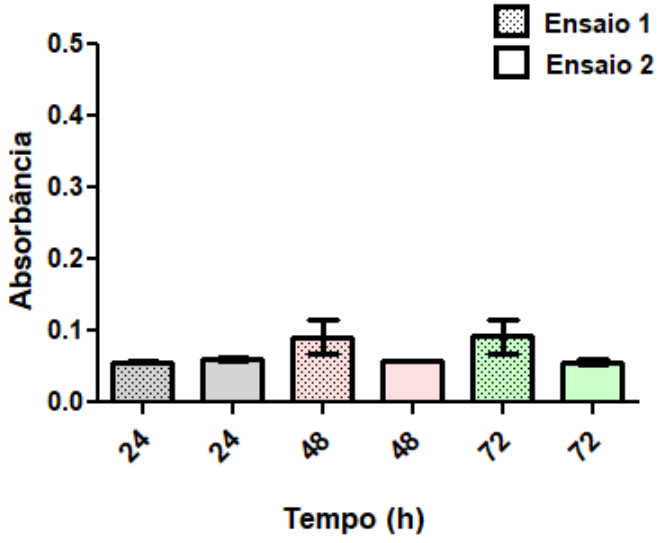
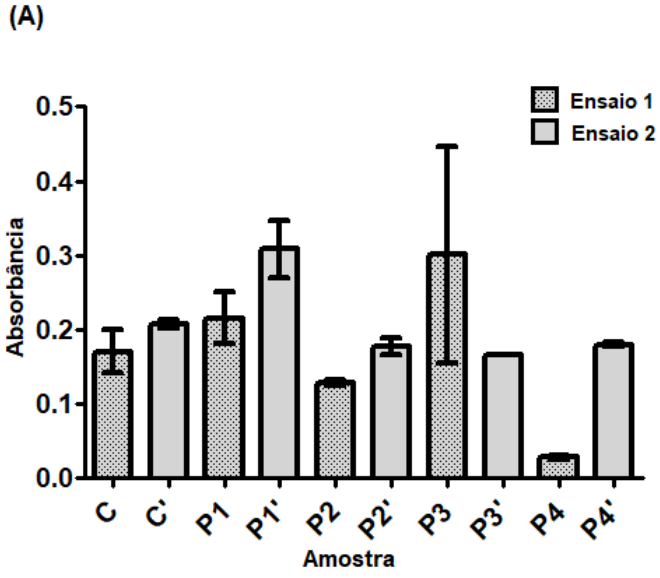


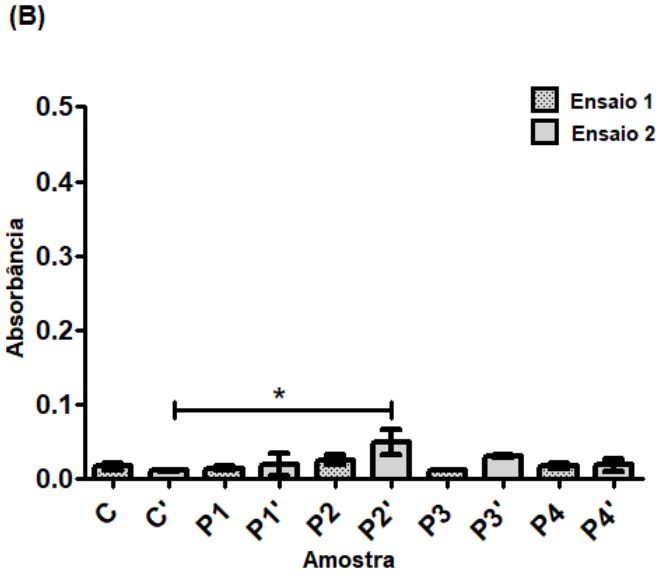
Gráfico 2 - O tempo do ensaio colorimétrico não altera a absorbância do branco utilizando M9 p>0,05

A exposição dos vermes às amostras de água da Lagoa da Pampulha e do Rio do Bicudo por 24 horas não provocou diferença na sobrevivência das larvas, quando comparada à sobrevivência dos vermes mantidos em seu tampão fisiológico M9 (Gráfico 3). O mesmo é observado quando são feitas diluições das amostras, exceto para a amostra do P2 10 vezes diluída no ensaio 2, em que os vermes apresentaram maior sobrevivência quando comparado ao controle. Entretanto, dado que a diferença foi pequena e observada apenas em um dos experimentos e apenas para essa diluição, o resultado observado pode ser decorrente da introdução de uma quantidade ligeiramente maior de vermes em um dos poços durante a execução do experimento.

Observa-se também que a sobrevivência dos vermes nas amostras diluídas é, no geral, menor que nas amostras brutas (Gráficos 3B e 3C), o que não seria observado caso as

amostras apresentassem efeitos tóxicos para o modelo. Por outro lado, o resultado sugere que as amostras podem ter algum efeito positivo na sobrevivência do verme. É válido considerar que o *C. elegans* é um nematódeo de vida livre naturalmente encontrado no solo de ambientes úmidos, pode-se supor que, por se tratar de amostras ambientais que não apresentaram efeitos tóxicos, a sua composição pode ser mais próxima àquela encontrada pelo verme selvagem.





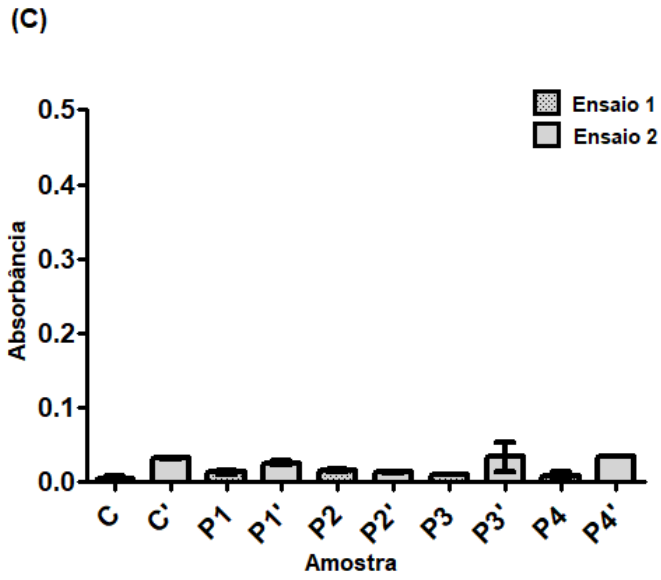


Gráfico 3 - As amostras de água da Lagoa da Pampulha em seu estado natural (A), diluída dez vezes (B) ou diluída 100 vezes (C) não apresentaram toxicidade para o *C. elegans* quando comparadas às águas do Rio do Bicudo (ensaio de redução do MTT).
p>0,05

5.2.2 Fertilidade e desenvolvimento

Os vermes em estágio L4 (adulto jovem) foram expostos às amostras de água da Lagoa da Pampulha, do Rio do Bicudo e tampão M9. Quando os vermes tornaram-se adultos e foram observados os primeiros ovos, eles foram retirados do ensaio. Foi realizada a contagem dos ovos presentes em cada poço para comparar a fertilidade dos vermes expostos às amostras e aqueles mantidos em seu tampão fisiológico (M9). Os adultos mantidos no tampão botaram em média 15,7 ovos/verme, os mantidos na amostra controle botaram 11,3 ovos/verme, enquanto os vermes expostos às amostras P1, P2, P3 e P4 botaram respectivamente 7,0, 11,8, 7,8 e 8,1 ovos/ verme. No gráfico 4, em que os resultados foram comparados com o resultado de M9, observa-se que entre as amostras ambientais não houve diferença de impacto na fertilidade do *C. elegans*. Entretanto, em relação ao tampão fisiológico, as amostras dos pontos P1, P3 e P4 da Lagoa da Pampulha reduziram a fertilidade do modelo (gráfico 4). O resultado indica que, em relação a este parâmetro, as águas da lagoa implicaram em toxicidade para o *C. elegans*, efeito que não é observado com a amostra controle (Rio do Bicudo).

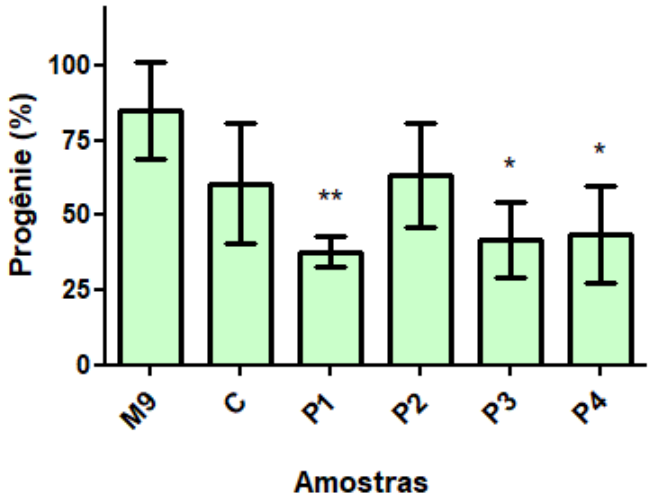


Gráfico 4 - Não há diferença na fertilidade entre o *C. elegans* exposto às amostras de água da Lagoa da Pampulha ou à amostra controle (Rio do Bicudo). Quando comparados aos vermes mantidos em tampão M9, há redução da fertilidade dos vermes expostos às amostras dos pontos P1, P3 e P4 da Lagoa da Pampulha.
* $p<0,05$ ** $p<0,01$

O tampão M9 acrescido de alimento (*E. coli* OP50) fornece condições ideais para a sobrevivência e manutenção do *C. elegans*, por isso a fertilidade do verme neste meio foi considerada o parâmetro de comparação (100%) para as demais amostras. A toxicidade das águas da Lagoa da Pampulha pode ser decorrente da presença de compostos contaminantes, que estão ausentes na amostra do Rio do Bicudo ou não estão presentes em concentração suficiente para causar prejuízo à fertilidade do verme (RIETZLER, et al., 2018).

Além da quantidade de ovos, também foi realizada a contabilização do tempo de desenvolvimento dos vermes desde L1 até tornarem-se adultos, sendo que não houve diferença entre as amostras e o tampão, em que os vermes levaram 5 dias para passar do estágio L1 e atingirem a fase adulta.

5.3 Isolamento e identificação das bactérias

A partir do cultivo das amostras em ágar MacConkey foram selecionadas e isoladas, ao acaso, 26 colônias bacterianas, sendo 5 oriundas do Rio do Bicudo e 21 da Lagoa da Pampulha. A amostra coletada do Rio do Bicudo (C) foi a que apresentou menor crescimento de bactérias, 390 UFC/ml. O menor crescimento para a amostra controle, quando comparada às amostras da Lagoa da Pampulha, está de acordo com o esperado, uma vez que trata-se de

um corpo hídrico saudável localizado em ambiente rural, enquanto as águas da Lagoa da Pampulha, localizada em meio intensamente urbanizado, são poluídas.

A partir da amostra do primeiro ponto (P1) da Lagoa da Pampulha houve o crescimento de 22.500 UFC/ml, sendo notadamente superior aos demais pontos de coleta. As amostras coletadas de P2 e P3 apresentaram crescimento de 1.545 UFC/ml e 1.530 UFC/ml, respectivamente, enquanto o P4 apresentou crescimento de 6.550 UFC/ml.

De acordo com a Resolução CONAMA nº 274/2000, um corpo d'água é considerado adequado para uso recreativo de contato primário se em 80% ou mais de um conjunto de amostras coletadas em cinco semanas apresentar em 100 ml até 800 *Escherichia coli* ou até 1000 coliformes termotolerantes. (BRASIL, 2000)

O cultivo das amostras foi feito em meio seletivo para bactérias Gram negativas, embora não exista parâmetros de qualidade que considerem o crescimento total de bastonetes Gram negativos em amostra única, os resultados obtidos podem oferecer um indício da qualidade microbiológica da água, uma vez que bactérias entéricas (principalmente bastonetes Gram negativos), especialmente a *E. coli*, são classicamente empregados como indicadores de qualidade hídrica. Portanto, pode-se inferir que, dentre as amostras coletadas, a qualidade microbiológica das águas do Rio do Bicudo tende a ser superior à das águas da Lagoa da Pampulha.

A variação no crescimento bacteriano a partir das diferentes amostras pode estar relacionado a fatores como a presença de animais e fezes de animais próximo ao ponto de amostragem, a proximidade com pontos de chegada de esgotos e córregos, o processo de diluição ao longo do corpo d'água, desde o ponto de chegada da água contaminada até o vertedouro. A considerável diferença de densidade bacteriana entre os pontos amostrais já foi observada em monitoramentos feitos pelo IGAM. Diferentes pontos de coleta possuem diferentes cargas de *E. coli*, sendo que, assim como no caso do P1, as amostras coletadas próximo do início da Lagoa apresentaram maior carga desse microrganismo, enquanto aquelas coletadas próximo do vertedouro, como em P3, possuem menor densidade de *E. coli* (LOPES et al., 2019).

Durante as coletas foi observada a presença de resíduos como embalagens de alimentos, restos de frutas, roupas e outros materiais diversos, além de folhas e galhos no entorno e no interior da água, em todos os pontos de coleta da Lagoa da Pampulha. Em P1 e P2 também foi observada a presença de aves no interior da lagoa. Em P4 foi visualizada uma camada densa e esverdeada na superfície da água (floração), indicando a eutrofização do lago

nesse trecho. No Rio do Bicudo não foram observados resíduos, materiais estranhos ao ambiente natural ou quaisquer animais no interior das águas, apenas folhas e galhos.

5.3.1 MALDI-ToF-MS e Sequenciamento

Todos os isolados foram submetidos a análise por MALDI-ToF e os resultados estão descritos no quadro abaixo (Quadro 1). As análises pelo método de MALDI-ToF podem fornecer a identificação a nível de espécie ou gênero, sendo que para considerar a identificação de espécie o escore da identificação deve estar entre 2.000 e 3.000, para a identificação do gênero o escore deve estar entre 1.700 e 1.999, enquanto em análises com escore inferior à 1,699 a identificação não é realizada.

Dentre todos os 26 isolados submetidos à identificação, 21 foram identificados a nível de espécie, quatro a nível de gênero e um não foi identificado. Após as identificações, os isolados selecionados para prosseguir no ensaio de infecção foram as espécies que podem acometer humanos e causar manifestações gastrointestinais, sendo o critério aplicado pelo potencial de indicar possível contaminação fecal das águas e risco de infecção para humanos que tenham contato com elas.

Quadro 1 - Identificação dos isolados por MALDI-ToF e respectivos escores

Isolado	C	P1	P2	P3	P4
1	*E. cloacae* (2.221)	*E. asburiae* (2.265)	*E. kobei* (2.173)	*E. asburiae* (2.326)	*E. kobei* (2.159)
2	*E. asburiae* (2.199)	*E. asburiae* (2.105)	*E. kobei* (2.126)	*E. asburiae* (2.244)	*E. asburiae* (2.121)
3	*Providencia* sp. (1.749)	*E. cloacae* (2.158)	*E. kobei* (2.045)	*E. kobei* (2.183)	*Enterobacter* sp. (1.893)
4	Não identificado (1.488)	*A. caviae* (2.323)	*E. asburiae* (2.169)	*E. kobei* (2.18)	*A. veronii* (2.016)
5	*Pseudomonas monteilii* (2.2)	*Kluyvera ascorbata* (2.069)	*A. hydrophila* (2.053)	*E. kobei* (2.01)	*Pseudomonas* sp. (1.847)
6		*Citrobacter* sp. (1.785)			

C: isolados obtidos a partir do ponto controle de amostragem (Rio do Bicudo); P1 a P4: isolados obtidos a partir dos ponto 1 a 4 de amostragem na Lagoa da Pampulha

A fim de facilitar a identificação da bactéria, ao longo do presente texto os isolados poderão ser referenciados de acordo com o seu número (Quadro) e o ponto de coleta da sua amostra de origem. Como por exemplo, o isolado 1 da amostra oriunda do ponto de coleta controle (Rio do Bicudo) poderá ser identificado como: *Enterobacter cloacae* (C1), para que seja possível diferenciá-lo de outros isolados da mesma espécie.

Os isolados pertencentes ao gênero *Aeromonas* tiveram sua identificação confirmada por meio de sequenciamento, uma vez que sua identificação por espectrometria de massa pode não ser acurada, ainda que apresente um escore alto. A partir das sequências obtidas dos genes *recA*, *gyrB* e *rpoD* foram feitas buscas por alinhamento com sequências depositadas no banco de dados do NCBI, preferencialmente oriundas de material tipo. Os resultados dos alinhamentos confirmaram as identificações feitas pelo MALDI-ToF (Apêndice A).

Dentre as bactérias identificadas, as que prosseguiram para os ensaios de sobrevivência foram aquelas que são potenciais patógenos humanos causadores de manifestações gastrointestinais. Portanto, foram excluídos dos ensaios seguintes os isolados: *Pseudomonas monteilii* (C5) e *Pseudomonas* sp. (P4-5), além do isolado não identificado (C4).

Todas as bactérias isoladas podem ser de origem fecal, mas também são naturalmente encontradas em ambiente aquático, sem que isso represente, necessariamente, contaminação. Diante disso, os resultados indicam possível contaminação fecal, principalmente quando avaliado considerando também o elevado número de bactérias Gram negativas cultivadas a partir das amostras da Lagoa.

A escolha dos isolados para serem identificados foi feita ao acaso, buscando por colônias de morfotipos diferentes, apesar disso, pode-se notar que a maioria dos isolados foram do gênero *Enterobacter*, 17 dos 25 identificados (68%), não havendo quaisquer fatores empregados para favorecer o seu crescimento, pode-se inferir que, dentre as bactérias cultiváveis pelo método empregado, esse gênero encotrava-se em grande quantidade nas amostras coletadas.

As bactérias do gênero *Enterobacter* são consideradas patógenos oportunistas, que acometem pacientes imunocomprometidos e hospitalizados em UTI, sendo as espécies *E. aerogenes*, *E. cloacae* e *E. hormaechei*, as principais isoladas em processos infecciosos. A relevância clínica dessas bactérias encontra-se, na capacidade dessas espécies adaptarem-se e apresentarem resistência a diferentes antimicrobianos, dificultando o tratamento (DAVIN-REGLI, LAVIGNE e PAGÈS, 2019). Dentre os isolados desse gênero, os de maior relevância para a saúde humana são os dois *E. cloacae* (C1 e P1-3).

O segundo gênero mais isolado das amostras foi *Aeromonas* (12%), presente em três pontos amostrais da Lagoa da Pampulha (P1, P2 e P4). Trata-se de um gênero comum em ambientes aquáticos, sendo importante patógeno de peixes. Também são patógenos oportunistas que causam infecções, a partir da ingestão de água ou alimentos contaminados, principalmente em crianças menores de cinco anos, idosos e pessoas imunossuprimidas (PESSOA et al., 2019; CABRAL, 2010).

As demais bactérias isoladas em menor frequência: *Providencia* sp. (C3), *Kluyvera ascorbata* (P1-5) e *Citrobacter* sp. (P1-6), também são patógenos oportunistas, não sendo agentes comuns de infecções. Dentre estes gêneros, as espécies *C. freundii* e *C. koseri* são as mais relevantes clinicamente, pela diversidade de tecidos que podem acometer e por causarem importantes surtos nosocomiais (DEVECI e COBAN, 2014).

Neste trabalho não foram identificadas nenhuma bactéria entérica classicamente ou estritamente patogênica. Entretanto, esse resultado não pode ser considerado como evidência de que as águas da lagoa são, do ponto de vista microbiológico, próprias para o contato ou que é adequado o consumo de seus pescados, ainda que por pessoas hígidas. Deve-se considerar que há contaminação das suas águas por esgoto, inúmeros são os patógenos

(bactérias, vírus, protozoários) que podem estar presentes (ASHBOLT, 2015; MS, 2018). Além de haver o risco comprovado de transmissão de esquistossomose (PINTO, MATI, e MELO, 2013).

Outro aspecto a ser considerado é que não se faz necessário grande quantidade de bactérias para que ocorra uma infecção, isto é, um patógeno pode estar presente em pequena concentração e por isso não ter sido encontrado neste estudo, mas apresentar baixa dose infectante. Um exemplo de patógeno que possui baixa dose infectante é a *E. coli* enterohemorrágica, em que apenas 10 células podem ser suficientes para estabelecer um processo infeccioso (SCHMID-HEMPEL e FRANK, 2007).

5.4 Avaliação da patogenicidade das bactérias

Nota-se, a partir da identificação dos isolados, que não houve nenhuma bactéria sabidamente patogênica para humanos, apenas causadoras de infecções oportunistas. Entretanto, sabe-se que as bactérias sofrem processos de adaptação e diferentes linhagens de uma mesma espécie podem interagir de forma diferente com os organismos e apresentar diferentes níveis de patogenicidade (KUMAR, CHHIBBER e HARJAI, 2009). Diante disso, buscou-se verificar o potencial patogênico das bactérias para o *C. elegans* e observar se o ambiente da lagoa implicaria no isolamento de linhagens mais patogênicas para esse modelo, uma vez que por ser poluído poderia oferecer pressões adaptativas diferentes de um corpo hídrico saudável.

O ensaio foi realizado empregando duas linhagens do *C. elegans*, a linhagem selvagem N2 e a linhagem KU25 (*pmk-1*), um mutante nocaute para o gene da proteína PMK-1, que é importante componente de uma via que regula a imunidade inata, tornando essa linhagem mais sensível à infecções (SHIVERS et al., 2010; TROEMEL et al., 2006).

No ensaio foram empregadas, além das bactérias isoladas das amostras de água, duas bactérias de linhagens de referência: *E. aerogenes* ATCC13048 e *C. freundii* ATCC8090, para fins de comparação entre os isolados do ambiente e linhagens caracterizadas. A *E. coli* OP50, que é a bactéria utilizada para alimentar o *C. elegans*, foi empregada como controle negativo das infecções, uma vez que não é patogênica para o modelo. O isolado *Aeromonas hydrophila* (P2-5) foi excluído do ensaio, uma vez que ao longo do experimento o tapete bacteriano adquiriu coloração levemente acastanhada impossibilitando a visualização dos vermes.

No ensaio empregando o *C. elegans* da linhagem N2 (selvagem) todos os isolados levaram à menor sobrevivência do verme quando comparado ao controle OP50 (gráfico 5). A

LT_{50} média dos vermes infectados pelo controle OP50 foi de 16 dias, enquanto a LT_{50} média dos vermes infectados pelos isolados ambientais foi de 14 dias, exceto para os infectados pelo *E. cloacae* (P1-3) em que a LT_{50} média foi de 15 dias. Os vermes infectados pelas linhagens de referência *E. aerogenes* ATCC 13048 e *C. freundii* ATCC 8090 apresentaram menor LT_{50}, respectivamente, 12 e 8 dias.

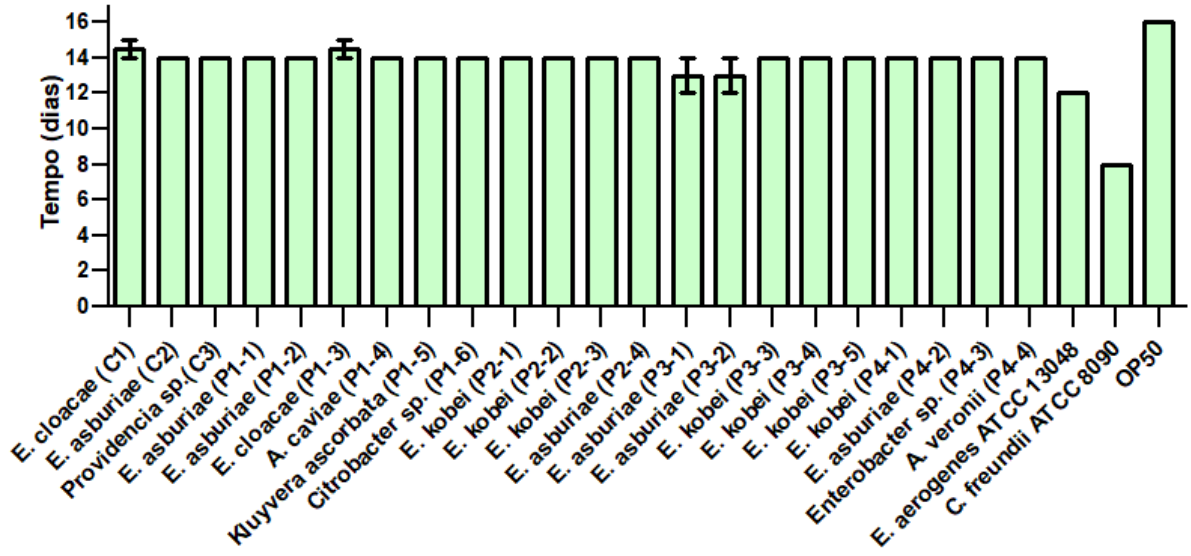


Gráfico 5 - Os isolados ambientais e as linhagens de referência levaram à redução da sobrevivência do *C. elegans* N2 (LT_{50})

O *C. elegans* da linhagem KU25 quando infectado pelas bactérias não apresentou diferença significativa na sua sobrevivência, quando comparado aos controles. No gráfico 6 é possível observar que não há diferença na LT_{50} (tempo necessário para ocorrer a morte de 50% dos animais) dos vermes infectados com os isolados e com os controles. As curvas de sobrevivência do KU25 para todos os isolados estão presentes no Apêndice B.

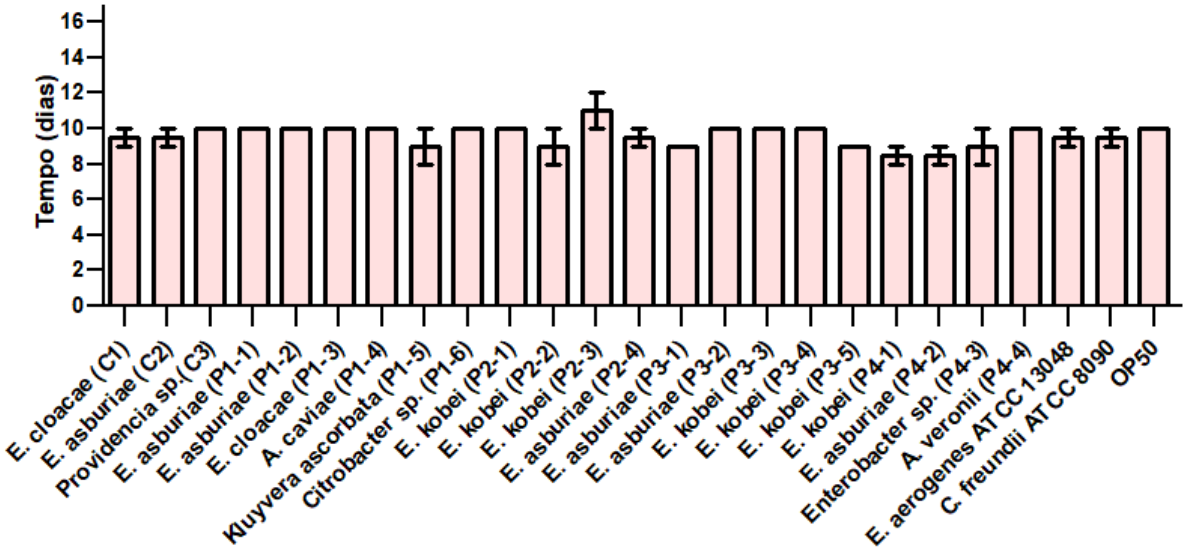


Gráfico 6 - As bactérias isoladas não impactaram na sobrevivência do *C. elegans* KU25 (LT_{50})
p>0,05

A partir dos resultados do ensaio de infecção empregando a linhagem N2 é possível observar que entre os isolados ambientais não há diferença na LT_{50} dos vermes, evidenciando que as bactérias da Lagoa da Pampulha não são mais patogênicas para o *C. elegans* que os isolados da amostra controle (Rio do Bicudo), assim como observado no ensaio empregando KU25. Entretanto, diferente do observado na infecção do KU25, as linhagens de referência levaram a menor tempo de sobrevivência do verme.

A linhagem *E. aerogenes* ATCC 13048 já mostrou-se mais patogênica que a OP50 para o verme (LAVIGNE et al., 2012), porém não foram encontrados trabalhos que avaliaram a sobrevivência do *C. elegans* após infecção com *C. freundii* ATCC 8090. Diante disso, ao se comparar os isolados ambientais com o *E. aerogenes* ATCC 13048 e OP50, pode-se concluir que as bactérias ambientais são pouco patogênicas para o *C. elegans* N2.

A diferença entre a sobrevivência média das linhagens N2 e KU25 está de acordo com o esperado, uma vez que KU25 é naturalmente mais sensível à infecções e também possui menor tempo de sobrevivência mesmo quando alimentada apenas com a *E. coli* OP50 (PARK et al., 2018). Entretanto, não foram encontrados trabalhos empregando *E. aerogenes* ATCC 13048 e *C. freundii* ATCC 8090 em ensaios de infecção de *C. elegans* da linhagem KU25 para relacionar com os achados, em que não houve redução da sobrevivência quando comparado ao controle OP50. Portanto, seria interessante que outros estudos pudessem incluir ensaios empregando essas bactérias para infectar KU25, a fim de compará-los aos achados deste trabalho.

Os resultados evidenciam que as espécies, que são pouco patogênicas para humanos, também não impactaram no tempo de sobrevivência do *C. elegans* KU25 ou impactaram pouco no tempo de sobrevivência do *C. elegans* N2, indicando que o ambiente das águas da lagoa não implicou no isolamento de linhagens bacterianas mais patogênicas que aquelas encontradas no rio saudável.

6 Conclusões

A partir da observação dos dados meteorológicos nos dias de coleta, pode-se concluir que os parâmetros avaliados não tiveram correlação com os resultados observados nas análises.

A partir da avaliação dos efeitos tóxicos das amostras de água da Lagoa da Pampulha e do Rio do Bicudo na sobrevivência, fertilidade e desenvolvimento do *C. elegans* (selvagem N2) pode-se concluir que:

- Não houve diferença entre sobrevivência do *C. elegans* em estágio L1 exposto às amostras da Lagoa da Pampulha e do Rio do Bicudo por 24h;
- A sobrevivência do *C. elegans* nas amostras ambientais em seu estado natural foi maior do que nas mesmas amostras diluídas;
- Não há diferença na fertilidade entre o *C. elegans* exposto às amostras de água da Lagoa da Pampulha ou à amostra do Rio do Bicudo;
- Não há diferença no tempo de desenvolvimento do *C. elegans* de L1 a adulto exposto às águas da Lagoa da Pampulha e às águas do Rio do Bicudo;
- Em relação ao tampão M9, as águas da Lagoa da Pampulha reduziram a fertilidade do *C. elegans*;

A partir do isolamento, identificação e avaliação da patogenicidade de bactérias entéricas oriundas das amostras de água da Lagoa da Pampulha e do Rio do Bicudo pode-se concluir que:

- As águas da Lagoa da Pampulha, quando comparadas às águas do Rio do Bicudo, apresentaram maior densidade de bactérias Gram negativas;
- O gênero *Enterobacter* foi predominante nas amostras analisadas;
- Não houve diferença entre a patogenicidade, para o *C. elegans*, das bactérias isoladas da Lagoa da Pampulha e aquelas isoladas do Rio do Bicudo;
- As bactérias isoladas do ambiente, quando comparadas ao controle *E. coli* OP50, levaram a menor sobrevivência do *C. elegans* N2 (redução de 2 dias na LT_{50});
- As bactérias das linhagens de referência, quando comparadas ao controle *E. coli* OP50, levaram a menor sobrevivência do *C. elegans* N2 (redução de 4 e 8 dias na LT_{50});

Deste modo, as águas da Lagoa da Pampulha quando comparadas às águas do Rio do Bicudo apresentaram pouco efeito tóxico para o *C. elegans*, e as bactérias isoladas das

amostras ambientais não impactaram na sobrevivência do *C. elegans* KU25 e impactaram pouco na sobrevivência do N2.

Por fim, conclui-se que apesar de o corpo hídrico receber o despejo de esgotos e apresentar maior densidade bacteriana que o Rio do Bicudo, os microrganismos isolados da Lagoa da Pampulha não implicaram em patogenicidade muito maior para o modelo empregado. Além disso, as águas da Lagoa também não apresentam maiores efeitos tóxicos quando comparadas às águas do Rio do Bicudo, a partir dos parâmetros avaliados. Entretanto, deve-se considerar que o contato com as águas da Lagoa da Pampulha envolvem riscos para a saúde humana, uma vez que apresenta elevada densidade de bactérias que são patógenos oportunistas e apresenta efeitos tóxicos (redução de fertilidade) para o organismo modelo.

Os resultados podem sugerir que as abordagens empregadas para a recuperação da qualidade da Lagoa estão apresentando resultados positivos. Entretanto, deve-se considerar que as coletas foram realizadas de forma única para cada ponto amostral, tratando-se de resultados pontuais, que retratam as condições das águas nos momentos das coletas. Outro aspecto a ser considerado é a heterogeneidade das características das águas, que existe ao longo da extensão da lagoa. Portanto, é interessante que sejam realizados novos ensaios e novas coletas - em períodos secos e chuvosos e em mais pontos amostrais. Além de mais estudos que ofereçam outras formas de avaliação da qualidade da água (avaliação de outros parâmetros e uso de outros modelos biológicos) e do isolamento e caracterização das bactérias (outros métodos de isolamento, infecção de diferentes modelos, verificação da presença de fatores de virulência ou genes resistência a antimicrobianos).

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, Mohammad; BALSHI, Ahmad. First literature review of carbapenem-resistant *Providencia*. **New microbes and new infections**, v. 25, p. 16-23, 2018.

ADEOLU, Mobolaji et al. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacteriales ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5575-5599, 2016.

AGÊNCIA PEIXE VIVO. Termo de Referência para Contratação de pessoa jurídica especializada para execução de projeto hidroambiental na unidade territorial estratégica rio Bicudo, em Minas Gerais. Ato Convocatório nº 001/2019. **Belo Horizonte**, 2019.

ALTUN, Zeynep F.; HALL, David H. Handbook of *C. elegans* Anatomy. **WormAtlas**, 2009. Disponível em: http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/hermaphroditehomepage.htm. Acesso em: 5 de Outubro de 2020.

ANA. Agência Nacional de Águas. Cuidando das águas: soluções para melhorar a qualidade dos recursos hídricos. Agência Nacional de Águas, Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente. **Brasília: ANA**, 2013.

ANA. Agência Nacional de Águas e Saneamento Básico. Ministério do Desenvolvimento Regional. Enquadramento dos corpos d'água em classes. **Brasília: ANA**, 57p., 2020.

ANGELETTI, Silvia. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. **Journal of microbiological methods**, v. 138, p. 20-29, 2017.

APFELD, Javier; ALPER, Scott. What can we learn about human disease from the nematode *C. elegans*?. **Disease Gene Identification**, p. 53-75, 2018.

ARTAL-SANZ, Marta; DE JONG, Liesbeth; TAVERNARAKIS, Nektarios. *Caenorhabditis elegans*: a versatile platform for drug discovery. **Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology**, v. 1, n. 12, p. 1405-1418, 2006.

ASHBOLT, Nicholas J. Microbial contamination of drinking water and human health from community water systems. **Current environmental health reports**, v. 2, n. 1, p. 95-106, 2015.

ATLI, Gülüzar; CANLI, Mustafa. Response of antioxidant system of freshwater fish Oreochromis niloticus to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 8, p. 1884-1889, 2010.

BALLAL, Mamatha et al. An unusually encountered bacterium causing diarrhea, *Kluyvera ascorbata*: A case report. **Biomedicine**, v. 41, n. 4, p. 865-867, 2021.

BELO HORIZONTE. Secretaria Municipal de Obras e Infraestrutura. Plano Municipal de Saneamento de Belo Horizonte – PMS 2020/2023. **Belo Horizonte**, 2020. Disponível em: https://prefeitura.pbh.gov.br/sites/default/files/estrutura-de-governo/obras-e-infraestrutura/2021/_pms2020-2023_texto_completo.pdf. Acesso em: 02 de Dezembro de 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 5 :Tecnologias em Serviços de Saúde: descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos **Brasília: Anvisa**, 2013a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6 : Detecção e identificação de bactérias de importância médica **Brasília: Anvisa**, 2013b.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA no 274 de 29 de novembro de 2000: Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. **Diário Oficial da União**, 2000.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução CONAMA no 357 de 17 de março de 2005: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais. **Diário Oficial da União**, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria no. 888 de 4 de maio de 2021: Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS no. 5, de 28 de setembro de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, 2021.

BUZELLI, Giovanna Moreti; CUNHA-SANTINO, Marcela Bianchessi da. Análise e diagnóstico da qualidade da água e estado trófico do reservatório de Barra Bonita, SP. **Revista Ambiente e Água**, v. 8, n. 1, p. 186-205, 2013.

CABRAL, João PS. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. **International journal of environmental research and public health**, v. 7, n. 10, p. 3657-3703, 2010.

CETESB. Companhia ambiental do estado de São Paulo. Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos. Companhia ambiental do estado de São Paulo: Organizadores: Carlos Jesus Brandão et al. **São Paulo: Cetesb**: Brasília: ANA, 2011.

CLAVIJO, Araceli et al. The nematode *Caenorhabditis elegans* as an integrated toxicological tool to assess water quality and pollution. **Science of the Total Environment**, v. 569, p. 252-261, 2016.

COPETTI, Diego et al. Eutrophication management in surface waters using lanthanum modified bentonite: a review. **Water Research**, v. 97, p. 162-174, 2016.

CORSI, Ann K.; WIGHTMAN, Bruce; CHALFIE, Martin. A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, v. 200, n. 2, p. 387-407, 2015.

COSTA, Leíse. Mitos e baixa renda fortalecem a tradição da pesca na Pampulha. **Edição do Brasil**, Belo Horizonte, 17 de maio de 2018. Disponível em:http://edicaodobrasil.com.br/2018/05/17/mitos-e-baixa-renda-fortalecem-tradicao-da-pesca-na-pampulha. Acesso em: 11 de Setembro de 2020.

COUILLAULT, Carole; EWBANK, Jonathan J. Diverse bacteria are pathogens of *Caenorhabditis elegans*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4705-4707, 2002.

DALLA, A. Vecchia et al. Surface water quality in the Sinos River basin, in Southern Brazil: tracking microbiological contamination and correlation with physicochemical parameters. **Environmental science and pollution research international**, v. 22, n. 13, p. 9899-9911, 2015.

DAVIN-REGLI, Anne; LAVIGNE, Jean-Philippe; PAGÈS, Jean-Marie. Enterobacter spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 32, n. 4, p. e00002-19, 2019.

DE ÁVILA, Renato Ivan; VALADARES, Marize Campos. Brazil moves toward the replacement of animal experimentation. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 47, n. 2, p. 71-81, 2019.

DE LIMA, Geisiane Aparecida; ASSIS, Natália Gonçalves; IBRAHIM, Elizabeth Rodrigues Brito. Diagnóstico dos córregos de influência direta da Lagoa da Pampulha com base nos requisitos do código florestal brasileiro por meio da utilização das ferramentas do SIG. In: **VII Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental**, Campina Grande, 2016.

DE PÁDUA, Valter Lúcio et al. Remoção de microrganismos emergentes e microcontaminantes orgânicos no tratamento de água para consumo humano. **Rio de Janeiro: ABES,** 2009.

DEVECI, Aydin; COBAN, Ahmet Yilmaz. Optimum management of *Citrobacter koseri* infection. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 12, n. 9, p. 1137-1142, 2014.

DESHMUKH, Rehan A. et al. Recent developments in detection and enumeration of waterborne bacteria: a retrospective minireview. **MicrobiologyOpen**, v. 5, n. 6, p. 901-922, 2016.

DI VENTURA, Barbara et al. From *in vivo* to *in silico* biology and back. **Nature**, v. 443, n. 7111, p. 527-533, 2006.

DOKE, Sonali K.; DHAWALE, Shashikant C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 23, n. 3, p. 223-229, 2015.

ESCRITÓRIO DE HISTÓRIAS. **Museu Virtual Brasil**, c2009. Museu Virtual Pampulha. Disponível em: http://www.museuvirtualbrasil.com.br/museu_pampulha/modules/myalbum/photo.php?lid=233&cid=1. Acesso em: 01 de outubro de 2020.

FHOGARTAIGH, Caoimhe Nic; EDGEWORTH, Jonathan. Bacterial gastroenteritis. **Medicine**, v. 37, n. 11, p. 586-593, 2009.

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Saneamento. 3.ed. rev. **Brasília: Funasa**, 408p., 2006.

FURTADO, Ana Paula Fernandes Viana; MONTE-MOR, Roberto Cézar de Almeida; DO COUTO, Eduardo de Aguiar. Avaliação das ações de reabilitação da Lagoa da Pampulha em Belo Horizonte-MG. In: **XXIII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos**, 2019.

GAO, Shan et al. Classification and prediction of toxicity of chemicals using an automated phenotypic profiling of *Caenorhabditis elegans*. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 19, n. 1, p. 1-11, 2018.

GIRARDI, Viviane et al. Microbial risk assessment in recreational freshwaters from southern Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 651, p. 298-308, 2019.

GUIMARÃES, Mariana Vasconcelos; FREIRE, José Ednésio da Cruz; MENEZES, Lea Maria Bezerra de. Utilização de animais em pesquisas: breve revisão da legislação no Brasil. **Revista Bioética**, v. 24, n. 2, p. 217-224, 2016.

HUNT, Piper Reid. The *C. elegans* model in toxicity testing. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 1, p. 50-59, 2017.

IGAM. Instituto Mineiro de Gestão das Águas. Monitoramento da Qualidade das Águas Superficiais da Sub-bacia do Ribeirão Pampulha - Relatório Trimestral - 3° Trimestre de 2018. **Belo Horizonte: Igam**, 2019.

JAISHANKAR, Monisha et al. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. Interdisciplinary toxicology, v. 7, n. 2, p. 60-72, 2014.

JAISWAL, Ankur; VERMA, Arpit; JAISWAL, Pallavi. Detrimental effects of heavy metals in soil, plants, and aquatic ecosystems and in humans. **Journal of Environmental Pathology**, Toxicology and Oncology, v. 37, n. 3, 2018.

JAMES, Catherine E.; DAVEY, Mary W. A rapid colorimetric assay for the quantification of the viability of free-living larvae of nematodes *in vitro*. **Parasitology research**, v. 101, n. 4, p. 975-980, 2007.

JEAN-QUARTIER, Claire et al. *In silico* cancer research towards 3R. **BMC cancer**, v. 18, n. 1, p. 408, 2018.

JONES, Kevin C.; DE VOOGT, Pim. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. **Environmental pollution**, v. 100, n. 1-3, p. 209-221, 1999.

KALETTA, Titus; HENGARTNER, Michael O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nature reviews Drug discovery**, v. 5, n. 5, p. 387-399, 2006.

KANG, Eugene et al. Enterobacteria and host resistance to infection. **Mammalian Genome**, v. 29, n. 7-8, p. 558-576, 2018.

KREVŠ, Alina; KUČINSKIENĖ, Alė. Microbial decomposition of sedimentary organic matter in small temperate lakes. **Fundamental and Applied Limnology/Archiv für Hydrobiologie**, v. 191, n. 3, p. 239-251, 2018.

KUMAR, Ravi; CHHIBBER, Sanjay; HARJAI, Kusum. A comparative study of clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in terms of quorum sensing, outer membrane proteins and their ability to cause urinary tract infection. **Am J Biomed Sci**, v. 1, n. 3, p. 205-214, 2009.

KUMAR, Arun et al. *Caenorhabditis elegans*: a model to understand host–microbe interactions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 7, p. 1229-1249, 2019.

LAGOA da Pampulha: de bebedouro a reservatório de toxinas. **LEI.A**, 2019. Disponível em: http://blog.leia.org.br/lagoa-da-pampulha-de-bebedouro-a-reservatorio-de-toxinas. Acesso em: 01 de outubro de 2020.

LAVIGNE, J.-P. et al. Membrane permeability, a pivotal function involved in antibiotic resistance and virulence in *Enterobacter aerogenes* clinical isolates. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 6, p. 539-545, 2012.

LEME, Ednilse et al. Billings reservoir water used for human consumption presents microbiological contaminants and induces both behavior impairments and astrogliosis in zebrafish. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 161, p. 364-373, 2018.

LE MOAL, Morgane et al. Eutrophication: a new wine in an old bottle?. **Science of the Total Environment**, v. 651, p. 1-11, 2019.

LIBÂNIO, Paulo Augusto Cunha; CHERNICHARO, Carlos Augusto de Lemos; NASCIMENTO, Nilo de Oliveira. A dimensão da qualidade de água: avaliação da relação entre indicadores sociais, de disponibilidade hídrica, de saneamento e de saúde pública. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 3, p. 219-228, 2005.

LOPES, Frederico Azevedo et al. Recreação de contato secundário em lagos urbanos: o caso da Lagoa da Pampulha. **Revista GEOgrafias**, v. 27, n. 2, p. 42-60, 2019.

LUCENA, André Diego Leite Souto de. **Avaliação da eficiência de biomassas comerciais para tratamento de efluentes sanitários.** 2011. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Engenharia Química) - Centro de Tecnologia e Geociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

MACHADO, Enéas Souza; KNAPIK, Heloise Garcia; BITENCOURT, Camila de Carvalho Almeida de. Considerações sobre o processo de enquadramento de corpos de água. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 24, n. 2, p. 261-269, 2019.

MARKAKI, Maria; TAVERNARAKIS, Nektarios. *Caenorhabditis elegans* as a model system for human diseases. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 63, p. 118-125, 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. **Brasília: Ministério da Saúde**, 213p., 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. Diretriz para atuação em situações de surtos de doenças e agravos de veiculação hídrica. **Brasília: Ministério da Saúde**, 55 p., 2018.

MORAES, Danielle Serra de Lima; JORDÃO, Berenice Quinzani. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista de saúde pública**, v. 36, p. 370-374, 2002.

MOREIRA, Fernanda Deister et al. Análise da continuidade do "Programa de Recuperação e Desenvolvimento da Bacia da Pampulha"(PROPAM). **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e295974198-e295974198, 2020. Disponível em: https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/4198. Acesso em: 1 de Dezembro de 2021.

MURRAY, Patrick R. What is new in clinical microbiology—microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry. **The journal of molecular diagnostics**, v. 14, n. 5, p. 419-423, 2012.

NASCIMENTO, Ermeton Duarte do; MAIA, Claudio Marcio de Medeiros; ARAÚJO, Magnólia Fernandes Florêncio de. Contaminação da água de reservatórios do semiárido potiguar por bactérias de importância médica. **Revista Ambiente e Água**, v. 11, n. 2, p. 414-427, 2016.

O'HARA, Caroline Mohr; BRENNER, Frances W.; MILLER, J. Michael. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 4, p. 534-546, 2000.

O'REILLY, Linda P. et al. *C. elegans* in high-throughput drug discovery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 69, p. 247-253, 2014.

PAES, Cíntia. Vídeo de homem nadando na Lagoa da Pampulha ao som de 'Piscininha Amor' viraliza em BH. **G1**, 18 de janeiro, 2019. Disponível em: https://g1.globo.com/mg/minas-gerais/noticia/2019/01/18/video-de-homem-nadando-na-lagoa-da-pampulha-ao-som-de-piscininha-amor-viraliza-em-bh.ghtml. Acesso em: 11 de Setembro de 2020.

PAIVA, Roberta Fernanda da Paz de Souza; DE SOUZA, Marcela Fernanda da Paz. Associação entre condições socioeconômicas, sanitárias e de atenção básica e a morbidade hospitalar por doenças de veiculação hídrica no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, p. 1-11, 2018.

PARK, Mi Ri et al. Probiotic Lactobacillus fermentum strain JDFM216 stimulates the longevity and immune response of *Caenorhabditis elegans* through a nuclear hormone receptor. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.

PARREIRAS, Mateus. Peixes contaminados da Lagoa da Pampulha são vendidos ilegalmente em Belo Horizonte. **Estado de Minas**, Belo Horizonte, 24 de janeiro de 2016. Disponível em:https://www.em.com.br/app/noticia/gerais/2016/01/24/interna_gerais,727762/peixes-contaminados-da-lagoa-da-pampulha-sao-vendidos-ilegalmente-em-b.shtml. Acesso em: 09 de Setembro de 2020.

PARREIRAS, Mateus. Sujeira ainda desafia lagoa três anos depois de a Pampulha virar patrimônio da humanidade.**Estado de Minas**, Belo Horizonte, 19 de julho de 2019 Disponível em: https://www.em.com.br/app/noticia/gerais/2019/07/19/interna_gerais,1070799/sujeira-ainda-desafia-pampulha-3-anos-depois-de-virar-patrimonio.shtml. Acesso em: 09 de Setembro de 2020.

PESSOA, Rafael Bastos Gonçalves et al. The genus *Aeromonas*: A general approach. **Microbial pathogenesis**, v. 130, p. 81-94, 2019.

PINTO, Hudson Alves; MATI, Vitor Luis Tenorio; MELO, Alan Lane de. The Pampulha reservoir remains a potential urban focus of schistosomiasis mansoni in Brazil: changes in the occurrence patterns of *Biomphalaria* species and a new record of the parasite. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, p. 478-483, 2013.

PINTO-COELHO, Ricardo Motta et al. Atlas da qualidade de água do Reservatório da Pampulha. **Recóleo: Belo Horizonte**, 2012.

PORTA-DE-LA-RIVA, Montserrat et al. Basic *Caenorhabditis elegans* methods: synchronization and observation. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 64, 2012.

PRESGRAVE, Octavio Augusto França et al. Métodos alternativos ao uso de animais: uma visão atual. In: **II Congresso Brasileiro de Bioética e Bem Estar Animal**, 2010.

RIDOLFI, Stéphano Diniz; POSSATO, Luiz Alfredo. Avaliação da qualidade da água da lagoa da Pampulha, Belo Horizonte-MG. In: **XIII Congresso Nacional de Meio Ambiente de Poços de Caldas**, 2016.

RIETZLER, A. C. et al. Accelerated eutrophication and toxicity in tropical reservoir water and sediments: an ecotoxicological approach. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 14, p. 13292-13311, 2018.

RODRIGUES, Gladyson Crosta verde na água da Lagoa da Pampulha. **Estado de Minas**, Belo Horizonte, 10 de outubro de 2019 Disponível em: https://www.em.com.br/app/noticia/gerais/2019/10/10/interna_gerais,1091718/prefeitura-de-bh-vai-investigar-causas-da-poluicao-da-lagoa-da-pampulh.shtml. Acesso em: 15 de Setembro de 2020.

SARRIA, Juan C.; VIDAL, Ana M.; KIMBROUGH III, Robert C. Infections caused by *Kluyvera* species in humans. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 7, p. e69-e74, 2001.

SHAH, Mohammad Monir; ODOYO, Erick; ICHINOSE, Yoshio. Epidemiology and pathogenesis of *Providencia alcalifaciens* infections. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 101, n. 2, p. 290, 2019.

SHIVERS, Robert P. et al. Phosphorylation of the conserved transcription factor ATF-7 by PMK-1 p38 MAPK regulates innate immunity in *Caenorhabditis elegans*. **PLoS genetics**, v. 6, n. 4, p. e1000892, 2010.

SINGHAL, Neelja et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 791, 2015.

STIERNAGLE, Theresa. Maintenance of *C. elegans*. ***C. elegans***, v. 2, p. 51-67, 1999.

SUTHERLAND, Donna L.; RALPH, Peter J. Microalgal bioremediation of emerging contaminants-Opportunities and challenges. **Water Research**, v. 164, p. 114921, 2019.

TRAUNSPURGER, Walter et al. Ecotoxicological assessment of aquatic sediments with *Caenorhabditis elegans* (nematoda) - a method for testing liquid medium and whole-sediment samples. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 16, n. 2, p. 245-250, 1997.

TROEMEL, Emily R. et al. p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in *C. elegans*. **PLoS genetics**, v. 2, n. 11, p. e183, 2006.

VALENTE, José Pedro Serra; PADILHA, Pedro Magalhães; SILVA, Assunta Maria Marques. Oxigênio dissolvido (OD), demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e demanda química de oxigênio (DQO) como parâmetros de poluição no ribeirão Lavapés/Botucatu-SP. **Eclética Química Journal**, v. 22, n. 1, 1997.

VIANA, Juliana de Alencar. Do remo à pesca: o prescrito e o imprevisto na constituição da Lagoa da Pampulha como um espaço de lazer moderno em Belo Horizonte (1942 a 1968). **LICERE - Revista do Programa de Pós-graduação Interdisciplinar em Estudos do Lazer**, v. 16, n. 2, 2013.

VIEGAS, Fernanda. Jovem tido como desaparecido atravessou lagoa da Pampulha a nado. **O Tempo**, 25 de outubro, 2016. Disponível em: https://www.otempo.com.br/cidades/jovem-tido-como-desaparecido-atravessou-lagoa-da-pampulha-a-nado-1.1390462. Acesso em: 14 de Setembro de 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for Drinking-water Quality. Guidelines for
ZHEN, Mei; SAMUEL, Aravinthan DT. *C. elegans* locomotion: small circuits, complex functions. **Current opinion in neurobiology**, v. 33, p. 117-126, 2015.
YELLURKAR, Manoj Limbraj et al. Evaluation of a natural compound extracted from *Dolichandrone atrovirens* as a novel antioxidant agent using *Caenorhabditis elegans*. **Plos one**, v. 16, n. 9, p. e0257702, 2021.

ZINGER, Lucie; GOBET, Angélique; POMMIER, Thomas. Two decades of describing the unseen majority of aquatic microbial diversity. **Molecular ecology**, v. 21, n. 8, p. 1878-1896, 2012.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Dados de sequenciamento das bactérias do gênero *Aeromonas*

Sequências dos genes *recA, gyrB* e *rpoD* dos isolados do gênero *Aeromonas*

Isolado	Gene	Sequência
P1-4	*recA*	>RECA-F TGCKGGGCRATCGAAGCAGTTTGGCAAAGGCTCCATCATGCGTCTGGGCG ACAGCAAGACCATGGATATTGAAGCCATCTCCACCGGCTCTCTCTCTCTG GACGTGGCGCTGGGGATCGGTGGTCTGCCGTGCGGTCGTATCGTCGAGAT CTACGGTCCGGAATCCTCCGGTAAAACTACGCTGACCCTGCAGGTGATCG CCGAAGCCCAGAAGAAGGGCAAGACCTGTGCCTTCGTCGATGCGGAGCAC GCACTGGATCCTATCTATGCCGCCAAGCTGGGCGTCAACGTCGACGACCT GCTCATCTCCCAGCCGGATACCGGTGAACAGGCACTGGAGATTTGCGACA TGCTGGTGCGCTCCAATGCCGTCGACGTCATCATCGTCGACTCCGTGGCT GCCCTGACCCCGAAAGCGGAAATCGAAGGGGAGATGGGTGACTCCCACGT CGGCCTGCAGGCCCGACTGATGTCCCAGGCGCTGCGTAAATTGACCGCCA ACATCAAGAACGCCAACTGCCTGTGCATCTTCATCAACCAGATCCGGATG AAGATTGGCGTCATGTTCGGCAGCCCGGAGACCACCACCGGTGGTAACGC GCTCAAGTAAMC >RECA-R TSAKAACAAACAGAAGGCACTGGCGGCTGCGCTGGGCCAGATCGAAAAGC AGTTTGGCAAAGGCTCCATCATGCGTCTGGGCGACAGCAAGACCATGGAT ATTGAAGCCATCTCCACCGGCTCTCTCTCTCTGGACGTGGCGCTGGGGAT CGGTGGTCTGCCGTGCGGTCGTATCGTCGAGATCTACGGTCCGGAATCCT CCGGTAAAACTACGCTGACCCTGCAGGTGATCGCCGAAGCCCAGAAGAAG GGCAAGACCTGTGCCTTCGTCGATGCGGAGCACGCACTGGATCCTATCTA TGCCGCCAAGCTGGGCGTCAACGTCGACGACCTGCTCATCTCCCAGCCGG ATACCGGTGAACAGGCACTGGAGATTTGCGACATGCTGGTGCGCTCCAAT GCCGTCGACGTCATCATCGTCGACTCCGTGGCTGCCCTGACCCCGAAAGC GGAAATCGAAGGGGAGATGGGTGACTCCCACGTCGGCCTGCAGGCCCGAC TGATGTCCCAGGCGCTGCGTAAATTGACCGCCAACATCAAGAACGCCAAC TGCCTGTGCATCTTCATCAACCAGATCCGGATGAAGATGGCGTCATGTCG GMGCCCCMSRC
	gyrB	>GYRB-F CGGGGGAKGGTGGCMCCACCTGGTGGGCTTCCGTACCGCGTTGACCCGGA CGCTGAACAACTACATGGACAAGGAGGACTACAGCAAGAAGGCCAAGTCC GCCGCCAGTGGTGACGACGTCCGTGAAGGTCTGATTGCCGTTATCTCCGT CAAGGTGCCTGACCCTAAGTTCTCCTCCCAGACCAAGGACAAGCTGGTCT CGTCCGAGGTGAAGACCGCCGTGGAACAGGCGATGGGCGAGAAGCTGGCG GACTTCCTGCTGGAAAACCCGGGCGACGCCAAGATCGTGGTCAACAAGAT CATCGATGCGGCCCGTGCCCGCGAAGCGGCCCGCAAGGCCCGCGAACTGA CCCGCCGCAAGGGCGCGCTGGATATCGCCGGTCTGCCCGGCAAGCTGGCG GACTGTCAGGAGAAAGACCCGGCGCTCTCCGAACTCTACATCGTGGAAGG GGACTCTGCTGGCGGTTCCGCCAAGCAGGGTCGCAACCGGAAGAACCAGG CCATCCTGCCCCTCAAGGGCAAGATCCTGAACGTGGAGAAGGCCCGTTTC GACAAGATGATCTCCTCCCAGGAGGTGGGCACCCTGATCACCGCTCTGGG CTGTGGCATCGGTCGCGACGAGTACAACCCGGACAAGA >GYRB-R

		GKGGTCTACTGCTTCACCAACAACATTCCGCAGCGGGATGGTGGCACCCA CCTGGTGGGCTTCCGTACCGCGTTGACCCGGACGCTGAACAACTACATGG ACAAGGAGGACTACAGCAAGAAGGCCAAGTCCGCCGCCAGTGGTGACGAC GTCCGTGAAGGTCTGATTGCCGTTATCTCCGTCAAGGTGCCTGACCCTAA GTTCTCCTCCCAGACCAAGGACAAGCTGGTCTCGTCCGAGGTGAAGACCG CCGTGGAACAGGCGATGGGCGAGAAGCTGGCGGACTTCCTGCTGGAAAAC CCGGGCGACGCCAAGATCGTGGTCAACAAGATCATCGATGCGGCCCGTGC CCGCGAAGCGGCCCGCAAGGCCCGCGAACTGACCCGCCGCAAGGGCGCGC TGGATATCGCCGGTCTGCCCGGCAAGCTGGCGGACTGTCAGGAGAAAGAC CCGGCGCTCTCCGAACTCTACATCGTGGAAGGGGACTCTGCTGGCGGTTC CGCCAAGCAGGGTCGCAACCGGAAGAACCAGGCCATCCTGCCCCTCAAGG GCAAGATCCTGAACGTGGAGAAGGCCCGTTTCGACAAGATGATCTCCTCC CAGGAGGTGGGCACCCTGATCACCCGCTCYGGGGCYG
	rpoD	>RPOD-F AGRGGGTTCACCAGGTACAAAGCTCCGTCGCCGAGTACCCTGAAGCCATC ACCTATCTGCTCGAACAGTACGACAAGTACGAAGCCGAGCAGCTTCGCCT GTCCGACATCATCTCCGGCTTCATCGATCCGAACGAAGTGGATGACGTGG CACCGACCGCCACTCATATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGACGACCTCGCC GACGAAGACGAAGATGAGGACGAAGACGAAGACGAAGACGGTGACAACTC CGACGATGATGGCGACGGTGGCCCGGATCCGGAAGTCGCTCGCGAGAAAT TCGGCGAACTGCGTGCCCAGTACGAGGTGACTCGTCTCTCCATTCAGCAG AATGGCCGTGCCCACGACGACACCCAGAATGCCATCGCCCAGCTGGCCGA TGTCTTCCGTCAATTCCGCCTGATGCCCAAGCAGTTCGATCGCCTGGTCA ACAACATGCGGGAGATGATGGAGCGTGTCCGCGTGCAGGAACGCATCATC ATGAAGCTCTGCGTTGAGCAGGCCAAGATGCCGAAGAAGACCTTCGTCGC GGCCTTCACCAACAACGAGTGCGAAACTGCCTGGTTCGAATACCAGAAGC AGGCCGGCAAGGCGTGGTCTCCCCGCCTGCTCGAGATGGACGAAGAAGTA CTGCGTTCCATCGGCAAGCTGCAGCAGATCGAAGAAGAGACCGGTCTGTC CATCGCCCAGATCAAGGACATCAACCGYCSMAWKGAGCATKA >RPOD-R TGAAGGCGAAATCGACATCGCCWAGCGGATCGAAGACGGTATCAACCAGG TACAAAGCTCCGTCGCCGAGTACCCTGAAGCCATCACCTATCTGCTCGAA CAGTACGACAAGTACGAAGCCGAGCAGCTTCGCCTGTCCGACATCATCTC CGGCTTCATCGATCCGAACGAAGTGGATGACGTGGCACCGACCGCCACTC ATATCGGCTCCGAGCTCAGCGAGGACGACCTCGCCGACGAAGACGAAGAT GAGGACGAAGACGAAGACGAAGACGGTGACAACTCCGACGATGATGGCGA CGGTGGCCCGGATCCGGAAGTCGCTCGCGAGAAATTCGGCGAACTGCGTG CCCAGTACGAGGTGACTCGTCTCTCCATTCAGCAGAATGGCCGTGCCCAC GACGACACCCAGAATGCCATCGCCCAGCTGGCCGATGTCTTCCGTCAATT CCGCCTGATGCCCAAGCAGTTCGATCGCCTGGTCAACAACATGCGGGAGA TGATGGAGCGTGTCCGCGTGCAGGAACGCATCATCATGAAGCTCTGCGTT GAGCAGGCCAAGATGCCGAAGAAGACCTTCGTCGCGGCCTTCACCAACAA CGAGTGCGAAACTGCCTGGTTCGAATACCAGAAGCAGGCCGGCAAGGCGT GGTCTCCCCGCCTGCTCGAGATGGACGAAGAAGTACTGCGTTCCATCGGC AAGCTGCAGCAGATCGAAGAAGAGACCGTCKCCWCSCCKRCGATTTTCGT TGACG
P2-5	*recA*	>RECA-F GSKSSGGKGGYMRGATSGAAAGCAGTTTGGCAAAGGCTCCATCATGCGTC TGGGCGACAGCAAGACCATGGACATCGAAGCCATCTCCACCGGCTCCCTC TCCCTGGACGTGGCGCTGGGCATCGGTGGCCTGCCGTGCGGTCGTATCGT CGAGATCTATGGCCCGGAATCTTCCGGTAAAACCACGCTGACCCTGCAGG TGATCGCCGAAGCGCAGAAGAAGGGCAAGACCTGTGCCTTCGTCGATGCG GAGCACGCACTCGACCCTATCTATGCCGCCAAGCTGGGCGTCAACGTCGA

	CGACCTGCTGATCTCCCAGCCGGATACCGGTGAACAGGCGCTGGAAATCT GCGACATGTTGGTGCGTTCCAACGCCGTTGACGTCATCATCGTCGACTCG GTGGCGGCACTGACCCCGAAAGCGGAAATAGAAGGCGAGATGGGTGATTC CCACGTCGGCCTGCAGGCCCGTCTGATGTCCCAGGCGCTGCGCAAGCTGA CCGCCAACATCAAGAACGCCAACTGCCTGTGCATCTTCATCAACCAGATC CGGATGAAGATCGGCGTCATGTTCGGCAGCCCGGGAGACCACCACGGGTG GTAACGCGCTCAAGT >RECA-R AGAACMAAACCRAGGCACTGGCGGCTGCGCTGGGTCAGATCGAAAAGCAG TTYGGCAAAGGCTCCATCATGCGTCTGGGCGACAGCAAGACCATGGACAT CGAAGCCATCTCCACCGGCTCCCTCTCCCTGGACGTGGCGCTGGGCATCG GTGGCCTGCCGTGCGGTCGTATCGTCGAGATCTATGGCCCGGAATCTTCC GGTAAAACCACGCTGACCCTGCAGGTGATCGCCGAAGCGCAGAAGAAGGG CAAGACCTGTGCCTTCGTCGATGCGGAGCACGCACTCGACCCTATCTATG CCGCCAAGCTGGGCGTCAACGTCGACGACCTGCTGATCTCCCAGCCGGAT ACCGGTGAACAGGCGCTGGAAATCTGCGACATGTTGGTGCGTTCCAACGC CGTTGACGTCATCATCGTCGACTCGGTGGCGGCACTGACCCCGAAAGCGG AAATAGAAGGCGAGATGGGTGATTCCCACGTCGGCCTGCAGGCCCGTCTG ATGTCCCAGGCGCTGCGCAAGCTGACCGCCAACATCAAGAACGCCAACTG CCTGTGCATCTTCATCAACCAGATCCGGATGAAGATCGGCGTCAKTCGCM GCCCCMRC
gyrB	>GYRB-F TGSGAKGGTGGTMCCACCTGGTGGGCTTCCGTACCGCGCTGACCCGTACT CTGAACTCCTACATGGACAAAGAGGACTACAGCAAGAAGGCCAAGTCTGC CGCCAGTGGCGACGACGTGCGTGAAGGTCTGATTGCCGTTATCTCCGTCA AGGTGCCTGATCCCAAGTTCTCCTCCCAGACCAAGGACAAGCTGGTCTCT TCCGAAGTGAAGACCGCCGTCGAACAGGCGATGGGTGAGAAGCTGGCCGA CTTCCTGCTGGAAAACCCGGGCGATGCCAAGATCGTGGTCAACAAGATCA TCGATGCGGCCCGTGCCCGTGAGGCGGCCCGCAAGGCCCGTGAACTGACC CGCCGCAAGGCGCGCTGGATATCGCCGGTCTGCCCGGCAAGCTGGCTGAC TGTCAGGAAAAGACCCCGCTCTCTCCGAACTCTACATAGTGGAAGGGGAC TCTGCTGGCGGTTCCGCCAAGCAGGGTCGCAACCGGAAAACCAGGCCATC CTGCCGCTCAGGGCAAGATCTGAACGTGGAGAAGCCCGTTTCGACAGATG ATCTCCTCCCRGARGKGGCACCTGATCACGCACTGGGTKSGGCWCGTCKG RCARTCACCCSGAMAAGAAAA >GYRB-R TSGTGGTCTACTGCTTCACCAACAACATTCCGCAGCGCGATGGTGGTACC CACCTGGTGGGCTTCCGTACCGCGCTGACCCGTACTCTGAACTCCTACAT GGACAAAGAGGACTACAGCAAGAAGGCCAAGTCTGCCGCCAGTGGCGACG ACGTGCGTGAAGGTCTGATTGCCGTTATCTCCGTCAAGGTGCCTGATCCC AAGTTCTCCTCCCAGACCAAGGACAAGCTGGTCTCTTCCGAAGTGAAGAC CGCCGTCGAACAGGCGATGGGTGAGAAGCTGGCCGACTTCCTGCTGGAAA ACCCGGGCGATGCCAAGATCGTGGTCAACAAGATCATCGATGCGGCCCGT GCCCGTGAGGCGGCCCGCAAGGCCCGTGAACTGACCCGCCGCAAAGGCGC GCTGGATATCGCCGGTCTGCCCGGCAAGCTGGCTGACTGTCAGGAAAAAG ACCCCGCTCTCTCCGAACTCTACATAGTGGAAGGGGACTCTGCTGGCGGT TCCGCCAAGCAGGGTCGCAACCGGAAGAACCAGGCCATCCTGCCGCTCAA GGGCAAGATCCTGAACGTGGAGAAGGCCCGTTTCGACAAGATGATCTCCT CCCAGGAGGTGGGCACCCTGATCACCGCACTGGYSSC
rpoD	>RPOD-F ACGGARGGTTACMAGGTACAAAGCTCCGTCGCCGAGTACCCGGAAGCGAT TACCTATCTGCTTGAGCAGTACGACAAATACGAAGCGGAACAGCTGCGTC TGTCCGACATCATTTCCGGCTTCATCGATCCCAACGAGACCGACGACGTC

		GCCCCGACCGCCACTCACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAAGAAGATCTGGC TGACGAAGACGAAGACGAAGATGAAGACGAAGACGGTGATGGTGATGACT CCGACGATGATGGTGACGGTGGTCCGGATCCGGAAGTCGCTCGCGAGAAG TTCGGTGATCTGCGCGCCCAGTACGAAGTAACCCGTCTCTCCATTCAGCA GAATGGTCGTGCGCACGAAGATACTCAGGCTGCGATTGCCCAGCTGGCCG ATGTATTCCGTCAATTCCGTCTGATGCCCAAGCAGTTCGATCGCCTGGTC AACAACATGCGCGAGATGATGGAGCGGGTCCGCGTGCAGGAACGCATCAT CATGAAACTCTGCGTTGAGCAGGCCAAGATGCCGAAGAAGACCTTCGTCG CGGCCTTCACCAACAACGAGTGCGAAACTGCCTGGTTCGAGTACCAGAAG CAGGCCGGCAAGGCCTGGTCACCGCGTCTGGTCGAGATGGACGAAGATGT GCTGCGCGCCATCGGCAAGCTGCAGCAGATCGAGGAAGAGACCGGTCTGT CCATCGCCCAGATCAAGGACATCAACCGYCSCATGAGCATYAAA >RPOD-R TSGWTAGGCGAAAATCGACATCGCCAAGCGTATCGAAGACGGTATCAACC AGGTACAAAGCTCCGTCGCCGAGTACCCGGAAGCGATTACCTATCTGCTT GAGCAGTACGACAAATACGAAGCGGAACAGCTGCGTCTGTCCGACATCAT TTCCGGCTTCATCGATCCCAACGAGACCGACGACGTCGCCCCGACCGCCA CTCACATCGGCTCCGAGCTCAGCGAAGAAGATCTGGCTGACGAAGACGAA GACGAAGATGAAGACGAAGACGGTGATGGTGATGACTCCGACGATGATGG TGACGGTGGTCCGGATCCGGAAGTCGCTCGCGAGAAGTTCGGTGATCTGC GCGCCCAGTACGAAGTAACCCGTCTCTCCATTCAGCAGAATGGTCGTGCG CACGAAGATACTCAGGCTGCGATTGCCCAGCTGGCCGATGTATTCCGTCA ATTCCGTCTGATGCCCAAGCAGTTCGATCGCCTGGTCAACAACATGCGCG AGATGATGGAGCGGGTCCGCGTGCAGGAACGCATCATCATGAAACTCTGC GTTGAGCAGGCCAAGATGCCGAAGAAGACCTTCGTCGCGGCCTTCACCAA CAACGAGTGCGAAACTGCCTGGTTCGAGTACCAGAAGCAGGCCGGCAAGG CCTGGTCACCGCGTCTGGTCGAGATGGACGAAGATGTGCTGCGCGCCATC GGCAAGCTGCAGCAGATCGAGGAAGAGACCGTYTKCCMTCSCCMT
P4-4	*recA*	>RECA-F GSYCGKGAYAGATTGAAGCAGTTCGGCAAGGTTCCATCATGCGTCTGGGC GACAGCAAGACCATGGATATCGAAGCCATCTCTACCGGTTCCCTCTCGCT GGACGTGGCGCTGGGCATTGGCGGTCTGCCGTGTGGCCGTATCGTCGAAA TCTACGGCCCGGAATCTTCCGGTAAAACCACCCTCACCCTGCAGGTGATC GCGGAAGCCCAGAAGAAGGGCAAAACCTGTGCCTTCGTCGATGCGGAGCA CGCGCTGGATCCTATCTACGCTGCCAAGCTGGGCGTCAACGTCGACGACC TGCTCATCTCCCAACCGGATACCGGTGAACAGGCGTTGGAGATCTGCGAC ATGCTGGTGCGCTCCAACGCGGTTGACGTCATCATCGTCGACTCCGTGGC GGCCCTGACCCCGAAAGCGGAAATCGAAGGGGAGATGGGGGATTCCCACG TTGGCCTGCAGGCCCGTTTGATGTCCCAGGCACTGCGCAGCTGACTGCCA ACATCAAAACGCCACTGCCTGTGCATCTTCMTCACCAGATCCGRAGAAAA YGGCKTCWKGTTCGSMRCCCTGARAMCMCWMCGGKGGWACSSCYMAAGTT AAAM >RECA-R TSWGAACAAACAGAAGGCACTGGCGGCTGCGCTGGGTCAGATTGAAAAGC AGTTCGGCAAAGGTTCCATCATGCGTCTGGGCGACAGCAAGACCATGGAT ATCGAAGCCATCTCTACCGGTTCCCTCTCGCTGGACGTGGCGCTGGGCAT TGGCGGTCTGCCGTGTGGCCGTATCGTCGAAATCTACGGCCCGGAATCTT CCGGTAAAACCACCCTCACCCTGCAGGTGATCGCGGAAGCCCAGAAGAAG GGCAAAACCTGTGCCTTCGTCGATGCGGAGCACGCGCTGGATCCTATCTA CGCTGCCAAGCTGGGCGTCAACGTCGACGACCTGCTCATCTCCCAACCGG ATACCGGTGAACAGGCGTTGGAGATCTGCGACATGCTGGTGCGCTCCAAC GCGGTTGACGTCATCATCGTCGACTCCGTGGCGGCCCTGACCCCGAAAGC GGAAATCGAAGGGGAGATGGGGGATTCCCACGTTGGCCTGCAGGCCCGTT TGATGTCCCAGGCACTGCGCAAGCTGACTGCCAACATCAAAAACGCCAAC

	TGCCTGTGCATCTTCATCAACCAGATCCGGATGAAGATCGGCGTCAKTCG CMGCCCWG
gyrB	>GYRB-F ASGGGGGAWGGTGGTACTCACCTCGTTGGCTTCCGTACCGCGCTGACCCG TACTCTGAACTCCTATATGGACAAAGAGGACTACAGCAAGAAGGCCAAGT CTGCCGCCAGTGGTGACGACGTGCGTGAAGGTCTGATTGCCGTTATCTCC GTCAAGGTGCCGGATCCCAAGTTCTCCTCCCAGACCAAAGACAAGCTGGT CTCTTCCGAAGTGAAGACCGCCGTTGAACAGGCGATGGGTGAGAAGCTGG CCGACTTCCTGCTGGAAAACCCGGGCGATGCCAAGATCGTGGTCAACAAG ATCATCGATGCGGCCCGTGCCCGTGAAGCGGCCCGCAAAGCCCGCGAACT GACCCGCCGCAAAGGCGCGCTGGATATCGCCGGTCTGCCCGGCAAGCTGG CTGACTGTCAGGAAAAAGACCCGGCTCTCTCCGAACTCTACATAGTGGAA GGGGACTCTGCTGGCGGTTCCGCCAAGCAGGGTCGCAACCGGAAGAACCA GGCCATCCTGCCGCTCAAGGGTAAAATCCTGAACGTGGAGAAGGCCCGTT TCGACAAGATGATCTCCTCGCAAGAGGTGGGCACCCTGATCACCGCACTG GGTTGCGGTATCGGTCGCGACGAGTACAACCCGGACAAGAA >GYRB-R TGGKGGTCTACTGCTTCACCAACAACATCCCGCAGCGGGATGGTGGTACT CACCTCGTTGGCTTCCGTACCGCGCTGACCCGTACTCTGAACTCCTATAT GGACAAAGAGGACTACAGCAAGAAGGCCAAGTCTGCCGCCAGTGGTGACG ACGTGCGTGAAGGTCTGATTGCCGTTATCTCCGTCAAGGTGCCGGATCCC AAGTTCTCCTCCCAGACCAAAGACAAGCTGGTCTCTTCCGAAGTGAAGAC CGCCGTTGAACAGGCGATGGGTGAGAAGCTGGCCGACTTCCTGCTGGAAA ACCCGGGCGATGCCAAGATCGTGGTCAACAAGATCATCGATGCGGCCCGT GCCCGTGAAGCGGCCCGCAAAGCCCGCGAACTGACCCGCCGCAAAGGCGC GCTGGATATCGCCGGTCTGCCCGGCAAGCTGGCTGACTGTCAGGAAAAAG ACCCGGCTCTCTCCGAACTCTACATAGTGGAAGGGGACTCTGCTGGCGGT TCCGCCAAGCAGGGTCGCAACCGGAAGAACCAGGCCATCCTGCCGCTCAA GGGTAAAATCCTGAACGTGGAGAAGGCCCGTTTCGACAAGATGATCTCCT CGCAAGAGGTGGGCACCCTGATCACCGCACCTGTTC
rpoD	>RPOD-F GGGGTTYAACCAAGTACAAAGCTCCGTAGCCGAGTACCCTGAAGCAATTA CTTACCTGCTCGAACAGTACGACAAGTACGAAGCCGAACAGCTGCGTCTC TCTGACATCATCTCTGGCTTTATTGACCCGAACGAAACCGAAGACATGGC GCCTACCGCCACGCATATCGGTTCCGAGCTCGGCGAAGACGATCTGGCCG ACGAAGATGAAGAGGACGAAGAAGACGAAGACGAAGATGGCGACAGCTCT GACGACGACGGTGACGGTGGTCCGGACCCGGAAGTCGCTCGCGAGAAGTT CGGCGAACTGCGTGCCCAGTATGAAGTGACCCGCCTCTCCATTCAGAAGA ATGGTCGCGCGCACGAAGATACCCAGGCCGCCATCGCCCAGCTGGCCGAT GTATTCCGTCAATTCCGCCTGATGCCCAAGCAGTTCGATCGCCTGGTCAA TAACATGCGTGAAATGATGGAGCGCGTTCGCGTGCAGGAACGCATCATCA TGAAGCTCTGCGTTGAGCAGGCCAAGATGCCGAAGAAAACCTTCGTCGCG GCCTTCACCAACAACGAGTGTGAAACGGCCTGGTTCGAATACCAGAAGCA GGCAGGCAAAGCCTGGTCTCCCCGTCTGGTTGAAATGGACGAGGATATTC AGCGCGCCATCGGCAAGCTGCAGCAGATTGAAGAAGAGACCGGTCTGTCG ATTGCCCAGATCAAGGATATCAACCGYCSCMATGAGCATACTCAGA >RPOD-R TSGAWKGCGAAATCGACATCGCCAAGCGGATCGAAGACGGTATCAACCAA GTACAAAGCTCCGTAGCCGAGTACCCTGAAGCAATTACTTACCTGCTCGA ACAGTACGACAAGTACGAAGCCGAACAGCTGCGTCTCTCTGACATCATCT CTGGCTTTATTGACCCGAACGAAACCGAAGACATGGCGCCTACCGCCACG CATATCGGTTCCGAGCTCGGCGAAGACGATCTGGCCGACGAAGATGAAGA GGACGAAGAAGACGAAGACGAAGATGGCGACAGCTCTGACGACGACGGTG

ACGGTGGTCCGGACCCGGAAGTCGCTCGCGAGAAGTTCGGCGAACTGCGT
GCCCAGTATGAAGTGACCCGCCTCTCCATTCAGAAGAATGGTCGCGCGCA
CGAAGATACCCAGGCCGCCATCGCCCAGCTGGCCGATGTATTCCGTCAAT
TCCGCCTGATGCCCAAGCAGTTCGATCGCCTGGTCAATAACATGCGTGAA
ATGATGGAGCGCGTTCGCGTGCAGGAACGCATCATCATGAAGCTCTGCGT
TGAGCAGGCCAAGATGCCGAAGAAAACCTTCGTCGCGGCCTTCACCAACA
ACGAGTGTGAAACGGCCTGGTTCGAATACCAGAAGCAGGCAGGCAAAGCC
TGGTCTCCCCGTCTGGTTGAAATGGACGAGGATATTCAGCGCGCCATCGG
CAAGCTGCAGCAGATTGAAGAAGAGACCGGTCKKCRTCCCCG

P1-4: isolado 4 do P1; P2-5: isolado 5 do P2; P4-4: isolado 4 do P4.

Alinhamento das sequências com o banco de dados do NCBI

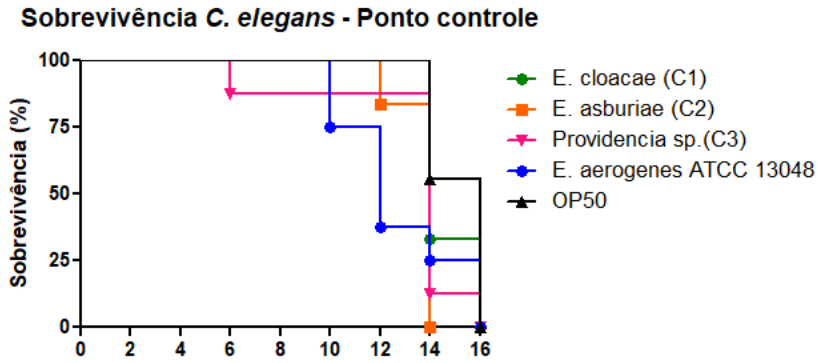
Isolado	**Gene**	**Identificação**	**Query coverage**	**E-value**	**Percent identity**
P1-4	*recA*	*Aeromonas caviae*	97% (F) 97% (R)	0.0 (F) 0.0 (R)	98.82% (F) 98.83% (R)
P1-4	*gyrB*	*Aeromonas caviae*	97% (F) 99% (R)	0.0 (F) 0.0 (R)	98.39% (F) 97.78% (R)
P1-4	*rpoD*	*Aeromonas caviae*	97% (F) 96% (R)	0.0 (F) 0.0 (R)	97.93% (F) 98.35% (R)
P2-5	*recA*	*Aeromonas hydrophila*	97% (F) 97% (R)	0.0 (F) 0.0 (R)	97.82% (F) 96.97% (R)
P2-5	*gyrB*	*Aeromonas hydrophila*	94% (F) 98% (R)	0.0 (F) 0.0 (R)	95.48% (F) 98.41% (R)
P2-5	*rpoD*	*Aeromonas hydrophila*	98% (F) 97% (R)	0.0 (F) 0.0 (R)	98.36% (F) 98.48% (R)
P4-4	*recA*	*Aeromonas veronii*	88% (F) 97% (R)	0.0 (F) 0.0 (R)	95.01% (F) 96.63% (R)
P4-4	*gyrB*	*Aeromonas veronii*	99% (F) 98% (R)	0.0 (F) 0.0 (R)	98.43% (F) 98.56% (R)
P4-4	*rpoD*	*Aeromonas veronii*	98% (F) 97% (R)	0.0 (F) 0.0 (R)	97.54% (F) 98.07% (R)

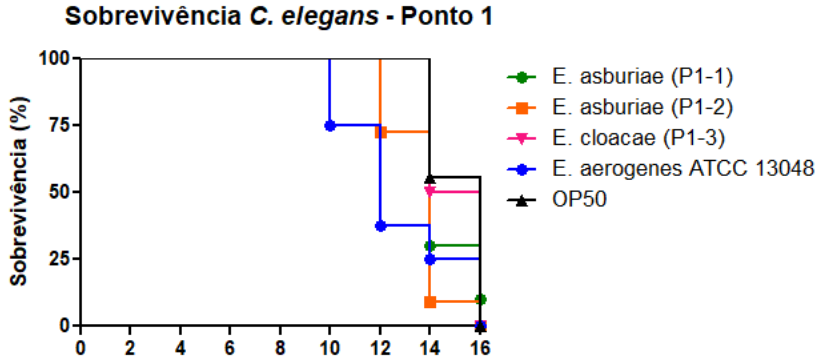
F: sequência forward; R: sequência reverse

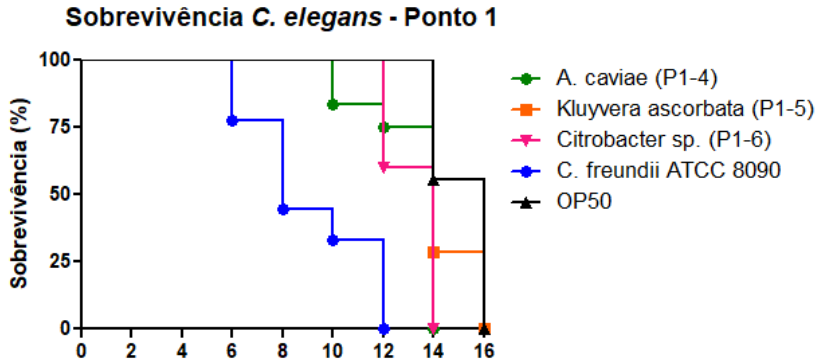
APÊNDICE B - Curvas de sobrevivência do *C. elegans*

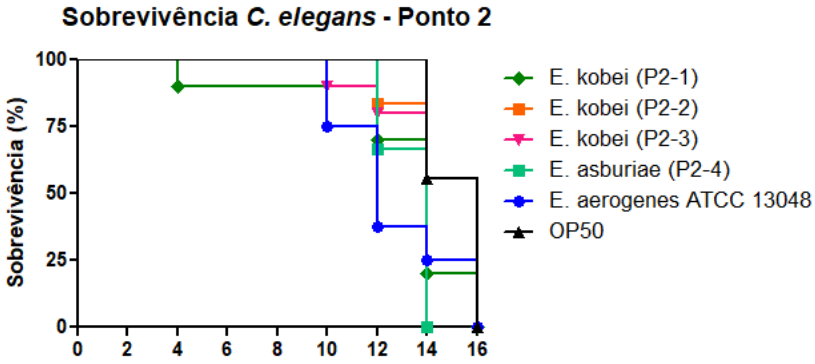
N2

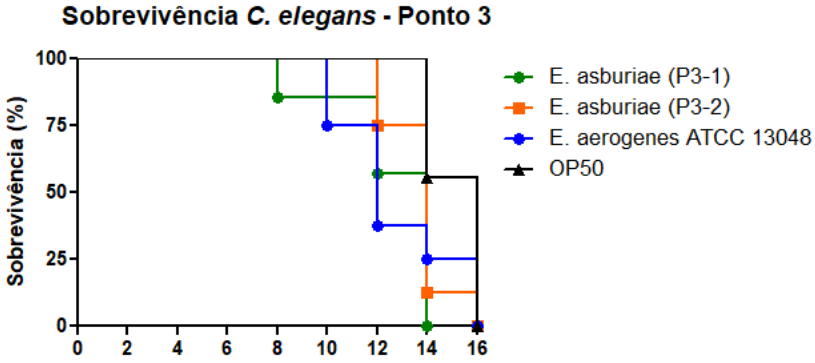
Ensaio 1

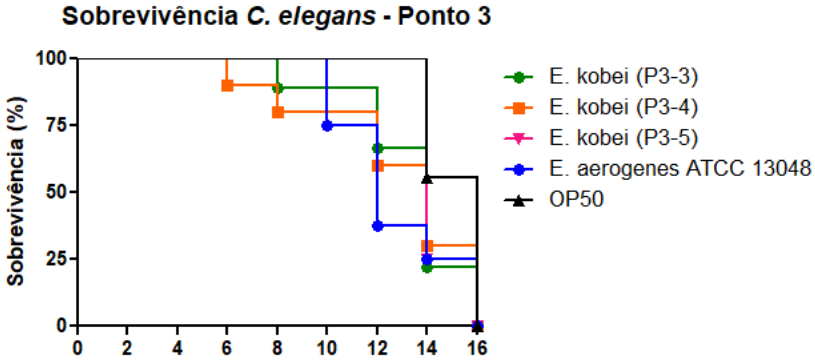


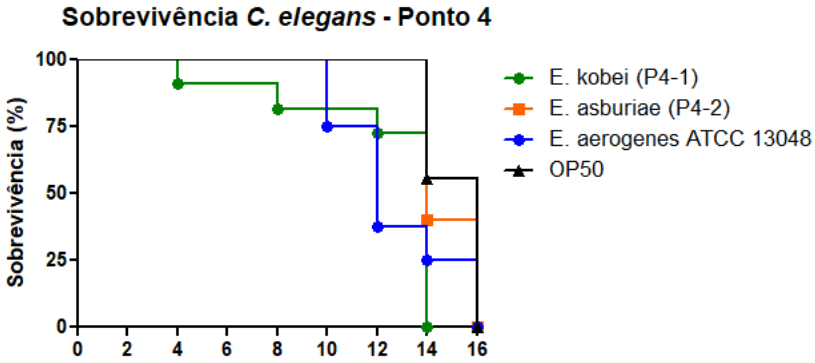


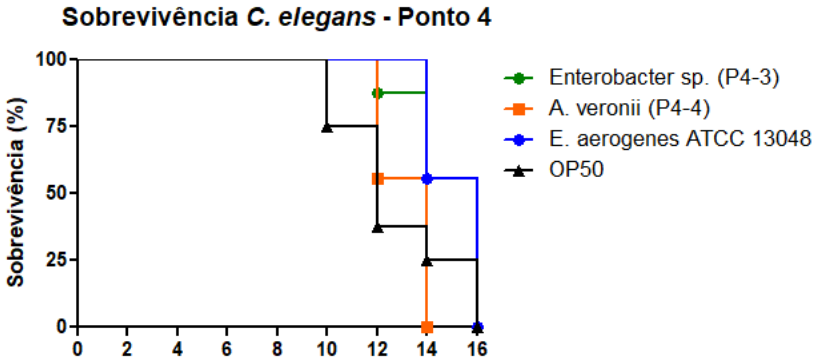



Sobrevivência C. elegans - Ponto 2
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16
E. kobei (P2-1)
E. kobei (P2-2)
E. kobei (P2-3)
E. asburiae (P2-4)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50

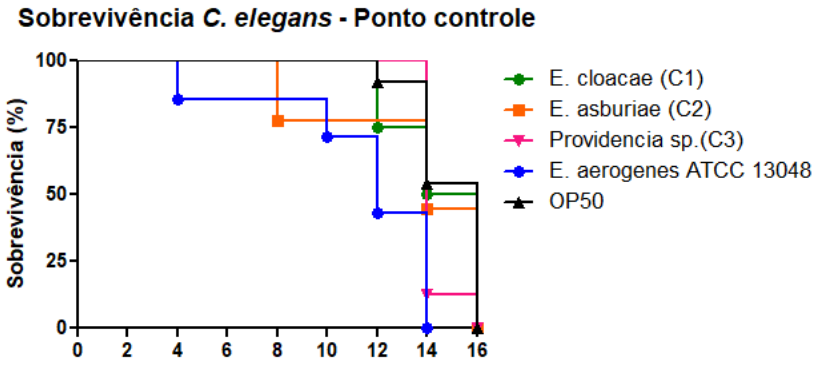

Sobrevivência C. elegans - Ponto 3
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16
E. asburiae (P3-1)
E. asburiae (P3-2)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50

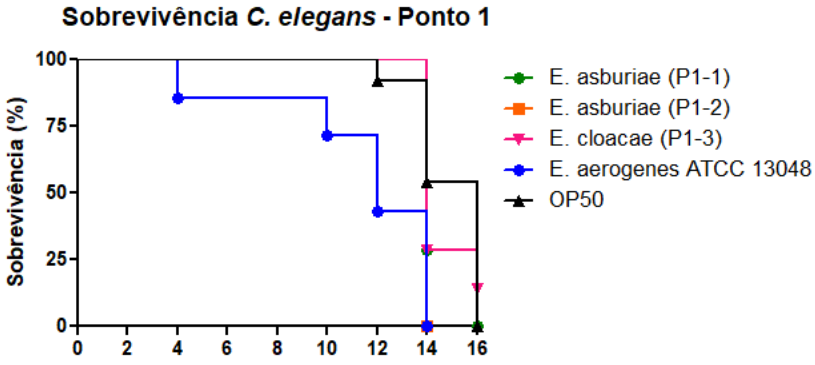

Sobrevivência C. elegans - Ponto 3
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16
E. kobei (P3-3)
E. kobei (P3-4)
E. kobei (P3-5)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50

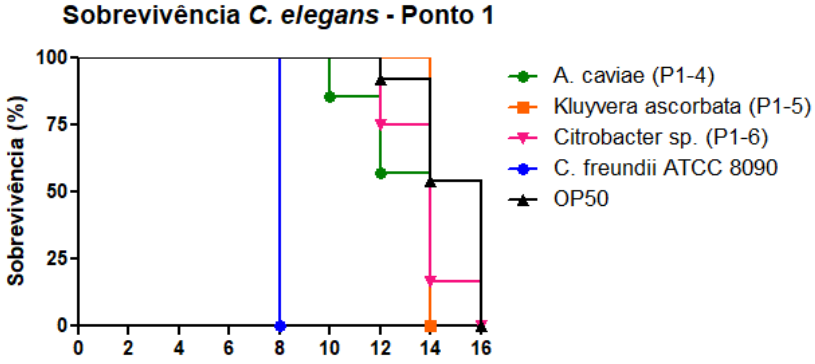

Sobrevivência C. elegans - Ponto 4
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16
E. kobei (P4-1)
E. asburiae (P4-2)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50

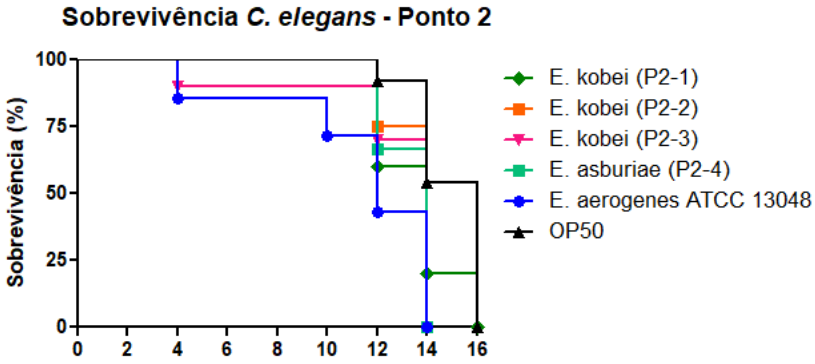

Sobrevivência C. elegans - Ponto 4
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16
Enterobacter sp. (P4-3)
A. veronii (P4-4)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50

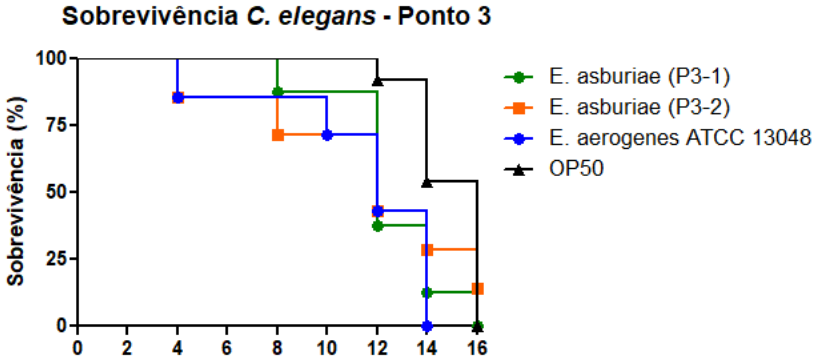
Ensaio 2

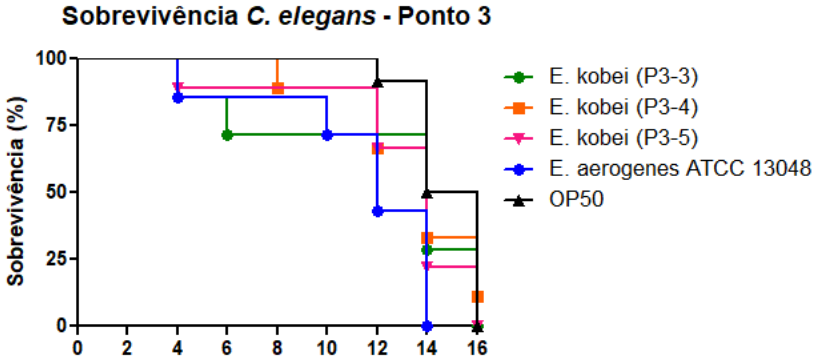

Sobrevivência C. elegans - Ponto controle
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16
E. cloacae (C1)
E. asburiae (C2)
Providencia sp.(C3)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50

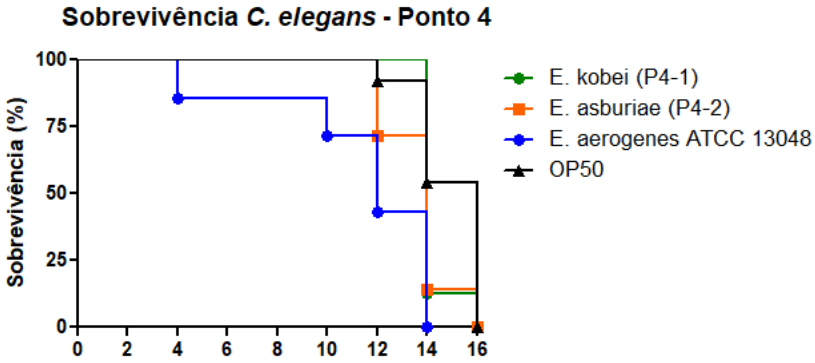

Sobrevivência C. elegans - Ponto 1
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16
E. asburiae (P1-1)
E. asburiae (P1-2)
E. cloacae (P1-3)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50

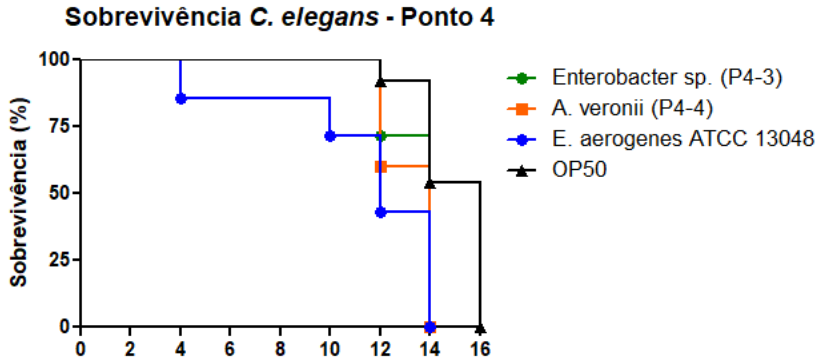

Sobrevivência C. elegans - Ponto 1
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16
A. caviae (P1-4)
Kluyvera ascorbata (P1-5)
Citrobacter sp. (P1-6)
C. freundii ATCC 8090
OP50


Sobrevivência C. elegans - Ponto 2
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16
E. kobei (P2-1)
E. kobei (P2-2)
E. kobei (P2-3)
E. asburiae (P2-4)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50


Sobrevivência C. elegans - Ponto 3
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16
E. asburiae (P3-1)
E. asburiae (P3-2)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50

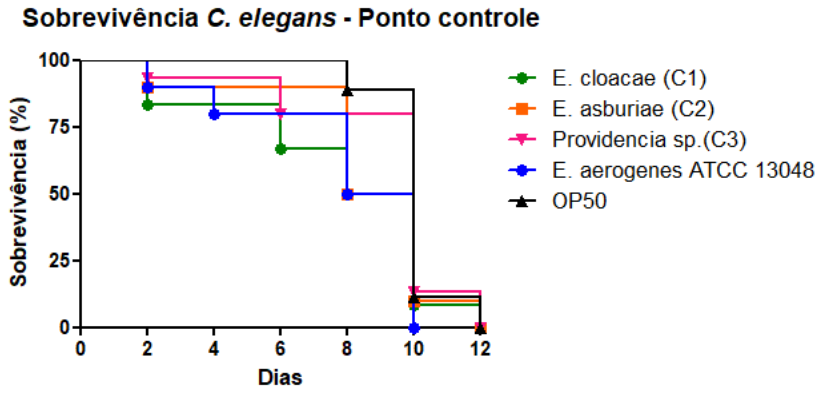

Sobrevivência C. elegans - Ponto 3
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16
E. kobei (P3-3)
E. kobei (P3-4)
E. kobei (P3-5)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50

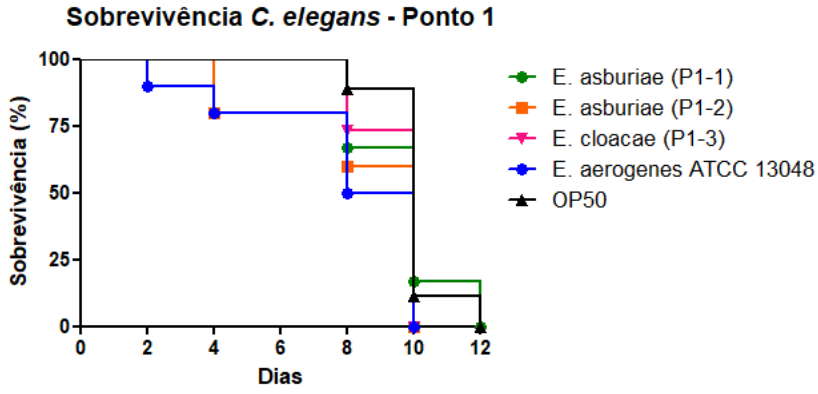

Sobrevivência C. elegans - Ponto 4
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16
E. kobei (P4-1)
E. asburiae (P4-2)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50

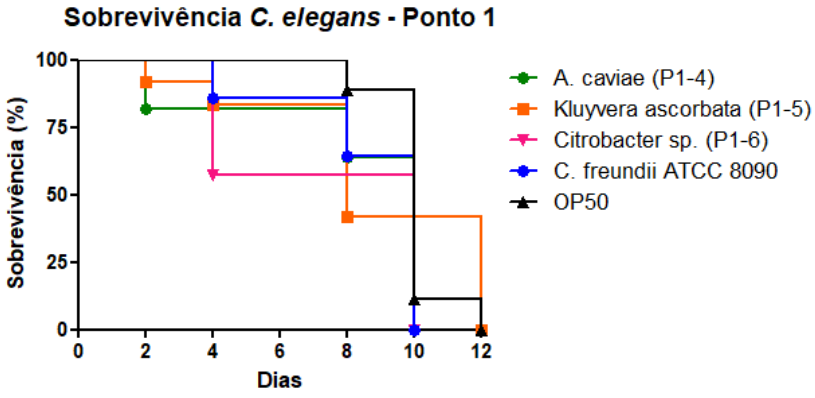


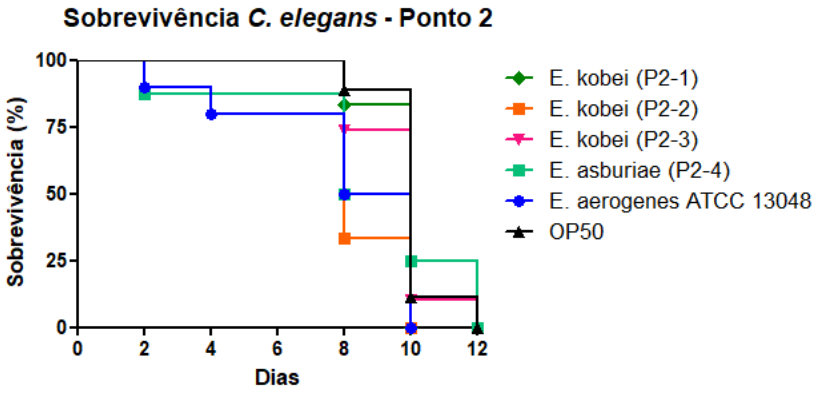
KU25

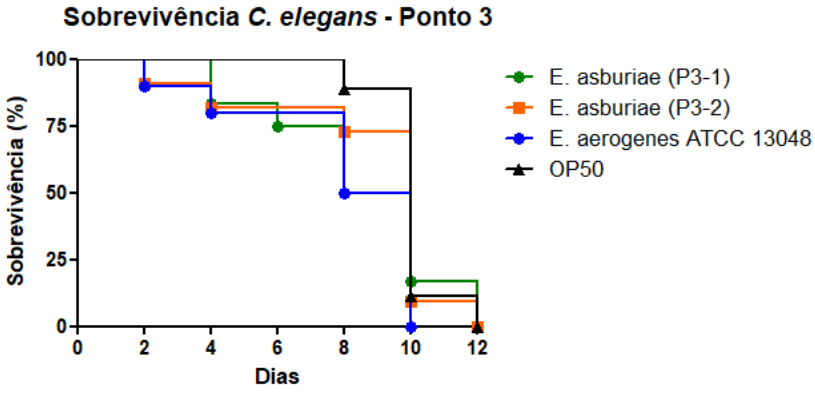
Ensaio 1

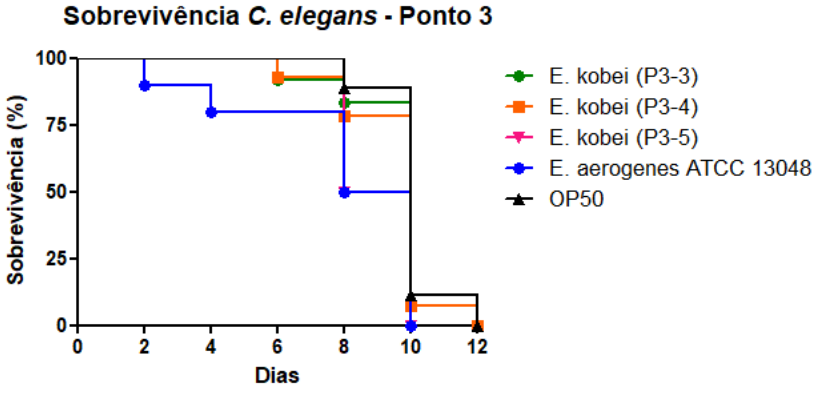


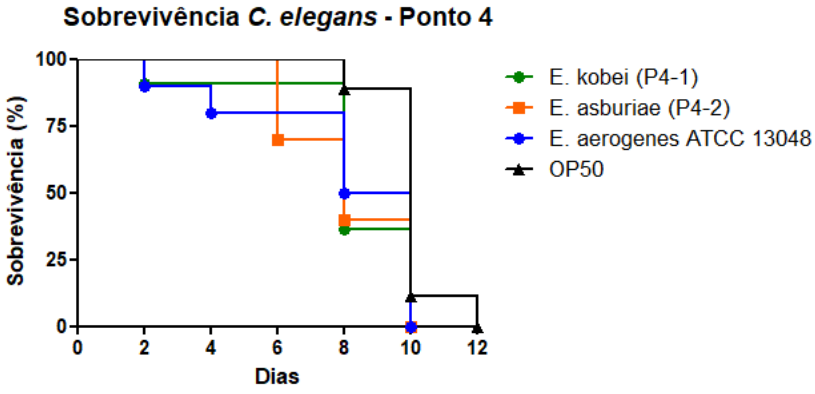


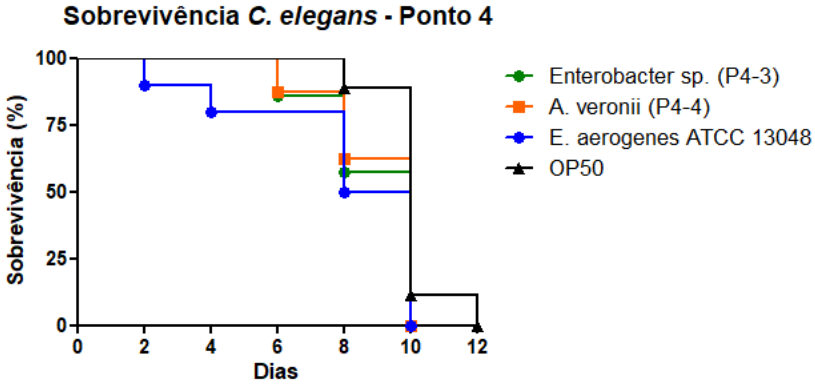

Sobrevivência C. elegans - Ponto 1
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0
2
4
6
8
10
12
Dias
A. caviae (P1-4)
Kluyvera ascorbata (P1-5)
Citrobacter sp. (P1-6)
C. freundii ATCC 8090
OP50


Sobrevivência C. elegans - Ponto 2
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0
2
4
6
8
10
12
Dias
E. kobei (P2-1)
E. kobei (P2-2)
E. kobei (P2-3)
E. asburiae (P2-4)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50

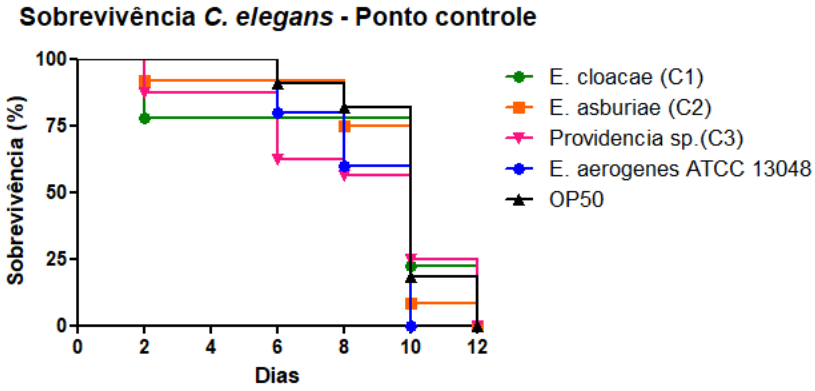

Sobrevivência C. elegans - Ponto 3
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0
2
4
6
8
10
12
Dias
E. asburiae (P3-1)
E. asburiae (P3-2)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50

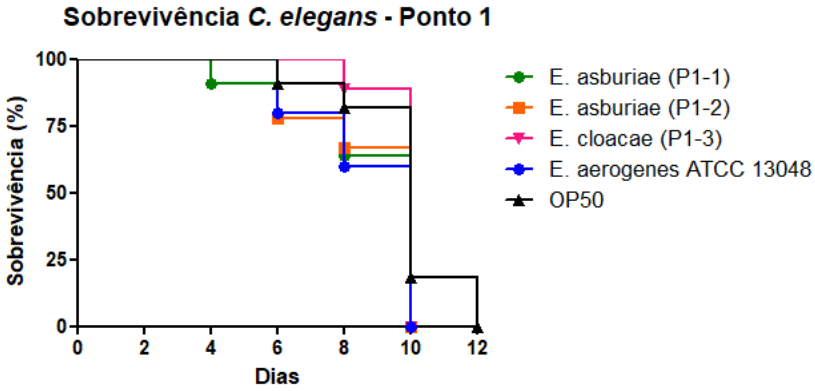

Sobrevivência C. elegans - Ponto 3
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0
2
4
6
8
10
12
Dias
E. kobei (P3-3)
E. kobei (P3-4)
E. kobei (P3-5)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50

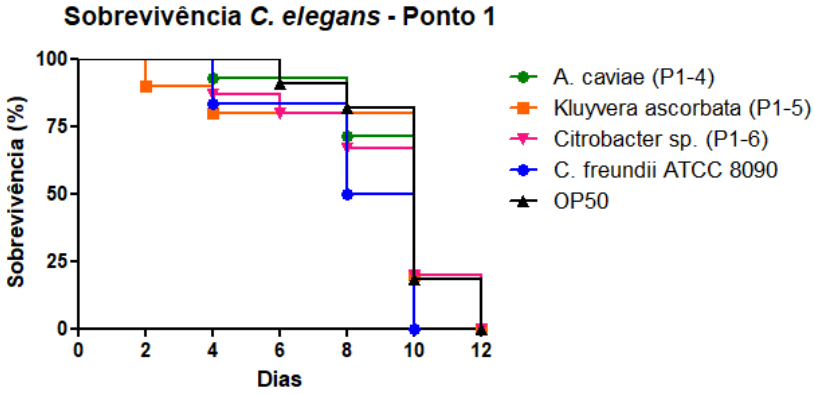

Sobrevivência C. elegans - Ponto 4
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0
2
4
6
8
10
12
Dias
E. kobei (P4-1)
E. asburiae (P4-2)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50

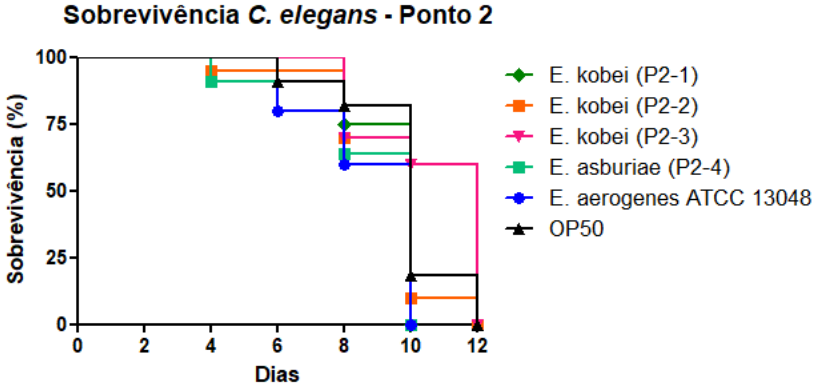

Sobrevivência C. elegans - Ponto 4
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0
2
4
6
8
10
12
Dias
Enterobacter sp. (P4-3)
A. veronii (P4-4)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50

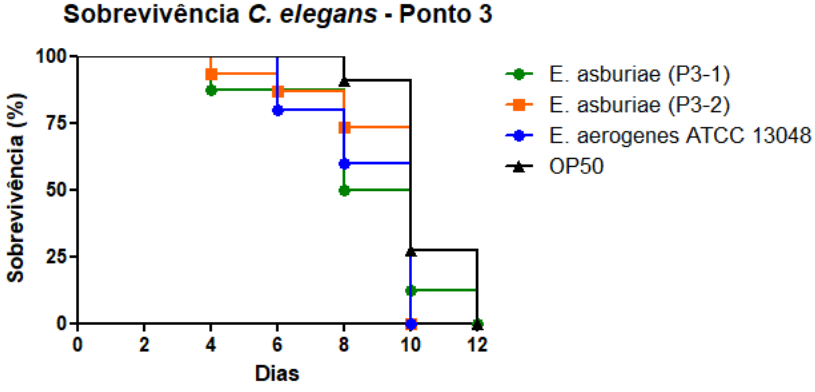
Ensaio 2

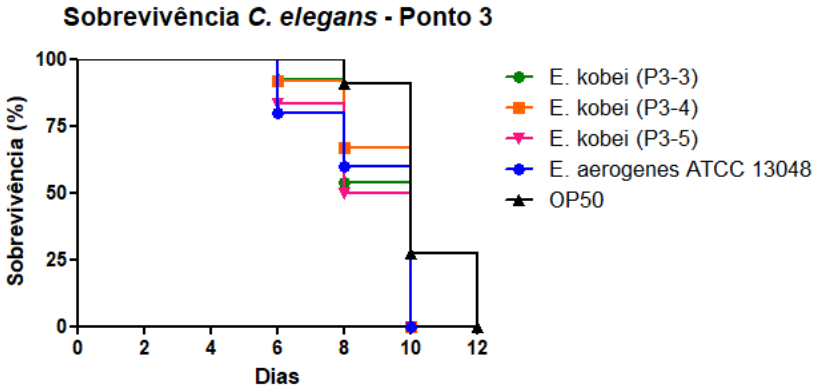

Sobrevivência C. elegans - Ponto controle
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0
2
4
6
8
10
12
Dias
E. cloacae (C1)
E. asburiae (C2)
Providencia sp.(C3)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50

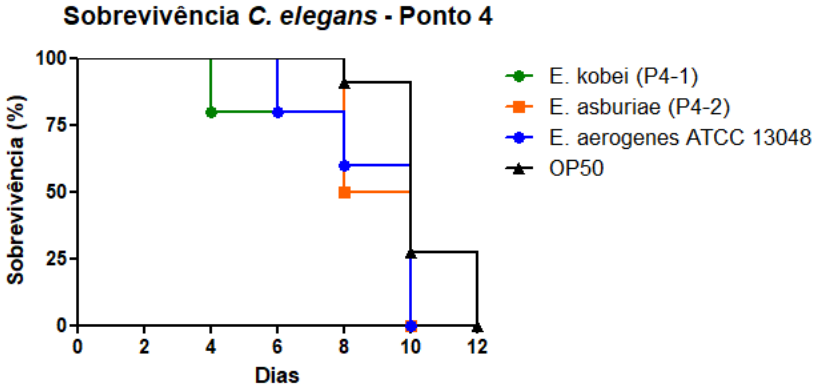

Sobrevivência C. elegans - Ponto 1
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0
2
4
6
8
10
12
Dias
E. asburiae (P1-1)
E. asburiae (P1-2)
E. cloacae (P1-3)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50

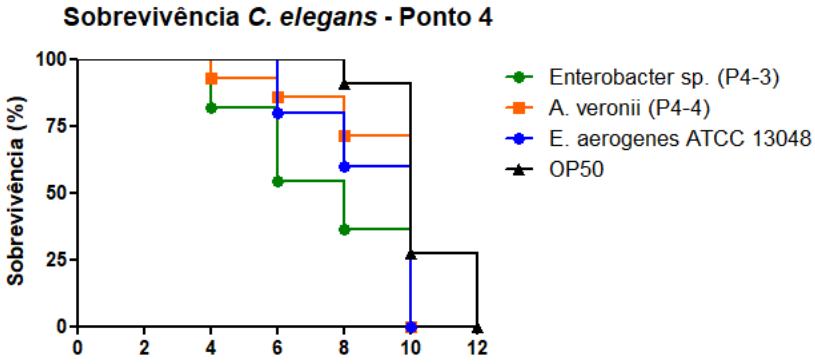

Sobrevivência C. elegans - Ponto 1
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0
2
4
6
8
10
12
Dias
A. caviae (P1-4)
Kluyvera ascorbata (P1-5)
Citrobacter sp. (P1-6)
C. freundii ATCC 8090
OP50


Sobrevivência C. elegans - Ponto 2
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0
2
4
6
8
10
12
Dias
E. kobei (P2-1)
E. kobei (P2-2)
E. kobei (P2-3)
E. asburiae (P2-4)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50

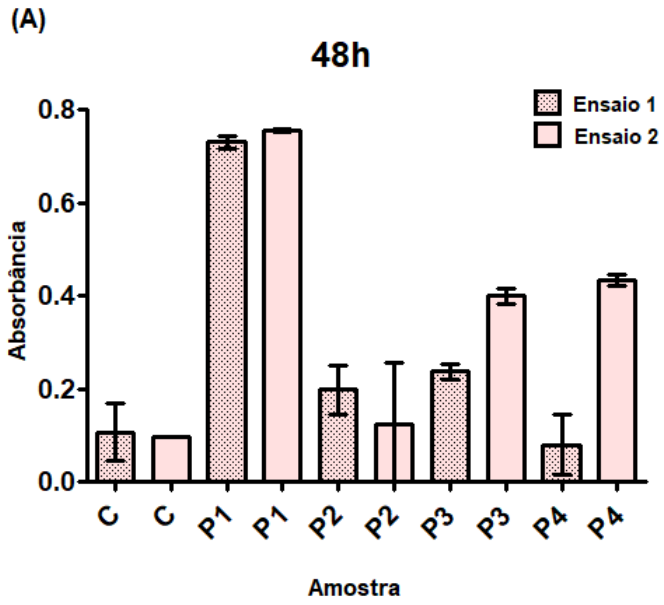

Sobrevivência C. elegans - Ponto 3
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0
2
4
6
8
10
12
Dias
E. asburiae (P3-1)
E. asburiae (P3-2)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50

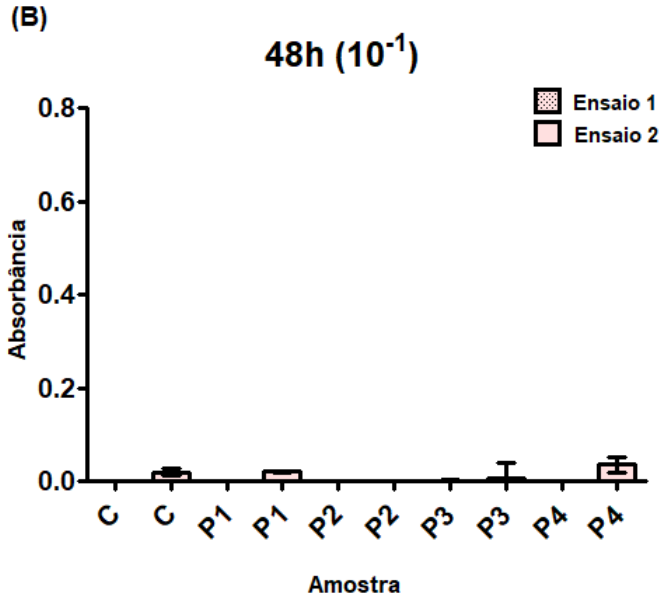

Sobrevivência C. elegans - Ponto 3
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0
2
4
6
8
10
12
Dias
E. kobei (P3-3)
E. kobei (P3-4)
E. kobei (P3-5)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50


Sobrevivência C. elegans - Ponto 4
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0
2
4
6
8
10
12
Dias
E. kobei (P4-1)
E. asburiae (P4-2)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50

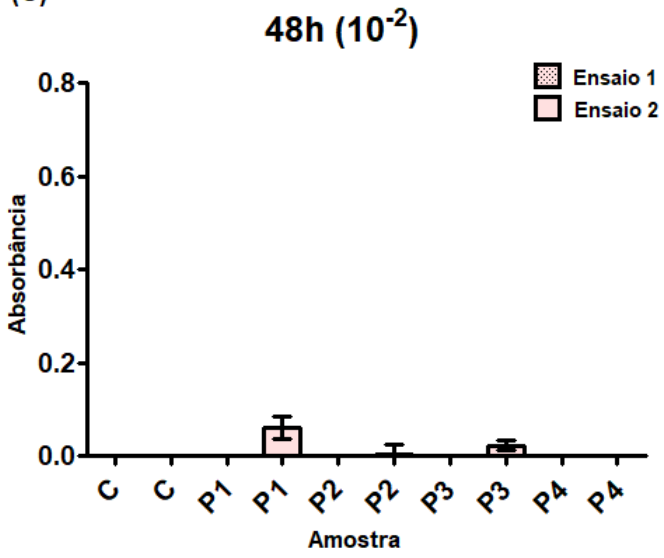

Sobrevivência C. elegans - Ponto 4
Sobrevivência (%)
100
75
50
25
0
0
2
4
6
8
10
12
Enterobacter sp. (P4-3)
A. veronii (P4-4)
E. aerogenes ATCC 13048
OP50

APÊNDICE C - Ensaio de redução do MTT de 48h e 72h de exposição com amostras brutas e diluídas 10 e 100 vezes

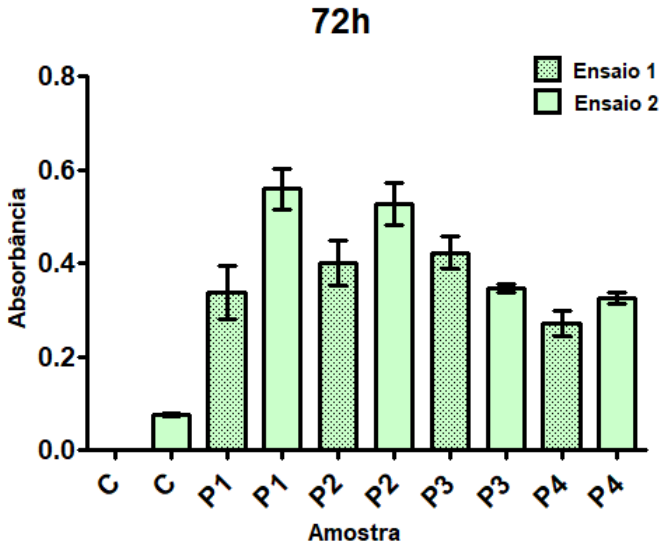




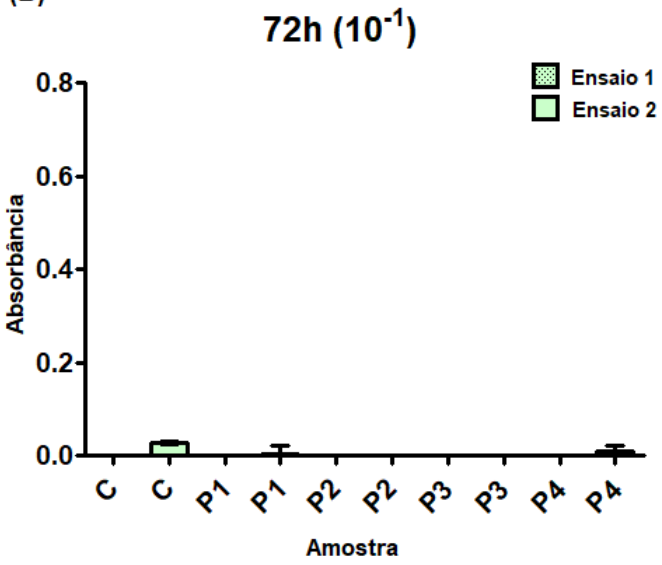
(C)


48h (10-2)
Ensaio 1
Ensaio 2
Absorbância
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
C
C
P1
P1
P2
P2
P3
P3
P4
P4
Amostra

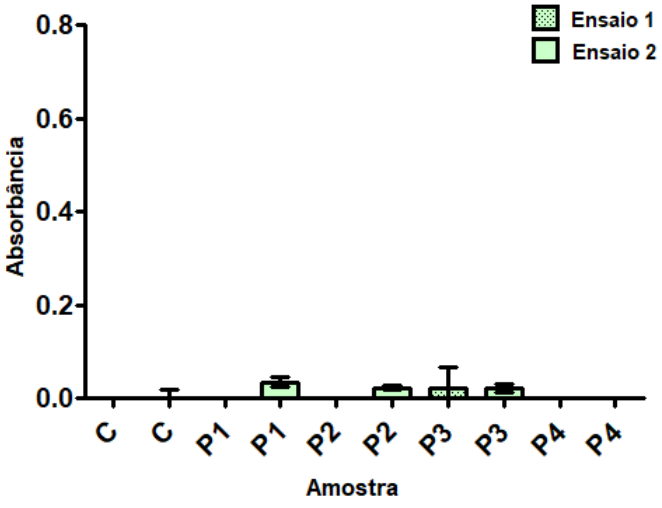
(A)


72h
Ensaio 1
Ensaio 2
Absorbância
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
C
C
P1
P1
P2
P2
P3
P3
P4
P4
Amostra

(B)


72h (10-1)
Ensaio 1
Ensaio 2
Absorbância
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
C C P1 P1 P2 P2 P3 P3 P4 P4
Amostra

(C)


72h (10-2)
Ensaio 1
Ensaio 2
Absorbância
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
C C P1 P1 P2 P2 P3 P3 P4 P4
Amostra