

II-016 - INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS PATOGENICAS EM AMOSTRAS DE ESGOTO BRUTO E TRATADO POR LAGOAS DE POLIMENTO UTILIZANDO A TÉCNICA DA PCR

Valéria Martins Godinho⁽¹⁾

Bióloga, Mestre e Doutora em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela UFMG, Professora substituta do Departamento Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG.

Fernanda Maria Santos do Nascimento

Bióloga, Mestre em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos pela UFMG, Professora da UNIPAC-Campo Belo/MG

Silvana de Queiroz Silva

Bióloga, Mestre em Hidráulica e Saneamento pela USP São Carlos, Doutora em Microbiologia Ambiental pela University of Essex, Inglaterra, Professora adjunta do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto/MG

Marcos von Sperling⁽¹⁾

Engenheiro civil, Doutor pela Imperial College – Universidade de Londres, Professor titular do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG.

Endereço⁽¹⁾: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG; Av. Antônio Carlos, 6627 – Escola de Engenharia - Bloco 1, 4º andar, sala 4622 – CEP 31270-901 - Belo Horizonte MG -Tel: (31) 3409-1935; Fax: (031) 3409-1879; e-mail: (marcos@desa.ufmg.br; valgodinho@yahoo.com.br)

RESUMO

Os resíduos gerados pelas populações e despejados nos corpos de água por meio dos esgotos, sem tratamento, são a principal causa da poluição destes, afetando seus diversos usos. Ainda que *Escherichia coli*, seja o parâmetro mais utilizado na avaliação da remoção de patógenos, sabe-se que outros microrganismos, tais como bactérias dos gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Helicobacter* e outros, podem estar presentes e com isso poderiam ser investigados. As lagoas são processos de tratamento de esgotos e de pós-tratamentos largamente utilizados no Brasil. Estes sistemas são amplamente reconhecidos por serem capazes de remover organismos patogênicos. O presente trabalho tem por objetivo investigar a ocorrência das bactérias *Salmonella enterica* (ser) Typhimurium, *Shigella dysenteriae*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica* em esgoto bruto e efluentes de lagoas de polimento em série utilizando-se a técnica da PCR. Considerando-se *Salmonella* Typhimurium, e *Shigella dysenteriae*, estas só foram detectadas nos estágios iniciais (esgoto bruto ou lagoa 1, a depender da bactéria e da coleta) e não mais se verificou sua presença nas lagoas subsequentes. Quanto às demais bactérias investigadas (*Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica*) sua presença não foi detectada em nenhuma das unidades investigadas e em nenhuma das quatro coletas.

PALAVRAS-CHAVE: Esgoto bruto, lagoas de polimento, bactérias patogênicas, PCR

INTRODUÇÃO

Os resíduos gerados pelas populações e despejados nos corpos de água por meio dos esgotos, sem tratamento, são a principal causa da poluição destes, afetando seus diversos usos, sobretudo aquele que requer melhor qualidade, que é o abastecimento doméstico. Um corpo de água que recebe esgotos pode incorporar uma enorme quantidade dos mais variados gêneros de organismos, muitos deles patogênicos. A gênese destes agentes patogênicos, em grandes centros urbanos, é essencialmente humana, refletindo diretamente o nível de saúde da população e as condições de saneamento básico presentes em cada região. Juntamente com a contribuição humana existe a procedência animal (gatos, cachorros, aves e outros), cujos dejetos também são eliminados através do esgoto (von Sperling, 2005).

Ainda que o grupo dos coliformes, centrados em *Escherichia coli*, seja o parâmetro mais utilizado para a avaliação da remoção de patógenos, sabe-se que outros microrganismos, patogênicos ou oportunistas, tais como bactérias dos gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Helicobacter* e outros, podem estar

presentes e com isso poderiam ser investigados, de modo a permitir se a avaliação dos sistemas de tratamento também é eficiente na remoção destes. A efetiva ocorrência de bactérias patogênicas em esgotos brutos e tratados tem sido pouco estudada e a maioria dos trabalhos tem seu foco na avaliação do grupo dos coliformes.

As lagoas são processos de tratamento de esgotos e de pós-tratamento de efluentes anaeróbios largamente utilizados no Brasil. Estes sistemas são amplamente reconhecidos por serem capazes de remover organismos patogênicos. Dentre as modalidades existentes, as lagoas de polimento têm sido utilizadas como pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios, tipo UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), possibilitando alcançar elevadas eficiências na remoção de organismos patogênicos.

Há algumas décadas as ferramentas moleculares têm tido grande destaque e aplicabilidade na detecção de microrganismos quando se trata de temas relacionados a especialidades médicas. Sua utilização no conhecimento da ecologia de organismos ambientais tem se revelado nas três últimas décadas, e no Brasil, atualmente, essa tecnologia tem se despontado na avaliação dos microrganismos envolvidos nos sistemas de tratamento de esgotos com maior frequência. É assim, um instrumento de pesquisa bastante promissor, que permite conhecer com maior precisão os microrganismos patogênicos presentes nestes ambientes. Dentre as principais técnicas moleculares utilizadas na investigação de microrganismos em amostras ambientais, a PCR (*Polymerase Chain Reaction* - reação em cadeia da polimerase) tem se destacado, e tem sido utilizada na investigação de bactérias patogênicas, tais como, linhagens patogênicas de *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp. e outros microrganismos, no entendimento da sua distribuição no meio ambiente (Lee *et al.*, 2006; Burtscher *et al.*, 2003).

O presente trabalho tem por objetivo investigar a ocorrência das bactérias *Salmonella enterica* (ser) Typhimurium, *Shigella dysenteriae*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica* em esgoto bruto e efluentes de lagoa de polimento utilizando-se a técnica da PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição do aparato experimental

O aparato, em escala de demonstração, está implantado no CePTS/ (Centro de Pesquisas e Treinamento em Saneamento) UFMG/COPASA, localizado junto à ETE Arrudas, em Belo Horizonte. É constituído de um reator UASB e três lagoas de polimento em série conforme apresentado na Figura 1. As principais características do sistema estão descritas na Tabela 1. O sistema recebe esgotos sanitários típicos gerados nas cidades de Belo Horizonte e Contagem.

Coleta e preparo da amostra

Os pontos avaliados compreenderam amostras do esgoto bruto (EB), da lagoa 1 (L1) e da lagoa 3 (L3). Foram coletados 2L do afluente e do efluente das lagoas em quatro campanhas de coleta, nas seguintes datas: 25/04/2007, 27/02/2008, 11/02/2009, 27/05/2009. As datas das coletas foram selecionadas casualmente, ou seja, não foi considerado nenhum evento específico para se fazer a coleta. As amostras foram coletadas em garrafas plásticas de 2 litros, previamente lavadas com uma solução de Extran a 1%, enxaguadas com água de torneira e secas. Após a secagem, foram novamente enxaguadas com água destilada, porém não foram autoclavadas. Após a coleta, as amostras foram transportadas para o Laboratório de Microbiologia do DESA/UFMG preservadas em gelo.

As amostras provenientes das lagoas foram pré-tratadas segundo metodologia descrita em Godinho *et al.* (2007) considerando o fato de a amostra ser muito diluída e principalmente devido a elevada concentração de algas existentes nas lagoas e que poderia interferir na reação da PCR. O pré-tratamento adotado consistiu basicamente em filtrar as amostras em filtro de 12,5 cm de diâmetro e 8,0 µm de porosidade (Filtros J-Prolab-faixa azul), e em seguida através de membrana éster-celulose, de 47 mm de diâmetro e porosidade 1,2 µm, Milipore, ou equivalente e em seguida foram concentradas por centrifugação a 4000 rpm durante 30 minutos. O esgoto bruto foi centrifugado a 4.000 rpm por 20 minutos diretamente, sem passar por nenhum processo de purificação prévio. O sedimento obtido da centrifugação das amostras foi mantido a -20 °C até se fazer a extração do DNA. O volume especificado (2 L) foi integralmente utilizado para se fazer a extração do DNA a ser utilizado nas reações da PCR.



Figura 1 - Fluxograma e vista parcial do aparato experimental: UASB, Lagoas 1, 2, 3 e Filtro

Tabela 1 - Características do reator UASB e das lagoas de polimento

Reator UASB	Lagoas de Polimento 1 e 2	Lagoa de Polimento 3
Volume: 14,2 m ³	Volume: 125 m ³	Volume: 42 m ³
Altura: 4,5 m	Comp. no fundo: 25,00 m	Comp. no fundo: 16,56 m
Diâmetro: 2,0 m	Largura no fundo: 5,25 m	Largura no fundo: 5,25 m
	Profundidades médias: 0,75 m e 0,70 m respectivamente	Profundidade média: 0,50 m
Vazão Média: 29 m ³ /d	Vazão Média: 29 m ³ /d	Vazão Média: 29 m ³ /d
TDH: 11,7 h	TDH: 4,3 d TAH: 0,15 m ³ /m ² .d	TDH: 1,5 d TAH: 0,22 m ³ /m ² .d
TDH: Tempo de detenção hidráulica; TAH: Taxa de aplicação hidráulica		

Extração do DNA para as análises da PCR

Para a extração do DNA, utilizou-se o protocolo descrito por Egli *et al.* (2003). As extrações foram feitas em duplicata ou triplicata, a depender da quantidade de amostra gerada na fase de preparo da amostra. Os sedimentos obtidos foram unificados em único tubo. Após a extração, alíquotas de 5,0 µl de cada amostra extraída, adicionadas a 1,0 µl de tampão de corrida, foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% a 75 V por 40 minutos. O marcador de DNA (*Ladder*) utilizado para verificar a positividade da extração foi o de 1 Kb ou 100 pb (*Fermentas*). O gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) por aproximadamente 15 minutos e em seguida submerso em água destilada por 5 minutos. A visualização e obtenção das imagens foram feitas em um transiluminador de luz UV (de 300 nm) para verificar a presença de bandas fluorescentes e a confirmação positiva da extração do DNA.

Condições de amplificação do DNA

As concentrações e volumes das reações da PCR estão apresentados na Tabela 2. A amplificação do DNA pela PCR foi feita seguindo as seguintes condições: desnaturação inicial: 3 minutos a 94 °C; desnaturação: 30 ciclos de 60 segundos a 94 °C; anelamento: 1 minuto a T° específica; extensão: 1 minuto a 72 °C; extensão final: 7 minutos a 72 °C. As temperaturas, inicial e final, foram de 94 °C e 4 °C, respectivamente. Para a análise das bactérias investigadas foram utilizados pares de *primers* específicos para cada grupo alvo investigado, listados na Tabela 3. As melhores temperaturas de anelamento para cada par de *primers* foram determinadas por meio de reações da PCR com culturas puras em um termociclador com gradiente de temperatura (*Mastercycler Gradient*, *Eppendorf*), onde foram testadas simultaneamente várias temperaturas diferentes

Tabela 2 - Concentrações e volumes dos reagentes utilizados na reação de PCR

Reagentes	Concentração estoque	Concentração por reação	Volume (μL)
Água ultra-pura	-	-	16,875
*Tampão	10X	1X	2,5
dNTP	10 mM Total	0,2 mM Total	0,5
Primer 1	10 pmol/μL	0,3 pmol/μL (300 nM)	0,75
Primer 2	10 pmol/μL	0,3 pmol/μL (300 nM)	0,75
BSA	2,5 mg/mL	0,3 μg/μL	3,0
Taq Polimerase	5 u/μL	0,7 u	0,125
DNA template			0,5
Volume total			25 μL

* Tampão acrescido de 50mM de MgCl₂ (concentração por reação 1,5 mM)

Tabela 3 - Primers específicos utilizados na detecção de bactérias patogênicas por PCR

Bactéria	Nome dos primers	Sequência (5' → 3')	Gene alvo	Amplicon (pb)	*T. (°C)	Referência
Salmonella Typhimurium	L-himA	cgtgctctggaaaacggtga g	himA	123	65	Bej <i>et al.</i> (1994).
	R-himA	cgtgctgtaataggaata tcttca				
Shigella dysenteriae	L-phoBR	attgaagccgcgcgcg acgcaa	phoB-phoR	152	68	Bej (2004)
	R-phoBR	cgttgccctgacaccttgaggg gcaatcagcgtcagtaatgtt c				
Helicobacter pylori	HP1	gctaagagatcagcct atgtcc	DNAr 16S	521	55	Lu <i>et al.</i> (2002).
	HP2	ctgtcttcatttgagcattc				
Yersinia enterocolitica	YE-1	gcaacatacatcgcaactc	Gene de enteroto -xina	159	-	Burtscher e Wuertz (2003).
	YE-2	gcaacatacatcgcaactc				
Staphylococcus aureus	nuc1	gcgattgatggatgacggtt agccaagccttgacgaactaa agc	Gene nuc	270	55	Burtscher e Wuertz (2003).
	nuc2	gcgattgatggatgacggtt agccaagccttgacgaactaa agc				

*Temperatura de anelamento recomendada pelos autores dos artigos de referência

Os resultados da PCR podem ser interpretados da seguinte maneira: i) positivo: presença de bandas no gel, do fragmento de interesse, de acordo com o tamanho do fragmento amplificado no *Ladder* (não importando a intensidade da banda); ii) negativo: ausência de bandas no gel, implicando que o gênero ou a espécie investigada estava ausente na amostra, ou estava abaixo do limite de detecção da técnica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 4 apresenta um resumo dos resultados das bactérias investigadas por meio da PCR, nas coletas 1 a 4.

Tabela 4 - Resultados da PCR para as bactérias investigadas com primer específico

Bactérias	Coleta 1			Coleta 2			Coleta 3			Coleta 4		
	EB	L1	L3	EB	L1	L3	EB	L1	L3	EB	L1	L3
Salmonella Typhimurium	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Shigella dysenteriae	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Helicobacter pylori	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yersinia enterocolitica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ Amplificação do DNA bacteriano positiva/ - Amplificação do DNA bacteriano negativa

EB = esgoto bruto; L1 e L3 = efluentes das lagoas 1 e 3, respectivamente

Quanto à bactéria *Salmonella enterica* (ser) Typhimurium, os resultados mostraram a presença de *amplicons* de 123 pb, indicando reação positiva no esgoto bruto (nas duas primeiras coletas) e um baixo sinal na lagoa 1 (na primeira coleta). Para as coletas 3 e 4 foram detectadas bandas positivas para a amostra oriunda do esgoto bruto (EB), e ausência de bandas para as lagoas 1 e 3 (L1 e L3). Estes resultados indicam que o sistema de tratamento pode ter apresentando decaimento de *Salmonella* Typhimurium no decorrer das unidades.

Para *S. dysenteriae* a amplificação só foi positiva para o EB na primeira coleta. Mesmo considerando a hipótese de que o *primer* para *S. dysenteriae* seja bastante sensível, não se verificaram reações positivas para *S. dysenteriae* nas lagoas em nenhuma das coletas.

Quanto a *H. pylori*, esta não foi detectada em nenhum dos pontos avaliados, nas quatro coletas, mesmo após algumas mudanças que levariam a uma otimização da PCR (alterações da temperatura de anelamento, diluição das amostras, aumento no volume de DNA *template*). Também foi utilizada a estratégia de “*Nested PCR*”, onde foi aplicado o par de primers 1541 e EpF que amplifica aproximadamente 1400pb do gene DNAr16S para o domínio *Bacteria*, e o uso dos *amplicons* para uma nova reação de PCR com os *primers* de uma região do gene DNAr16S, específico de *H. pylori* para as amostras da primeira e segunda coletas. Porém, os resultados da segunda amplificação também foram negativos.

Alguns pesquisadores que investigaram a presença de *H. pylori* em amostras de esgoto bruto e tratado utilizando-se de técnicas moleculares (PCR e PCR-RT) também não a detectaram em suas amostras (Lee *et al.*, 2006; Shannon *et al.*, 2007; Janzon *et al.*, 2009). Ao contrário, Lu *et al.* (2002) identificaram *H. pylori* em amostras de esgotos não tratados, coletadas em um canal de esgoto a “céu aberto” no México. Importantes observações sobre a detecção de *H. pylori* em diversas amostras de água, incluindo água potável, água residuária, biofilmes oriundos de água doce, água de lagos e de rios, foram feitas no trabalho de pesquisa conduzido por Janzon *et al.* (2009). Os autores fizeram um extenso levantamento de possíveis fatores que poderiam ocasionar falhas na tentativa de se detectar o DNA de *H. pylori* nas amostras especificadas, em Dhaka/Bangladesh – região de alta endemicidade de *H. pylori*, utilizando a técnica de PCR-RT, com rigoroso controle de resultados falso-positivo e falso-negativo.

Para confirmar que seus resultados negativos não eram falso-negativos os autores monitoraram, por meio de testes, diversos fatores intervenientes na PCR, que poderiam ser elementos a ocasionar resultados falso-negativos e/ou falso-positivos, tais como, o método de coleta da amostra, a sensibilidade da reação, a especificidade dos ensaios com cultura pura e a possível degradação do DNA *template*. Os autores também sugeriram que a ausência de resultados positivos pudesse estar associada à presença de inibidores da PCR.

Mesmo após controlar todos estes fatores de interferência, ainda assim não foram verificados resultados positivos e confirmou-se a veracidade do resultado negativo. Algumas de suas observações estão em consonância com as verificadas nesta pesquisa. Aqui também foram adotadas medidas na tentativa de confirmar os resultados negativos para *H. pylori* nas amostras investigadas, tais como a diluição do DNA, a fim de minimizar inibidores da reação de PCR, “*Nested PCR*”, PCR com gradiente de temperatura e cultura pura, aumento e diminuição do DNA *template*, sendo que nenhuma dessas medidas foi suficiente para modificar o resultado negativo observado nas amostras investigadas nas quatro coletas.

Janzon *et al.* (2009) concluíram que possivelmente a rota de transmissão predominante na área estudada (Bangladesh) não seria por meio de veiculação hídrica, mas ainda assim eles consideram que esta via de transmissão não pode ser refutada em regiões em que haja endemicidade de *H. pylori*. Elitsur e Yahav (2005) mencionam que, a partir de 2004, vários trabalhos restabeleceram a rota feco-oral como um modo efetivo de transmissão desta espécie. Aqui também se aventa a possibilidade de que os esgotos, brutos e tratados, ainda não sejam rotas expressivas de veiculação da espécie bacteriana na região estudada. Assim, pode-se considerar a não detecção desta bactéria no presente trabalho, principalmente pela possibilidade de que a rota feco-oral ainda não esteja bem estabelecida na transmissão da doença na região estudada. Tais observações não implicam dizer que *H. pylori* esteja totalmente ausente no esgoto de Belo Horizonte, mas que possivelmente, caso ocorra, seja em concentração tão baixa que não pode ser detectada pela PCR.

Os resultados também foram negativos para todas as tentativas de detecção de *Staphylococcus aureus* nas três amostras investigadas, nas quatro coletas. Este resultado é bastante coerente com aqueles observados por Shannon *et al.* (2007) e Lee *et al.* (2006), utilizando a técnica da PCR em tempo real para quantificação de bactérias patogênicas, nos quais *Staphylococcus aureus* não foi detectada em nenhuma das amostras de esgoto

(bruto ou tratado) investigadas. Ampofo e Clerk (2003) reportaram que, dentre 25 gêneros de bactérias patogênicas investigadas em um sistema de tratamento de esgoto, composto por 4 lagoas de maturação em série, utilizando-se técnicas de cultivo, o gênero *Staphylococcus* foi detectado em menos de 1% das amostras.

Ahtiainen *et al.* (1991), também investigaram a presença do gênero *Staphylococcus* spp. em águas poluídas, no sul da Finlândia, incluindo na avaliação, amostras de esgoto tratado. Os autores verificaram que dentre 48 amostras avaliadas, somente uma amostra (correspondente a 2%) mostrou-se positiva para *Staphylococcus aureus*. A presença de *Staphylococcus aureus* foi identificada em 18% das amostras de águas pristinas investigadas. Nas amostras de esgoto tratado, a espécie mais comum foi *Staphylococcus cohnii*, que é patogênica oportunista. D'Azevedo *et al.* (2008) relataram um caso de infecção por *S. cohnii*, ocorrido no estado de São Paulo/Brasil, cujo paciente, foi a óbito no 25º dia de internação.

Considerando-se que o gene nuc (que codifica a enzima nuclease extracelular termooestável de *S. aureus*) é um bom marcador para investigação deste organismo (Burtscher e Wuertz, 2003; Martineau *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1997), a ausência de resultados positivos para *S. aureus* é aceitável. É possível que outras espécies do gênero *Staphylococcus*, que sejam oportunistas quando se instalam em hospedeiros humanos imunossuprimidos, possam estar presentes nos esgotos em concentrações mais elevadas que *Staphylococcus aureus*.

Outro fato relevante é que a toxina liberada por esta espécie, que é o grande problema atribuído a elas, está basicamente restrita aos alimentos, sendo raramente detectada nas fezes, uma vez que esta espécie é detectada principalmente em infecções da pele e da garganta. Porém como tem importante papel em infecções nosocomiais, pode ser detectada, eventualmente, em amostras de esgotos que recebam resíduos de unidades hospitalares sem tratamento prévio. Considerando-se que em ambientes muito competitivos *Staphylococcus* spp. não são boas competidoras (Tortora *et al.*, 2005) e que sua presença em amostras de esgotos brutos e tratados possa ser detectada quando haja algum aumento de infecções nosocomiais de origem estafilocócica, os resultados negativos verificados nesta pesquisa são razoáveis.

Quanto a *Y. enterocolitica* não houve resultado positivo de PCR para todas as amostras investigadas nas quatro coletas, indicando ausência desta no esgoto e nas unidades de tratamento. É possível que esta bactéria patogênica esteja em concentrações muito baixas nos esgotos brutos e tratados das ETEs brasileiras, uma vez que a sua ocorrência é mais detectada em países de clima temperado (Carniel, *et al.*, 2006; Falcão e Falcão, 2006).

CONCLUSÕES

A presente pesquisa teve por objetivo a investigação das bactérias patogênicas: *Salmonella enterica* (ser) Typhimurium, *Shigella dysenteriae*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* no esgoto sanitário bruto e no efluente de lagoas de polimento em série (lagoas 1 e 3 após reator UASB), utilizando-se a técnica da PCR. Avaliando-se as bactérias *Salmonella* Typhimurium, e *Shigella dysenteriae*, estas só foram detectadas nos estágios iniciais (esgoto bruto ou lagoa 1, a depender da bactéria e da coleta) e não mais se verificou sua presença nos estágios posteriores do tratamento. A ausência de reações positivas para estas bactérias nos demais estágios do tratamento (lagoas 1 e 3, a depender da coleta) pode ser interpretada pela interação de dois eventos: i) a ocorrência de um decaimento expressivo nas unidades do tratamento e ii) os baixos índices com que tais bactérias ocorreram nos esgotos, particularmente, nas amostras e nos períodos estudados.

Quanto às demais bactérias investigadas (*Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica*) sua presença não foi detectada em nenhuma das unidades do tratamento investigadas em nenhuma das quatro coletas. O fato de que uma espécie (e/ou sorotipo) tenha se mostrado negativo pode não significar totalmente que a bactéria esteja ausente nas amostras investigadas. Existe a possibilidade de que a espécie possa estar presente, porém em concentrações muito baixas, ou ainda que a rota feco-oral não esteja totalmente estabelecida na transmissão da espécie, requerendo que sejam feitas mais análises para que se tenha um resultado mais representativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AHTIAINEN, J., NIEMI, M., SOMER, H.J. Staphylococci in polluted waters and in waters of uninhabited areas. *Water Science and Technology*, London, v. 24, n. 2, p. 103–108, 1991.
2. AMPOFO, J.A.; CLERK, G.C. Diversity of bacteria in sewage treatment plant used as fish culture pond in southern Ghana. *Aquaculture Research*, v. 34, p.667-675, 2003.
3. BEJ, A.K., MAHBUBANI, M.H., BOYCE, M.J., Atlas, R.M. Detection of Salmonella spp. in Oysters by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(1), 368-373, 1994.
4. BEJ, A.K. Detection of microbial nucleic acids by polymerase chain reaction in aquatic samples. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*, Ed(s) George A. Kowalchuk, Frans, J. de Bruijn, Ian M. Head, Antoon D.L. Akkermans, Jan Dirk van Elsas, v1, 2nd Edition. p. 369-432, 2004.
5. BURTSCHER, C. e WUERTZ, S. Evaluation of the use of PCR and reverse transcriptase PCR for detection of pathogenic bacteria in biosolids from anaerobic digestors and aerobic composters. *Applied and Environmental Microbiology*, v.69, p. 4618-4627, 2003.
6. CARNIEL, E.; AUTENRIETH, I.; CORNELIS, G.; FUKUSHIMA, H.; GUINET, F.; ISBERG, R.; PHAM, J.; PRENTICE, M.; SIMONET, M.; SKURNIK, M.; WAUTERS, G. Y. enterocolitica and Y. pseudotuberculosis. In: MARTIN, D.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K-H.; STACKEBRANDT, E. (Ed.) *The Prokaryotes. A handbook on the biology of Bacteria*. 3. ed. Springer, New York, p.270-398. 2006.
7. D'AZEVEDO, P.A.; ANTUNES, A.L.S.; MARTINO, M.D.V.; PIGNATARI, A.C.C. Staphylococcus cohnii spp. urealyticus: relato de caso de um patógeno incomum. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.41, n.2, p. 197-199, mar-abr, 2008.
8. EGLI, K.; LANGER, C.; SIEGRIST, H-R.; ZEHNDER, A.J.B.; WAGNER, M.; VAN DER MEER, J.R. Community analysis of ammonia and nitrite oxidizers during start-up of nitrification reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 6, p. 3213-3222, 2003.
9. ELITSUR, Y.; YAHAV, J. *Helicobacter pylori* Infections in Pediatrics. *Helicobacter*, v. 10 (suppl. I), p. 47-53, 2005.
10. FALCÃO, J.P. FALCÃO, D.P. Importância de Yersinia enterocolitica em microbiologia médica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 27, nº 1, p. 9-19, 2006.
11. GODINHO, V.M., SILVA, S.Q.; NASCIMENTO, F.M.S; von SPERLING, M. Desenvolvimento e aplicação de metodologia para concentração e extração de DNA de bactérias presentes em efluentes de lagoas de polimento. In: 24º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 02 a 07 de setembro. Belo Horizonte: ABES. 2007.
12. JANZON, A.; SJÖLING, A.; LOTHIGIUS A.; AHMED, D.; QADRI, F.; SVENNERHOLM, A-M.; Failure to Detect Helicobacter pylori DNA in Drinking and Environmental Water in Dhaka, Bangladesh, using Highly sensitive Real-Time PCR Assays. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 10, p. 3039-3044, may. 2009.
13. LEE, D-Y.; SHANNON, K.; BEAUDETTE, L.A. Detection of bacterial pathogens in municipal wastewater using an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods*, v.65, p. 453-467, 2006.
14. LU, Y.; REDLINGER, T.E.; AVITIA, R.; GALINDO, A.; GOODMAN, K. Isolation and genotyping of H. pylori from untreated municipal wastewater. *Applied Environmental Microbiology*, v. 68, n. 3, p. 1436-1439, 2002.
15. MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; ROY, P.H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M.G. Species-Specific and Ubiquitous-DNA-Based Assays for Rapid Identification of Staphylococcus aureus. *Journal of Clinical Microbiology*, v.36, n. 3, p.618-623. 1998.
16. SHANNON, K.E.; LEE, D-Y; TREVORS, J.T.; BEAUDETTE, L.A. Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, v.382, p.121-129. 2007.
17. TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C.L. (2005). *Microbiologia*. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
18. VON SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 3ª.ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – UFMG. 452p. (Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, 1). 2005.
19. WANG, R-F.; CAO, W.W; CERNIGLIA, C.E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *Journal of Applied Microbiology*, Washington, v. 83, p. 727-736, 1997.