



COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

**RASTREAMENTO DE FONTES DE CONTAMINAÇÃO FECAL HUMANA E ANIMAL EM
AMOSTRAS AMBIENTAIS EMPREGANDO MÉTODOS FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS**

**PROJETO 2012 – CORHI- 131
CONTRATO CORHI/FEHIDRO: 162/2013**

RELATÓRIO FINAL

SÃO PAULO, MAIO DE 2019





COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

CETESB – Companhia Ambiental do Estado do São Paulo

Diretora-Presidente	Patrícia Faga Iglecias Lemos
Diretor de Gestão Corporativa	Clayton Paganotto
Diretor de Engenharia e Qualidade Ambiental	Carlos Roberto dos Santos
Diretora de Controle de Poluição Ambiental	Gláucio Attorre Penna
Diretora de Avaliação de Impacto Ambiental	Domenico Tremaroli



COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

FICHA TÉCNICA

Diretoria de Engenharia e Qualidade Ambiental
Engº Carlos Roberto dos Santos
Diretor

Coordenação geral

Biom. Maria Inês Zanoli Sato
Gerente do Departamento de Análises Ambientais

Coordenação técnica

Elayse Maria Hachich
Gerente da Divisão de Microbiologia e Parasitologia
Mikaela Renata Funada Barbosa
Gerente da Divisão de Microbiologia e Parasitologia

Equipe Técnica

Divisão de Microbiologia e Parasitologia

Biól. Ana Paula Guarnieri Christ
Biól. Marisa Di Bari
Biom. Maria Cristina L. S. Coelho
Farm. Bioq. Solange Rodrigues Ramos

Coletas e Ensaios de Campo

Divisão de Coleta e Amostragem
Divisão de Laboratório de Campinas
Divisão de Laboratório de Marília
Divisão de Laboratório de Sorocaba
Divisão de Laboratório de Ribeirão Preto
Divisão de Laboratório de Cubatão
Divisão de Laboratório de Taubaté



COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	4
3.	MATERIAL E MÉTODOS (ATIVIDADES DESENVOLVIDAS).....	5
3.1.	AMOSTRAGEM	5
3.2.	FILTRAÇÃO DAS AMOSTRAS, ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS DE ORIGEM FECAL, e CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE LINHAGENS MICROBIANAS.....	11
3.3.	IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA PELA TÉCNICA DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO TIPO MALDI- TOF (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>).....	12
3.4.	SEQUENCIAMENTO PARCIAL DOS GENE DO rDNA RIBOSSOMAL SUBUNIDADE 16S.....	15
3.5.	ENSAIOS EM CAMPO	18
3.6.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	18
4.	EQUIPAMENTOS E MATERIAIS ADQUIRIDOS NO PROJETO	20
5.	SERVIÇOS CONTRATADOS NO PROJETO.....	21
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
6.1.	IDENTIFICAÇÃO POR SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE DO rDNA RIBOSSOMAL SUBUNIDADE 16S	22
6.2.	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DOCE	22
6.3.	ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DOS INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO FECAL ENCONTRADOS NOS PONTOS DE ÁGUA DOCE DAS UGRHIS PESQUISADAS.....	25
6.3.1.	UGRHIS 5, 6 e 7 - VOCAÇÃO INDUSTRIAL.....	25
6.3.2.	UGRHIS 15,19, 20, 21 e 22 - VOCAÇÃO AGROPECUÁRIA	44
6.3.3.	UGRHIS 9 e 14 – VOCAÇÕES EM INDUSTRIALIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO	55
6.3.4.	CONCLUSÕES	62
6.4.	ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DOS DADOS DOS INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO FECAL NOS PONTOS DE BALNEABILIDADE SELECIONADOS NA BAIXADA SANTISTA (UGRHI 7)	63
6.4.1.	CONCLUSÕES	70
7.	INFERÊNCIAS ESTATÍSTICAS	71
8.	CONCLUSÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES.....	80
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
	ANEXOS	86



1. INTRODUÇÃO

Uma parcela significativa dos recursos hídricos superficiais do Estado de São Paulo não atinge a qualidade microbiológica requerida pelas regulamentações vigentes, estando em desacordo entre as classificações alcançadas em relação à qualidade das águas e seus múltiplos usos. No contexto do gerenciamento dos recursos hídricos, a proteção e recuperação dos corpos de água do Estado tratam-se de um dos principais desafios da atualidade a ser superado. A universalização da coleta e tratamento de esgotos é a ação efetiva a ser realizada visando à proteção e recuperação dos recursos hídricos do Estado. Segundo dados de 2017, o Estado de São Paulo coleta 88% do esgoto gerado no Estado e trata 64% (CETESB, 2018), com uma Carga Remanescente t DBO dia⁻¹ de 1.068.749,20, indicando que o volume de esgoto bruto lançado diretamente na natureza ainda é elevado.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA define as classes da qualidade de águas doces, salinas e salobra por meio da Resolução CONAMA 357/2005 (Brasil, 2005). Para cada classe de qualidade, são associados usos preponderantes e futuros, fixando-se ou adotando-se padrões de qualidade balizados por parâmetros físicos, químicos, microbiológicos e biológicos fixados em legislação. Em complemento à CONAMA 357/05, foi editada a Resolução CONAMA 430/2011 (Brasil, 2011) que fixou condições e padrões de emissão para o lançamento de efluentes em corpos de água receptores.

O lançamento dos esgotos domésticos nas águas dos rios, reservatórios, estuários e regiões costeiras reduz sua qualidade, restringindo seus múltiplos usos e contribui para o aumento da ocorrência de doenças de veiculação hídrica, causadas pelo contato primário ou ingestão de água contaminada (CETESB, 2015).

Em relação ao controle sanitário das águas, um dos principais parâmetros capaz de indicar o lançamento de esgoto doméstico bruto é o aumento da densidade da bactéria *Escherichia coli* (*E. coli*), utilizada, também, como variável microbiológica para compor o Índice de Qualidade das Águas (IQA) adotado pela CETESB. Tanto a *E. coli*, como os coliformes termotolerantes e bactérias do grupo Enterococos, são classificadas como bactérias indicadoras de contaminação fecal, utilizadas como padrões microbiológicos rotineiramente para atestar a qualidade sanitária de um recurso hídrico. Os critérios aceitos em relação às densidades permitidas desses indicadores estão definidas em diversas legislações associadas ao tema, como CONAMA 357/05, Anexo XX da Portaria de Consolidação N° 5 de 28 de setembro de 2017 do Ministério da Saúde, Resolução CONAMA 274/04, dentre outras (Brasil, 2004; Brasil, 2005; Brasil, 2011).



COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

O Estado de São Paulo está dividido em 22 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHs), designadas com uma vocação específica. As quatro vocações das UGRHs - industrial, em industrialização, agropecuária e conservação - determinam a principal utilização do conjunto de recursos hídricos daquela determinada área. Pressupõe-se que as UGRHs que exibem a mesma vocação possuem usos do solo e pressões ambientais semelhantes sobre os corpos d'água com características comuns (CETESB, 2018). Desta forma, infere-se que os impactos ambientais sofridos pelos corpos d'água localizados em diferentes UGRHs, em relação ao aporte de efluentes, sejam distintos, e, conseqüentemente, tanto a densidade de indicadores de contaminação fecal como a qualidade da microbiota existente nesses ambientes devam também variar e assumir características próprias.

A avaliação mais detalhada das características da microbiota presente em um determinado ambiente, a partir de seus perfis genéticos ou proteicos, é o suporte dos estudos de *Rastreamento de Fontes de Contaminação Microbiológica* (RFCM) (Hagedorn *et al.*, 2011). Tais estudos indicam que, através da identificação de perfis microbiológicos, sejam estes fenotípicos ou genotípicos, possibilitaria a identificação da origem de fontes de contaminação microbiológica, e conseqüentemente, determinar se a poluição fecal eventualmente defrontada em determinado ambiente, seria oriunda de impactos de atividades antrópicas (Hagedorn *et al.*, 2011).

Na literatura encontram-se estudos que descrevem diversas metodologias capazes de diferenciar perfis microbiológicos característicos de poluição fecal oriunda de animais distintos, sendo capazes de distinguir efluentes com características mais antrópica, mais animal ou com características próprias de poluição difusa (Bradshaw *et al.*, 2016). No entanto, até o presente momento, e apesar da importância dessa ferramenta, não existe uma metodologia padrão para execução deste tipo de ensaio, e tampouco uma metodologia consolidada para estudar e diferenciar microrganismos isolados de matrizes ambientais.

Este projeto avaliou a diversidade microbiana presente em dois grupos de bactérias de origem fecal, os Coliformes e os Enterococos, utilizando-se metodologias de caracterização fenotípica (análise de *fingerprints* proteicos gerados pela técnica de espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF – *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*) e genotípica (sequenciamento parcial de fragmentos do gene do DNA ribossomal subunidade 16S). Tal levantamento permitiu identificar, dentre a microbiota de origem fecal, as espécies microbianas mais prevalentes em cada uma das UGRHs. Com os resultados obtidos foi possível ampliar a caracterização das espécies microbianas em corpos d'água destinados a diferentes vocações, que são impactados por efluentes de características distintas. Futuramente, e com base nos dados obtidos neste projeto, as análises microbiológicas das águas realizadas



CETESB

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

pela CETESB poderão, não somente ficar restritas às análises da densidade de indicadores de contaminação fecal, mas também analisadas de forma qualitativa, e correlacionando-se espécies microbianas prevalentes à qualidade do aporte de efluente aportado em determinado corpo hídrico.



2. OBJETIVOS

Este projeto se direcionou aos seguintes objetivos:

- Implementar a técnica de espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*) no laboratório de Biologia Molecular da CETESB, como ferramenta de identificação de espécies de microrganismos isolados de amostras ambientais.
- Analisar quantitativamente espécies de bactérias de origem fecal pertencentes aos grupos Coliformes e Enterococos, nos pontos de amostragem monitorados regularmente nos programas de avaliação de qualidade de águas interiores e costeiras da CETESB.
- Identificar, até o nível de espécie, os microrganismos encontrados nas diferentes UGRHs desse Projeto, utilizando as ferramentas propostas (espectrometria de massas e sequenciamento parcial do gene do rRNA 16S).
- Correlacionar, de forma georeferenciada, possíveis agrupamentos de espécies de bactérias com o tipo de aporte de efluentes pelos corpos hídricos, que possuem distintas vocações.

3. MATERIAL E MÉTODOS (ATIVIDADES DESENVOLVIDAS)

3.1. AMOSTRAGEM

As coletas de amostras ocorreram bimensalmente durante o período de maio de 2014 a junho de 2015 (13 meses). Os pontos de amostragem selecionados estão descritos nas Tabelas 1 e 2. Os cinco pontos de água salgada, localizados na Baixada Santista (Tabela 1), foram coletados bimensalmente, sendo que o número de amostras para cada ponto variou de 6 a 8. A amostragem foi realizada de acordo com a disponibilidade de viagens programadas no calendário anual do Programa de Monitoramento da Balneabilidade da CETESB (2014 e 2015). Um total de quatorze pontos de água doce foi avaliado (Tabela 2), sendo que o número de amostras coletadas, para cada ponto, variou de 5 a 11, pois estas também foram realizadas de acordo com as viagens agendadas para a Rede de Monitoramento Anual de Águas Superficiais da CETESB, para os mesmos anos *opus cit.*

As amostragens da água foram efetuadas de acordo com as orientações propostas pelo Guia de Coleta e Preservação de Amostras de Águas, publicado pela ANA e CETESB (ANA/CETESB, 2011).

Tabela 1. Caracterização dos pontos de amostragem de água salgada (balneabilidade) e número de coletas efetuadas por ponto (Descrição do local de amostragem, município, UGRHI, bacia hidrográfica, classificação anual de acordo com os parâmetros da Res. CONAMA 274/2000).

Descrição/Local de Amostragem	Município	UGRHI	Bacia Hidrográfica	Classificação Anual (Res. CONAMA 274/2000)		Número de Coletas/Ponto
				2014	2015	
Iporanga	GUARUJÁ	7	Baixada Santista	Ótima	Boa	8
Praia do Tombo	GUARUJÁ	7	Baixada Santista	Boa	Boa	6
Pitangueiras (Av. Puglisi)	GUARUJÁ	7	Baixada Santista	Ruim	Boa	6
Boqueirão	SANTOS	7	Baixada Santista	Ruim	Péssima	6
Boqueirão	PRAIA GRANDE	7	Baixada Santista	Ruim	Ruim	6

Tabela 2. Caracterização dos pontos de amostragem de água doce e número de coletas efetuadas por ponto (Código do ponto, descrição do local de amostragem, município, localização georreferenciada, UGRHI, bacia hidrográfica e classe de enquadramento segundo a Res. CONAMA 357/2005).

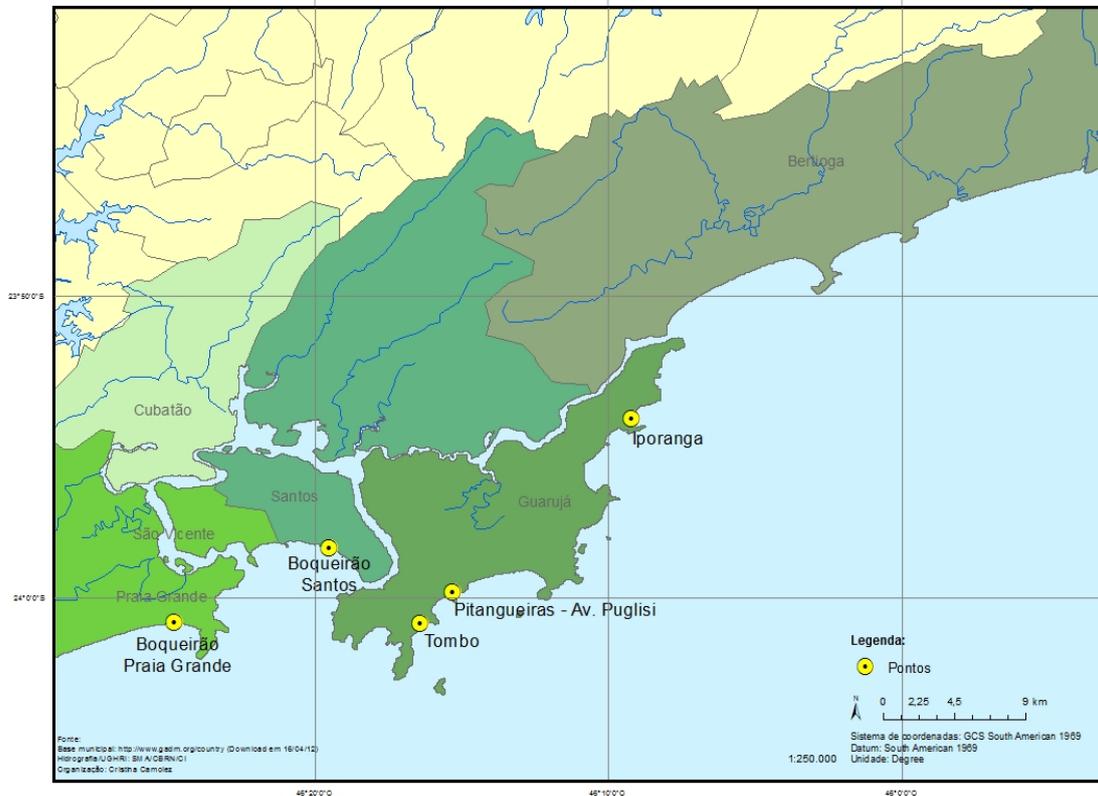
Código do Ponto (CETESB)	Descrição/Local de Amostragem	Município	Latitude S	Longitude W	UGRHI	Bacia Hidrográfica	Classe de Qualidade (Res. CONAMA 357/2005)	Número de Coletas/Ponto
RAIN0901	Praia dos Lavapés, em Nazaré Paulista (Represa do Rio Atibainha)	NAZARÉ PAULISTA	23 11 03	46 23 35	5	PCJ	0	11
ATIB2010	Junto à captação do município de Atibaia (Rio Atibaia)	ATIBAIA	23 06 12	46 32 42	5	PCJ	2	6
COTI3900	No canal de captação de águas para a ETA do Baixo Cotia (Rio Cotia)	CARAPICUÍBA	23 32 25	46 51 45	6	Alto Tietê	3	6
GUAR0900	Na captação da SABESP junto à casa de bombas no Bairro Capela do Socorro (Reservatório do Guarapiranga)	SÃO PAULO	23 40 17	46 43 35	6	Alto Tietê	0	7
BITQ0100	Na baía situada no final da Rua Tomekichi Inouye (Captação SABESP - Braço do Riberão Taquacetuba)	SÃO PAULO	23 50 41	46 39 20	6	Alto Tietê	0	5
CAMO0900	Junto à estação de Recalque da SABESP (Reservatório Capivari-Monos)	EMBU-GUAÇU	23 55 21	46 43 46	7	Baixada Santista	0	7
MOGU2800	Ponte na SP-333, na entrada de Barrinha, a jusante da ETE de Jaboticabal (Rio Mogi-Guaçu)	BARRINHA	21 12 08	48 10 17	9	Mogi-Guaçu	2	7
JURU2500	Ponte na rodovia SP-255, trecho que liga Avaré a Itaí (Reservatório Jurumirim)	AVARÉ	23 15 39	49 00 04	14	Alto do Paranapanema	2	5
TURV2500	Ponte na rodovia que liga São José do Rio Preto a Olímpia (Rio Turvo - UGRHI 15)	GUAPIAÇU	20 44 30	49 06 13	15	Turvo-Grande	2	5
XOTE2500	Na estrada municipal que liga Birigui a Coroados, na captação de Birigui (Córrego do Baixote)	BIRIGUI	21 18 37	50 18 38	19	Baixo Tietê	2	7
LAGE2500	Rua Altino Vaz de Melo, na captação do município de Penápolis (Riberão Lageado)	PENÁPOLIS	21 26 10	50 03 23	19	Baixo Tietê	2	7
IACR3750	A jusante da entrada do Rio Afonso XIII. Ponte na estrada de terra para a aldeia dos índios (Rio Iacri)	TUPÃ	21 49 31	50 25 22	20	Aguapeí	3	5
PEIX2800	Ponte na rodovia que liga Tupi Paulista a Presidente Venceslau (Rio do Peixe - UGRHI 21)	DRACENA	21 36 16	51 42 10	21	Peixe	2	6
STAN2700	Ponte que liga Presidente Venceslau a Teodoro Sampaio, SP-563 (Rio Santo Anastácio)	PIQUEROBI	22 01 25	51 53 27	22	Pontal do Paranapanema	2	6

Nos Mapas 1 e 2 localizam-se os pontos de coleta de amostragens para o Projeto.

Mapa 1. Localização dos pontos de coleta das amostras de água doce.



Mapa 2. Localização dos pontos de coleta das amostras de água salgada (pontos de balneabilidade).



As coletas foram realizadas pela CETESB com o apoio da Divisão de Amostragem (ELC) e das Divisões de Laboratórios Descentralizados de Campinas (EDA), Marília (EDM), Sorocaba (EDS), Ribeirão Preto (EDR), Cubatão (EDC) e Taubaté (EDT). As análises das amostras de água bruta foram inicialmente processadas no laboratório de Indicadores Microbiológicos da Divisão de Microbiologia e Parasitologia da CETESB (ELP) para filtração, coleta e isolamento dos microrganismos. Em seguida, as análises fenotípicas e genotípicas dos microrganismos isolados foram efetuadas pelo laboratório de Biologia Molecular da CETESB (ELP). No Quadro 1 estão contidas as informações relativas às coletas do Projeto, constando as datas, número de cadastro no sistema de qualidade laboratorial da CETESB e os respectivos pontos amostrados. Durante o Projeto, coletaram-se 123 amostras, sendo 91 de água doce e 32 de água salgada, ao longo dos 13 meses.



COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

Quadro 1. Especificações das 123 amostras coletadas: Data da coleta, Número da Amostra no sistema LIMS da CETESB e Código do Ponto de Amostragem.

Amostra	Data da Coleta	Número da Amostra	Ponto (Cód. CETESB)
1	01/05/2014	*	Iporanga – Guarujá
2	06/05/2014	1416281	LAGE2500
3	06/05/2014	1416282	XOTE2500
4	07/05/2014	1416284	CAMO0900
5	07/05/2014	1416285	GUAR0900
6	08/05/2014	1416286	COTI3900
7	15/05/2014	1416385	BITQ0100
8	26/05/2014	1401581	ATIB2010
9	26/05/2014	1417834	RAIN0901
10	24/05/2014	*	Boqueirão – Santos
11	24/05/2014	*	Boqueirão – P. Grande
12	24/05/2014	*	Pitangueiras – Guarujá
13	24/05/2014	*	Tombo - Guarujá
14	04/06/2014	1400832	MOGU2800
15	23/05/2014	1419214	RAIN0901
16	24/06/2014	1405260	STAN2700
17	24/06/2014	1405261	PEIX2800
18	24/06/2014	1406704	JURU2500
19	07/07/2014	1419713	COTI3900
20	01/07/2014	*	Iporanga – Guarujá
21	14/07/2014	1401754	ATIB2010
22	17/07/2014	1418202	LAGE2500
23	17/07/2014	1418203	XOTE2500
24	23/07/2014	1415742	TURV2500
25	24/07/2014	1419725	CAMO0900
26	24/07/2014	1419738	GUAR0900
27	29/07/2014	1422037	RAIN0901
28	31/07/2014	1419746	BITQ0100
29	05/08/2014	*	Boqueirão – Santos
30	05/08/2014	*	Boqueirão – P. Grande
31	05/08/2014	*	Pitangueiras – Guarujá
32	05/08/2014	*	Tombo - Guarujá
33	12/08/2014	1423565	JURU2500
34	19/08/2014	1424298	RAIN0901
35	19/08/2014	1418327	IACR3750

Amostra	Data da Coleta	Número da Amostra	Ponto (Cód. CETESB)
36	26/08/2014	1418358	PEIX2800
37	26/08/2014	1418359	STAN2700
38	27/08/2014	1415786	MOGU2800
39	01/09/2014	1401935	ATIB2010
40	03/09/2014	1425647	CAMO0900
41	03/09/2014	1425648	GUAR0900
42	04/09/2014	1418418	LAGE2500
43	04/09/2014	1418419	XOTE2500
44	04/09/2014	1425652	COTI3900
45	10/09/2014	1415938	TURV2500
46	01/09/2014	*	Iporanga – Guarujá
47	22/09/2014	1427117	RAIN0901
48	25/09/2014	1427060	BITQ0100
49	14/10/2014	1418549	STAN2700
50	14/10/2014	1418550	PEIX2800
51	21/10/2014	1429646	RAIN0901
52	29/10/2014	1425805	MOGU2800
53	30/10/2014	1423961	JURU2500
54	01/11/2014	*	Iporanga – Guarujá
55	05/11/2014	1425860	TURV2500
56	06/11/2014	1429878	CAMO0900
57	06/11/2014	1429878	GUAR0900
58	10/11/2014	1402210	ATIB2010
59	13/11/2014	1430504	BITQ0100
60	18/11/2014	1426580	LAGE2500
61	18/11/2014	1426581	XOTE2500
62	24/11/2014	1430755	RAIN0901
63	26/11/2014	1430707	COTI3900
64	01/12/2014	*	Iporanga – Guarujá
65	01/12/2014	*	Boqueirão – Santos
66	01/12/2014	*	Boqueirão – P. Grande
67	01/12/2014	*	Pitangueiras – Guarujá
68	01/12/2014	*	Tombo - Guarujá
69	04/12/2014	1426622	IACR3750
70	09/12/2014	1424076	JURU2500



COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

Amostra	Data da Coleta	Número da Amostra	Ponto (Cód. CETESB)
71	10/12/2014	1425971	MOGU2800
72	10/12/2014	1426631	STAN2700
73	10/12/2014	1426632	PEIX2800
74	08/01/2015	1511546	GUAR0900
75	08/01/2015	1511543	CAMO0900
76	11/01/2015	1505957	TURV2500
74	19/01/2015	1512787	RAIN0901
78	20/01/2015	1504416	XOTE2500
79	20/01/2015	1504417	LAGE2500
80	22/01/2015	1511952	COTI3900
81	28/01/2014	1501101	ATIB2010
82	03/02/2015	1504513	IACR3750
83	05/02/2015	1506036	MOGU2800
84	01/02/2015	*	Iporanga – Guarujá
85	01/02/2015	*	Boqueirão – Santos
86	01/02/2015	*	Boqueirão – P. Grande
87	01/02/2015	*	Pitangueiras – Guarujá
88	01/02/2015	*	Tombo - Guarujá
89	26/02/2015	1504540	STAN2700
90	26/02/2015	1504541	PEIX2800
91	01/03/2015	*	Iporanga – Guarujá
92	12/03/2015	1515142	BITQ0100
93	12/03/2015	1504598	XOTE2500
94	12/03/2015	1504599	LAGE2500
95	19/03/2015	1515223	GUAR0900
96	19/03/2015	1515259	CAMO0900
97	24/03/2015	2626566	RAIN0901
98	02/04/2015	*	Boqueirão – Santos
99	02/04/2015	*	Boqueirão – P. Grande
100	02/04/2015	*	Pitangueiras – Guarujá
101	02/04/2015	*	Tombo - Guarujá

Amostra	Data da Coleta	Número da Amostra	Ponto (Cód. CETESB)
102	07/04/2015	1504666	STAN2700
103	07/04/2015	1504667	PEIX2800
104	14/04/2015	1504688	IACR3750
105	16/04/2015	1506319	MOGU2800
106	28/04/2015	1518961	RAIN0901
107	04/05/2015	1501508	ATIB2010
108	05/05/2015	1504749	XOTE2500
109	05/05/2015	1504750	LAGE2500
110	07/05/2015	1519341	COTI3900
111	01/05/2015	*	Iporanga – Guarujá
112	13/05/2015	1506416	TURV2500
113	14/05/2015	1519422	CAMO0900
114	14/05/2015	1519428	GUAR0900
115	21/05/2015	1519652	BITQ0100
116	25/05/2015	1520855	RAIN0901
117	09/06/2015	1504894	IACR3750
118	11/06/2015	1506507	MOGU2800
119	11/06/2015	1507178	JURU2500
120	15/06/2015	*	Boqueirão – Santos
121	15/06/2015	*	Boqueirão – P. Grande
122	15/06/2015	*	Pitangueiras – Guarujá
123	15/06/2015	*	Tombo - Guarujá

*Nota: As amostras de água salgada não apresentam número de cadastro, pois seguem a padronização interna do laboratório da Divisão de Laboratório de Cubatão (EDC), responsável pelas coletas da Baixada Santista, relativas ao Programa de Balneabilidade da CETESB. O Laboratório não utilizava Sistema LIMS.



3.2. FILTRAÇÃO DAS AMOSTRAS, ISOLAMENTO DOS MICRORGANISMOS DE ORIGEM FECAL, e CONSTRUÇÃO DE UMA BIBLIOTECA DE LINHAGENS MICROBIANAS.

As amostras foram processadas pela técnica da membrana filtrante, em um prazo de até 24 horas após o horário da coleta, segundo a metodologia descrita na 22ª edição do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012).

As amostras foram filtradas em duplicata, em membranas mistas de acetato e nitrato de celulose com diâmetro de 47 mm e porosidade 0,45 µm. Posteriormente, as membranas foram transferidas para placas de Petri, contendo os meios de cultivo seletivos e diferenciais M-ENDO e mEI para o isolamento dos microrganismos dos grupos Coliformes totais (Família Enterobacteriaceae) e Enterococos, respectivamente. O grupo Enterococos foi definido fenotipicamente, pela seleção de colônias características no meio seletivo mEI, estabelecido pelo Standard Methods e USEPA como um dos meios de cultura padronizado para o isolamento e quantificação de Enterococos em amostras de água. No entanto, esse meio pode ser permissivo ao crescimento de algumas espécies de outros gêneros como *Streptococcus*. Para determinação de Coliformes totais e Enterococos, empregaram-se as metodologias propostas no *Standard Methods* (APHA, 2012) modificadas segundo as normas técnicas CETESB L5.214 (CETESB, 2007) e CETESB L5.212 (CETESB, 2012), respectivamente. As placas foram incubadas nas temperaturas ideais para o crescimento dos grupos de microrganismos durante 24 horas (CETESB, 2007; CETESB, 2012).

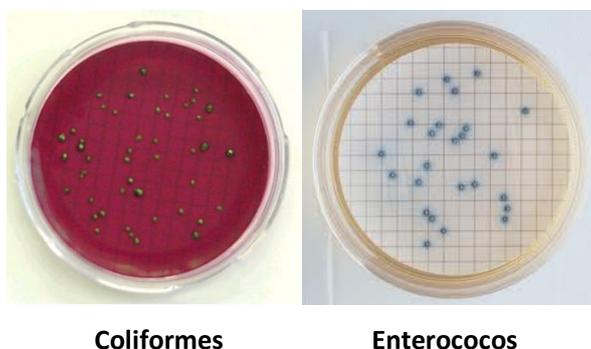
Após este período, realizou-se a contagem das colônias dos microrganismos nas placas, sendo escolhidas, por amostra filtrada, cinco colônias representativas e fenotipicamente pertencentes ao Grupo Coliformes e cinco colônias do Grupo Enterococos para levantamento da diversidade microbiana. Para as amostras de água doce, ambos os grupos de bactérias de origem fecal foram testadas, já para as amostras de água salgada, somente o Grupo Enterococos, uma vez que está bem documentado na literatura que microrganismos do Grupo Enterococos possuem maior halotolerância quando comparados a microrganismos do Grupo Coliformes (Slanetz e Bartley, 1964).

As colônias selecionadas foram re-isoladas em meio nutritivo e não diferencial, TSA (trypticase soy agar), e então cultivadas em meio líquido TSB (trypticase soy broth). Os caldos de cultivos das colônias foram acrescidos de glicerol na concentração final de 15%, e uma alíquota de cada um recebeu um número sequencial e foi congelada a -80°C. Seguindo esta metodologia, obteve-se, ao final das coletas, uma biblioteca de microrganismos imortalizados, composta por 967 isolados microbianos, 832 isolados provenientes de amostras de água doce e 135 isolados provenientes de água salgada. Posteriormente, os

microrganismos isolados foram analisados pelas técnicas de espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF (MALDI-TOF MS) e sequenciamento parcial do gene do rDNA ribossomal 16S.

A Figura 1 exemplifica placas de cultivo dos meios de cultura M-ENDO e MEI contendo, respectivamente, colônias típicas dos grupos Coliformes (colônia verde brilhante) e *Enterococos* (colônia azul ou com halo azulado), que foram selecionadas e submetidas ao processo de isolamento, imortalização e composição da biblioteca de isolados.

Figura 1. Placas de cultivo contendo os meios de cultura M-ENDO (esquerda) e MEI (direita), com colônias típicas de microrganismos dos grupos Coliformes e *Enterococos*. (com ponto final)



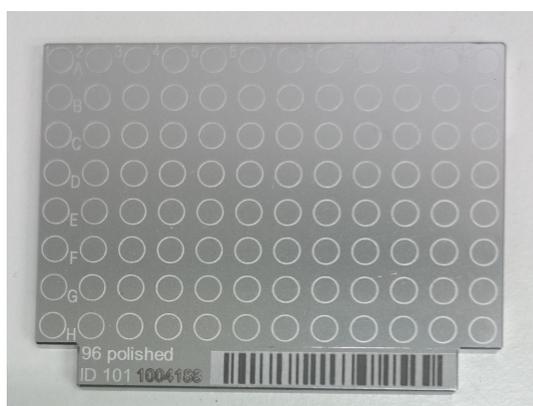
3.3. IDENTIFICAÇÃO MICROBIANA PELA TÉCNICA DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS DO TIPO MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*)

Os microrganismos isolados foram, sequencialmente, identificados pela técnica de MS MALDI-TOF. Para isso, foram descongelados e cada um dos isolados teve uma alíquota de 1 µL estriada em uma placa de meio de cultura não seletivo TS, incubadas durante 24h a 35°C. Após esse período, uma colônia de cada um dos isolados foi submetida ao protocolo de extração proteica.

Para a extração proteica, empregou-se o protocolo descrito por Christ e colaboradores (Christ *et al.*, 2017). Brevemente, as colônias provenientes de cada um dos isolados foram diluídas em 300 µL de água estéril e homogeneizadas. Adicionou-se 900 µL de etanol absoluto à suspensão e as células foram lavadas e centrifugadas por dois minutos à temperatura ambiente a 10.000 g para remoção completa do sobrenadante. Em seguida, adicionou-se aos pellets 50 µL de uma solução de ácido fórmico 70% e 50 µL de acetonitrila grau cromatográfico. Com um pipetador de 200 µL, procedeu-se a lise mecânica das células contidas no pellet. A suspensão foi centrifugada dois minutos à temperatura ambiente a 10.000 g, e o sobrenadante (extrato proteico) separado e congelado a -20°C, para posterior análise no espectrômetro de

massas. Um microlitro de cada extrato proteico, oriundo de cada um dos isolados microbianos, foi aplicado em uma placa de 96 poços de aço inoxidável polido, própria para a técnica de espectrometria do tipo MALDI-TOF (placa de MALDI – Figura 2). Aguardou-se a secagem completa do extrato proteico na placa, e em seguida foi aplicada na superfície de cada poço 1 μ L de matrix orgânica de ácido cinâmico (solução saturada contendo ácido ciano-4-hidroxi-cinâmico em acetonitrila 50% acrescida de 2,5% de ácido trifluoroacético), recobrando os extratos proteicos.

Figura 2. Placa de aço inoxidável do MALDI – TOF



***Cada círculo corresponde a um Spot onde os extratos proteicos são aplicados para serem submetidos à ionização no espectrômetro de massas.**

A placa de MALDI foi mais uma vez exposta à secagem em ambiente escuro e à temperatura ambiente. Durante a secagem da matriz (amostra), aguarda-se que ocorra o processo de co-cristalização entre as proteínas citosólicas no extrato proteico microbiano e o sal presente na matriz orgânica, assim expondo as subunidades proteicas que ficarão passíveis ao processo de ionização, quando forem bombardeadas pela fonte de laser do espectrômetro de massas.

Após a secagem completa da placa, esta foi transferida para o espectrômetro de massas do tipo MALDI-TOF Modelo Microflex, Marca Bruker-Daltonics® (Figura 3). No equipamento, realizou-se a programação do método utilizado no software FlexControl (Bruker-Daltonics®), para obtenção e leitura de espectros de massa de proteínas no intervalo de 2 a 20kDa, abrangendo, de forma parcialmente seletiva, as proteínas ribossomais citosólicas. Com base no polimorfismo dessas moléculas, após a aplicação do método, cada um dos isolados mostrou um espectro de massa único que foi comparado a um banco de dados.

Figura 3. Espectrômetro de Massas do Tipo MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*), Modelo Microflex, Marca Bruker-Daltonics®



Para análise e identificação dos espectros de massas relativos a cada um dos isolados, empregou-se o software MALDI BioTyper 3.0™ (Bruker-Daltonics®) que comparou cada um dos espectros obtidos com o banco de dados do fabricante (Bruker-Daltonics®). Após este procedimento, o software retornou para cada um dos isolados uma classificação taxonômica constando gênero e espécie, e um valor arbitrário denominado **Score**. De acordo com as recomendações do fabricante, se assumiu que para Scores maiores ou iguais a 1.9, a identificação do microrganismo está validada até o nível de espécie, enquanto para valores entre 1.7 e 1.9, autenticada até o nível de gênero. Valores de Score inferiores a 1.7 foram desconsiderados e as amostras reanalisadas.

Sequencialmente, todos os 967 microrganismos que compõe a biblioteca de isolados, foram submetidos ao protocolo descrito anteriormente para a realização de sua classificação taxonômica. Dentre os 967 isolados, apenas 8 não foram passíveis de identificação pela técnica de MS MALDI-TOF, apresentando ou Score igual a 0 (o microrganismo não consta do banco de dados) ou inferior a 1.7, o que pelos critérios de análises estabelecidos é inaceitável.

3.4. SEQUENCIAMENTO PARCIAL DOS GENE DO rDNA RIBOSSOMAL SUBUNIDADE 16S

Após a identificação dos isolados pela técnica de MS MALDI-TOF, a análise dos resultados revelou que os isolados 441, 463, 519, 523, 581, 682, 715 e 903 expressaram Score igual à zero ou consistentemente inferior a 1.7, significando que a identificação microbiológica destas linhagens foi impossível pela caracterização fenotípica das proteínas ribossomais utilizando a técnica de MS MALDI-TOF.

Para identificação desses oito isolados realizou-se o sequenciamento parcial do gene do rDNA ribossomal 16S, considerada a técnica de identificação genotípica padrão ouro para microrganismos procariotos.

Os isolados foram descongelados, e uma alíquota de 1 µL transferida para 5 mL de meio de cultivo TSB, para obtenção de biomassa suficiente na realização da extração do DNA total das amostras. As culturas foram incubadas a 35°C por 24h; após esse período, as culturas foram lavadas e centrifugadas a 12.000 g por 1 minuto para obtenção do pellet celular.

Realizou-se a extração do DNA total de cada uma das amostras, utilizando o kit de extração de DNA microbiano *Ultractean Microbial DNA Isolation Kit* (MOBIO, Laboratories, Inc, USA), seguindo as instruções do fabricante. Após a extração de DNA, uma alíquota de 1 µL foi utilizada para amplificação do gene do rDNA ribossomal 16S, empregando os primers descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Sequência nucleotídicas (primers) utilizada na amplificação do gene do DNA ribossomal 16S.

Gene	Sequência Nucleotídica	Instrumento Utilizado	Referência Bibliográfica
DNA ribossomal 16S	<i>Primer FW: (27f)</i> AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Step One Plus, Marca Life Technologies	Weisburg et al., 1991
	<i>Primer RW: (1492r)</i> CGGTTACCTTGTACGACTT	Step One Plus, Marca Life Technologies	Weisburg et al., 1991

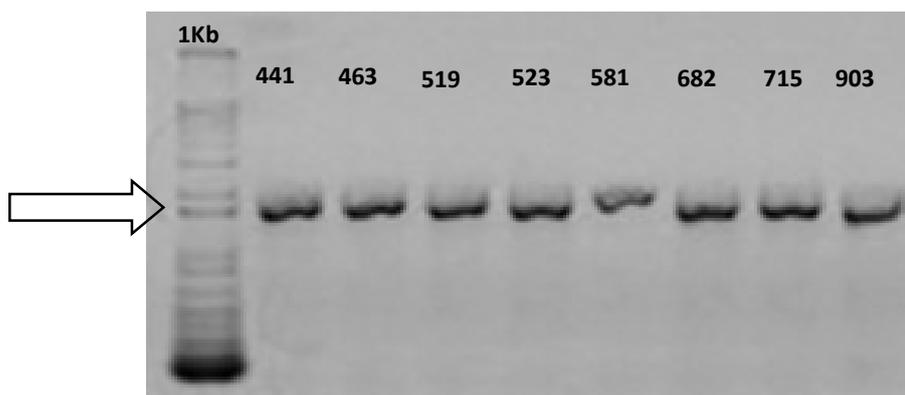
O volume final da reação de PCR usada para a amplificação dos genes dos DNAs ribossomais 16S das amostras testadas foi de 50 µL, contendo: 5 µL de tampão de reação de PCR 10X, 1,5 µL de solução de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de solução de dNTP 10 mM, 2 µL de solução equimolar dos primers Fw e Rw a 20 mM, 1 unidade da enzima Taq Polimerase e 1 µg de DNA total de cada amostra. A amplificação foi realizada no termociclador Step OnePlus® da Marca Life Technologies (Figura 4).

Figura 4. Termociclador Modelo StepOne Plus da Marca Life Technologies.



As condições de amplificação empregadas durante a termociclagem foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos, seguido por uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os fragmentos do DNA 16S de cada amostra foram purificados em coluna GFX (GE Healthcare, USA) seguindo as instruções do fabricante. Para verificação da técnica correu-se um gel de agarose a 0,8% para conferência do tamanho do fragmento (cerca de 1500 pb) e pureza da reação (Figura 5).

Figura 5. Fotodocumentação em gel de agarose (0,8%) da amplificação do DNA ribossomal 16S do isolados microbianos. A região indicada pela seta corresponde a 1500 pb que é o tamanho aproximado esperado para o fragmento em questão. Na figura é possível visualizar que foi possível amplificar o DNA ribossomal 16S de todos os isolados. Na primeira coluna à esquerda observa-se o padrão 1Kb plus.



Após a conferência das reações de PCR, os fragmentos referentes ao DNA ribossomal 16S de cada amostra foram enviados para sequenciamento na Empresa Genomic Engenharia Molecular, localizada em São Paulo (<http://genomic.com.br>). Para a reação de sequenciamento, empregou-se o kit *Big Dye Terminator Sequencing Ready Reaction v3.1* (Applied Biosystems, USA). Para uma reação com 10 μ L de volume final, utilizaram-se 1 μ L de *Big Dye*, 2 μ L de tampão *Save Money 5x* (200 mM tris-HCl; 5 mM MgCl₂; pH 9,0), 1 μ L de *primer* 3,2 μ M e de 1 ng de DNA purificado. As condições das reações consistiram de desnaturação inicial a 96°C por 1 min e 35 ciclos de 96°C por 10 s, 50°C por 5s e 60°C por 4 min.

Após a reação de sequenciamento, os produtos foram purificados por precipitação em etanol, EDTA e acetato de sódio. A cada amostra, foi adicionado 0,5 μ L de EDTA 125 mM (pH 8,0); 0,5 μ L de acetato de sódio 3M (pH 4,8) e 25 μ L de etanol 100%. As placas foram vedadas, homogeneizadas por inversão (4 vezes) e incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos. As amostras foram centrifugadas a 1500 g por 35 min a 4°C e em seguida, o sobrenadante foi descartado. A cada amostra adicionaram-se 35 μ L de etanol 70%, centrifugadas a 1500 g por 20 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e a placa foi mantida em banho seco a 95°C por 1 min. Após a evaporação do etanol, o pellet foi ressuscitado em 12 μ L de formamida *Hi-Di*, posteriormente desnaturadas a 95°C por 5 min, colocadas em banho de gelo por 5 min e dispostas no sequenciador.

A Empresa contratada devolveu 16 cromatogramas referentes às sequências obtidas com os primers 27f e 1492r utilizados nas reações de PCR, ~~os quais foram~~ utilizados na reação de sequenciamento



também como iniciadores das reações. ~~Utilizando~~ Aplicando o Software Bioedit (Hall, 1999) os cromatogramas foram transformados em sequências FASTA e com as 16 sequências geradas realizaram-se o alinhamento local no Programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990) e assim efetuada a identificação dos microrganismos isolados.

3.5. ENSAIOS EM CAMPO

Para as 92 amostras de água doce, os parâmetros físico-químicos: temperatura da água, pH e oxigênio dissolvido foram mensurados em campo durante as coletas, de acordo com as metodologias descritas no Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras, para cada um dos parâmetros aferidos (ANA, 2011). A cor da água das amostras na hora da coleta e a presença ou não de chuvas nas últimas 24 horas também foram avaliadas, para posterior comparação com os dados microbiológicos.

3.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas para interpretação dos dados físico-químicos e microbiológicos do estudo. Empregaram-se somente os dados das análises em amostras de água doce, devido ao número amostral significativo, excluindo-se os dados de água marinha.

Para cada ponto monitorado, até 5 colônias foram pesquisadas, utilizando espectrometria de massa por MALDI-TOF. As espécies foram identificadas (47 no total) e suas frequências em cada amostra calculadas.

As espécies identificadas foram provenientes de 14 locais de água doce amostrados, sendo que o total de variáveis analisadas neste estudo de 81. O total de amostras versus espécies foi de 487, o total de amostras de 97, constituindo o número de dados das análises estatísticas.

Para analisar as variáveis físico-químicas e as microbiológicas (quantitativas e qualitativas) simultaneamente, foi empregada a técnica multivariada FAMD (*Factor Analysis of Mixed Data*) para a análise fatorial e a técnica PAM (*Partitioning Around Medoids*) para determinação dos clusters formados pelas frequências das espécies (Audigier *et al.*, 2013).

O critério para determinação do número ideal de clusters foi baseado no método da Largura da silhueta [*silhouette width*], desenvolvido por Peter J. Rousseeuw (Rousseeuw, 1987).

Além da análise empregando a técnica multivariada FAMD, os dados microbiológicos também foram analisados pela técnica de Co-cluster, com o objetivo de definir agrupamentos simultâneos de amostras e a relevância das frequências das espécies nos pontos de coleta estudados. De forma a



COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

complementar os dados, modelos de contingência (*Contingency models*) foram aplicados (Bhatia *et al.*, 2017).

Os pacotes do software R empregados nas análises dos dados foram: FactoMineR, Factoextra, PCAmixdata, missMDA, corrplot, dplyr, cluster, Rtsne, ggplot e blockcluster.

4. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS ADQUIRIDOS NO PROJETO

A seguinte lista descreve os equipamentos adquiridos no Projeto:

Item	Descrição do Equipamento/Material
1	Termociclador da Marca Life Technologies, Modelo Step One Plus (Patrimônio CETESB ME-11096) (Figura 6)
2	Espectrômetro de Massas do Tipo MALDI-TOF da Marca Bruker-Daltonics, Modelo Microflex (Patrimônio CETESB ME-11706) (Figura 7)
3	Pacote de software para processamento de dados provenientes da técnica de espectrometria de massas, Marca Bruker-Daltonics, Modelo Flex-Analysis (Patrimônio CETESB ME-11706)
4	Banco de dados de espectros de massas de microrganismos, Marca Bruker-Daltonics, Modelo Biotyper (Patrimônio CETESB ME-11706)

Figure 6. Termociclador Modelo StepOne Plus da Marca Life Technologies (Patrimônio CETESB ME-11096).



Figura 7. Espectrômetro de Massas do Tipo MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry*), Modelo Microflex, Marca Bruker-Daltonics® (Patrimônio CETESB ME-11706).



5. SERVIÇOS CONTRATADOS NO PROJETO

Não foram utilizados serviços contratados no presente projeto

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. IDENTIFICAÇÃO POR SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE DO rDNA RIBOSSOMAL SUBUNIDADE 16S

Na Tabela 4 está descrita a classificação taxonômica dos isolados 441, 463, 519, 523, 581, 682, 715 e 903, de acordo com os resultados obtidos como o alinhamento local das sequências parciais do gene do DNA ribossomal 16S.

Tabela 4. Resultados do alinhamento BLAST N utilizado para identificar as amostras submetidas ao protocolo de sequenciamento do DNA ribossomal 16S

ISOLADO	IDENTIFICAÇÃO
441	<i>Aerococcus viridans</i>
463	<i>Kluyvera intermedia</i>
519	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>
523	<i>Enterococcus mundtii</i>
581	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
682	<i>Aerococcus viridans</i>
715	<i>Enterobacter cloacae</i>
903	<i>Patoea sp.</i>

6.2. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE ÁGUA DOCE

A Tabela 5 mostra a média dos resultados físico-químicos obtidos nas amostras de água doce coletadas ao longo do período de amostragem, além da variação de sua coloração ao longo do período de monitoramento e a porcentagem de amostras coletadas após evento de precipitação (chuvas nas últimas 24h).

Utilizando como referências as classes de enquadramento dos corpos d'água, definidas pelo Decreto Estadual nº 10.755/77 (São Paulo, 1977) e, os padrões de qualidade para os parâmetros físico-



COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

químicos esperados para as diferentes classes e seus respectivos usos estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005, os pontos de coleta analisados exibiram resultados dentro na normalidade em relação ao pH, a exceção do ponto BITQ0100 que mostrou valores de pH superiores a 9 em 3 das 6 coletas realizadas, todos os demais estiveram em uma faixa de variação de pH estreita-entre 6 e 7, dentro da normalidade.

Em relação ao OD na água, a CONAMA 357/2005 preconiza valores superiores a 5 mg/L como critério de normalidade. Por esse critério, os pontos ATIB2010, COTI3900 (pontos de vocação industrial), TURV2500 e XOTE2500 (pontos de vocação agropecuária) mostraram, consistentemente, valores abaixo de 5 em grande parte das coletas realizadas, inclusive o ponto XOTE2500 exibiu uma média geométrica de 1,7 mg/L, muito abaixo do considerado natural de acordo com a CONAMA 357/2005. Águas poluídas são aquelas que apresentam baixa concentração de oxigênio dissolvido, relativo ao seu consumo pela decomposição de compostos orgânicos; enquanto que, em águas límpidas encontram-se concentrações de OD elevadas, atingindo a valores um pouco abaixo da concentração de saturação (9,2 mg/L). Esse princípio é alterado em corpos hídricos em processo de eutrofização, onde o crescimento exponencial de algas pode elevar momentaneamente as taxas de OD na água. Portanto, por este critério, os pontos supracitados foram aqueles que mostraram as piores condições devido ao aporte de carga de poluição orgânica.

Quanto à temperatura da água, não houve nenhuma variação brusca em nenhum dos pontos, sendo que a temperatura média constatada variou entre 20 e 26°C durante todas as estações climáticas. Em relação à porcentagem de amostras coletadas após evento de precipitação (realizada após chuvas nas últimas 24h), revelou elevada variação, constatando-se que os pontos com vocação industrial apontaram mais dias de precipitação quando comparado aos de vocação agropecuária. Entretanto, verificou-se pontos como IACR3760, XOTE2500 e LAGE2500 que ao longo do período de amostragem (2014 e 2015) não atestaram quase nenhum evento de precipitação, e o ponto JURU2500 (UGRHI de conservação), praticamente não ocorreu chuvas ao longo desse período, fenômeno atribuído ao período de seca sofrido pelo sudeste do Brasil, durante os anos de 2013 a 2015 (Coelho *et al.*, 2017).

Tabela 5. Valores das médias geométricas e desvios-padrão dos parâmetros físico-químicos, variação da coloração da água e porcentagem de amostras coletadas após evento de precipitação, obtidos nos pontos de água doce.

Pontos de Coleta/Vocação do Ponto/ Número de amostras coletadas por ponto	Parâmetro Físico-Químicos				
	Temperatura da água (°C)	pH	O ₂ Dissolvido (mg/L)	Varição da Coloração da água	Porcentagem de amostras coletadas após evento de precipitação
RAIN0901/INDUSTRIAL/ 11 COLETAS	23,4 (±DP 3,15)	7,4 (±DP 0,6)	NA	Incolor, Verde	18%
ATIB2010/INDUSTRIAL/ 6 COLETAS	20,5 (±DP 2,5)	6,4 (±DP 0,2)	2,2 (±DP 1,04)	Verde, Amarela, Vermelha	50%
COTI3900/INDUSTRIAL/ 6 COLETAS	21,8 (±DP 2,9)	7,2 (±DP 0,1)	3,4 (±DP 0,5)	Cinza, Amarela	50%
GUAR0900/INDUSTRIAL/ 7 COLETAS	22,7 (±DP 3,1)	7,9 (±DP 0,5)	7,6 (±DP 1,9)	Verde, Cinza	71%
BITQ0100/INDUSTRIAL/ 5 COLETAS	22,1 (±DP 2,7)	8,5 (±DP 0,7)	9,5 (±DP 2,2)	Verde	33%
CAMO0900/INDUSTRIAL/ 7 COLETAS	23,6 (±DP 3,3)	6,3 (±DP 0,3)	7,2 (±DP 0,6)	Amarela, Marrom	57%
MOGU2800/EM INDUSTRIALIZAÇÃO/ 7 COLETAS	24,4 (±DP 2,6)	7,01 (±DP 0,1)	6,8 (±DP 1,4)	Marrom	28%
JURU2500/CONSERVAÇÃO/5 COLETAS	23,9 (±DP 2)	7,5 (±DP 0,1)	8,2 (±DP 0,4)	Incolor, Verde	0%
TURV2500/AGROPECUÁRIA/ 5 COLETAS	22,3 (±DP 3,6)	7,1 (±DP 0,1)	5,3 (±DP 1,3)	Marrom	40%
XOTE2500/AGROPECUÁRIA/ 7 COLETAS	23,6 (±DP 2,9)	6,4 (±DP 0,1)	1,7 (±DP 0,8)	Marrom	14%
LAGE2500/AGROPECUÁRIA/ 7 COLETAS	23,2 (±DP 3,1)	7,03 (±DP 0,1)	5,6 (±DP 0,7)	Marrom	14%
IACR3750/ AGROPECUÁRIA/ 5 COLETAS	26,7 (±DP 2,9)	7,1 (±DP 0,1)	6,3 (±DP 0,6)	Marrom	0%
PEIX2800/AGROPECUÁRIA/ 6 COLETAS	24,9 (±DP 3)	7,4 (±DP 0,3)	7,04 (±DP 0,6)	Marrom	33%
STAN2700/AGROPECUÁRIA/ 6 COLETAS	24,9 (±DP 2)	6,2 (±DP 0,8)	6,8 (±DP 0,8)	Marrom	33%

Em relação à variação da coloração da água se observa um padrão em todos os pontos de vocação agropecuária mostrando uma coloração marrom em 100% das coletas, enquanto que os pontos de vocação industrial e em industrialização exibiram uma ampla variação na coloração da água nos momentos das coletas, variando no âmbito de incolor, verde, cinza, amarela, marrom e vermelha. O ponto JURU2500, de vocação para preservação, apontou, em 80% das coletas, a coloração verde, também consistente a este parâmetro.



6.3. ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DOS INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO FECAL ENCONTRADOS NOS PONTOS DE ÁGUA DOCE DAS UGRHIS PESQUISADAS

6.3.1. UGRHIS 5, 6 e 7 - VOCAÇÃO INDUSTRIAL

Os pontos selecionados como representativos das UGRHIs com vocação industrial foram: RAIN0901, ATIB2010, COTI3900, GUAR0900, BITQ0100 e CAMO0900, sendo que os dois primeiros pertencem à bacia do PCJ – Piracicaba, Capivari, Jundiá - (UGRHI 5); os três seguintes à bacia do Alto Tietê (UGRHI 6) e o último à Baixada Santista (UGRHI 7). Os pontos ATIB2010, COTI3900 e GUAR0900 estão localizados na captação da SABESP, respectivamente nos Rios Atibaia, Cotia e Reservatório do Guarapiranga.

Ao longo do período de amostragem coletaram-se 11 amostras no ponto RAIN0901, 6 nos pontos ATIB2010, COTI3900 e BITQ010, e 7 nos pontos GUAR0900 e CAMO0900. Para a realização das análises qualitativas e quantitativas considerou-se o número total de coletas e não o previsto (seis amostras por ponto), dada à previsão de amostragem bimestral.

Através da técnica de membrana filtrante (APHA, 2012; CETESB, 2007; CETESB, 2012) realizou-se a quantificação das colônias dos indicadores de contaminação fecal pertencentes aos Grupos Coliformes e Enterococos, e dessa forma, a determinação da densidade dos indicadores nos pontos de coleta estudados. As Figuras 8 e 9 exibem os resultados da densidade dos indicadores de contaminação microbiológica encontrados nos pontos monitorados, pertencentes às UGRHIs em epígrafe.

Os pontos de vocação industrial estudados estão classificados, como: classe especial (RAIN0901, GUAR0900, BITQ0100 e CAMO0900) localizados no interior de reservatórios de água, na RMSP; classe 2 (ATIB2010) e, classe 3 (COTI3900). Segundo CONAMA 357/2005, águas doces classificadas em classe 1 não devem exceder o limite de 200 coliformes termotolerantes por 100 mL em 80% ou mais, de pelo menos 6 amostras, coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral. Para águas doces especificadas em classe Especial, não há um critério determinado, pois deverão ser mantidas as condições naturais do corpo de água. Porém, no contexto desse projeto, considerou-se que as águas doces de classe especial devem atender a critérios microbiológicos iguais ou superiores daqueles designados como classe 1.

Figura 8. Representação BOX-PLOT das densidades (UFC/100 mL) dos microrganismos do Grupo Coliformes obtidas nos pontos monitorados das UGRHIs de Vocação Industrial, ao longo de 13 meses de amostragem.

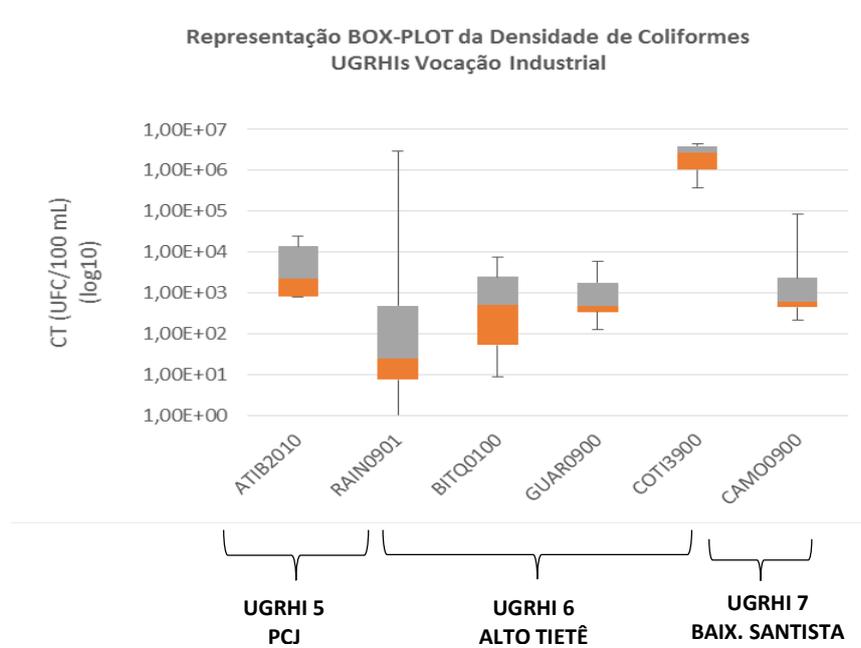
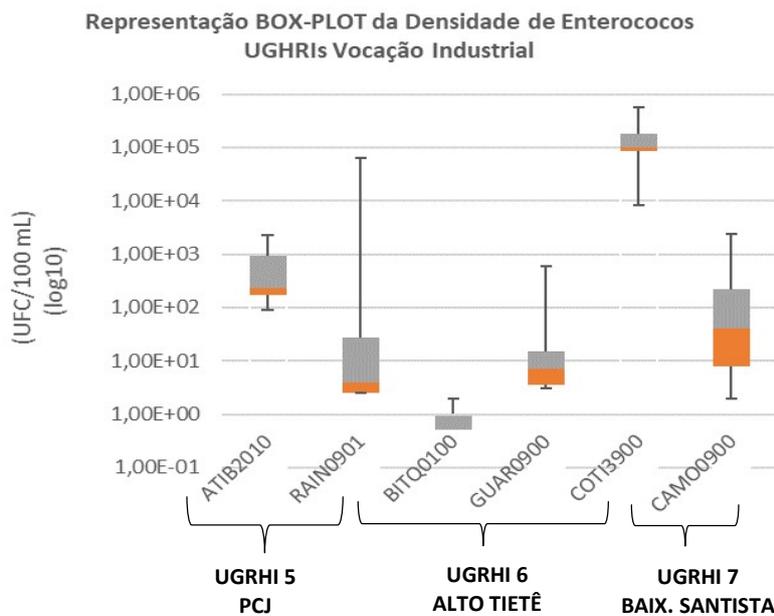
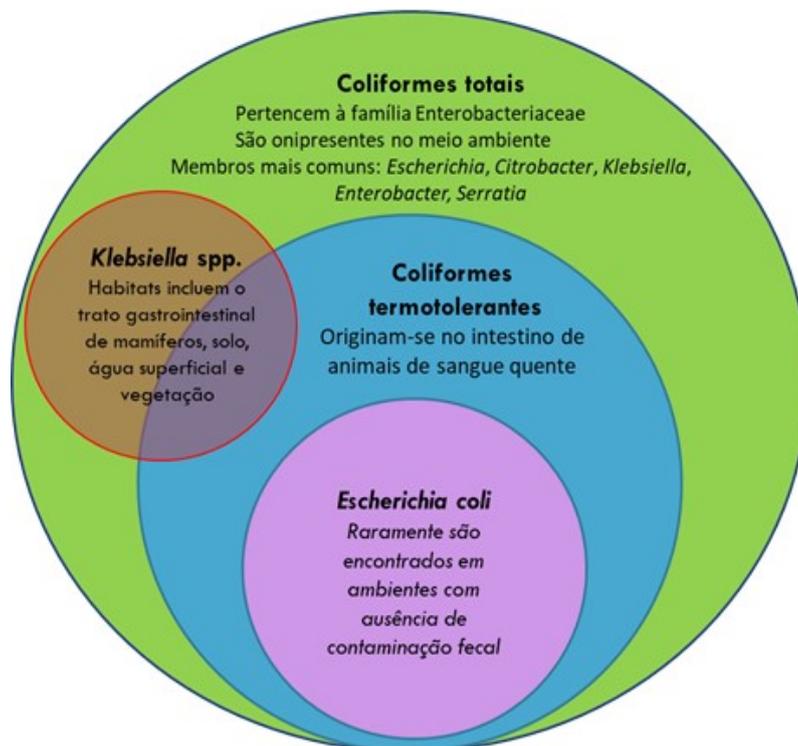


Figura 9. Representação BOX-PLOT das densidades (UFC/100 mL) dos microrganismos do Grupo Enterococos obtidas nos pontos monitorados UGRHIs de Vocação Industrial, ao longo de 13 meses de amostragem.



Embora a CONAMA 357/2005 preconize o uso dos Coliformes Termotolerantes como indicador de contaminação microbiológica, a *E. coli* poderá ser determinada em substituição a esse parâmetro de acordo com limites estabelecidos pelo órgão ambiental competente. Os Enterococos são um dos 3 indicadores estabelecidos na Resolução CONAMA 274, de 29/2000 para balneabilidade. Ambos são amplamente aceitos na literatura, tratam-se de indicadores mais específicos de contaminação fecal, pois são microrganismos associados ao trato gastrointestinal dos animais em geral. Os Coliformes Termotolerantes são um subgrupo dos Coliformes Totais, e espera-se que em águas com poluição de origem fecal estejam presentes em concentrações 10 a 100x vezes inferiores que os Coliformes Totais (Figura 10). As concentrações de *E.coli* obtidas nos pontos de vocação industrial estudados estão apresentadas em anexo.

Figura 10. Infográfico representando a composição do Grupo Coliformes e seus subgrupos.



Analisando-se os resultados constatou-se que os pontos classificados como Classe Especial – RAIN0901, GUAR0900, BITQ0100 e CAMO0900 - exibiram, tanto para o critério Coliformes quanto Enterococos, densidades inferiores ao ponto COTI3900, classificado como classe 3 (Figs. 8 e 9). Dessa forma, ambos os critérios expuseram proporcionalidade quanto à sua variação, indicando que ambos indicadores estão relacionados com o aporte de efluente sanitário nos corpos hídricos avaliados. O ponto ATIB2010, classificado como Classe 2, mostrou densidade de Coliformes e Enterococos intermediária, quando comparados aos de Classe Especial e o de Classe 3.

As Figuras 11 e 12 expressam as médias geométricas da variação temporal da densidade de Coliformes Totais e Enterococos, ao longo dos 13 meses nos pontos com vocação industrial.

Visualiza-se que, em todos os pontos estudados, as densidades médias de microrganismos do Grupo Enterococos foram sempre cerca de 10 a 100 vezes inferiores ao observado às densidades médias obtidas em relação ao Grupo Coliformes. É importante mencionar que existem várias espécies do grupo Coliformes que são residentes do próprio ambiente, explicando a proporção aumentada de Coliformes em relação aos Enterococos, quando a análise é realizada em amostras de origem ambiental pelos métodos de ensaio empregados.

Dados recentes provenientes do sequenciamento da microbiota do trato gastrointestinal humano demonstram que, relativamente poucos filos compõe a microbiota intestinal, sendo os mais abundantes: Firmicutes e Bacteroidetes (Walsh *et al.*, 2014). O grupo Enterococos pertence ao filo Firmicutes, o que sugere que, possivelmente, esse grupo é composto por microrganismos mais específicos para o estudo da poluição de origem fecal.

O grupo dos Coliformes, pertencente ao filo Proteobacteria, composto por vários gêneros da família *Enterobacteriaceae* e outras espécies de origem estritamente ambiental, engloba a espécie *Escherichia coli*, microrganismo de origem exclusivamente fecal, sempre presente, em densidades elevadas nas fezes de animais de sangue quente, sendo raramente encontrada na água ou solo contaminado. Optou-se, dessa forma, pela análise de Coliformes Totais para avaliação da qualidade microbiológica dos corpos hídricos estudados e observação de uma maior diversidade microbiana nesses locais, a fim de se distinguir padrões diferentes nos casos de contaminação fecal.

Figura 11. Médias Geométricas e Desvios Padrões das densidades de Coliformes Totais quantificados, ao longo da amostragem, realizada nos pontos de coleta, nas UGRHs com Vocação Industrial.

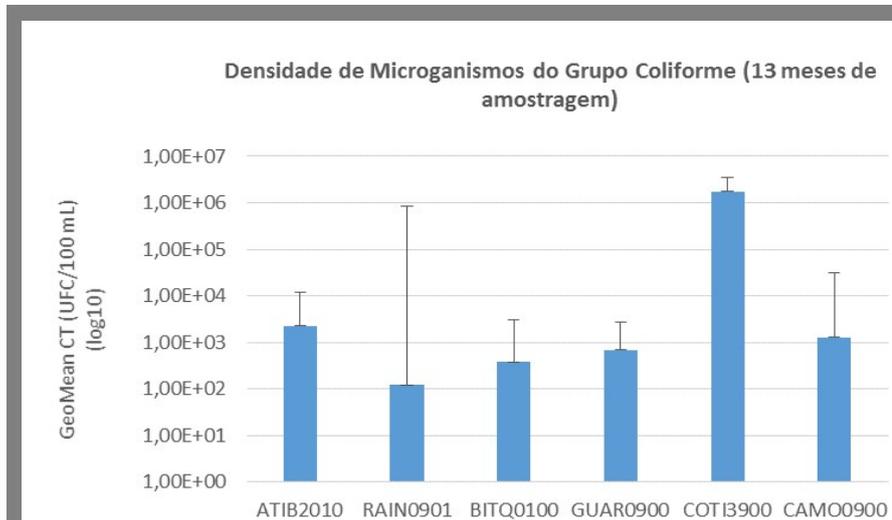
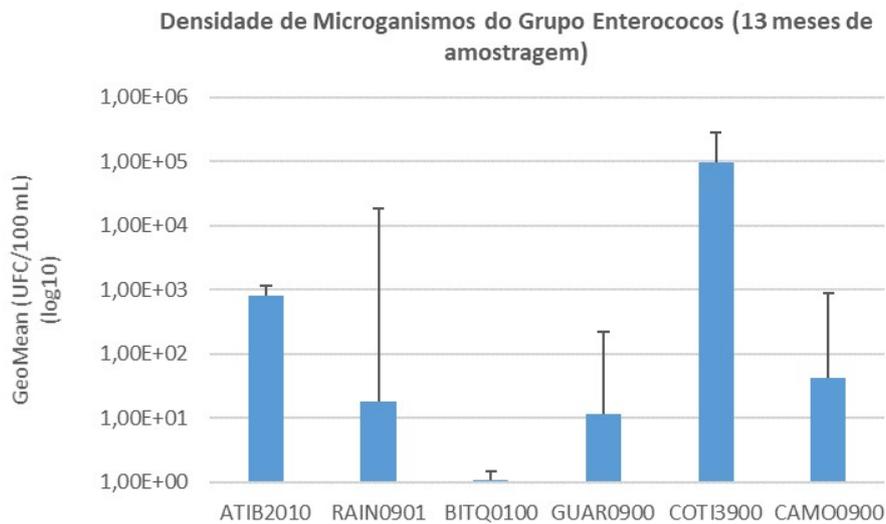


Figura 12. Médias Geométricas e Desvios Padrões das densidades de Enterococos quantificados ao longo da amostragem realizada nos pontos de coleta, nas UGRHs com Vocação Industrial.





COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

Na análise das Figuras 11 e 12, aventa-se que o ponto BITQ0100, localizado no ponto de captação da SABESP no interior da Represa Billings indicou, a melhor qualidade sanitária em relação aos parâmetros analisados, quando comparado aos demais pontos. De forma oposta, o ponto COTI3900 mostrou a pior qualidade, indicando densidades consistentes de indicadores de contaminação microbiana acima de 10^6 UFC/100 mL de Coliformes Totais e 10^5 UFC/100 mL de Enterococos. Os demais ficaram em uma posição intermediária entre os mencionados, exceto pelo RAIN0901, indicando uma variação significativa nas densidades dos parâmetros amostrados, exibindo, ainda uma tendência de conter uma água de melhor qualidade sanitária do que os demais. Na captação da SABESP (Guarapiranga) GUAR0900, a mediana de Coliformes Totais foi de 80 UFC/100 mL e 7 UFC/mL de Enterococos, sugerindo que este e o BITQ0100 indicaram melhor qualidade microbiológica, sendo que, provavelmente, este dado indica que os corpos hídricos nos quais estes pontos estão inseridos, exprimiriam conformidade com seus enquadramentos propostos (Classe Especial), constatados anualmente pela CETESB.

Analisando-se de forma qualitativa os tipos de microrganismos das amostras, constatou-se uma significativa variação na diversidade global de microrganismos. (Tabela 6). Apurou-se que o grupo Coliformes mostrou maior diversidade do que o grupo Enterococos. Esse dado é presumido, uma vez que a diversidade de gêneros bacterianos que compõe o grupo Coliformes é superior ao número de gêneros que compõe o grupo Enterococos (Zhang *et al.*, 2015; Lebreton *et al.*, 2014; Hardie and Whiley, 1997).

A técnica de espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF mostrou-se extremamente eficiente na identificação da diversidade microbiana isolada em amostras de água, quando utilizada formas de cultivo tradicionais (meios de cultura tanto não seletivos quanto diferenciais). Na amostragem dos pontos de água doce, 832 isolados foram catalogados, e a técnica de MS MALDI-TOF foi capaz de identificar 828 linhagens de um total de 832 isolados (99,5%), restando apenas quatro amostras que foram submetidas ao sequenciamento parcial do gene do DNA ribossomal 16S para a obtenção da identificação correta.

Tabela 6. Diversidade de microrganismos encontrada nos pontos de água doce pertencentes a todas as UGRHs (Industrial, Agropecuária, Em Industrialização e Conservação) amostrados no Projeto.

ID MALDI-TOF + Sequenciamento	Nº de isolados
<i>Aeromonas caviae</i>	52
<i>Aeromonas hydrophila</i>	21
<i>Aeromonas jandaei</i>	7
<i>Aeromonas media</i>	2
<i>Aeromonas veronii</i>	7
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1
<i>Citrobacter braaki</i>	1
<i>Citrobacter freundii</i>	27
<i>Comamonas testosteroni</i>	7
<i>Cronobacter sakazakii</i>	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3
<i>Enterobacter amnigenus</i>	1
<i>Enterobacter asburie</i>	25
<i>Enterobacter cloacae</i>	11
<i>Enterobacter cowanii</i>	2
<i>Enterobacter kobei</i>	6
<i>Enterobacter radicincitans</i>	1
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	52
<i>Enterococcus durans</i>	3
<i>Enterococcus faecalis</i>	140
<i>Enterococcus faecium</i>	83
<i>Enterococcus gallinarum</i>	1
<i>Enterococcus hirae</i>	74
<i>Enterococcus mundtii</i>	18
<i>Enterococcus sulfureus</i>	1
<i>Enterococcus villorum</i>	2
<i>Escherichia coli</i>	63
<i>Klebsiella oxytoca</i>	40
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	117
<i>Klebsiella variicola</i>	1
<i>Kluyvera ascorbata</i>	8
<i>Kluyvera intermedia</i>	1
<i>Lactococcus lactis</i>	1
<i>Micrococcus luteus</i>	1
<i>Pantoea ananatis</i>	2
<i>Pantoea sp.</i>	2
<i>Pectobacterium betavasculorum</i>	4
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	1
<i>Pseudomonas koreensis</i>	1
<i>Pseudomonas mendocina</i>	1
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	30
<i>Raoultella terrigena</i>	2
<i>Serratia marcescens</i>	2
<i>Staphylococcus capitis</i>	1
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1
<i>Staphylococcus sciuri</i>	2
<i>Staphylococcus warneri</i>	2
Total de Espécies = 47	Σ=832

Na Tabela 6 constata-se que, considerando a diversidade de microrganismos isolados com a utilização dos meios M-ENDO e MEI, que são seletivos e diferenciais para os grupos Coliformes e Enterococos, respectivamente, obtiveram-se o isolamento de 47 espécies distintas. Numa análise mais aprofundada da diversidade dos microrganismos observa-se que os meios M-ENDO e MEI não foram totalmente específicos para o isolamento dos grupos de microrganismos para os quais estão padronizados. Apurou-se que das 47 espécies isoladas, 32 foram selecionadas no meio M-ENDO, sendo que 23 pertencem ao grupo Coliformes (72%). Acrescenta-se que cerca de 30% de microrganismos isolados do meio M-ENDO não pertencem ao grupo Coliformes, e são, majoritariamente, bactérias do gênero *Aeromonas* (89 isolados) – as bactérias do gênero *Aeromonas* não compõe tipicamente a microbiota intestinal de animais; no entanto, são microrganismos residentes das água superficiais e esgotos, parcialmente justificando o seu aparecimento dentre os isolados. A frequência relativamente elevada com que esse microrganismo foi encontrado pode ser fundamentada pela baixa seletividade do meio m-ENDO para gêneros do grupo Coliformes. Esse meio permite o crescimento de quaisquer microrganismos capazes de fermentar a lactose de forma rápida, tratando-se, portanto, de uma via metabólica relativamente comum em bactérias). Durante a fermentação rápida da lactose, ocorre liberação de aldeídos que, ao reagirem com o meio, são responsáveis pela coloração típica verde brilhante das colônias. Por esse motivo, as colônias típicas selecionadas podem não pertencer ao grupo Coliformes.

Por sua vez, no meio MEI foram identificadas 15 espécies distintas de microrganismos, num total de 382 isolados. Dessas, nove são pertencentes ao grupo Enterococos (60%). No entanto apenas 8 dos 382 isolados (3%) não pertenciam ao grupo dos Enterococos, sugerindo que o meio MEI é altamente específico para o isolamento de microrganismos desse grupo. Destarte, dos 374 isolados de um total de 382, ou seja 97%, foram identificados como espécies do gênero *Enterococcus*.

A Tabela 7 mostra os agrupamentos das espécies pertencentes aos grupos Coliformes e Enterococos, identificados pela análise combinada dos dados de espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF e sequenciamento parcial do DNA ribossomal 16S. Do total de 832 isolados, 721 isolados (87%) pertencem aos grupos de indicadores de contaminação fecal.

Tabela 7. Diversidade de microrganismos pertencentes aos grupos Coliformes e Enterococos isolados nos meios de cultura M-ENDO e MEI, respectivamente, em todas as UGRHs (Industrial, Agropecuária, Em Industrialização e Conservação)

Espécies do Grupo Coliformes	N	Espécies do Grupo Enterococos	N
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	117	<i>Enterococcus faecalis</i>	140
<i>Escherichia coli</i>	63	<i>Enterococcus faecium</i>	83
<i>Klebsiella oxytoca</i>	40	<i>Enterococcus hirae</i>	74
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	30	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	52
<i>Citrobacter freundii</i>	27	<i>Enterococcus mundtii</i>	18
<i>Enterobacter asburie</i>	25	<i>Enterococcus durans</i>	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	11	<i>Enterococcus villorum</i>	2
<i>Kluyvera ascorbata</i>	8	<i>Enterococcus gallinarum</i>	1
<i>Enterobacter kobei</i>	6	<i>Enterococcus sulfureus</i>	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	Σ=374	
<i>Enterobacter cowanii</i>	2	N= N ^o de isolados	
<i>Pantoea ananatis</i>	2		
<i>Pantoea sp.</i>	2		
<i>Raoultella terrigena</i>	2		
<i>Serratia marcescens</i>	2		
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1		
<i>Citrobacter braaki</i>	1		
<i>Cronobacter sakazakii</i>	1		
<i>Enterobacter amnigenus</i>	1		
<i>Enterobacter radicincitans</i>	1		
<i>Klebsiella variicola</i>	1		
<i>Kluyvera intermedia</i>	1		
Σ=347			

No grupo Coliformes, a espécie predominante foi o microrganismo *Klebsiella pneumoniae*, encontrado com uma frequência relativa (FR) de 34%, dentre todos os coliformes identificados. O segundo foi a *Escherichia coli*, com FR% de 18%. Destaca-se que a *Klebsiella pneumoniae*, embora esteja também presente em fezes de animais, pode ocorrer naturalmente no meio ambiente, como no solo e na água, não sendo um bom indicador de contaminação fecal. Aproximadamente 60 a 80% de todas as espécies de *Klebsiella* spp. isoladas de fezes e material clínico são *K. pneumoniae* e são positivas no teste para coliformes termotolerantes (OMS, 2017).

Dentre o grupo Enterococos, o microrganismo mais preponderante foi o *Enterococcus faecalis* (FR = 38%), seguido das espécies *Enterococcus faecium* (FR = 22%) e *Enterococcus hirae* (FR = 20%).

Se for considerada a combinação dos dois grupos de indicadores, os indicadores de contaminação fecal mais prevalentes nas amostragens foram *Enterococcus faecalis* (19%), *Klebsiella pneumoniae* (16%), *Enterococcus faecium* (11%), *Enterococcus hirae* (10%) e *E. coli* (9%), respectivamente.

A baixa frequência de detecção de isolados de *E. coli* deve-se a utilização de um meio para detecção de coliformes totais e não um específico para essa espécie, diferente dos *Enterococcus*, onde foi empregado meio específico para o gênero.

Por outro lado, os dados obtidos demonstram que a *Klebsiella pneumoniae* representa uma parcela significativa do grupo dos coliformes, merecendo uma atenção diferenciada, pois são consideradas patógenos oportunistas. Essas bactérias podem ainda produzir a enzima carbapenemase, que confere resistência aos antibióticos β lactâmicos e são conhecidas como “superbactérias” (Lee *et al*, 2016).

Realizando um corte nesses dados globais, para verificar a diversidade microbiana somente nos pontos das UGRHIs com Vocação Industrial, constatou-se 34 espécies distintas de microrganismos, com prevalência das espécies: *Enterococcus faecium* (13%), *Enterococcus faecalis* (12,7%), *Enterococcus hirae* (10,6%), *Klebsiella pneumoniae* (10,6%) e *E.coli* (8,2%) (Tabela 8).

Denota-se, com base nas características das espécies prevalentes, que os pontos com Vocação Industrial indicaram uma microbiota associada, com características de poluição por esgoto doméstico, principalmente devido à grande frequência relativa dos microrganismos associados à poluição fecal: *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae* e *E.coli*, totalizando 42,5 % dos isolados. No entanto, quando analisada a diversidade microbiana ponto a ponto na área de Vocação Industrial, notou-se algumas diferenças, sendo possível constatar que os grupos Coliformes e Enterococos comportaram-se de forma similar.

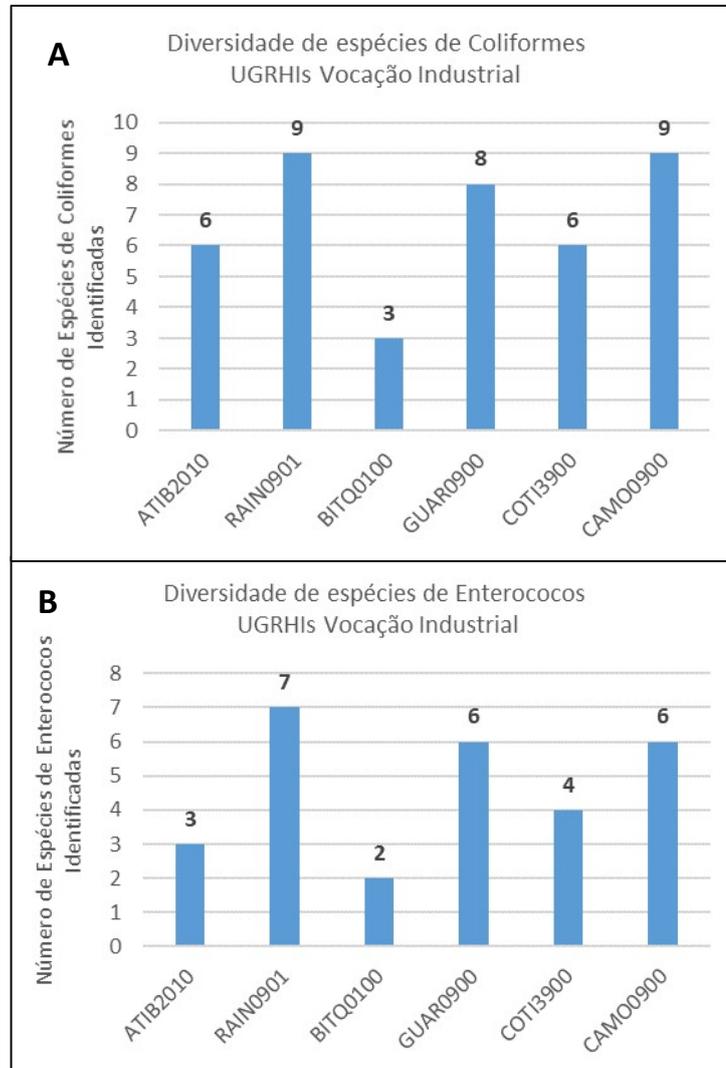
Tabela 8. Diversidade microbiana nos pontos de Vocação Industrial (UGRHs 5, 6 e 7)

Espécies de Microrganismos	Nº Isolados	FR (%)
<i>Enterococcus faecium</i>	49	13,03
<i>Enterococcus faecalis</i>	48	12,77
<i>Enterococcus hirae</i>	40	10,64
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40	10,64
<i>Escherichia coli</i>	31	8,24
<i>Citrobacter freundii</i>	24	6,38
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	21	5,59
<i>Klebsiella oxytoca</i>	19	5,05
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	17	4,52
<i>Aeromonas caviae</i>	14	3,72
<i>Enterobacter asburie</i>	11	2,93
<i>Aeromonas hydrophila</i>	9	2,39
<i>Enterobacter cloacae</i>	9	2,39
<i>Aeromonas veronii</i>	6	1,60
<i>Aeromonas jandaei</i>	4	1,06
<i>Comamonas testosteroni</i>	4	1,06
<i>Kluyvera ascorbata</i>	4	1,06
<i>Enterococcus durans</i>	3	0,80
<i>Enterococcus mundtii</i>	3	0,80
<i>Aeromonas media</i>	2	0,53
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	0,53
<i>Enterococcus villorum</i>	2	0,53
<i>Pectobacterium betavascuLorum</i>	2	0,53
<i>Raoultella terrigena</i>	2	0,53
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	0,27
<i>Cronobacter sakazakii</i>	1	0,27
<i>Enterobacter amnigenus</i>	1	0,27
<i>Enterococcus spLfureus</i>	1	0,27
<i>Kluyvera intermedia</i>	1	0,27
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	1	0,27
<i>Pseudomonas koreensis</i>	1	0,27
<i>Serratia marcescens</i>	1	0,27
<i>Staphylococcus capitis</i>	1	0,27
<i>Staphylococcus warneri</i>	1	0,27
Total de espécies	Σ=376	100,00

Ressalta-se que, os pontos com maior diversidade de espécies de Coliformes foram os mesmos que indicaram maior diversidade de espécies de Enterococos. Visualiza-se na Figura 11, o ponto BITQ0100, mostrando o melhor padrão microbiológico em termos de densidade de indicadores de contaminação e menor diversidade de microrganismo, para ambos os grupos estudados (3 espécies de Coliformes e 2 espécies de Enterococos). Poder-se-ia interpretar tal evento devido o ambiente aquático ser, por definição, oligotrófico, disponibilizando, em condições naturais, quantidades ínfimas de nutrientes, portanto não favorecendo o crescimento microbiano. No entanto, observando-se o comportamento dos demais pontos de vocação industrial em relação à diversidade de microrganismos indicadores de contaminação, não foi possível estabelecer uma correlação clara, pois no ponto COTI3900 onde se observa qualidade microbiológica ruim (altas densidade de indicadores de contaminação microbiológica e, portanto grande aporte de matéria orgânica) deparou-se com uma diversidade relativamente baixa de microrganismos (6 espécies de Coliformes e 4 de Enterococos) quando comparada a outros pontos (Figura 13). Esses resultados evidenciam uma maior competitividade dos microrganismos nesses ambientes, prevalecendo, dessa forma os mais abundantes e resistentes.

O ponto que evidenciou maior diversidade de microrganismos tanto do grupo Coliformes quanto do Enterococos foi o RAIN0901 (Figura 13), que, ao longo do período monitorado, também mostrou o maior desvio padrão constatado nas densidades de microrganismos, ao longo das amostragens, conforme as Figuras 11 e 12.

Figura 13. Diversidade de espécies classificadas taxonomicamente como Coliformes (A) e como Enterococos (B) nos pontos de amostragem localizados nas UGRHIs de Vocação Industrial.



Analisando-se qualitativamente as espécies de microrganismos identificadas nos pontos industriais apurou-se que cada ponto mostrou uma diversidade de microrganismos bastante específica e única (Tabela 9). No entanto, foi possível correlacionar alguns padrões.

Tabela 9. Dados referentes às UGRHIs Industriais - Análise qualitativa dos microrganismos identificados pelas técnicas de MS MALDI-TOF e sequenciamento parcial do gene do DNA ribossomal 16S. Os microrganismos identificados por ponto de coleta e as frequências relativas (FR%) dentro do universo amostral composto pela somatória dos isolados encontrados ao longo das amostragens de cada ponto. Os resultados indicam a diversidade global identificada, não só apenas dos grupos de indicadores de contaminação fecal.

ATIB 2010 - UGRHI 5 - Industrial	Nº Isolados	FR%
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	16,67
<i>Enterococcus faecium</i>	10	16,67
<i>Enterococcus hirae</i>	10	16,67
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	15,00
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	7	11,67
<i>Escherichia coli</i>	6	10,00
<i>Aeromonas caviae</i>	2	3,33
<i>Pectobacterium betavascuLorum</i>	2	3,33
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	1,67
<i>Cronobacter sakazakii</i>	1	1,67
<i>Enterobacter asburie</i>	1	1,67
<i>Kluyvera ascorbata</i>	1	1,67
N diversidade total = 12	60	100,00
RAIN 0901 - UGRHI 5 - Industrial	Nº Isolados	FR%
<i>Enterococcus faecalis</i>	19	21,11
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	15,56
<i>Klebsiella oxytoca</i>	9	10,00
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	8	8,89
<i>Aeromonas jandaei</i>	4	4,44
<i>Enterococcus hirae</i>	4	4,44
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	4	4,44
<i>Aeromonas caviae</i>	3	3,33
<i>Citrobacter freundii</i>	3	3,33
<i>Enterococcus faecium</i>	3	3,33
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	2,22
<i>Aeromonas media</i>	2	2,22
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	2,22
<i>Enterobacter asburie</i>	2	2,22
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	2,22
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	1	1,11

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

RAIN 0901 - UGRHI 5 - Industrial	Nº Isolados	FR%
<i>Comamonas testosteroni</i>	1	1,11
<i>Enterococcus durans</i>	1	1,11
<i>Enterococcus mundtii</i>	1	1,11
<i>Enterococcus villorum</i>	1	1,11
<i>Escherichia coli</i>	1	1,11
<i>Pseudomonas koreensis</i>	1	1,11
<i>Staphylococcus capitis</i>	1	1,11
<i>Staphylococcus warneri</i>	1	1,11
N diversidade = 24	90	100,00
BITQ 0100 - UGRHI 6 - Industrial	Nº Isolados	FR%
<i>Citrobacter freundii</i>	16	47,06
<i>Enterobacter asburie</i>	6	17,65
<i>Aeromonas veronii</i>	3	8,82
<i>Comamonas testosteroni</i>	3	8,82
<i>Enterococcus hirae</i>	3	8,82
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	2,94
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1	2,94
<i>Serratia marcescens</i>	1	2,94
N diversidade = 8	34	100,00
GUAR 0900 - UGRHI 6 - Industrial	Nº Isolados	FR%
<i>Enterococcus faecium</i>	13	20,00
<i>Enterococcus hirae</i>	10	15,38
<i>Aeromonas cavie</i>	7	10,77
<i>Escherichia coli</i>	6	9,23
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6	9,23
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	6,15
<i>Citrobacter freundii</i>	3	4,62
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	4,62
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	3,08
<i>Aeromonas veronii</i>	2	3,08
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	2	3,08
<i>Enterobacter asburie</i>	1	1,54
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	1,54
<i>Enterococcus sulfureus</i>	1	1,54
<i>Enterococcus villorum</i>	1	1,54
<i>Kluyvera intermedia</i>	1	1,54

RAIN 0901 - UGRHI 5 - Industrial	Nº Isolados	FR%
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	1	1,54
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1	1,54
N diversidade = 18	65	100,00
COTI 3900 - UGRHI 6 - Industrial	Nº Isolados	FR%
<i>Enterococcus faecium</i>	14	23,33
<i>Enterococcus faecalis</i>	8	13,33
<i>Escherichia coli</i>	8	13,33
<i>Enterococcus hirae</i>	6	10,00
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	6	10,00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	8,33
<i>Aeromonas caviae</i>	2	3,33
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	3,33
<i>Citrobacter freundii</i>	2	3,33
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	2	3,33
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	3,33
<i>Kluyvera ascorbata</i>	2	3,33
<i>Aeromonas veronii</i>	1	1,67
N diversidade = 13	60	100,00
CAMO 0900 - UGRHI 7 - Industrial	Nº Isolados	FR%
<i>Escherichia coli</i>	10	14,93
<i>Enterococcus faecium</i>	9	13,43
<i>Enterococcus faecalis</i>	8	11,94
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	11,94
<i>Enterococcus hirae</i>	7	10,45
<i>Enterobacter cloacae</i>	6	8,96
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	4	5,97
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	3	4,48
<i>Enterococcus durans</i>	2	2,99
<i>Enterococcus mundtii</i>	2	2,99
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	2,99
<i>Raoultella terrigena</i>	2	2,99
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	1,49
<i>Enterobacter amnigenus</i>	1	1,49
<i>Enterobacter asburie</i>	1	1,49
<i>Kluyvera ascorbata</i>	1	1,49
N diversidade = 16	67	100,00

Ao se considerar as quatro espécies mais prevalentes por ponto amostrado, constata-se que mais de 50% dos microrganismos isolados estão classificados nessa categoria, portanto tratando-se de um subgrupo amostral representativo (Tabela 10).

Tabela 10. Espécies prevalentes de microrganismos dos Grupos Coliformes e Enterococos encontradas nos pontos amostrados nas UGRHs de Vocação Industrial e suas respectivas frequências relativas (FR).

Ponto de Amostragem	Espécies de Microrganismos	FR (%)
ATIB0100 UGRHI 5	<i>Enterococcus faecalis</i>	16,67
	<i>Enterococcus faecium</i>	16,67
	<i>Enterococcus hirae</i>	16,67
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15,00
RAIN0901 UGRHI 5	<i>Enterococcus faecalis</i>	21,11
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15,56
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	10,00
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	8,89
BITQ010 UGRHI 6	<i>Citrobacter freundii</i>	47,06
	<i>Enterobacter asburie</i>	17,65
	<i>Aeromonas veronii</i>	8,82
	<i>Comamonas testosteroni</i>	8,82
GUAR0900 UGRHI 6	<i>Enterococcus faecium</i>	20,00
	<i>Enterococcus hirae</i>	15,38
	<i>Aeromonas caviae</i>	10,77
	<i>Escherichia coli</i>	9,23
COTI3900 UGRHI 6	<i>Enterococcus faecium</i>	23,33
	<i>Enterococcus faecalis</i>	13,33
	<i>Escherichia coli</i>	13,33
	<i>Enterococcus hirae</i>	10,00
CAMO0900 UGRHI 7	<i>Escherichia coli</i>	14,93
	<i>Enterococcus faecium</i>	13,43
	<i>Enterococcus faecalis</i>	11,94
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11,94

Considerando-se esse dado, constata-se que o ponto BITQ0100, representando o menos impactado por poluição fecal, indicou como as espécies mais prevalentes os microrganismos: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter asburie*, *Aeromonas veronii* e *Comamonas testosteroni* (Tabela 10). Como já mencionado,



COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

bactérias do gênero *Aeromonas*, não estão relacionadas diretamente com o aporte de poluição fecal, pois são microrganismos residentes de águas superficiais e esgotos. Por sua vez, o gênero *Citrobacter* é composto por espécies ubíquas na natureza, sendo encontradas em amostras de água, solo e também esgoto. As bactérias do gênero *Enterobacter* também não se relacionam diretamente à presença de fezes de animais, pois podem estar presentes em diversos microbiomas, inclusive em plantas. E, finalmente, o microrganismo *Comamonas testosteroni* é uma bactéria Gram negativa, comumente encontrada em amostras de solo, e não está relacionada com poluição de origem fecal. Com base nessas informações, aventa-se que a microbiota predominante no ponto BITQ0100 não é exclusiva de origem fecal, corroborando com a análise das densidades dos indicadores de contaminação fecal, revelando que esse ponto possui uma qualidade sanitária da água considerada boa.

Analisando-se as espécies mais preponderantes nos pontos com pior qualidade sanitária - COTI3900, CAMO0900 e ATIB2010 - constata-se que duas das quatro espécies prevalentes - *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* - se repetem, sendo que ambas são reconhecidas na literatura como indicadoras de contaminação fecal. As espécies do gênero *Enterococcus* (filo Firmicutes), são atualmente descritas como comensais do trato gastrointestinal nos estudos de metagenômica da microbiota intestinal humana (Qin *et al.*, 2010). Lebreton e cols. (2014) recentemente revisaram o gênero *Enterococcus* concluindo que as espécies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* e *E. durans* são estritamente relacionadas com o trato gastrointestinal de mamíferos, sendo que as demais estão mais associadas à águas superficiais, répteis, pássaros, insetos e plantas. Na água, as espécies consideradas como contaminantes de origem fecal são *E. faecalis* e *E. faecium* e ambas estão relacionadas com aporte de esgoto doméstico nesse ambiente (Aarestrup, Butaye and Witte. 2002).

Os pontos COTI3900 e CAMO0900 também indicaram, dentre as três espécies prevalentes, o microrganismo *Escherichia coli*, Coliforme classicamente descrito como comensal do trato gastrointestinal de animais de sangue quente.

O ponto ATIB2010 também exibiu, além das espécies de *Enterococcus* (*E. faecium* e *E. faecalis*), os microrganismos *E. hirae* e *Klebsiella pneumoniae* como preponderantes. As três espécies de *Enterococcus* estão relacionadas com poluição de origem fecal como já mencionado, corroborando mais uma vez com o resultado da densidade de indicadores de contaminação fecal, elevado durante todas as amostragens. Já o gênero *Klebsiella* é composto por bactérias ubíquas na natureza e ~~pode ser~~ também encontrado em amostras contaminadas por poluição fecal.

O ponto RAIN0901 indicou como espécies prevalentes os microrganismos: *Enterococcus faecalis* e *casseliflavus*, e *Klebsiella pneumoniae* e *oxytoca*. As espécies de *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, como já discutido, são microrganismos comensais de trato gastrointestinal de mamíferos. Notadamente, *E. casseliflavus* associa-se com o trato gastrointestinal de mamíferos selvagens e plantas, assim como as demais espécies de *Enterococcus* que expressam pigmentos, de modo que possa ser descrita como sendo um contaminante mais de origem ambiental do que proveniente de contaminação fecal. Já o gênero *Klebsiella* é composto por bactérias ubíquas na natureza e a *K. pneumoniae* é a espécie do gênero que está mais relacionada com águas poluídas com material fecal, pois faz parte da microbiota residente ou transiente de animais, inclusive dos doentes, porém, não relaciona-se a um grupo específico. Por sua vez, a espécie *K. oxytoca* integra a rizosfera de várias plantas fixadoras de nitrogênio, portanto é um microrganismo de origem mais ambiental. Destarte o ponto RAIN0901 foi o que mostrou a maior variação na densidade de indicadores de contaminação fecal, expondo como espécies prevalentes uma mistura de microrganismos de origem fecal e ambiental, indicando que nas coletas detectaram-se maiores concentração de indicadores, apontando que o corpo hídrico havia recebido descargas de esgoto recente.

Finalmente, no ponto GUAR0900, os microrganismos prevalentes detectados foram: *E. faecium* e *E. hirae*, *Aeromonas caviae* e *Escherichia coli*. Esta última e as espécies de *Enterococcus* relacionam-se com o aporte de esgoto no ambiente aquático e a bactéria *Aeromonas caviae* é residente de esgoto. Esse dado indica que, apesar das densidades dos indicadores de contaminação fecal não mostrarem-se elevadas, principalmente do indicador do grupo Enterococos, oscilando entre 7 e 600 UFC/100 mL, a diversidade de microrganismos mostra que, provavelmente, ocorre descargas de esgoto doméstico contínuas nesse ambiente.

Todos esses pontos analisados pertencem à UGRHIs de Vocação Industrial, portanto sabe-se que são pontos que sofrem influência direta de esgotos domésticos e industriais. A metodologia de identificação da diversidade dos microrganismos, dentre o universo dos indicadores de contaminação fecal, provou-se, adequada, uma vez que nos pontos mais contaminados depararam-se com bactérias estritamente relacionadas com o trato gastrointestinal de mamíferos, incluindo humanos. Em contraponto, o ponto menos contaminado, exibiu uma diversidade de bactérias com características ambientais, substanciando a ideia do uso dessa metodologia como ferramenta complementar na análise da densidade dos indicadores de contaminação fecal, para avaliação da qualidade sanitária de um corpo hídrico.

A análise compreensiva dos dados de diversidade dos microrganismos, oriundos das técnicas atuais, utilizadas na rotina do monitoramento da qualidade sanitária dos corpos d'água, tais como o



COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

isolamento de bactérias indicadoras de contaminação fecal pela técnica da membrana filtrante, indica que o agrupamento das espécies mais prevalentes em determinado ponto, aponta para o tipo de poluição o ambiente aquático está sofrendo ao longo do tempo.

6.3.2. UGRHIS 15,19, 20, 21 e 22 - VOCAÇÃO AGROPECUÁRIA

Os pontos selecionados como representativos das UGRHIs com vocação agropecuária foram: TURV2500, XOTE2500, LAGE2500, IACR3750, PEIX2800 e STAN2700, sendo que TURV2500 pertence à UGRHI 15 (bacia do Rio Turvo-Grande), XOTE2500 e LAGE2500 à UGRHI 19 (bacia do Baixo Tietê), IACR3750 à UGRHI 20 (bacia do Rio Aguapeí), PEIX2800 à UGRHI 21 (bacia do Rio Peixe) e, STAN2700 à UGRHI 21 (bacia do Pontal do Paranapanema).

A distribuição dos pontos de vocação agropecuária dispersa-se por todo o nordeste e centro-oeste do Estado de São Paulo, exceto os pontos XOTE2500 e LAGE2500, que localizam-se próximos, todos os demais estão geograficamente espalhados pelas principais bacias hidrográficas no interior do Estado. A exceção do ponto IACR3750, classificado como Classe 3 de acordo com os critérios da CONAMA 357/05, todos os demais estão classificados como Classe 2 conforme Relatório de Qualidade das Águas Superficiais do Estado de São Paulo do ano de 2015 (CETESB, 2016).

Para cada ponto das UGRHIs com Vocação Agropecuária foram realizadas de 5 a 7 amostragens, dependendo da disponibilidade das viagens para cada uma das regiões.

As Figuras 14 e 15 mostram, respectivamente, as densidades dos indicadores do grupo Coliformes e do grupo Enterococos nos pontos de coleta estudados.

Durante o período de amostragem do Projeto, de cada ponto da UGRHIs com Vocação Agropecuária foram coletadas de 5 a 7 amostras dependendo da disponibilidade das viagens realizadas pela equipe coletora.

A análise dos dados referentes às densidades de ambos indicadores de contaminação fecal (Grupo Coliformes e Grupo Enterococos) nas UGRHIs de Vocação Agropecuária indica que não ocorreu variação significativa desses parâmetros nos locais selecionados. Apesar do ponto IACR3750 ser o único classificado como Classe 3, somente o indicador do Grupo Coliformes mostrou mediana superior (34000 UFC/100 mL) em relação às aquelas constatadas nos demais pontos, classificados como Classe 2 (Figura 14). As medianas das densidades para o Grupo Coliformes variaram entre 10^3 e 10^4 UFC/100 mL (Figura 14), e entre 10^2 e 10^3 UFC/100 mL para Enterococos (Figura 15), sendo que as flutuações das densidades dos indicadores de contaminação microbológica seguiram as mesmas tendências para os dois grupos de microrganismos.

Figura 14. Representação BOX-PLOT das densidades (UFC/100 mL) dos microrganismos do Grupo Coliformes nos pontos monitorados das UGRHIs com Vocação Agropecuária.

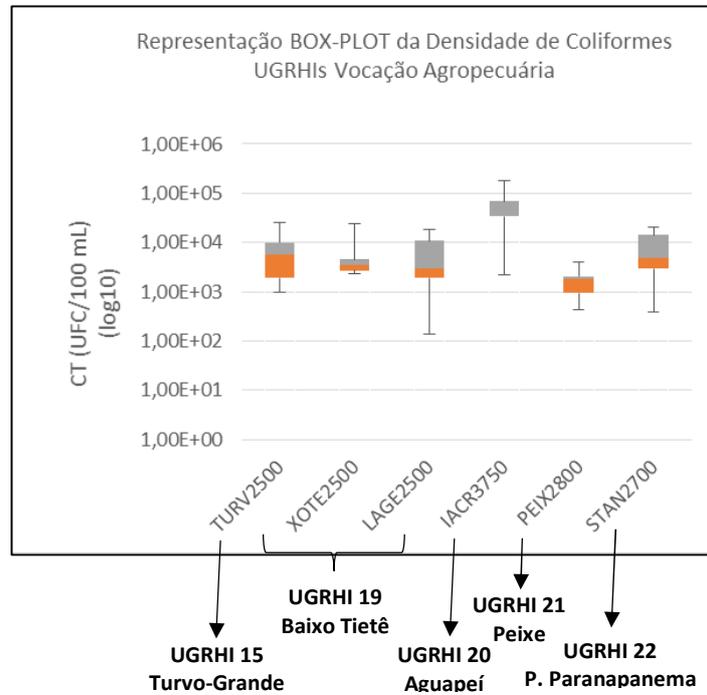
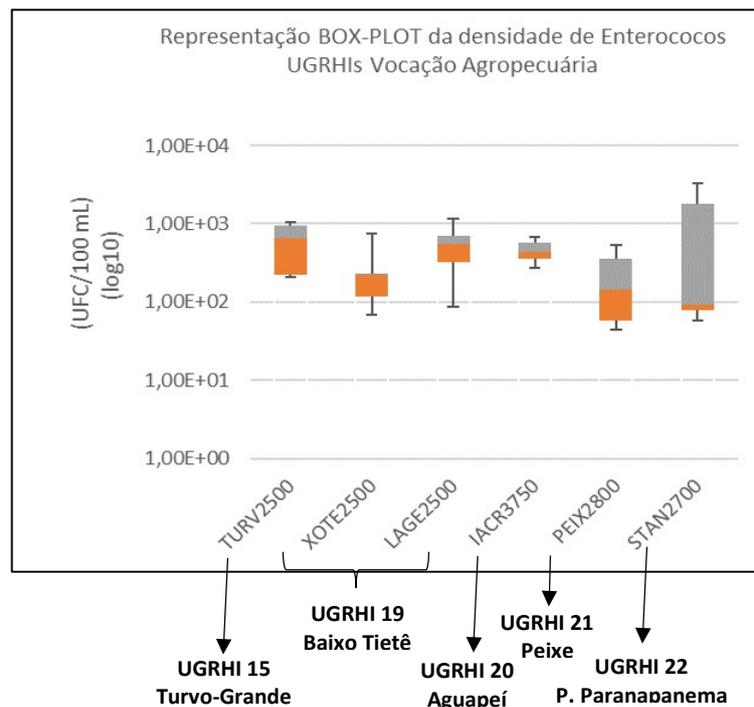


Figura 15. Representação BOX-PLOT das densidades (UFC/100 mL) dos microrganismos do Grupo Enterococos nos pontos monitorados das UGRHIs de Vocação Agropecuária.



As médias geométricas da variação temporal da densidade de Coliformes Totais e Enterococos estão descritas nas figuras 16 e 17. Reproduzindo a tendência constatada nas UGRHs de Vocação Industrial, as densidades médias de microrganismos do Grupo Enterococos, neste caso, exibiram cerca de 10 vezes menores do que o mensurado para o Grupo Coliforme.

A variação constatada das médias geométricas das densidades tanto do Grupo Coliformes como para Enterococos (Figuras 16 e 17) mostrou-se ínfima, dado esse esperado por se tratarem da mesma Classe (exceto IACR3750). A média das densidades de Coliformes totais, entre 10^3 e 10^4 UFC/100 mL, indica que, em relação ao critério de qualidade sanitária, todos os pontos atendem ao seu enquadramento (Classes 2 e 3) (CETESB, 2015; CETESB, 2016). Os dados de *E.coli* para esses pontos-estão reportados no Anexo). De forma análoga aos resultados das UGRHs Industriais, as variações da densidade dos grupos de microrganismos se comportaram de forma similar, sempre havendo uma menor concentração de Enterococos do que Coliformes.

Figura 16. Médias Geométricas e Desvio Padrão das densidades de Coliformes Totais quantificados ao longo da amostragem realizada nos pontos de coleta nas UGRHs com Vocação Agropecuária.

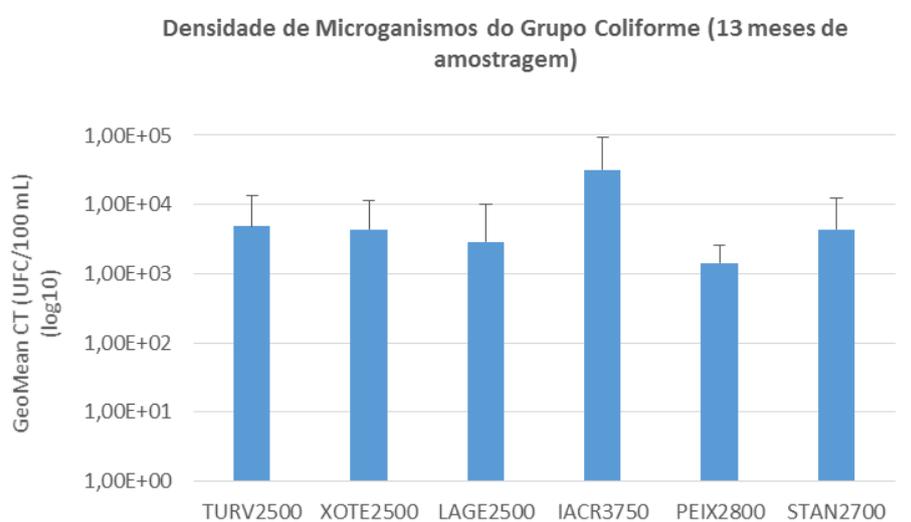
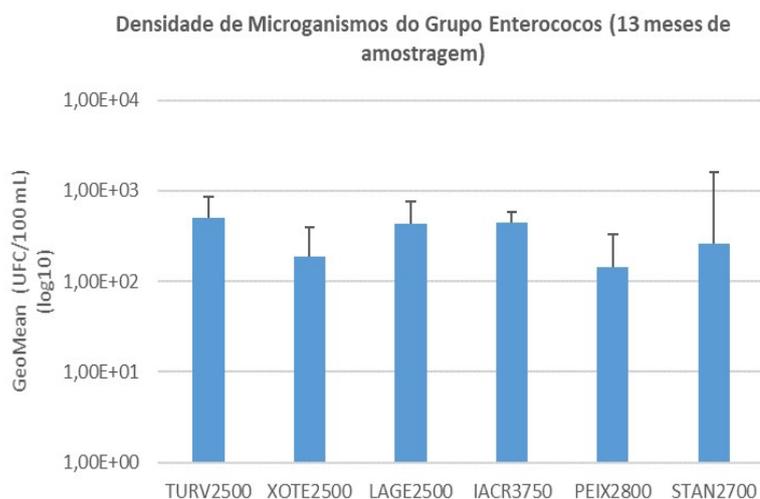


Figura 17. Médias Geométricas e Desvios Padrões das densidades de Enterococos quantificados ao longo da amostragem realizada nos pontos de coleta nas UGRHIs com Vocação Agropecuária



A pequena variação observada em relação aos parâmetros microbiológicos coincide com o constatado aos parâmetros físico-químico (Tabela 5). Os pontos localizados nas UGRHIs de Vocação Industrial variaram muito pouco entre si em relação à temperatura da água, pH, OD e coloração da água. Exceto o ponto XOTE2500, com média geométrica de 1,7 mg/mL de OD, muito abaixo do requerido para classes 2 (5 mg/L) e 3 (4 mg/L) pela CONAMA 357/2005).

Em relação à análise qualitativa global da diversidade dos microrganismos identificados pela técnica combinada de MS MALDI-TOF e Sequenciamento parcial do gene do DNA ribossomal 16S, verificou-se inicialmente o conjunto formado pelas espécies oriundas dos pontos de Vocação Agropecuária. A Tabela 11 mostra que o número de espécies foi de 30, um pouco inferior ao constatado na UGRHIs de Vocação Industrial (34 espécies – Tabela 8). As espécies dos isolados prevalentes foram: *Enterococcus faecalis* (22,8%), *Klebsiella pneumoniae* (18,6%), *Enterococcus casseliflavus* (7,8%) e *Escherichia coli* (7,8%).

Tabela 11. Diversidade microbiana encontrada nos pontos de Vocação Agropecuária (UGRHs 15, 19, 20, 21 e 22).

Espécies de Microrganismos	No. Isolados	FR (%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	82	22,78
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	67	18,61
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	28	7,78
<i>Escherichia coli</i>	28	7,78
<i>Aeromonas caviae</i>	27	7,50
<i>Enterococcus faecium</i>	25	6,94
<i>Enterococcus hirae</i>	25	6,94
<i>Enterococcus mundtii</i>	15	4,17
<i>Klebsiella oxytoca</i>	14	3,89
<i>Aeromonas hydrophila</i>	10	2,78
<i>Enterobacter asburie</i>	5	1,39
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	5	1,39
<i>Kluyvera ascorbata</i>	4	1,11
<i>Aeromonas jandaei</i>	3	0,83
<i>Citrobacter freundii</i>	3	0,83
<i>Comamonas testosteroni</i>	2	0,56
<i>Enterobacter kobei</i>	2	0,56
<i>Pantoea ananatis</i>	2	0,56
<i>Pantoea sp.</i>	2	0,56
<i>Aeromonas veronii</i>	1	0,28
<i>Citrobacter braaki</i>	1	0,28
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0,28
<i>Enterobacter cowanii</i>	1	0,28
<i>Enterobacter radicincitans</i>	1	0,28
<i>Lactococcus lactis</i>	1	0,28
<i>Micrococcus luteus</i>	1	0,28
<i>Pectobacterium betavascuLorum</i>	1	0,28
<i>Pseudomonas mendocina</i>	1	0,28
<i>Serratia marcescens</i>	1	0,28
<i>Staphylococcus warneri</i>	1	0,28
Σ=376	360	100,00



COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

Analisando-se a frequência relativa das espécies prevalentes, diferentemente do observado nas UGRHIs Industriais, existe uma proporção menor de microrganismos exclusivos de poluição por esgoto doméstico (22,8% *E. faecalis*) e uma proporção maior de microrganismos relacionados com contaminação fecal de outros animais, como também poluição difusa (34,2% *K. pneumoniae*, *E. casseliflavus* e *E. coli*) (Tabela 8).

Os pontos situados nas UGRHIs de Vocação Agropecuária indicaram uma diversidade média de microrganismos semelhantes àquela observada nos pontos de pior qualidade sanitária nas UGRHIs de Vocação Industrial (Figura 18).

A diversidade de microrganismos do Grupo Coliformes foi mais elevada do que a do Grupo Enterococos (Figura 18). Os pontos TURV2500, XOTE2500 e LAGE2500 apresentaram maior número de espécies do que os pontos IACR3750, PEIX2800 e STAN2700; porém, a variação de diversidade não se correlacionou de nenhuma forma com a densidade dos Coliformes verificada nos pontos de coleta. A variação das medianas das densidades dos Coliformes para os pontos de classe 2 ficou entre 1800 UFC/100 mL (PEIX2800) e 5700 UFC/100 mL (TURV2500). Para o ponto classe 3, IACR2750, a mediana aferida foi de 34000 UFC/100 mL (Figura 16). Nas Figuras 16 e 18A, os pontos com densidades semelhantes de Coliformes, oscilaram, em relação à diversidade de microrganismos, entre 4 e 8 espécies distintas. O ponto com maior diversidade de Coliformes (8 espécies distintas), foi o LAGE2500, com mediana C. Totais de 3000 UFC/100 mL, impossibilitando inferir nenhum tipo de correlação o número de espécies de microrganismos e essa faixa de densidade de Coliformes.

O Grupo Enterococos praticamente não mostrou uma variação no número de espécies (Figura 15 B). O ponto com a maior mediana de densidade de microrganismos do Grupo Enterococos - TURV2500 (660 UFC/100 mL) - apresentou 5 espécies distintas, e, nos demais, com uma variação na densidade entre 93 UFC/100 mL (STAN2700) e 560 UFC/100 mL (LAGE2500), foram reportadas espécies diferentes (Figuras 14 e 15).

Comparando-se o número de espécies distintas dos grupos Coliformes e Enterococos com Vocação Agropecuária com os das UGRHIs de Vocação Industrial, aferiu-se que o mais poluído COTI3900 (Figura 13) mostrou uma diversidade de 6 espécies de Coliformes e 4 de Enterococos, número muito próximo ao observado nos pontos de Vocação Agropecuária. No entanto, avaliando-se qualitativamente as espécies de microrganismos associados aos pontos de Vocação Agropecuária, constata-se diferença das microfloras associadas a pontos com vocações distintas. A Tabela 12 mostra a diversidade global dos pontos das UGRHIs com Vocação Agropecuária

Figura 18. Diversidade de espécies classificadas taxonomicamente como Coliformes (A) e como Enterococos (B) nos pontos localizados nas UGRHs de Vocação Agropecuária.

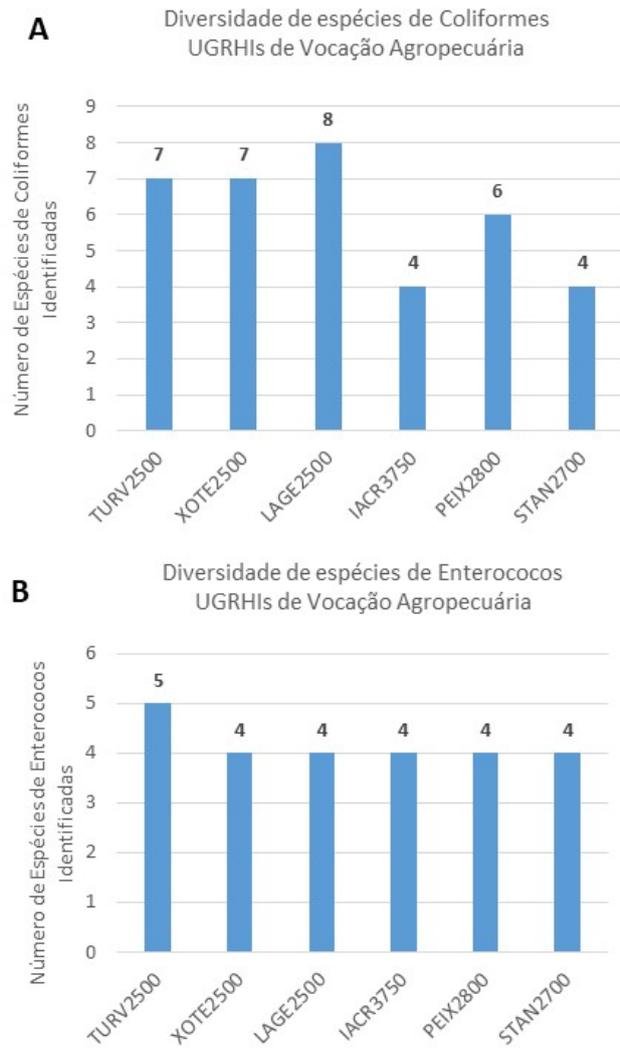


Tabela 12. Análise qualitativa dos microrganismos identificados pelas técnicas de MS MALDI-TOF e sequenciamento parcial do gene do DNA ribossomal 16S. As espécies estão identificadas por ponto de coleta e as frequências relativas (FR%) dentro do universo amostral composto pela somatória dos isolados de cada ponto. Os resultados indicam a diversidade global identificada, não só apenas microrganismos dos grupos de indicadores de contaminação fecal.

TURV 2500 - UGRHI 15 - Agropecuária	No. Isolados	F% relativa
<i>Enterococcus faecium</i>	11	22,00
<i>Aeromonas caviae</i>	6	12,00
<i>Enterococcus faecalis</i>	5	10,00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	10,00
<i>Enterococcus mundtii</i>	4	8,00
<i>Escherichia coli</i>	4	8,00
<i>Enterococcus hirae</i>	3	6,00
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	2	4,00
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	4,00
<i>Pantoea</i> sp.	2	4,00
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	2,00
<i>Citrobacter freundii</i>	1	2,00
<i>Comamonas testosteroni</i>	1	2,00
<i>Enterobacter cowanii</i>	1	2,00
<i>Pectobacterium betavasculorum</i>	1	2,00
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1	2,00
N diversidade = 16	50	100,00
XOTE 2500 - UGRHI 19 - Agropecuária	No. Isolados	F% relativa
<i>Enterococcus faecalis</i>	18	25,71
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	14,29
<i>Enterococcus hirae</i>	9	12,86
<i>Aeromonas caviae</i>	5	7,14
<i>Escherichia coli</i>	5	7,14
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	4	5,71
<i>Aeromonas jandaei</i>	3	4,29
<i>Kluyvera ascorbata</i>	3	4,29
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	2,86
<i>Enterobacter asburie</i>	2	2,86
<i>Enterococcus faecium</i>	2	2,86
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	2,86
<i>Aeromonas veronii</i>	1	1,43
<i>Enterobacter kobei</i>	1	1,43

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

XOTE 2500 - UGRHI 19 – Agropecuária Continuação	No. Isolados	F% relativa
<i>Micrococcus luteis</i>	1	1,43
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1	1,43
<i>Staphylococcus warneri</i>	1	1,43
N diversidade = 17	70	100,00
LAGE 2500 - UGRHI 19 - Agropecuária	No. Isolados	F% relativa
<i>Enterococcus faecalis</i>	22	31,43
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	22,86
<i>Klebsiella oxytoca</i>	7	10,00
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	6	8,57
<i>Enterococcus mundtii</i>	5	7,14
<i>Escherichia coli</i>	4	5,71
<i>Citrobacter freundii</i>	2	2,86
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	2	2,86
<i>Aeromonas caviae</i>	1	1,43
<i>Citrobacter braaki</i>	1	1,43
<i>Enterobacter radicincitans</i>	1	1,43
<i>Enterococcus hirae</i>	1	1,43
<i>Kluyvera ascorbata</i>	1	1,43
<i>Pseudomonas mendocina</i>	1	1,43
N diversidade = 14	70	100,00
IACR 3750 - UGRHI 20 - Agropecuária	No. Isolados	F% relativa
<i>Enterococcus faecium</i>	10	20,00
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	20,00
<i>Enterococcus hirae</i>	9	18,00
<i>Aeromonas caviae</i>	7	14,00
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	8,00
<i>Escherichia coli</i>	4	8,00
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	4,00
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	2	4,00
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	2,00
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1	2,00
N diversidade = 10	50	100,00

PEIX 2800 - UGRHI 21 - Agropecuária	No. Isolados	F% relativa
<i>Enterococcus faecalis</i>	19	31,67
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13	21,67
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	5	8,33
<i>Aeromonas caviae</i>	4	6,67
<i>Aeromonas hydrophila</i>	4	6,67
<i>Enterobacter asburie</i>	3	5,00
<i>Klebsiella oxytoca</i>	3	5,00
<i>Enterococcus faecium</i>	2	3,33
<i>Enterococcus mundtii</i>	2	3,33
<i>Escherichia coli</i>	2	3,33
<i>Enterobacter kobei</i>	1	1,67
<i>Lactococcus lactis</i>	1	1,67
<i>Pantoea ananatis</i>	1	1,67
N diversidade = 13	60	100,00
STAN 2700 - UGRHI 22 - Agropecuária	No. Isolados	F% relativa
<i>Enterococcus faecalis</i>	14	23,33
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13	21,67
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	9	15,00
<i>Escherichia coli</i>	9	15,00
<i>Aeromonas caviae</i>	4	6,67
<i>Enterococcus mundtii</i>	4	6,67
<i>Enterococcus hirae</i>	3	5,00
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	1,67
<i>Comamonas testosteroni</i>	1	1,67
<i>Pantoea ananatis</i>	1	1,67
<i>Serratia marcescens</i>	1	1,67
N diversidade = 11	60	100,00

Verificou-se, analogamente, aos resultados obtidos na Vocação Industrial, que mais de 50% dos microrganismos isolados da região de Vocação Agropecuária classificam-se como uma das quatro espécies prevalentes, tratando-se, portanto, de um subgrupo amostral representativo (Tabela 13).

Tabela 13. Espécies prevalentes de microrganismos dos Grupos Coliformes e Enterococos nos pontos amostrados nas UGRHIs de Vocação Agropecuária e suas respectivas frequências relativas.

Ponto de Amostragem	Espécies de Microrganismos	FR (%)
TURV2500	<i>Enterococcus faecium</i>	22,00
	<i>Aeromonas caviae</i>	12,00
	<i>Enterococcus faecalis</i>	10,00
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
XOTE2500	<i>Enterococcus faecalis</i>	25,71
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14,29
	<i>Enterococcus hirae</i>	12,86
	<i>Aeromonas caviae</i>	7,14
LAGE2500	<i>Enterococcus faecalis</i>	31,43
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	22,86
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	10,00
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	8,57
IACR3750	<i>Enterococcus faecium</i>	20,00
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20,00
	<i>Enterococcus hirae</i>	18,00
	<i>Aeromonas caviae</i>	14,00
PEIX2800	<i>Enterococcus faecalis</i>	31,67
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21,67
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	8,33
	<i>Aeromonas caviae</i>	6,67
STAN2700	<i>Enterococcus faecalis</i>	23,33
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21,67
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	15,00
	<i>Escherichia coli</i>	15,00

A diversidade das espécies de microrganismos prevalentes nos pontos de Vocação Agropecuária, em XOTE2500, LAGE2500, PEIX2800, STAN2700 e IACR3750 indicaram que as espécies *E. faecalis* ou *E. faecium*, e *K. pneumoniae* como sendo as mais frequentes dentre os quatros microrganismos mais prevalentes, sendo que esta semelhança esperava-se somente entre XOTE2500 e LAGE2500 devido à proximidade geográfica. No entanto, dada à semelhança quanto à maioria dos critérios microbiológicos e físico-químicos, esse resultado corrobora com os padrões observados em todos os pontos da UGRHIs de Vocação Agropecuária. Ressalta-se que, embora as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* estejam relacionadas



COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

com o aporte de efluente doméstico, revela a presença significativa do microrganismo *K. pneumoniae* (variando entre 10 a 22%), não observado em frequências relativas elevadas para os pontos de pior qualidade sanitária localizados nas UGRHIs industriais.

Como mencionado anteriormente, microrganismos do gênero *Klebsiella* são ubíquas na natureza. Dessa forma, a *K. pneumoniae* é a espécie do gênero mais relacionada com águas poluídas e com fezes de animais, pois pode fazer parte da microbiota residente ou transiente de animais, inclusive dos doentes, sem especificidade. No entanto não está relacionada com um grupo de animais específico. Ocorreu, também, o aparecimento de frequências elevadas relativas de *E. casseliflavus* (LAGE2500, 8,6%; PEIX2800, 8,3% e STAN2700, 15%) dentre o gênero *Enterococcus*, mais relacionada com o trato gastrointestinal de mamíferos selvagens e plantas. Desse modo, a composição da microflora na UGRHIs com Vocação Agropecuária possui um perfil misto, onde ocorrem microrganismos relacionados com aporte de esgoto doméstico, como também uma porcentagem elevada de microrganismos relacionados com poluição fecal animal e difusa, do próprio meio ambiente.

O ponto TURV2500 foi o único de Vocação Agropecuária que mostrou, dentre as duas espécies mais prevalentes, o microrganismo *Aeromonas caviae* (12%). Vale lembrar que as bactérias do gênero *Aeromonas* são residentes de esgoto, portanto não implicam em recente descarga de efluente sanitário no corpo hídrico. Os outros microrganismos prevalentes foram às espécies *E. faecium* (22%) e *E. faecalis* (10%), característicos de descargas de esgotos domésticos.

A análise compreensiva desses resultados sugere que os pontos localizados nas UGRHIs de Vocação Agropecuária diferiram muito pouco entre si, caracterizados por uma composição de microbiota distinta daquela encontrada em UGRHIs de Vocação Industrial. Constatou-se ainda que, nos pontos das UGRHIs agropecuárias não ocorreu muita variação em relação ao grau contaminação microbiológica, isto é, densidades dos indicadores de contaminação microbiológica ~~encontrada~~ das águas, refletindo na composição da microbiota relativamente semelhante.

6.3.3. UGRHIS 9 e 14 – VOCAÇÕES EM INDUSTRIALIZAÇÃO E CONSERVAÇÃO

Os pontos MOGU2800, Bacia do Rio Mogi-Guaçu, e JURU2500, Bacia do Alto do Paranapanema, foram selecionados como representativos de UGRHIs com Vocações Em Industrialização e Conservação, respectivamente, classificadas com Classe de Qualidade 2, segundo os critérios da CONAMA 375/2005 (CETESB, 2015; CETESB, 2016). Os resultados indicam que a qualidade das águas são distintas, anuindo com a situação desses pontos estarem localizados em UGRHIs com vocações diversas.

Realizaram-se 7 coletas em MOGU2800 e 5 em JURU2500, de acordo com a disponibilidade das viagens de amostragem.

Nas Figuras 19 e 20 visualizam-se os resultados das densidades dos indicadores de contaminação mensurados dos Grupos Coliformes e Enterococos, respectivamente. A água do ponto JURU2500 indicou melhor qualidade sanitária do que o ponto MOGU2800, uma vez que esse último apresentou mediana da densidade de Coliformes de 7100 UFC/100 mL e de 160 UFC/100 ML de Enterococos, superior à registrada na UGRHI de Conservação. O Grupo Coliformes manteve uma proporcionalidade em cerca de 10 a 100 vezes superior ao constatado de microrganismos pertencentes ao Grupo Enterococos.

Figura 19. Representação BOX-PLOT das densidades (UFC/100 mL) dos microrganismos do Grupo Coliformes mensuradas nos pontos MOGU2800 (Vocação Em Industrialização) e JURU2500 (Vocação Conservação)

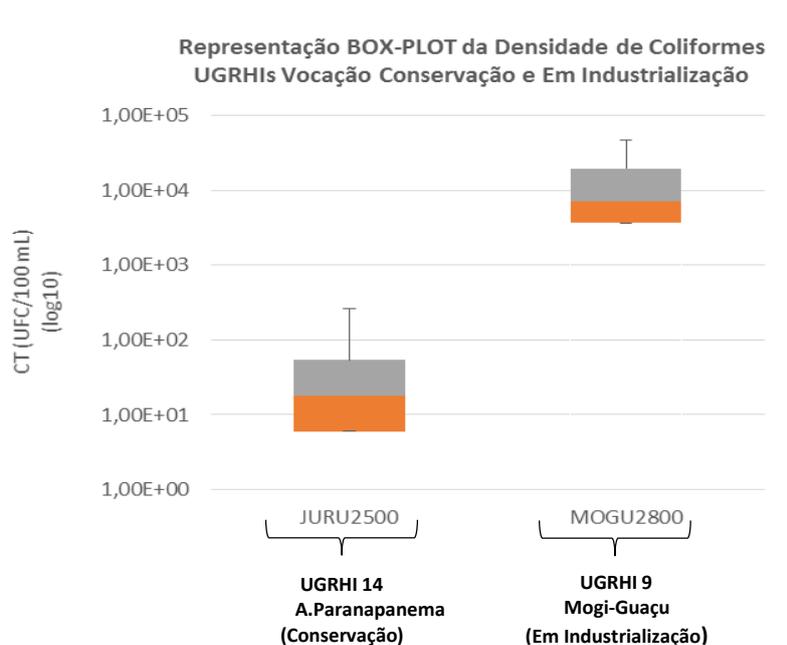
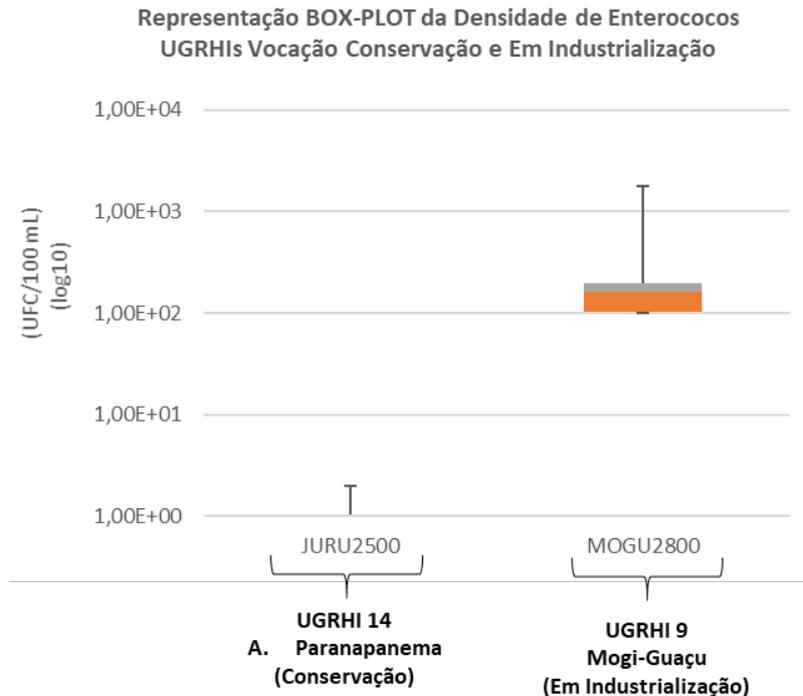


Figura 20. Representação BOX-PLOT das densidades (UFC/100 mL) dos microrganismos do Grupo Enterococos mensuradas nos pontos MOGU2800 (Vocação Em Industrialização) e JURU2500 (Vocação Conservação)



As Figuras 21 e 22 contêm as médias geométricas e os desvios padrões calculados na concentração dos indicadores de contaminação fecal monitorados. Destarte que, em JURU2500 e MOGU2800, constatou-se diferenças qualitativas em relação à microbiota associada a esses ambientes.

A Tabela 14 descreve os microrganismos oriundos dos pontos JURU2500 e MOGU2800, identificados pela técnica combinada de espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF associada ao sequenciamento do DNA ribossomal 16S. No ponto MOGU2800 distinguiu-se 15 espécies de microrganismos, enquanto que no ponto JURU2500, 13 espécies. Ressalta-se que a composição de espécies prevalentes nos dois pontos mostrou-se distinta.

Figura 21. Médias Geométricas e Desvios Padrões das densidades de Coliformes Totais quantificados, realizada nos pontos (JURU2500) e (MOGU2800), representativos das UGRHs de Conservação e em Industrialização respectivamente.

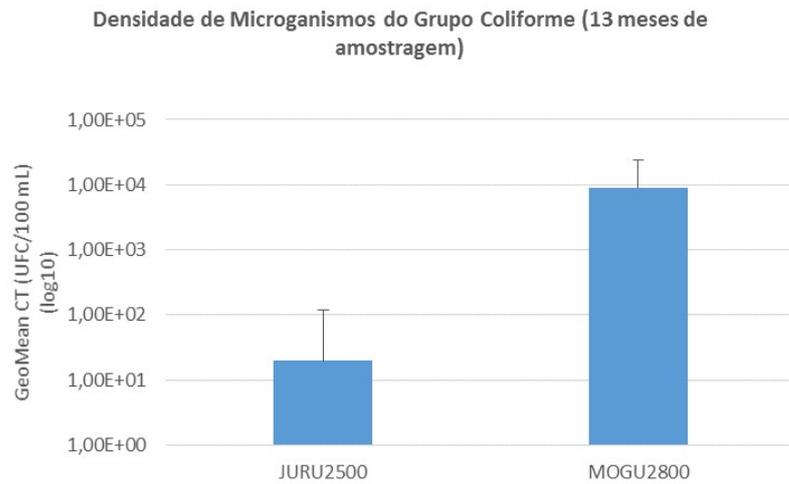


Figura 22. Médias Geométricas e Desvios Padrões das densidades de Enterococos quantificados, realizada nos pontos (JURU2500) e (MOGU2800), representativos das UGRHs de Conservação e em Industrialização respectivamente.

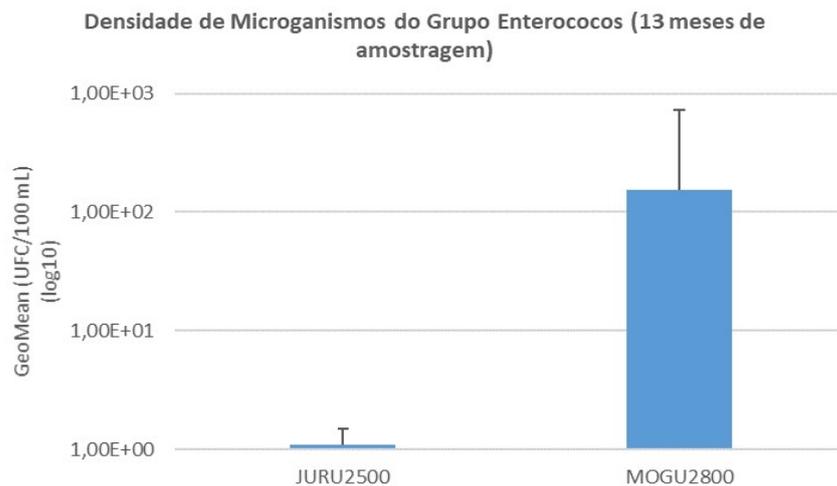
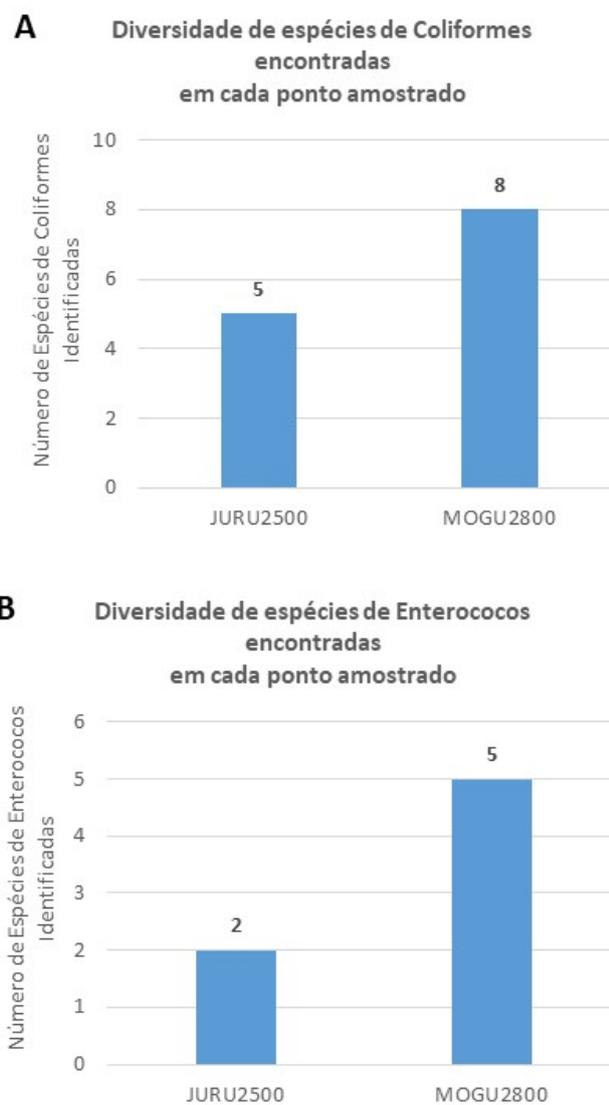


Tabela 14. Diversidade microbiana nos pontos MOGU2800 de Vocação Em Industrialização e JURU2500 de Vocação de Conservação.

MOGU 2800 - UGRHI 9 - Em Industrialização	No. Isolados	FR (%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	10	14,29
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	14,29
<i>Aeromonas caviae</i>	9	12,86
<i>Enterococcus hirae</i>	9	12,86
<i>Enterococcus faecium</i>	8	11,43
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	6	8,57
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5	7,14
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	4	5,71
<i>Escherichia coli</i>	3	4,29
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	1,43
<i>Enterobacter cowanii</i>	1	1,43
<i>Enterobacter kobei</i>	1	1,43
<i>Enterococcus gallinarum</i>	1	1,43
<i>Klebsiella variicola</i>	1	1,43
<i>Staphylococcus sciuri</i>	1	1,43
N diversidade = 15	70	100,00
JURU 2500 - UGRHI 14 - Conservação	No. Isolados	F% Relativa
<i>Enterobacter asburie</i>	9	34,62
<i>Enterobacter kobei</i>	3	11,54
<i>Aeromonas caviae</i>	2	7,69
<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	7,69
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	7,69
<i>Comamonas testosteroni</i>	1	3,85
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	3,85
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1	3,85
<i>Enterococcus faecium</i>	1	3,85
<i>Escherichia coli</i>	1	3,85
<i>Pectobacterium betavasculorum</i>	1	3,85
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1	3,85
<i>Staphylococcus sciuri</i>	1	3,85
N diversidade = 13	26	100

Quanto aos números de espécies indicadora exclusivamente de contaminação fecal, o ponto MOGU2800 exibiu 8 espécies distintas de Coliformes (Grupo Coliformes) e no ponto JURU2500 foram registradas 5 (Figura 23A). Em relação ao Grupo Enterococos, no ponto MOGU2800 identificaram-se 5 espécies de bactérias do gênero *Enterococcus* e em JURU2500, 2 (Figura 23B). Enfatiza-se que o Grupo Coliformes exibiu maior diversidade que o Grupo Streptococos.

Figura 23. Diversidade de espécies classificadas taxonomicamente como Coliformes (A) e Enterococos (B) em JURU2500 e MOGU2800, respectivamente.



Quando analisados os quatro microrganismos mais prevalentes em cada ponto das UGRHIs das demais vocações, constata-se que, analogamente, mais de 50% dos microrganismos isolados em MOGU2800 e JURU2500 estão classificados como uma das quatro espécies prevalentes, e, tratando-se, portanto, de subgrupos amostrais representativos (Tabela 15).

Tabela 15. Espécies prevalentes de microrganismos dos Grupos Coliformes e Enterococos nos pontos MOGU2800 e JURU2500, representativos de UGRHIs com Vocação Em Industrialização e Conservação, respectivamente,

Ponto de Amostragem	Espécies de Microrganismos	F% Relativa
MOGU2800	<i>Enterococcus faecalis</i>	14,29
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14,29
	<i>Aeromonas caviae</i>	12,86
	<i>Enterococcus hirae</i>	12,86
JURU2500	<i>Enterobacter asburie</i>	34,62
	<i>Enterobacter kobei</i>	11,54
	<i>Aeromonas caviae</i>	7,69
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	7,69

Das espécies prevalentes no ponto JURU2500, 45% dos microrganismos identificados pertencem ao gênero *Enterobacter*, coliforme presente em diversos microbiomas, inclusive plantas e sem relação direta com o trato gastrointestinal de animais. Coincidentemente, o agrupamento de espécies nesse local, indicou como a espécie mais prevalente a bactéria *Enterobacter asburie*, caracterizada como segundo microrganismos mais prevalentes em BITQ0100, lugar com melhor qualidade sanitária dentre os pontos de Vocação Industrial. Quanto à diversidade em MOGU2800, as espécies mais prevalentes foram *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella pneumoniae*. Como já amplamente discutido, *E. faecalis* é um microrganismo associado à poluição fecal proveniente de esgotos domésticos, enquanto *K. pneumoniae* é um coliforme mais associado à poluição difusa e fezes provenientes de animais.

Comparando-se as microbiotas identificadas nos pontos de Vocação Em Industrialização e de Conservação, com os padrões nas UGRHIs de Vocação Industrial e Agropecuária, infere-se que aqueles estão de acordo com o esperado, ou seja, o ponto JURU2500 mostra uma microbiota associada a um ambiente pouco impactado por efluentes domésticos, enquanto que o ponto MOGU2800 a uma microbiota mais característica de UGRHIs de Vocação Agropecuária, sugerindo que esse ponto ainda não se encontra totalmente impactado por esgoto doméstico.

6.3.4. CONCLUSÕES

Analisando-se os resultados preconiza-se que a análise da diversidade microbiana, identificada pelas técnicas de espectrometria massas do tipo MALDI-TOF e sequenciamento parcial do gene do DNA ribossomal 16S, é apontada como uma excelente ferramenta complementar às análises clássicas das densidades de indicadores de contaminação fecal, para atestar a qualidade sanitária de um determinado corpo hídrico. Dessa forma, através das análises temporais das microbiotas residentes nos pontos de coleta constatou-se que o surgimento regular de algumas espécies microbianas relaciona-se com a sua vocação, sendo possível inferir que a microbiota residente de determinado ambiente está relacionada com o aporte de poluição de origem fecal.

A identificação de espécies do gênero *Enterobacter* está relacionada à microbiota residente de ambientes pouco impactados por descargas de esgoto, como por exemplo os pontos JURU2500 - UGRHI 14, vocacionada como Conservação, e o ponto BITQ0100, que embora localizado em uma região industrial (UGRHI 6), trata-se um ponto de captação do Reservatório Billings. Por outro lado, as espécies de *Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*, quando encontradas com frequências elevadas, mostram-se associadas a locais impactados por efluentes domésticos e consequentemente densidades significativas de indicadores de contaminação fecal.

O despontamento da bactéria *Klebsiella pneumoniae* relaciona-se a ambientes em que a microbiota possui um perfil misto. *K. pneumoniae* é um microrganismo que está associado à poluição fecal de diversos animais, inclusive de animais doentes. A ocorrência dessa espécie em frequências mais elevadas foi constantemente observada nas UGRHIs de Vocação Agropecuária. Finalmente, *K. pneumoniae*, associada a frequências relativamente elevadas de bactérias do gênero *Enterococcus*, associa-se a um perfil de poluição com características mais difusas, impossibilitando inferir sobre o tipo de poluição de origem fecal que acarretaria maior impacto no ambiente.

6.4. ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DOS DADOS DOS INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO FECAL NOS PONTOS DE BALNEABILIDADE SELECIONADOS NA BAIXADA SANTISTA (UGRHI 7)

Os cinco pontos selecionados como representativos de locais vocacionados para Balneabilidade foram às seguintes praias: Iporanga, Praia do Tombo e Pitangueiras no Município do Guarujá, Praia do Boqueirão no Município da Praia Grande e Praia do Boqueirão no Município de Santos. Todos estão localizados na Baixada Santista (Mapa 2) inserida na UGRHI 7 de Vocação Industrial.

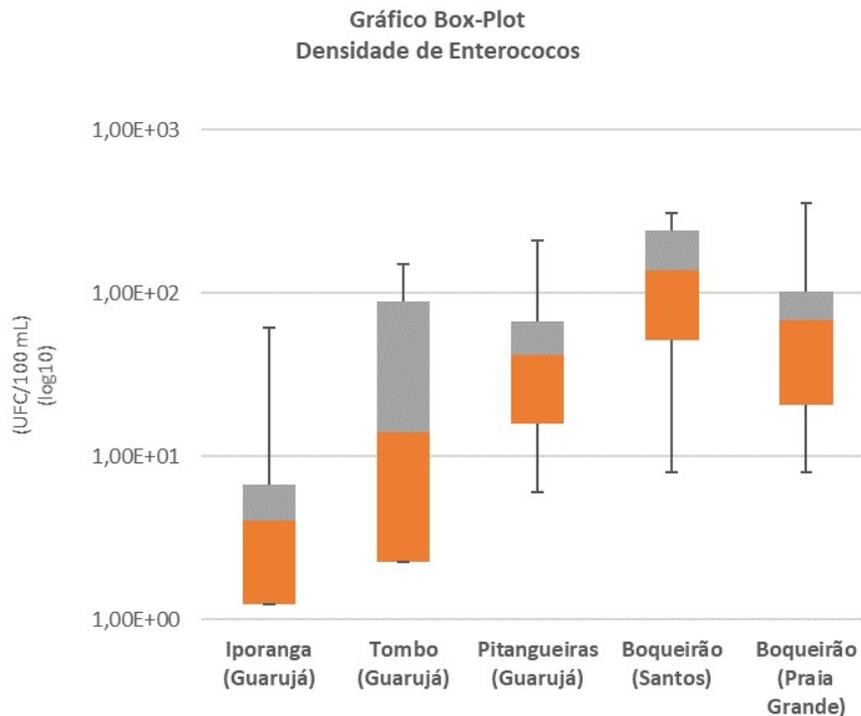
Efetuaram-se seis coletas em todos os pontos, exceto em Iporanga, amostrado oito vezes. As coletas nesses locais foram bimestrais, respeitando o calendário anual da Divisão de Laboratórios de Cubatão (EDC) da CETESB.

As amostras de água foram direcionadas para o laboratório de Indicadores Microbiológicos da Divisão de Microbiologia e Parasitologia da CETESB em até 24 horas e processadas pela técnica da membrana filtrante (APHA, 2012) para quantificação da densidade de microrganismos do Grupo Enterococos. Esse é o indicador de escolha para avaliação da contaminação fecal em águas salinas e salobras, dada a resistência intrínseca que esses microrganismos possuem a concentrações elevadas de cloreto de sódio (Byappanahalli *et. al.*, 2012).

Segundo o monitoramento anual publicado no Relatório de Qualidade das Praias e Águas Litorâneas do Estado de São Paulo (CETESB, 2016; CETESB, 2015) os pontos escolhidos, em relação aos resultados de qualidade microbiológica, uma variação significativa, constatando-se pontos com classificações Ótima, Boa, Ruim e Péssima, de acordo com os critérios da Resolução CONAMA 274/2000 (Brasil, 2000), permitindo comparar a microbiota residente de pontos com qualidades sanitárias distintas dentro de uma mesma bacia hidrográfica (Baixada Santista).

A Figura 24 mostra as densidades de microrganismos do Grupo Enterococos mensuradas nos pontos de coleta.

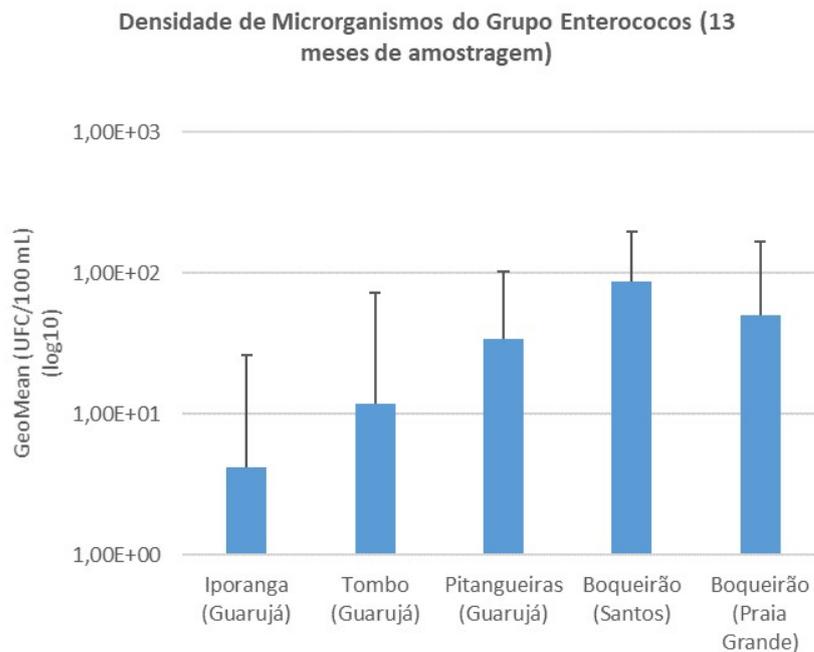
Figura 24. Representação BOX-PLOT das densidades (UFC/100 mL) de microrganismos do Grupo Enterococos nos pontos de Balneabilidade na Baixada Santista (UGHRI 7).



A qualidade sanitária das águas dos pontos avaliados variou muito, constatando-se que em Iporanga, classificado como Ótimo ou Bom entre 2014 e 2015, a mediana da densidade de Enterococos foi inferior a de Boqueirão (Praia Grande), Pitangueiras (Guarujá) e Boqueirão (Santos), classificados ao longo dos mesmos anos como Ruim ou Péssima. A praia do Tombo, classificada como Boa no período de estudo (2014 e 2015), registrou densidade de Enterococos intermediária entre os pontos de pior e melhor qualidade (Tabela 1 e Figura 24).

A Figura 25 mostra as médias geométricas da variação temporal da densidade do Grupo Enterococos.

Figura 25. Médias Geométricas e Desvio Padrão das densidades de Enterococos nos pontos de coleta de Balneabilidade localizados na Baixada Santista (UGRHI 7).



O cálculo da média geométrica revelou a mesma tendência constatada nas medianas das densidades de Enterococos, confirmando a variação do indicador de contaminação fecal entre os pontos. Por essa análise, Iporanga indicou melhor qualidade sanitária; Pitangueiras, Boqueirão (Santos) e Boqueirão (Praia Grande) as piores e a praia do Tombo qualidade intermediária, com medianas de 4, 42, 137, 68 e 14 UFC/100 mL, respectivamente.

Assim como para as amostras de água doce, uma porcentagem dos microrganismos do Grupo Enterococos, advindos dos pontos de balneabilidade, foi isolada e identificada pela técnica combinada de MS MALDI-TOF e Sequenciamento parcial do gene do DNA ribossomal 16S, para se verificar a diversidade microbiana nestes locais.

A Tabela 16 indica a diversidade global de microrganismos identificados, reportando as espécies isoladas em um total de 135 microrganismos provenientes do cultivo do meio MEI, específico para bactérias do Grupo Enterococos.

Tabela 16. Diversidade microbiana global nos pontos de Balneabilidade localizados na Baixada Santista (UGRHI 7).

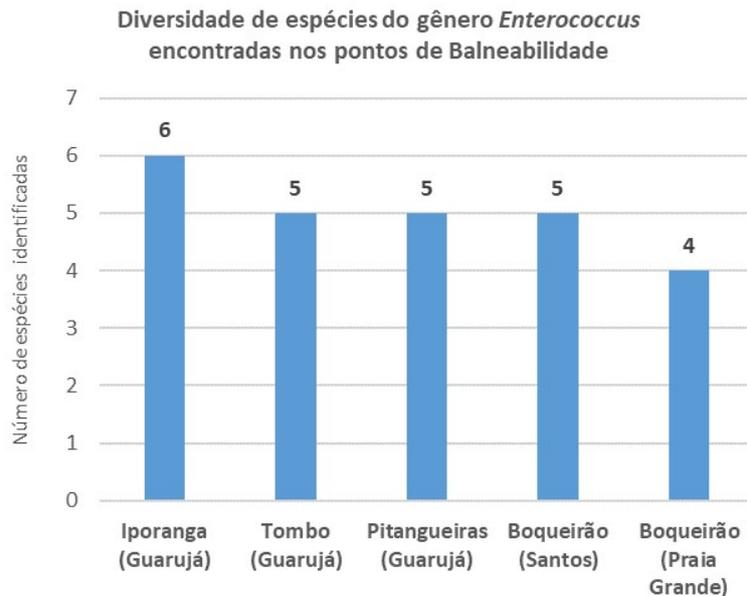
Espécie do Microrganismo	No. Isolados	F% Relativa
<i>Enterococcus faecium</i>	51	37,78%
<i>Enterococcus hirae</i>	38	28,15%
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	15	11,11%
<i>Enterococcus faecalis</i>	12	8,89%
<i>Enterococcus mundtii</i>	9	6,67%
<i>Aerococcus viridans</i>	3	2,22%
<i>Staphylococcus warneri</i>	3	2,22%
<i>Bacillus circulans</i>	1	0,74%
<i>Enterococcus durans</i>	1	0,74%
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	1	0,74%
<i>Streptococcus lutetiensis</i>	1	0,74%
N diversidade = 11	Σ=135	100,00%

O meio de cultura MEI se mostrou específico para o isolamento dos indicadores de contaminação fecal do Grupo Enterococos, pois dos 135 isolados, 127 (94%) pertencem aos gêneros *Enterococcus* ou *Streptococcus* (Tabela 16). A diversidade global de microrganismos nas amostras provenientes desses locais foi de 11 espécies distintas, sendo 4 não pertencem ao Grupo Enterococos/Streptococos.

Embora os pontos de Balneabilidade tenham sido avaliados somente para o indicador de contaminação fecal do Grupo Enterococos, a espécie prevalente observada foi o *Enterococcus faecium*, a mesma com maior prevalência no levantamento de diversidade dos pontos de água doce de Vocação industrial, que foram analisados para dois grupos de indicadores de contaminação microbiológica, ou seja, Coliformes e Enterococos.

Em relação somente ao Grupo Enterococos, não houve grande variação no número de espécies entre os pontos estudados. A Figura 26 exibe o número de espécies identificadas em cada local, variando entre quatro espécies no ponto Boqueirão, Santos, e seis em Iporanga, no Guarujá.

Figura 26. Diversidade de espécies classificadas taxonomicamente como Enterococos, nos pontos de amostragem de Balneabilidade (UGRHI 7).



A Tabela 17 contém a diversidade de espécies para os pontos amostrados, sendo que não houve variação significativa entre os locais com poluição elevada e os menos poluídos, diferentemente do constatado nas águas doces das UGRHIs de Vocação Industrial, indicando que, espécies do gênero *Enterococcus*, oriundas de poluição de origem fecal, revelaram-se significativamente prevalentes em todos os pontos de praias costeiras.

Procedeu-se a um corte nos resultados, dentro do universo amostral de diversidade, para analisar os microrganismos mais prevalente em cada ponto. Na Tabela 18 visualiza-se que mais de 50% dos microrganismos isolados estão classificados como uma das duas espécies mais prevalentes, e, portanto, de um subgrupo amostral representativo daquela microbiota.

Tabela 17. Análise qualitativa dos microrganismos identificados pelas técnicas de MS MALDI-TOF e sequenciamento parcial do gene do DNA ribossomal 16S. Espécies identificadas por ponto de coleta e frequências relativas (FR%) dentro do universo amostral composto pela somatória dos isolados de cada ponto. Os resultados indicam a diversidade global identificada a partir do isolamento dos microrganismos cultivados no meio MEI.

IPORANGA - GUARUJÁ - UGRHI 7	No. Isolados	F% relativa
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	7	29,17%
<i>Enterococcus faecium</i>	6	25,00%
<i>Enterococcus hirae</i>	4	16,67%
<i>Aerococcus viridans</i>	2	8,33%
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	8,33%
<i>Enterococcus durans</i>	1	4,17%
<i>Enterococcus mundtii</i>	1	4,17%
<i>Staphylococcus warneri</i>	1	4,17%
N diversidade = 8	24	100,00%
PRAIA DO TOMBO - GUARUJÁ - UGRHI 7		
<i>Enterococcus faecium</i>	7	33,33%
<i>Enterococcus hirae</i>	7	33,33%
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	3	14,29%
<i>Aerococcus viridans</i>	1	4,76%
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	4,76%
<i>Enterococcus mundtii</i>	1	4,76%
<i>Bacillus circulans</i>	1	4,76%
N diversidade = 7	21	100,00%
PITANGUEIRAS - GUARUJÁ - UGRHI 7		
<i>Enterococcus faecium</i>	16	53,33%
<i>Enterococcus hirae</i>	8	26,67%
<i>Enterococcus faecalis</i>	3	10,00%
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	2	6,67%
<i>Enterococcus mundtii</i>	1	3,33%
N diversidade = 7	30	100,00%
BOQUEIRÃO - SANTOS - UGRHI 7		
<i>Enterococcus hirae</i>	13	43,33%
<i>Enterococcus faecium</i>	8	26,67%
<i>Enterococcus mundtii</i>	6	20,00%
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	2	6,67%
<i>Streptococcus lutetiensis</i>	1	3,33%
N diversidade = 7	30	100,00%

BOQUEIRÃO - PRAIA GRANDE - UGRHI 7	No. Isolados	F% relativa
<i>Enterococcus faecium</i>	14	46,67%
<i>Enterococcus faecalis</i>	6	20,00%
<i>Enterococcus hirae</i>	6	20,00%
<i>Staphylococcus warneri</i>	2	6,67%
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1	3,33%
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	1	3,33%
N diversidade = 7	30	100,00%

A análise da diversidade dos microrganismos mais prevalentes nos pontos de Balneabilidade indica que, à exceção de Iporanga, com melhor qualidade sanitária que os demais pontos, a microbiota associada a esses ambientes é, praticamente, idêntica (Tabela 18), composta por três espécies de bactérias do gênero *Enterococcus*, relacionadas com poluição fecal do trato gastrointestinal de mamíferos (Lebreton *et al.*, 2014).

Tabela 18. Espécies prevalentes de microrganismo do Grupo Enterococos nos pontos de Balneabilidade (UGRHI 7) e suas respectivas frequências relativas.

Ponto de Amostragem	Espécies de Microrganismos	F% Relativa
IPORANGA - GUARUJÁ	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	29,17%
	<i>Enterococcus faecium</i>	25,00%
PRAIA DO TOMBO - GUARUJÁ	<i>Enterococcus faecium</i>	33,33%
	<i>Enterococcus hirae</i>	33,33%
PITANGUEIRAS - GUARUJÁ	<i>Enterococcus faecium</i>	53,33%
	<i>Enterococcus hirae</i>	26,67%
BOQUEIRÃO - SANTOS	<i>Enterococcus hirae</i>	43,33%
	<i>Enterococcus faecium</i>	26,67%
BOQUEIRÃO - PRAIA GRANDE	<i>Enterococcus faecium</i>	46,67%
	<i>Enterococcus faecalis</i>	20,00%

Considerando-se a proximidade dos pontos e que as praias são impactadas por esgoto doméstico, deduz-se que a diversidade de microrganismo é compreensível. Diferentemente dos demais, o ponto localizado em Iporanga indicou como microrganismo prevalente, a espécie *E. casseliflavus*, considerada, na literatura, como mais relacionada à microbiota fecal de animais silvestres, e o que condiz também com a característica do ponto de estar sob menor influência de impacto por efluentes domésticos.

6.4.1. CONCLUSÕES

Baseando-se na diversidade da microbiota residente nos pontos de Balneabilidade, aponta-se, assim como constatado nos pontos de água doce, que as técnicas de espectrometria massas do tipo MALDI-TOF e sequenciamento parcial do gene do DNA ribossomal 16S revelaram-se eficazes na identificação de microrganismos de água salgada, sugerindo que, especialmente a espectrometria de massas, se trata de uma técnica de identificação não influenciada pela matriz de isolamento do microrganismo, diferente das metodologias bioquímicas, que ainda são amplamente empregadas na identificação de microrganismos de origem ambiental.

A análise da diversidade microbiana preconiza que esses locais amostrados mostram-se sob a influência do impacto de efluentes domésticos, constatando-se que no ponto de melhor qualidade sanitária (Iporanga), identificou-se bactérias menos relacionadas a poluição fecal humana, apontando a capacidade da metodologia proposta em discriminar amostras impactadas principalmente por esgoto doméstico, e amostras que recebem influência de poluição difusa, ou poluição não relacionada diretamente com descargas de esgotos domésticos

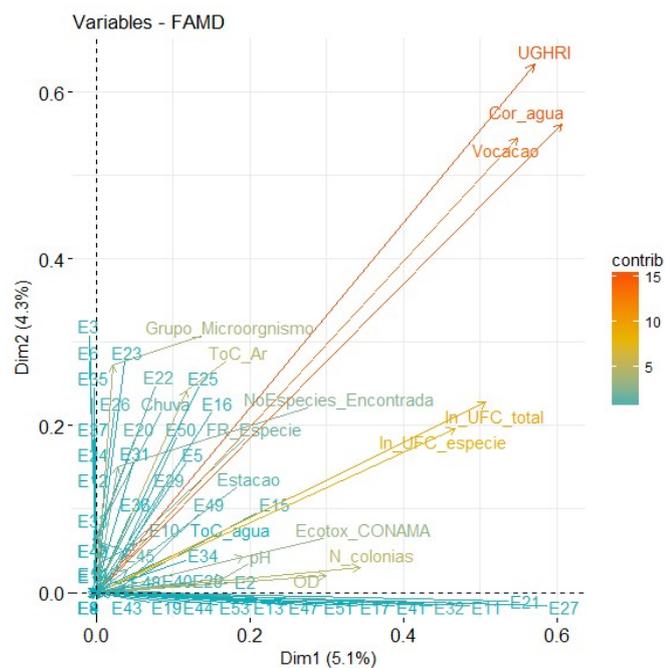
O perfil microbiano dos pontos de Balneabilidade com qualidade sanitária inferior, assemelhou-se ao constatado nos pontos de água doce com maior impacto por esgoto doméstico (COTI3900, CAMO0900, ATIB2010 e GUAR0900), indicando a prevalência das espécies *E. faecium*, *E. hirae* e *E. faecalis*. Denota-se que a identificação desses microrganismos em amostras ambientais direciona-se para o impacto por efluentes domésticos, mesmo que o monitoramento da densidade do indicador de contaminação fecal situa-se dentro dos limites legais aceitáveis para aquele corpo hídrico.

7. INFERÊNCIAS ESTATÍSTICAS

Conforme descrito no item 4.6, as variáveis físico-químicas e as microbiológicas (quantitativas e qualitativas) foram analisadas simultaneamente, empregando a técnica multivariada FAMD (*Factor Analysis of Mixed Data*) para a análise fatorial e a técnica PAM (*Partitioning Around Medoids*) para determinação dos clusters formados pelas frequências das espécies (Audigier *et al.*, 2013). Além da análise de FAMD, os resultados microbiológicos também foram explorados pela técnica de Co-cluster, com o objetivo de definir agrupamentos simultâneos de amostras e a relevância das frequências das espécies nos pontos de coleta.

A figura 27 mostra a contribuição das variáveis físico-químicas e microbiológicas, segundo a técnica multivariada de FAMD. O tamanho dos vetores e a escala de cores indicam a importância do parâmetro; a orientação reflete o comportamento nas duas componentes principais (DIM 1 e DIM2), assim quando estão apontados para a mesma direção, indicam afinidade. Pela análise de FAMD, conclui-se que as variáveis UGRHI, cor da água e vocação do local contribuíram significativamente para a interpretação dos dados coletados. Os parâmetros UFC total e UFC por espécie (UFC – Unidade formadora de colônias) também revelaram contribuições significativas como presumido, pois quanto mais um corpo d’água é impactado por contribuições de esgotos domésticos, maior a densidade de indicadores de contaminação fecal esperada.

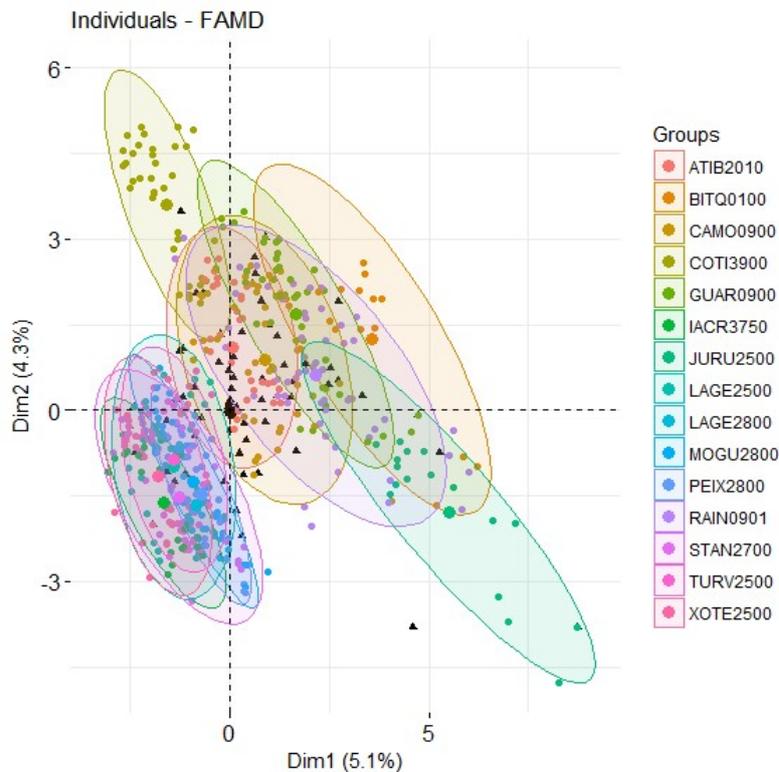
Figura 27 – Contribuição das variáveis físico-químicas e microbiológicas pelo modelo FAMD



As figuras a seguir apontam os resultados do modelo de análise estatística FAMD das variáveis de maior contribuição separadamente. As elipses representam zonas de confiança para os níveis dos fatores pesquisados.

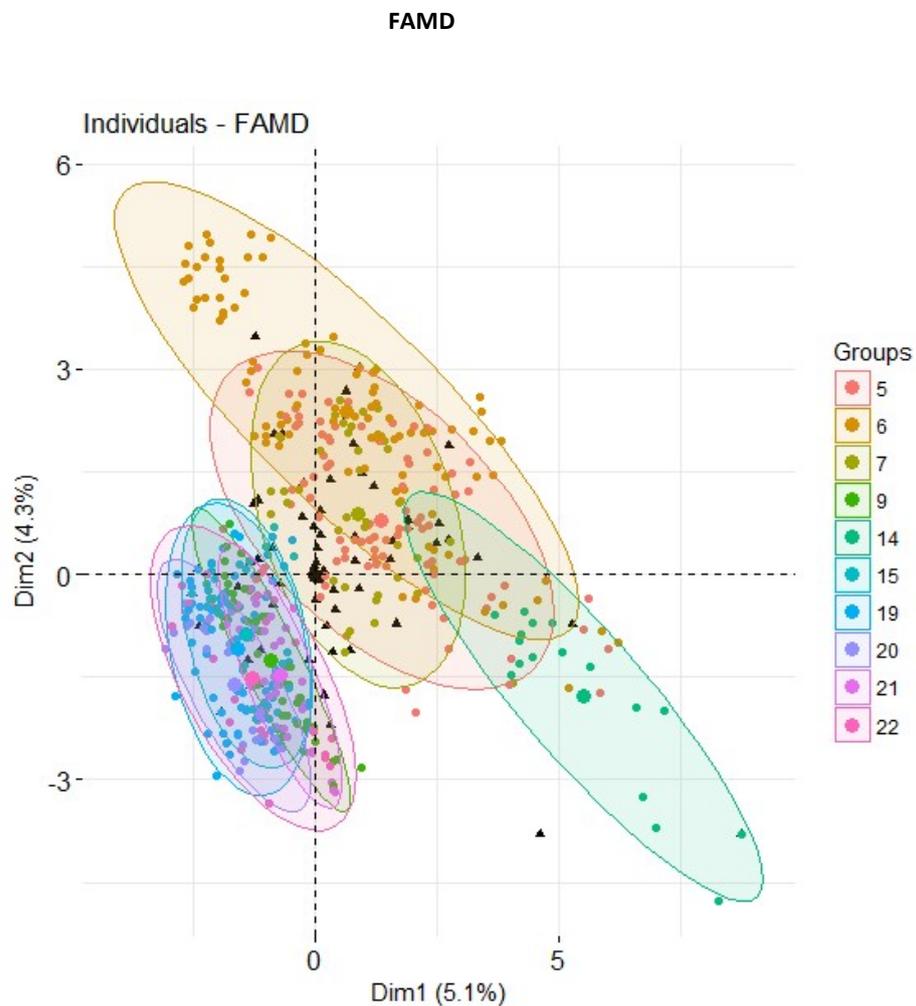
A figura 28 mostra as distribuições dos pontos segundo o local de monitoramento, onde observa-se que os locais que aparecem como diferenciados foram JURU2500, BITQ0100 e COTI3900. Os dois primeiros são aqueles com melhor qualidade e o último com pior qualidade, corroborando com o observado na análise descritiva. Como demonstrado no item 8.2, os pontos JURU2500 (Vocação Conservação) e BITQ0100 (Vocação Industrial) indicaram frequências relativas de espécies dos Grupos Coliformes e Enterococos superiores as aquelas relacionadas a espécies comumente encontradas em ambientes menos impactados por poluição fecal (Tabelas 10 e 15). Por outro lado, o ponto COTI3900 (Vocação Industrial) exibiu maior ocorrência de espécies relacionadas à contaminação fecal (Tabela 10), além da elevada densidade de indicadores (Figuras 8 e 9).

Figura 28 – Zonas de confiança estabelecidas para os pontos de monitoramento de água doce utilizando o modelo estatístico FAMD



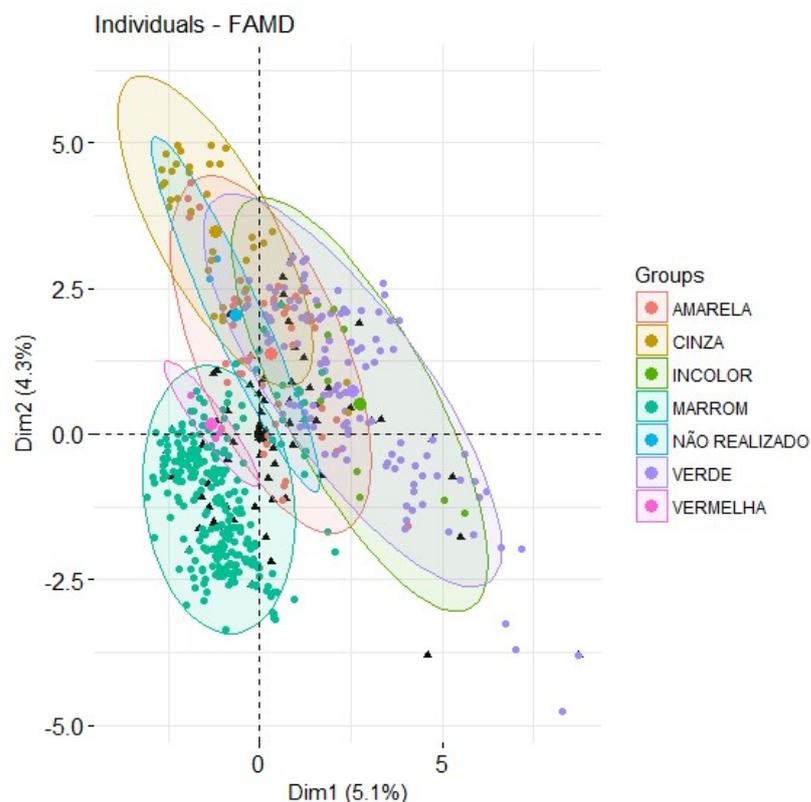
Na figura 29, salientam-se as zonas de confiança para as diversas UGRHIs. As que indicaram comportamento diferenciado foram 6 e 14; as UGRHIs 15, 19 20, 21 e 22 apresentaram resultados bastante semelhantes; e as UGRHIs 5 e 7 apresentaram-comportamentos semelhantes, com tendência mais próxima à UGRHI 6. Esta, de Vocação Industrial, agrupa os pontos mais impactados por poluição fecal, devido à alta densidade demográfica, enquanto que a UGRHI 14 (Alto do Paranapanema - Vocação conservação), por sua vez, possui corpos hídricos com menor degradação como consequência da baixa pressão antrópica.

Figura 29 - Zonas de confiança estabelecidas para as diferentes UGRHIs utilizando o modelo estatístico



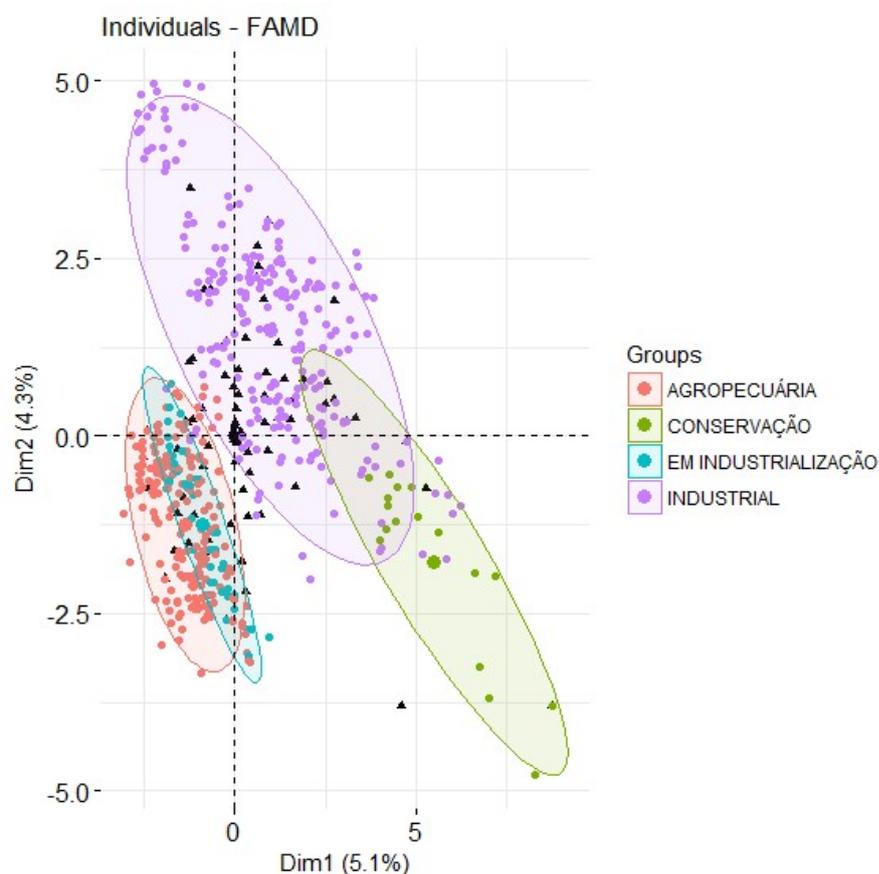
As zonas de confiança para cor da água estão ilustradas na Figura 30 e mostram que os corpos hídricos com cor da água marrom possuem comportamento diferenciado em relação aos demais, enquanto que corpos hídricos com colorações incolor e verde mostram resultados muito próximos. A coloração marrom revelou-se associada a todas as amostras dos pontos hídricos de Vocação Agropecuária, que se caracterizam pela elevada densidade de indicadores, mas com frequência relativa de espécies prevalentes associadas à poluição fecal animal e poluição difusa (Tabela 8), corroborando com o visualizado na análise descritiva, que encontrou resultados muito semelhantes para os parâmetros físico-químicos e microbiológicos, dentre todas as UGRHs de Vocação Agropecuária.

Figura 30 - Zonas de confiança estabelecidas para a variável coloração da água utilizando o modelo estatístico FAMD



A análise de FAMD com os grupos selecionados pela vocação do local mostrou que lugares com vocações de conservação e industrial manifestaram comportamentos distintos, enquanto que as de vocação agropecuária e em processo de industrialização exibiram resultados próximos (Figura 31).

Figura 31 - Zonas de confiança estabelecidas para a vocação do ponto de monitoramento utilizando o modelo estatístico FAMD



Pela análise de FAMD, utilizando tanto as variáveis físico-químicas quanto as microbiológicas, foi possível discriminar claramente dois clusters. Na Figura 32 é possível observar dois agrupamentos, um no quadrante superior do gráfico (pontos vermelhos) e um no quadrante inferior (pontos verdes), sendo que cada um se refere a uma amostragem em ponto específico de determinada UGRHI. Os pontos agrupados em cada cluster estão descritos na tabela 19. O cluster 1 agrupa os locais de melhor qualidade, representados pelos pontos JURU2500 e BITQ0100. Esses como mencionado anteriormente, se diferem dos

outros tanto pela baixa densidade dos indicadores microbiológicos avaliados quanto pela diversidade microbiológica, resultado que também corrobora com o observado na análise descritiva.

Figura 32 – Clusters formados com base nos dados físico-químicos e microbiológicos pela análise de FAMD.

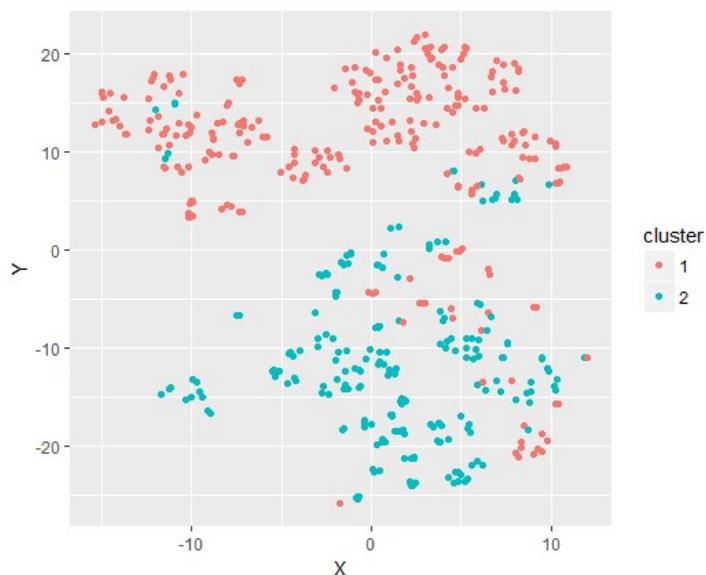


Tabela 19 – Alocação dos pontos de amostragem nos cluster discriminados pela técnica de FAMD, utilizando os dados físico-químicos e microbiológicos das amostras de água doce.

Cluster	
1	2
JURU2500	ATIB2010
BITQ0100	PEIX2800
	STAN2700
	TURV2500
	MOGU2800
	LAGE2800
	XOTE2500
	CAMO0900
	GUAR0900
	COTI3900 2
	RAIN0901 2
	LAGE2500 2
	IACR3750 2

Além da análise de FAMD, uma segunda investigação estatística foi realizada, utilizando-se a técnica de Co-cluster (Bhatia *et al.*, 2017). A Figura 33 mostra os resultados da análise de Co-cluster, realizada somente com as amostras de água doce e os seus respectivos microrganismos isolados. Nessa Figura, a intensidade da cor (escala de cinza), conforme a escala à direita, indica a frequência das colônias em cada amostra. Diferentes colunas indicam distintas espécies (tanto do Grupo Coliformes, quanto Enterococos), e linhas discordantes indicam diferentes amostras. Observa-se, no quadro da direita, que as linhas azuis separam três clusters para as espécies e três clusters para as amostras. A tabela 20 mostra a distribuição das espécies identificadas nos clusters.

Para os pontos mais poluídos, não se identificaram claramente as espécies de microrganismos mais relacionados com ambientes de Vocação Industrial ou Agropecuário, apesar dos resultados indicarem uma tendência de que o aparecimento de bactérias do gênero *Klebsiella* se relaciona melhor com os ambientes das UGRHIs de Vocação Industrial, pois é um microrganismo preditivo de descargas de poluição de origem mista (não somente esgoto doméstico). Verificou-se, também, que os microrganismos *E. coli* e as espécies de bactérias do gênero *Enterococcus* são bastante prevalentes nos pontos localizados nas UGRHIs industrial, conforme já mencionado.

Ademais, a análise de co-cluster corroborou com a descritiva à medida que inferiu que os microrganismos dos gêneros *Citrobacter* e *Enterobacter* (Tabela 20 – Cluster 2) relacionam-se com ambientes menos impactados por efluentes domésticos, como nos pontos JURU2500 (UGRHI de Vocação de Conservação) e BITQ0100 (captação do Reservatório Billings), pela análise de FAMD. Ou seja, o aparecimento desses microrganismos em densidades relativas elevadas indica um ambiente menos impactado por poluição oriunda de esgotos domésticos e industriais.

Figura 33. Dados originais e resultados de Co-cluster

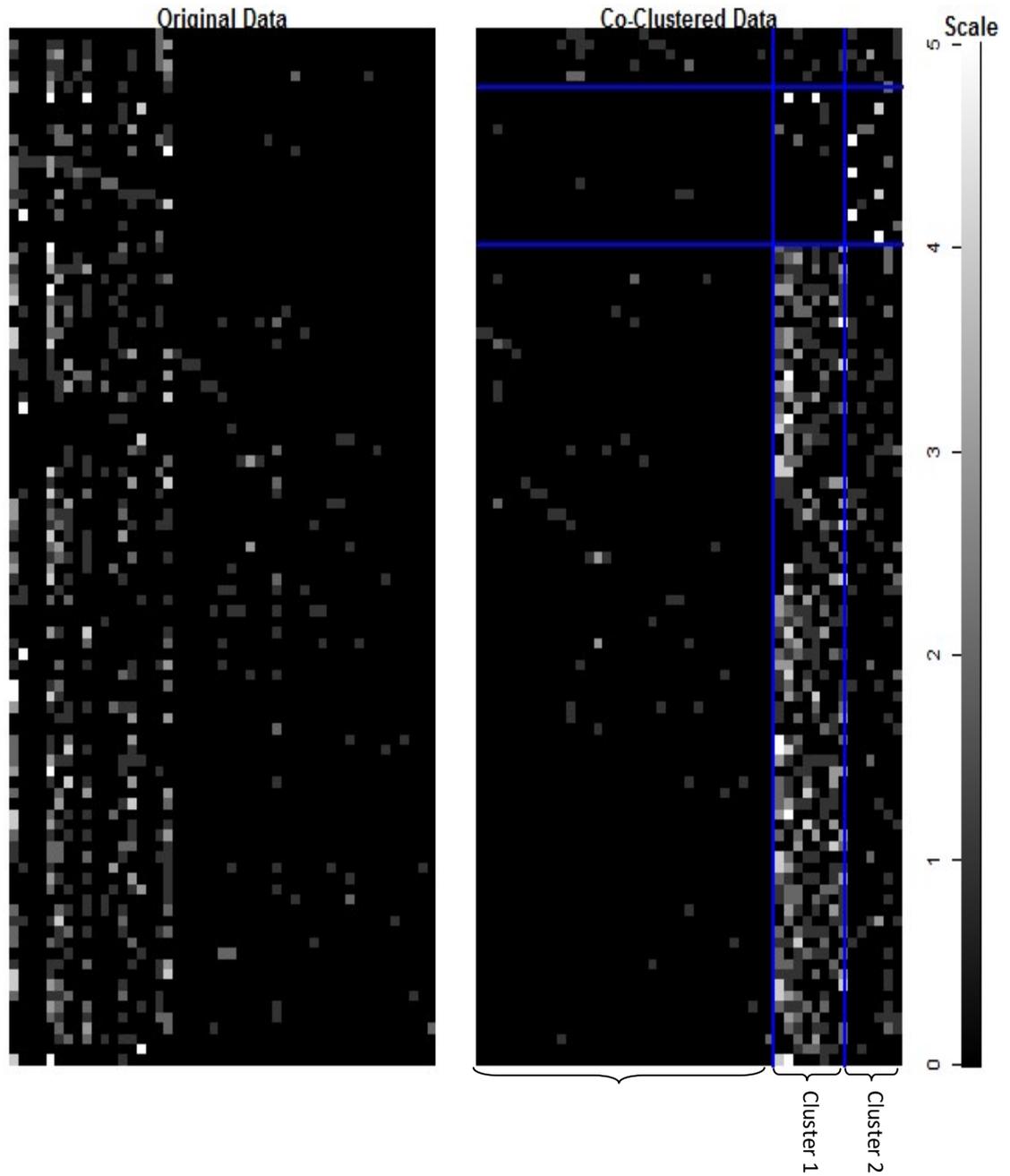


Tabela 20 – Alocação das espécies nos cluster pela análise de Co-cluster

Alocação das espécies nos cluster pela análise de Co-cluster		
Cluster 0	Cluster 1	Cluster 2
<i>Pseudomonas mendocina</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Enterobacter radicincitans</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<i>Kluyvera ascorbata</i>	<i>Enterococcus hirae</i>	<i>Enterococcus mundtii</i>
<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	<i>Enterobacter asburie</i>
<i>Enterococcus sulfureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
<i>Enterococcus gallinarum</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	
<i>Pseudomonas koreensis</i>	<i>Aeromonas caviae</i>	
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	
<i>Enterobacter amnigenus</i>		
<i>Enterococcus durans</i>		
<i>Aeromonas veronii</i>		
<i>Comamonas testosteroni</i>		
<i>Aeromonas media</i>		
<i>Aeromonas jandaei</i>		
<i>Staphylococcus warneri</i>		
<i>Klebsiella variicola</i>		
<i>Citrobacter braaki</i>		
<i>Pectobacterium betavasculorum</i>		
<i>Serratia marcescens</i>		
<i>Enterobacter aerogenes</i>		
<i>Enterococcus villorum</i>		
<i>Enterobacter cowanii</i>		
<i>Aeromonas media</i>		
<i>Enterobacter kobei</i>		
<i>Kluyvera intermedia</i>		
<i>Cronobacter sakazakii</i>		
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		
<i>Patococcus ananatis</i>		
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>		
<i>Lactococcus lactis</i>		
<i>Staphylococcus capitis</i>		
<i>Salmonella ssp</i>		
<i>Raoultella terrigena</i>		

8. CONCLUSÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES

O monitoramento microbiológico clássico realizado pela determinação da densidade dos indicadores de contaminação fecal compõe um dado histórico bastante importante sobre a qualidade sanitária de um determinado recurso hídrico. No entanto, trata-se de um dado incompleto, basicamente por duas razões. Primeiramente, os indicadores de contaminação fecal mais utilizado globalmente para atestar a qualidade sanitária de uma água são os Coliformes, e mais recentemente a *Escherichia coli*. Apesar do aumento da densidade de coliformes em águas superficiais relacionar-se com a descarga de esgotos domésticos, esse resultado pode ser superestimado, uma vez que diversas espécies de coliformes e mesmo a *E. coli* associam-se ao ambiente natural, sendo oriundos de animais selvagens, insetos e plantas, e não somente relacionados às fezes de animais de sangue quente como humanos e animais domésticos. Uma segunda objeção é a questão qualitativa desse dado. O cálculo da densidade de coliformes em determinada amostra baseia-se no cultivo dos microrganismos em meios de cultura seletivos e diferenciais, que selecionam o organismo-alvo de acordo com vias metabólicas específicas presentes nos microrganismos. Atualmente concebe-se que metodologias baseadas em provas bioquímicas são bastante inespecíficas, pois os microrganismos compartilham diversas vias metabólicas, de modo que somente as análises moleculares (sejam genômicas ou proteômicas) serão capazes de identificar com acurácia um microrganismo isolado.

A complementação dos dados das densidades dos indicadores de contaminação fecal com a identificação desses microrganismos, por técnicas moleculares, pode ser de grande utilidade, ao passo que a especiação da microbiota residente de determinado ambiente pode indicar o tipo de poluição que está deteriorando o ambiente.

Este estudo demonstrou a viabilidade da utilização da metodologia de identificação de microrganismos, tanto pela técnica de espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF, como pelo sequenciamento parcial do gene 16S, a partir de um conjunto amostral de colônias de microrganismos isoladas de uma amostra de um corpo d'água. A metodologia demonstrou ser capaz de inferir o tipo de poluição que determinado corpo hídrico recebe baseado na composição da microbiota residente, que, após cultivo nos meios tradicionais de isolamento, podem ser discriminadas com excelente acurácia através das técnicas propostas. Destarte, a técnica de espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF demonstrou ser especialmente apropriada nesse



COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

tipo de análise, relativa a facilidade de execução do ensaio, rapidez, baixo custo e alta porcentagem de retorno de resultados positivos.

Outro dado interessante possível de visualizar no conjunto de resultados analisados ao longo do projeto foi que espécies de bactérias do Grupo Enterococos mostraram-se melhores preditivos da presença de esgoto doméstico, em determinadas amostras, do que bactérias do Grupo Coliformes, considerando que a *E.coli*, componente do grupo especificamente associado a contaminação fecal, não foi a mais frequente dentre o grupo dos coliformes. Esse resultado, apesar de inesperado, é coerente, uma vez que o meio de cultivo empregado para o isolamento dos Enterococos (MEI) demonstrou maior especificidade do que o utilizado para o cultivo dos coliformes (M-ENDO), em virtude que engloba também várias espécies que não são de origem matéria. Esse resultado reforça a necessidade de se empregar meios específicos para detecção de *E.coli*, quando esse for o indicador de escolha e para atender as legislações vigentes, possuindo como indicador os coliformes termotolerantes ou *E.coli*. Além disso, estudos recentes sugerem que, dentre a microbiota que compõe as fezes humanas e de vários outros animais, bactérias do grupo Enterococos são mais prevalentes do que os Coliformes, sustentando os resultados constatados nessa pesquisa.

Neste contexto, recomenda-se que o monitoramento periódico das densidades dos indicadores de contaminação fecal seja complementado com os dados de identificação da microbiota residente com certa regularidade, para se determinar a fonte preponderante de contaminação. Ademais, os resultados do projeto indicam a necessidade de estudos complementares, para se aprofundar a robustez das bactérias do gênero *Enterococcus* como indicadores de contaminação fecal, também em águas doces, uma vez que, em comparação a *E.coli* e outros novos indicadores, considerando a sua maior especificidade ao meio de cultivo utilizado atualmente (MEI) e a sua presença em maior porcentagem nas fezes de diversos grupos de animais.



9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aarestrup, F. M., Butaye, P., & Witte, W. Non-human reservoirs of enterococci. In M. S. Gilmore, D. B. Clewell, P. Courvalin, G. M. Dunny, B. E. Murray, & L. B. Rice (Eds.), *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance* (pp. 55-100). Washington, District of Columbia: ASM Press. 2002.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA); COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO (CETESB). Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento e comunidades aquáticas e efluentes líquidos 1ª edição, 2011; BRASÍLIA, 321 p. Ed. ANA. Organizadores: Brnadão C.J., Coelho-Botelho, M.J., Sato, M.I.Z., Lamparelli, M.C. ISBN: 978-85-89629-83-6. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/publicacoes/guia-nacional-coleta-2012.pdf>.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410. 1990.

APHA, 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* published by American Public Health Association (APHA), the American Water Works Association (AWWA), and the Water Environment Federation (WEF). 1496 p. Hardcover. 2012.

Audigier, V., Husson, F., Josse, J. A principal component method to impute mixed data. Submitted arXiv: 1301.4797. 2013.

Bhatia, P.M., Iovleff, S., Govaert, G. Blockbuster: An R package for model-based co-clustering. *Journal of Statistical Software*. 76 (9): 1-24. 2017.

Bradshaw, J.K., Snyder, B.J., Oladeinde, A., Spidle, D., Berrang, M.E., Meinersmann, R.J., Oakley, B., Sidle, R.C., Sullivan, K., Molina, M. Characterizing relationships among fecal indicator bacteria, microbial source tracking markers, and associated waterborne pathogen occurrence in stream water and sediments in a mixed land use watershed. *Water Research* 101: 498-509. 2016.

BRASIL. CONAMA. Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000. Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. *Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 de janeiro de 2001. Seção 1, n. 18, p. 70-71.*



COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

BRASIL. CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 de março de 2005. Seção 1, n. 53, p. 58-63.

BRASIL. CONAMA. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamentos de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 de maio de 2011. N. 92, p. 89.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União. República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 de dezembro de 2011. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html

Byappanahalli, M.N., Nevers, M.B., Korajkic, A., Staley, Z.R., Harwood, V.J. Enterococci in the Environment. Microbiology and Molecular Biology Reviews 76(4): 685-706, 2012.

CETESB (São Paulo) Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2017 [recurso eletrônico] / CETESB. - - São Paulo : CETESB, 2018. 1 arquivo de texto (301 p.) : il. color., PDF ; 37 MB. - - (Série Relatórios / CETESB, ISSN 0103-4103)

CETESB (São Paulo) Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2014 [recurso eletrônico] / CETESB. - - São Paulo : CETESB, 2015. 2 arquivos de texto (540 p. em 2 partes) : il. color., PDF ; 65 MB. - - (Série Relatórios / CETESB, ISSN 0103-4103)

CETESB (São Paulo) Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo 2015 [recurso eletrônico] / CETESB. - - São Paulo : CETESB, 2016. 2 arquivos de texto (562 p. em 2 partes) : il. color., PDF ; 100 MB. - - (Série Relatórios / CETESB, ISSN 0103-4103)

CETESB (São Paulo) Qualidade das praias litorâneas no estado de São Paulo 2014 [recurso eletrônico] / CETESB. - - São Paulo : CETESB, 2015. 1 arquivo de texto (224 p.) : il. color., PDF ; 13 MB. - - (Série Relatórios / CETESB, ISSN 0103-4103)



COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

- CETESB (São Paulo) Qualidade das praias litorâneas no estado de São Paulo 2015 [recurso eletrônico] / CETESB. - - São Paulo : CETESB, 2016. 1 arquivo de texto (188 p.) : il. color., PDF ; 20 MB. - - (Série Relatórios / CETESB, ISSN 0103-4103)
- CETESB. Norma Técnica L5.212: Enterococos – determinação pela técnica da membrana filtrante: método de ensaio. São Paulo, 2012. 19p. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/servicos/normas-tecnicas-cetesb/normas-tecnicas-vigentes>.
- CETESB. Norma Técnica L5.214: Coliformes totais – determinação pela técnica da membrana filtrante: método de ensaio. São Paulo, 2007. 30p. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/servicos/normas-tecnicas-cetesb/normas-tecnicas-vigentes>.
- Christ, A.P.G., Ramos, S.R., Cayô, R., Gales, A.C., Hachich, E.M., Sato, M.I.Z. Characterization of Enterococcus species isolated from marine recreational waters by MALDI-TOF MS and rapid API® 20 Strep system. Marine Pollution Bulletin 118(1-2): 376-381. 2017.
- Coelho, C.A.S., Cardoso, D.H.F., Firpo, M.A.F. A seca de 2013 a 2015 na região sudeste do Brasil. Disponível em: <http://climanalise.cptec.inpe.br/~rclimanl/revista/pdf/30anos/Coelhoetal.pdf>
- Hagedorn, C., Harwood, V.J., Blanch, A., 2011. Microbial Source Tracking: Methods, Applications and Case Studies. Springer, New York, USA.
- Hall, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41:95-98. 1999.
- Hardie, J.M. and Whiley, R.A. Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement 83: 1S-11S. 1997.
- Lebreton, F., Willems, R.J.L., Gilmore, M.S. *Enterococcus* diversity, origins in Nature, and gut colonization. In: Gilmore, M.S., Clewell D.B., Ike, Y. et al., editors. Enterococci: From commensals to leading cause of drug resistant infection (Internet). Boston: Massachusetts eye and ear infirmary. 2014.
- Lee, C.R., Lee, J.H., Park, K.S., Kim, Y.B., Jeong, B.C., Lee, S.H. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. Front Microbiol. Jun 13;7:895. 2016.



COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D.R. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464 (7285): 59-65. 2010.
- Ruosseeuw, P.J. Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. *Journal of Computational and Applied Mathematics* 20: 53-65. 1987.
- Sebastian, L., Josse, J., Husson, F. FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*. 25 (1): 1-18. 2008.
- Slanetz, L.W. & Bartley, C.H. Detection and sanitary significance of fecal streptococci in water. *American Journal of Public Health and Nations Health* 54: 609-614. 1964.
- Walsh, C.J., Guinane, C.M., O'Toole, P.W., Cotter, P.D. Beneficial modulation of the gut microbiota. *FEBS Letters* 588: 4120-130. 2014.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173(2): 697-703. 1991.
- Zhang, Y., Hong, P-Y., LeChevallier, M.W., Liu, E-T. Phenotypic and phylogenetic identification of coliform bacteria obtained using 12 coliform methods approved by the U.S. Environmental Protection Agency. *Applied and Environmental Microbiology* 81:6012-6023. 2015.



COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

ANEXOS

DENSIDADES DE *E.coli* NOS DIFERENTES PONTOS DE ÁGUA S INTERIORES ESTUDADOS



COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

DENSIDADES DE *E.coli* NOS DIFERENTES PONTOS AMOSTRADOS NO ESTUDO. DADOS EXTRAÍDOS DA REDE BÁSICA DE MONITORAMENTO DA CETESB.

PONTO DE COLETA	DATA DE COLETA	<i>E.coli</i> (UFC/100mL)
VOCAÇÃO INDUSTRIAL		
ATIB2010	26/05/2014	113
	14/07/2014	300
	01/09/2014	204
	10/11/2014	60
	28/01/2014	820
	04/05/2015	540
RAIN0901	26/05/2014	40
	23/06/2014	2
	29/07/2014	1
	19/08/2014	2
	22/09/2014	1400
	21/10/2014	1
	24/11/2014	1
	19/01/2015	2
	24/03/2015	14
	28/04/2015	16
25/05/2015	30	
BITQ0100	15/05/2014	<1
	31/07/2014	128
	25/09/2014	3
	13/11/2014	1
	12/03/2015	1
	21/05/2015	1
GUAR0900	07/05/2014	17
	24/07/2014	53
	03/09/2014	25
	06/11/2014	216
	08/01/2015	152
19/03/2015	41	
COTI3900	08/05/2014	360.000
	07/07/2014	380.000
	04/09/2014	490.000
	26/11/2014	500.000
	22/01/2015	810.000
	07/05/2015	440.000
CAMO0900	24/07/2014	47
	03/09/2014	74
	06/11/2014	128
	08/01/2015	184
	19/03/2015	440.00
	14/05/2015	1800



COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

DENSIDADES DE *E.coli* NOS DIFERENTES PONTOS AMOSTRADOS NO ESTUDO. DADOS EXTRAÍDOS DA REDE BÁSICA DE MONITORAMENTO DA CETESB (Continuação).

PONTO DE COLETA	DATA DE COLETA	<i>E.coli</i> (UFC/100mL)
VOCAÇÃO AGROPECUÁRIA		
TURV2500	23/07/2014	2400
	10/09/2014	460
	05/11/2014	700
	11/01/2015	200
	13/05/2015	280
XOTE2500	06/05/2014	172
	17/07/2014	440
	04/09/2014	196
	18/11/2014	940
	20/01/2015	356
	12/03/2015	396
LAGE2500	05/05/2015	460
	06/05/2014	280
	17/07/2014	420
	04/09/2014	192
	18/11/2014	320
	20/01/2015	700
	12/03/2015	480
IACR3750	05/05/2015	500
	19/08/2014	500
	04/12/2014	3600
	03/02/2015	4000
	14/04/2015	2800
PEIX2800	09/06/2015	2360
	24/06/2014	232
	26/08/2014	107
	14/10/2014	104
	10/12/2014	640
	26/02/2015	460
STAN2700	07/04/2015	620
	24/06/2014	184
	26/08/2014	276
	14/10/2014	264
	10/12/2014	4200
	26/02/2015	3100
	07/04/2015	620



COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

DENSIDADES DE *E.coli* NOS DIVERENTES PONTOS AMOSTRADOS NO ESTUDO. DADOS EXTRAÍDOS DA REDE BÁSICA DE MONITORAMENTO DA CETESB (Continuação).

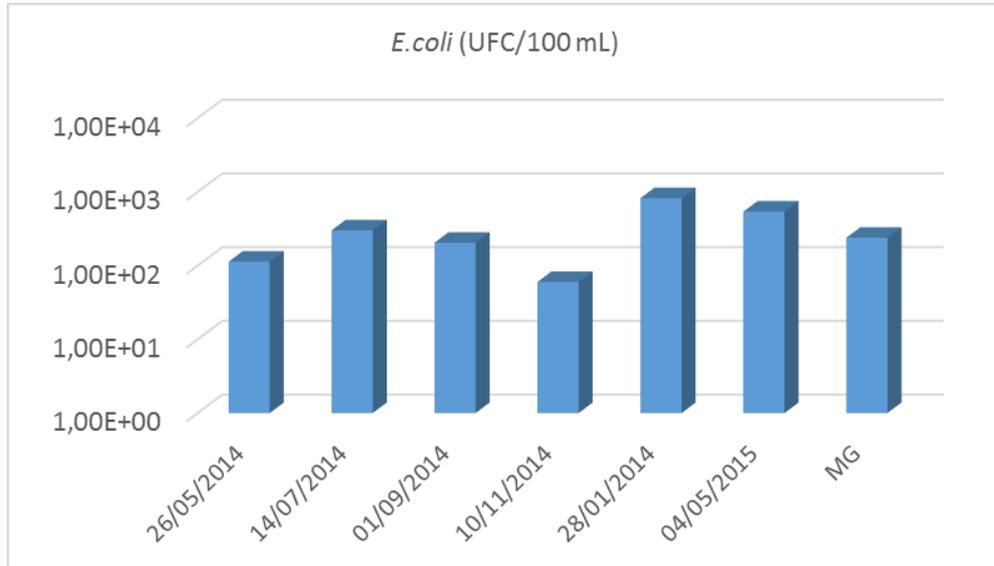
PONTO DE COLETA	DATA DE COLETA	<i>E.coli</i> (UFC/100mL)
VOCAÇÃO EM INDUSTRIALIZAÇÃO		
MOGU2800	04/06/2014	260
	27/08/2014	46
	29/10/2014	51
	10/12/2014	700
	05/02/2015	480
	16/04/2015	3800
	11/06/2015	540
VOCAÇÃO CONSERVAÇÃO		
JURU2500	24/06/2014	1
	12/08/2014	1
	30/10/2014	<1
	09/12/2014	<1
	11/06/2015	<1



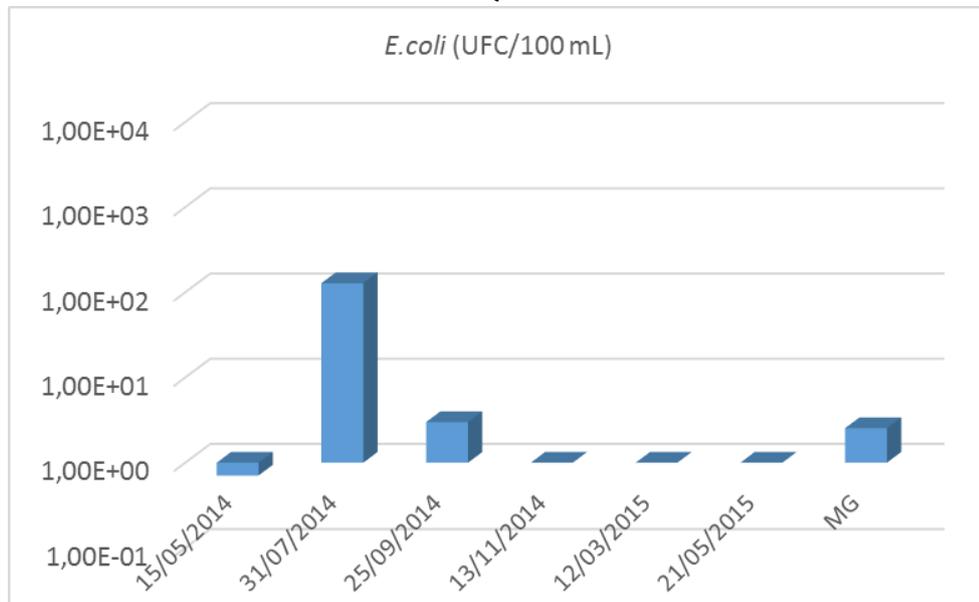
COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO

DENSIDADES DE *E.coli* – UGRHs VOCAÇÃO INDUSTRIAL

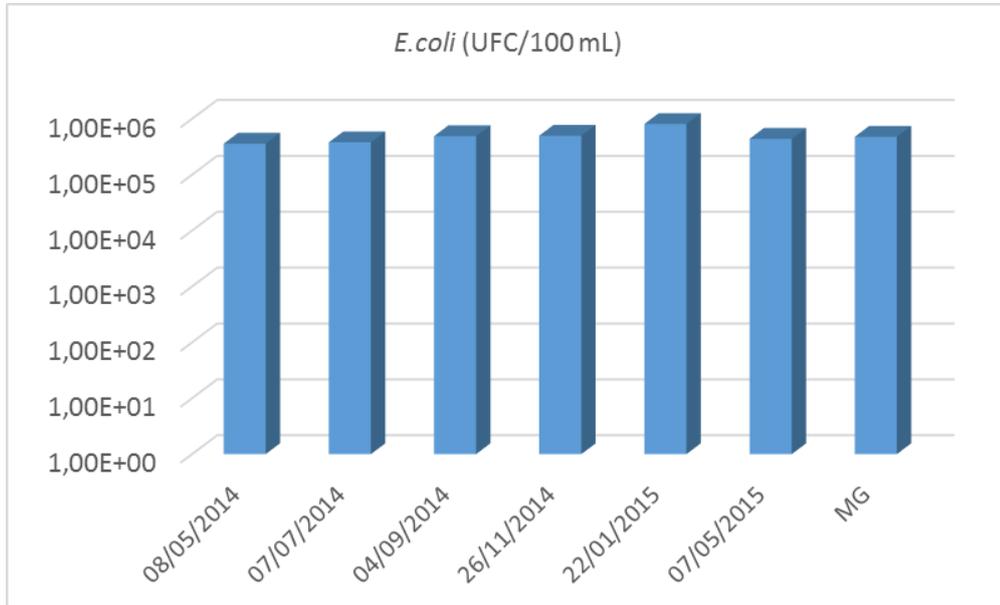
ATIB2010



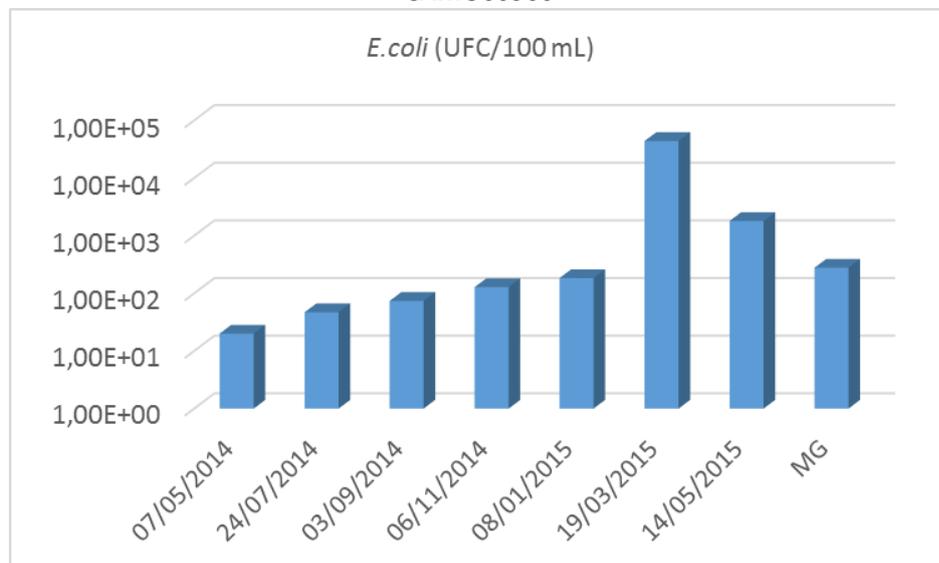
BITQ0100



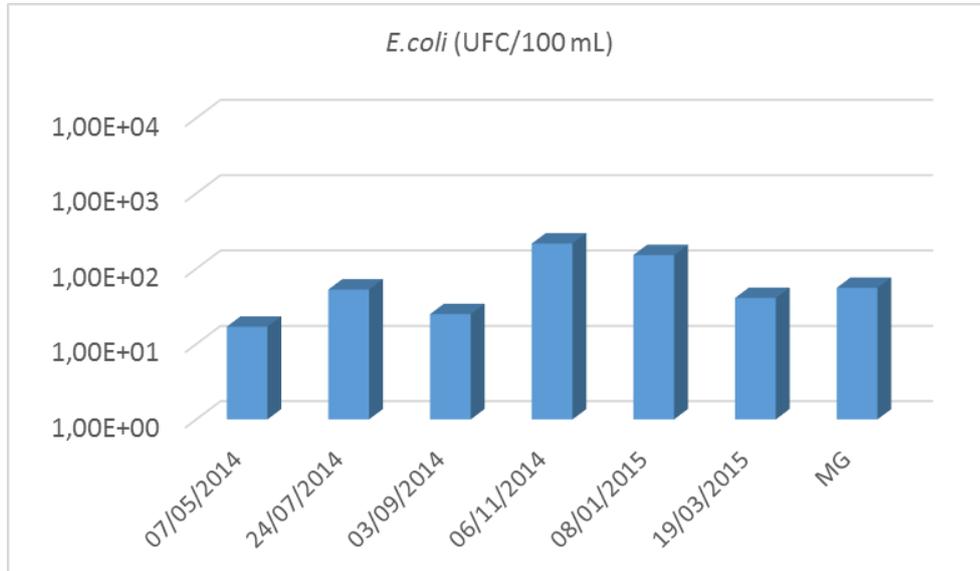
COTI3900



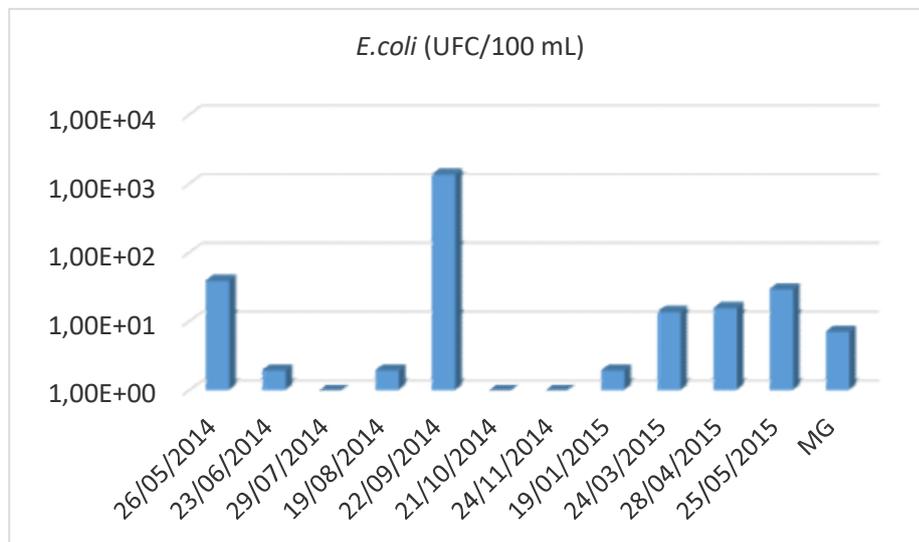
CAMO00900



GUAR0900

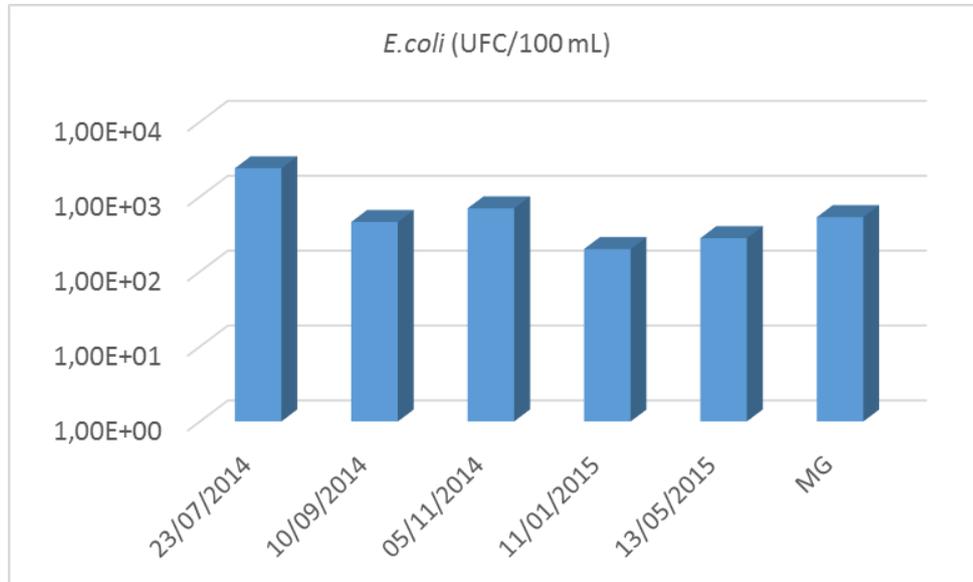


RAIN00901

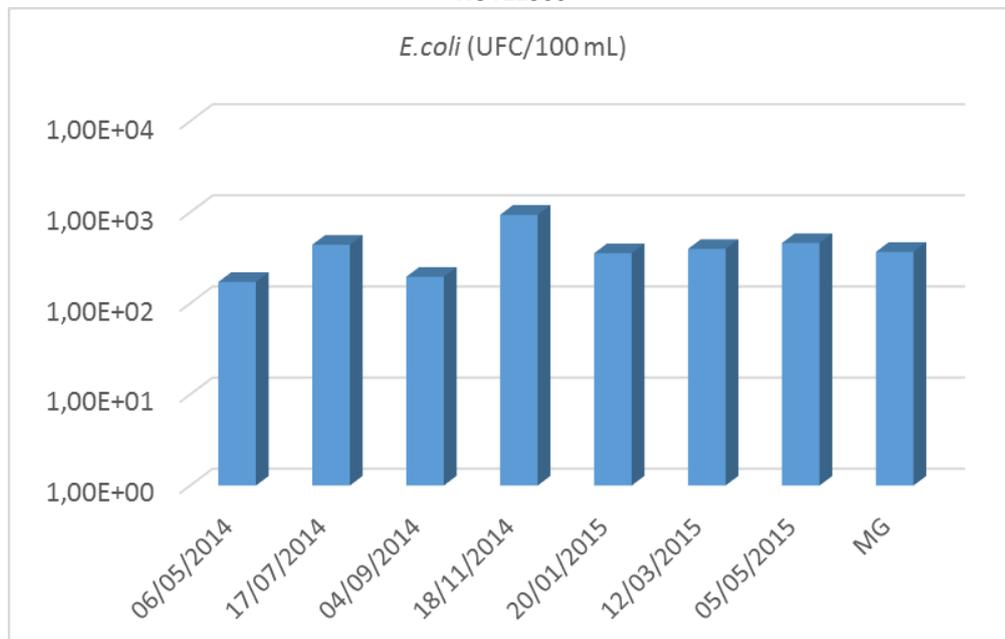


DENSIDADES *E.coli* – UGRHIS VOCAÇÃO AGROPECUÁRIA

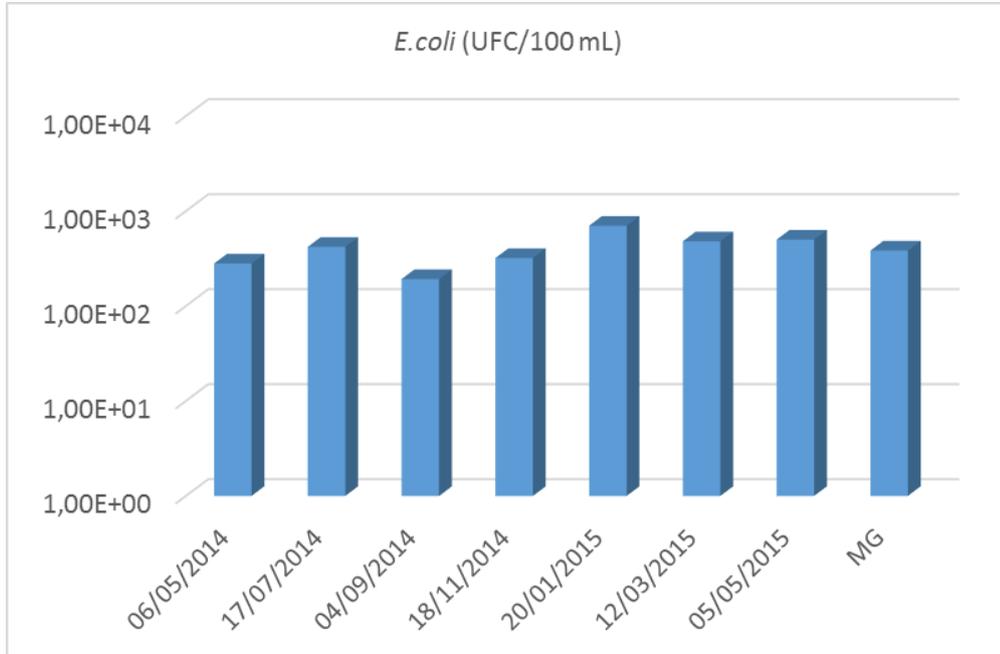
TURV2500



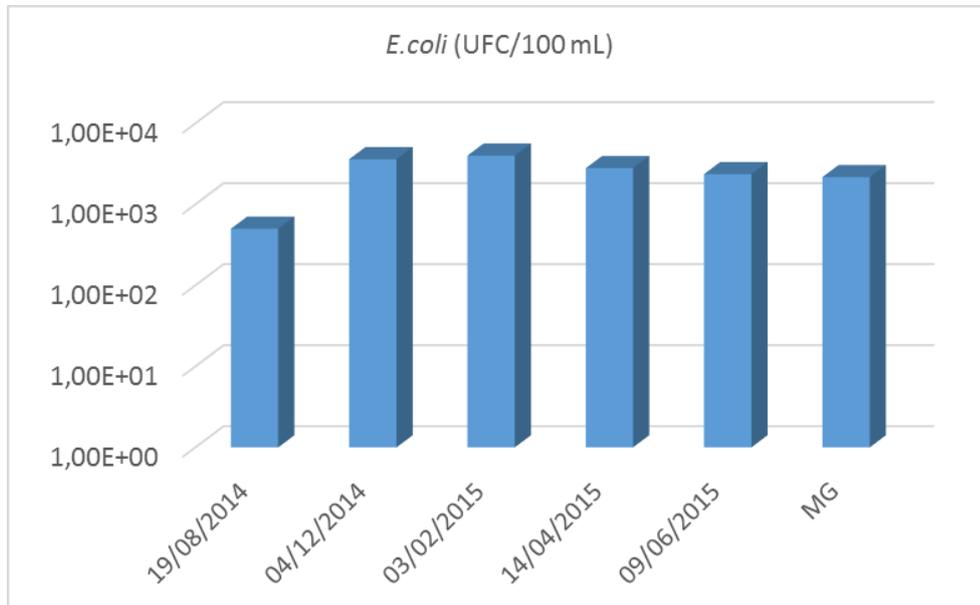
XOTE2500



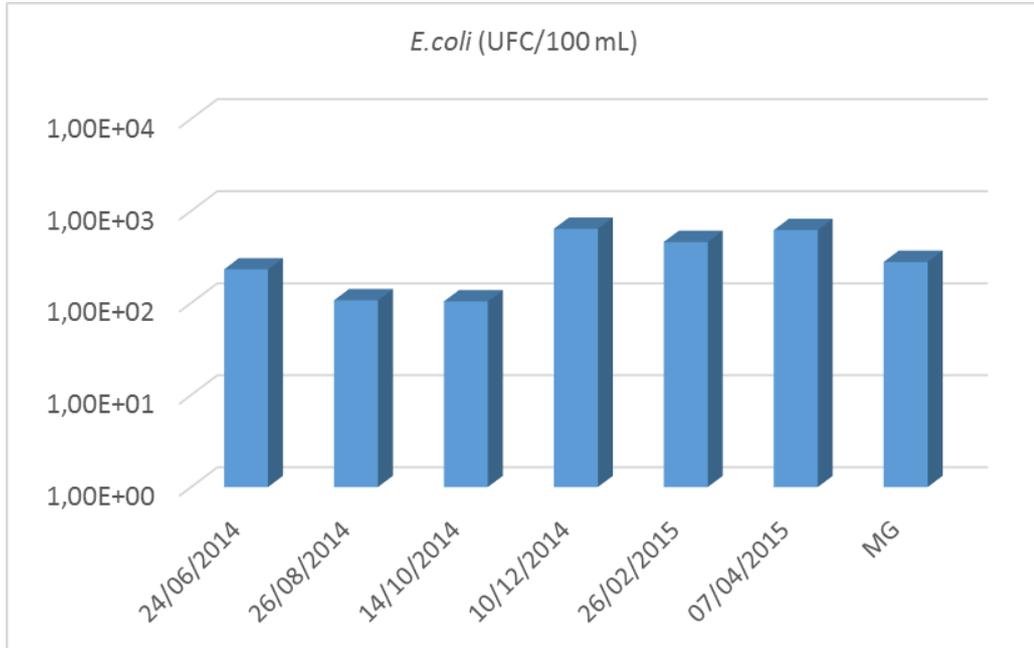
LAGE2500



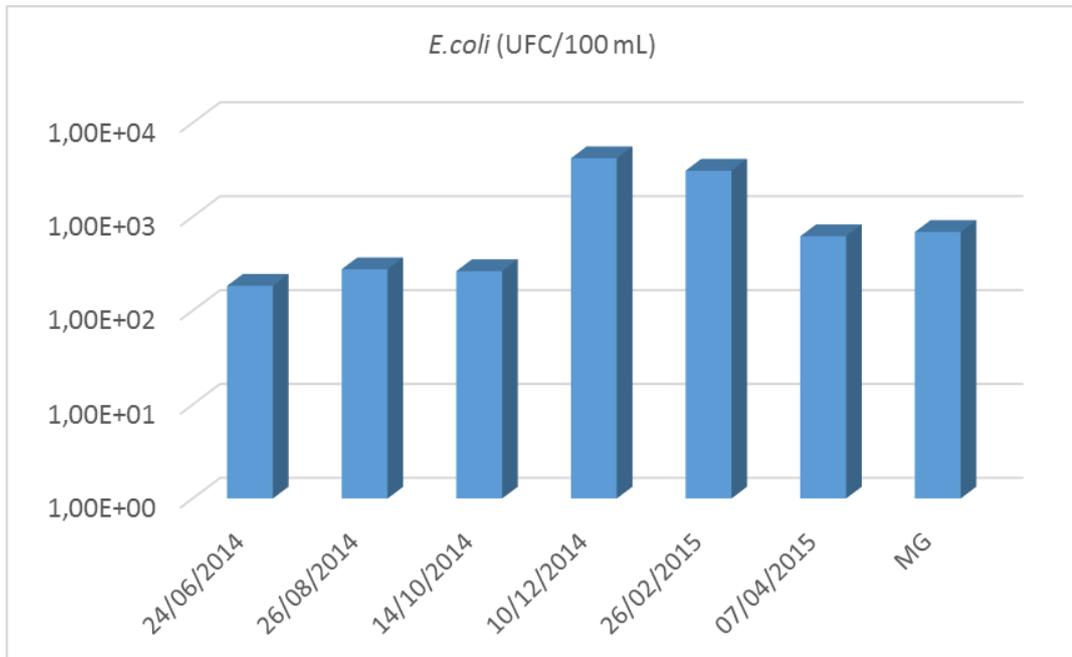
IACR3750



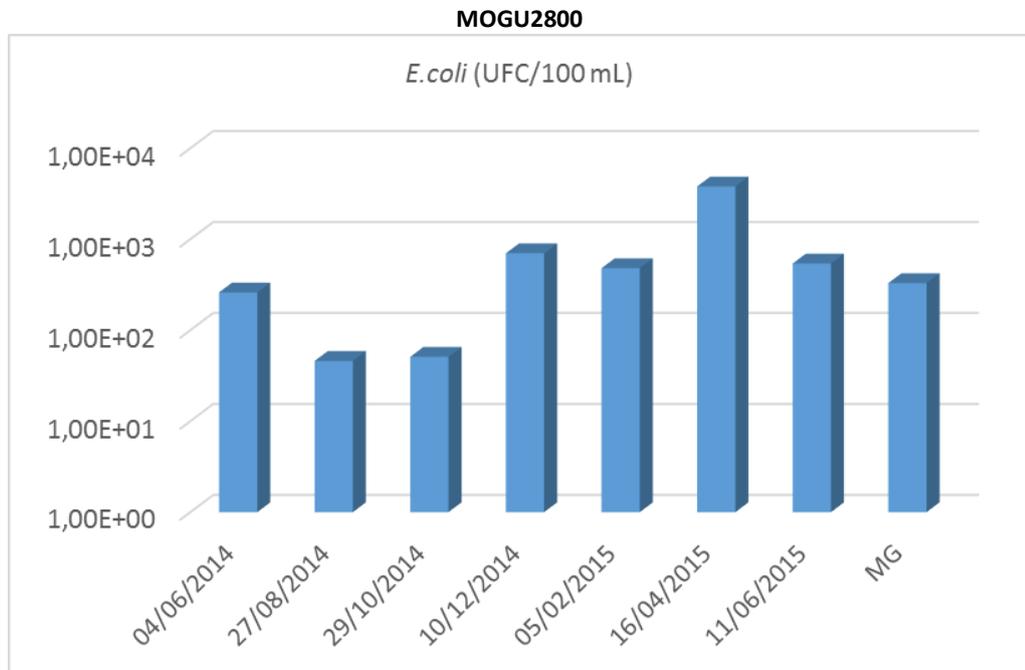
PEIX2800



STAN2700



DENSIDADES *E. coli* – UGRHIS VOCAÇÃO EM INDUSTRIALIZAÇÃO



DENSIDADES *E. coli* – UGRHIS VOCAÇÃO CONSERVAÇÃO

