



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO
AMBIENTE

THAISLA CRISTIANE BORELLA DA SILVA

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMEBAS DE VIDA
LIVRE A PARTIR DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO EM PORTO
ALEGRE, BRASIL.**

PORTO ALEGRE

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Borella da Silva, Thaisla Cristiane
ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
AMEBAS DE VIDA LIVRE A PARTIR DE ESTAÇÕES DE
TRATAMENTO DE ESGOTO EM PORTO ALEGRE, BRASIL. /
Thaisla Cristiane Borella da Silva. -- 2023.
79 f.
Orientadora: Marilise Brittes Rott.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Acanthamoeba. 2. Amebas de Vida Livre. 3.
Estações de tratamento de esgoto. I. Brittes Rott,
Marilise, orient. II. Título.

THAISLA CRISTIANE BORELLA DA SILVA

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMEBAS DE VIDA LIVRE A PARTIR DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO EM PORTO ALEGRE, BRASIL.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof.^a Dra. Marilise Brittes Rott

PORTO ALEGRE

2023

“Para el investigador no existe alegría comparable a la de un descubrimiento, por pequeño que sea”

Alexander Fleming

AGRADECIMENTOS

O maior agradecimento vai para a razão do meu viver, minha mãe Claudia Maria Borella, a pessoa mais batalhadora, maravilhosa e incrível que eu conheço, se estou onde estou é por causa de seu apoio. Muito obrigada por tudo e espero ser um dia a mulher que você é para mim.

Não posso deixar de agradecer ao meu companheiro, Leonardo José Roxo Rocho, que me apoia, acredita, e se interessa pelas minhas nerdices, e a minha melhor amiga Jéssica Azambuja Chaves, que mesmo longe, está sempre ao meu lado, me apoiando, acreditando e compartilhando os mais diversos momentos.

Não podia deixar de agradecer a melhor orientadora que eu podia pedir, Marilise Brittes Rott, que embarcou na minha ideia, acreditou nela e estamos trilhando esse lindo caminho juntas, e um agradecimento especial a Gertrudes Corção por todo apoio e carinho.

Muito obrigada aos meus amigos, amigas e familiares que acreditaram em mim e trilharam uma parte deste caminho comigo, com um agradecimento especial ao Giancarlo Tomazzoni de Oliveira, Felipe Santiago Machado de Carvalho e ao Ricardo Rohweder por todo apoio, e as minhas melhores amigas Kellen Barros e Larissa Borges Parodi.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa, e ao Departamento Municipal de Água e Esgoto (DMAE) de Porto Alegre, pela parceria nas coletas de amostras de esgoto, o qual me permitiu realizar este trabalho.

Por fim, agradeço a todos os meus colegas do laboratório de amebas de vida livre, que se tornaram amigos, e a todos que conheço e que contribuíram com meu crescimento e que acreditam no meu potencial.

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AMEBAS DE VIDA LIVRE A PARTIR DE ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ESGOTO EM PORTO ALEGRE, BRASIL ¹

Autora: Thaisla Cristiane Borella da Silva
Orientadora: Prof.^a Dra. Marilise Brittes Rott

RESUMO

Amebas de vida livre (AVL) são protozoários anfitriões, podendo estar no meio ambiente ou parasitando humanos e animais, sendo microrganismos amplamente encontrados no ar, água e solo. Algumas espécies e/ou gêneros, como *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, *Vermamoeba vermiformis*, *Paravahlkampfia francinae* n. sp. e *Sappinia pedata*, são associadas a doenças que afetam os olhos, a pele, o pulmão e o sistema nervoso central de humanos. Se alimentam de bactérias, fungos e até mesmo protozoários, por um processo chamado fagocitose. Porém, alguns microrganismos podem resistir a esse processo, tornando-se microrganismos resistentes as AVL (MRA) e abrigando-se dentro das amebas, que atuam como reservatórios. O ambiente do esgoto é rico em microrganismos e matéria orgânica, sendo seu estudo importante em termos de saúde pública. O objetivo deste trabalho foi isolar, identificar e caracterizar AVL presentes nas estações de tratamento de esgoto de Porto Alegre, Brasil. Foram coletadas amostras de 1L de oito estações, tanto do esgoto bruto quanto do esgoto tratado, nos meses de Janeiro, Fevereiro, Julho e Agosto de 2022. O material foi semeado em cultura monoxênica, o crescimento das amebas foi acompanhado por 15 dias, e realizado caracterização morfológica. Os resultados da PCR indicaram a presença de AVL em 100% das amostras, sendo o gênero *Acanthamoeba* o único encontrado. O sequenciamento gênico evidenciou a presença de *Acanthamoeba lenticulata* e *Acanthamoeba polyphaga*, com genótipos T5 e T4, respectivamente, que são relacionados à patogenicidade. O esgoto tratado é liberado no lago Guaíba ou no Rio Gravataí que são ambientes aquáticos utilizados para fins recreacionais, permitindo que hospedeiros entrem em contato com essas amebas e os MRA, o que pode significar riscos em termo de saúde pública.

Palavras-chave: *Acanthamoeba*, genótipo T4, genótipo T5, Lago Guaíba, Rio Gravataí.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS - Brasil - Agosto, 2023.

ISOLATION, IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF FREE-LIVING AMOEBAE FROM SEWAGE TREATMENT STATIONS IN PORTO ALEGRE, BRAZIL ¹

Author: Thaisla Cristiane Borella da Silva

Supervisor: Prof. Dr. Marilise Brittes Rott

ABSTRACT

Free-living amoebae (FLA) are amphizoic protozoans, which can be in the environment or parasitizing humans and animals, and are microorganisms widely found in air, water and soil. Some species and/or genera, such as *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, *Vermamoeba vermiformis*, *Paravahlkampfia francinae* n. sp. and *Sappinia pedata*, are associated with diseases that affect the eyes, skin, lungs and central nervous system of humans. They feed on bacteria, fungi and even protozoa, through a process called phagocytosis. However, some microorganisms can resist this process, becoming microorganisms resistant to FLA and sheltering inside the amoebae, which act as reservoirs. The sewage environment is rich in microorganisms and organic matter, and its study is important in terms of public health. The objective of this work was to isolate, identify and characterize FLA present in sewage treatment plants in Porto Alegre, Brazil. Samples of 1L were collected from eight stations, both raw sewage and treated sewage, in the months of January, February, July and August 2022. The material was sown in a monoxenic culture, the growth of the amoebas was monitored for 15 days, and morphological characterization was carried out. The PCR results indicated the presence of FLA in 100% of the samples, with the genus *Acanthamoeba* being the only one found. Gene sequencing showed the presence of *Acanthamoeba lenticulata* and *Acanthamoeba polyphaga*, with T5 and T4 genotypes, respectively, which are related to pathogenicity. Treated sewage is released into Lake Guaíba or the Gravataí River, which are aquatic environments used for recreational purposes, allowing hosts to come into contact with these amoebae and microorganisms resistant to FLA, which can pose risks in terms of public health.

Keywords: *Acanthamoeba*, genotype T4, genotype T5, Guaíba Lake, Gravataí River.

¹ Master's Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS - Brazil - August, 2023.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral.....	15
2.2	Objetivos Específicos.....	15
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1	Histórico.....	16
3.2	Aspectos biológicos e morfologia das espécies.....	17
3.2.1	Taxonomia e classificação das AVL.....	17
3.2.2	<i>Acanthamoeba</i> spp.....	18
3.2.3	<i>Naegleria</i> spp.....	20
3.2.4	<i>Balamuthia</i> spp.....	21
3.2.5	<i>Vermamoeba</i> spp.....	23
3.2.6	<i>Sappinia</i> spp.....	24
3.2.7	<i>Paravahlkampfia francinae</i> n. sp.....	25
3.3	Doenças causadas por amebas de vida livre.....	26
3.3.1	Encefalite amebiana granulomatosa.....	26
3.3.2	Ceratite amebiana.....	27
3.3.3	Meningoencefalite Amebiana Primária.....	28
3.4	Relação de endocitobiose.....	29
3.5	Testes fisiológicos.....	30
3.6	Água.....	31
3.7	Tipos de tratamento de esgoto.....	32
4.	METODOLOGIA	33
4.1	Local de desenvolvimento do projeto.....	33
4.2	Área de Estudo.....	33
4.3	Coletas.....	33
4.3.1	Estações de tratamento de esgoto.....	33
4.4	Processamento das amostras.....	35

4.4.1	Preparação das amostras e inoculação.....	35
4.4.2	Crescimento amebiano e obtenção das culturas monoxênicas.....	35
4.4.3	Clonagem dos isolados monoxênicos.....	35
4.5	Estudo morfológico dos clones.....	37
4.5.1	Caracterização morfológica.....	37
4.5.2	Teste de exflagelação.....	37
4.5.3	Teste de osmotolerância.....	37
4.5.4	Teste de termotolerância.....	38
4.6	Identificação molecular dos clones.....	38
4.6.1	Extração de DNA dos clones.....	38
4.7	Análise molecular dos clones.....	39
4.7.1	Identificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	39
4.7.2	Sequenciamento e análise dos amplicons.....	40
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1	Características da área de estudo.....	41
5.2	Características visuais das amostras.....	43
5.3	Isolamento de AVL das amostras coletadas.....	46
5.4	Clonagem das culturas monoxênicas.....	47
5.5	Caracterização morfológicas dos clones.....	49
5.6	Classificação morfológica segundo Pussard & Pons.....	52
5.7	Potencial de patogenicidade dos clones.....	53
5.8	Identificação molecular.....	55
5.9	Teste de exflagelação.....	56
5.10	Sequenciamento dos amplicons obtidos.....	56
6.	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64
	APÊNDICE A.....	76
	APÊNDICE B.....	77
	APÊNDICE C.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estações de tratamento de esgoto de Porto Alegre e suas características.	34
Tabela 2. Oligonucleotídeos específicos utilizados.....	40
Tabela 3. Caracterização morfológica dos clones das amostras do verão.....	51
Tabela 4. Caracterização morfológica dos clones das amostras do inverno.....	51
Tabela 5. Patogenicidade dos clones das amostras do verão.....	54
Tabela 6. Patogenicidade dos clones das amostras do inverno.....	55
Tabela 7. Resultado do PCR dos clones das amostras do verão e inverno.....	56
Tabela 8. Análise da identidade dos clones do verão.....	58
Tabela 9. Análise da identidade dos clones do inverno.....	59
Tabela 10. Registro dos depósitos no GenBank das amostras do verão.....	60
Tabela 11. Registro dos depósitos no GenBank das amostras do inverno.....	60
Tabela i. Quantificação do DNA extraído dos clones das amostras do verão.....	79
Tabela ii. Quantificação do DNA extraído dos clones das amostras do inverno.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore filogenética com a nova classificação dos seis grupos de eucariotos.....	18
Figura 2. <i>Acanthamoeba</i> spp.....	19
Figura 3. <i>Naegleria fowleri</i>	21
Figura 4. <i>Balamuthia mandrillaris</i>	22
Figura 5. <i>Vermamoeba vermiformis</i>	23
Figura 6. <i>Sappinia diploidea</i>	24
Figura 7. <i>Paravahlkampfia</i>	26
Figura 8. Mapa de Porto Alegre com as estações de tratamento de esgoto.....	34
Figura 9. Método de Diehl, Paes & Rott (2021).....	36
Figura 10. Temperaturas mensais no ano de 2022 em Porto Alegre, Brasil.....	41
Figura 11. Momentos de recreação.....	42
Figura 12. Coleta das amostras do verão.....	43
Figura 13. Coleta das amostras do verão.....	43
Figura 14. Coleta das amostras do inverno.....	44
Figura 15. Coleta das amostras do inverno.....	44
Figura 16. Sedimentação das amostras do verão.	45
Figura 17. Sedimentação das amostras do inverno.	46
Figura 18. Placas contendo microrganismos.....	46
Figura 19. Cultura com amebas de vida livre monoxênica.....	47
Figura 20. Ameba de vida livre das amostras do verão.....	48
Figura 21. Ameba de vida livre das amostras do inverno.....	48
Figura 22. Amostra do verão do efluente da ETE Belém Novo.....	49
Figura 23. Amostra do inverno do efluente da ETE Navegantes.....	50
Figura 24. Cistos com características do Grupo II.....	52

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
µL	Microlítro
µm	Micrômetro
AFLU	Afluente
ANN	Ágar Não-Nutriente
ATCC	American Type Culture Collection
AVL	Amebas de Vida Livre
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DNA	Desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
EAG	Encefalite Amebiana Granulomatosa
EFLU	Efluente
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
EUA	Estados Unidos da América
F	Forward
MAP	Meningoencefalite Amebiana Primária
MRA	Microrganismos Resistentes as AVL
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato-Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
R	Reverse
RAFA	Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente
SNC	Sistema Nervoso Central
UASB	Reator Anaeróbio de Manta de Lodo de Fluxo Ascendente

1. INTRODUÇÃO

As Amebas de Vida Livre (AVL) são protozoários, aeróbios, anfizoicos que são amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontradas na água para consumo humano, cursos d'água, esgoto, fontes termais, lagos, piscinas, rios, solos (De Jonckheere, 1991; Khan, 2006; Carlesso et al., 2007) e no ar, e em diversas condições geográficas e climáticas. Entre as espécies de AVL potencialmente patogênicas destacam-se cinco gêneros: *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Naegleria*, *Vermamoeba*, *Paravahlkampfia* e *Sappinia*, que são associados a doenças que podem acometer os seres humanos e animais (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Trabelsi et al., 2012; Visvesvara et al., 2009).

As AVL, possuem dois estágios morfológicos, o de trofozoíto (forma ativa) e o de cisto (forma de resistência), com exceção do gênero *Naegleria* que possui uma fase intermediária flagelada (Visvesvara et al., 2007; Delafont et al., 2018). Dentre as doenças causadas por AVL, destaca-se a encefalite amebiana granulomatosa (EAG) causada por espécies de *Acanthamoeba* e *B. mandrillaris*, que também podem causar infecções pulmonares e na pele (Carlesso et al., 2007; Magnet et al., 2013).

Acanthamoeba spp. e *V. vermiformis*, em associação ou não, podem causar ceratite, que é uma doença ocular que pode levar à perda de visão, parcial ou total (Marciano-Cabral and Cabral, 2003; Magnet et al., 2013; Delafont et al., 2018). Esses gêneros, também podem carrear microrganismos patogênicos ou não, visto que alguns microrganismos, tem a capacidade de sobreviver ao processo de fagocitose amebiana e se abrigar no seu interior, sendo chamados de microrganismos resistentes as AVL, protegendo-se de processos de cloração e biocidas (Berger et al., 2006; Lorenzo-Moralez et al., 2007; Gomes et al., 2020).

A meningoencefalite amebiana primária (MAP), é uma doença fatal causada por *N. fowleri*, podendo acometer crianças, jovens e adultos imunocompetentes. Já foi também associada a *P. francinae* n. que pode ser patogênica para humanos (Carlesso et al., 2007; Visvesvara et al., 2009; Solgi et al., 2012). Outra espécie potencialmente patogênica é *Sappinia diploidea*, que está presente majoritariamente no solo contaminado com fezes e causou encefalite em um jovem saudável (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Visvesvara et al., 2007).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) estimam que, cerca de 85% das doenças conhecidas possuem associação ou são transmitidas pela água

(Monteiro et al., 2016). As águas residuais (esgoto) são compostas por diversos microrganismos, que variam dependendo da localidade e sazonalidade e sua análise microbiológica pode ser utilizada como indicador da qualidade da água que é liberada no meio ambiente (Maritz et al., 2019).

O esgoto tratado é liberado no ambiente aquático, ambiente este que pode ser utilizado para atividades aquáticas e recreacionais, representando um potencial risco de transmissão de microrganismos patogênicos para frequentadores desses locais (Pond, 2005; Soller et al., 2010; Oliveira & Buss, 2018). Com a crescente falta de água potável no mundo (Jacobi et al., 2016), a utilização do esgoto tratado como fonte de água para irrigar plantas, vem sendo utilizada a anos (Bastos, 1999; Simões et al., 2013), no entanto, uma preocupação é que o esgoto tratado pode apresentar um acúmulo de contaminantes biológicos, e estes, podem ser transferidos para os solos e para as culturas, ocorrendo transferência de patógenos que são transmitidos da água para a filosfera e rizosfera das plantas (Al-Lahham et al., 2003).

É sabido que as AVL podem estar presentes no esgoto bruto e no tratado que é liberado no meio aquático, o qual pode ser usado para recreação ou irrigação de plantas. Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo isolar, identificar e caracterizar pela primeira vez no Brasil, as AVL potencialmente patogênicas no esgoto bruto e esgoto tratado das estações de tratamento de esgoto de Porto Alegre, RS.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar, identificar e caracterizar amebas de vida livre (AVL) presentes em estações de tratamento de esgoto da cidade de Porto Alegre no estado no Rio Grande do Sul (RS).

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar AVL em amostras de esgoto das estações de tratamento de Porto Alegre, RS;
- Identificar e caracterizar os gêneros de AVL encontradas através de características morfológicas;
- Avaliar os isolados de AVL quanto ao potencial patogênico através de testes fenotípicos de osmotolerância e termotolerância;
- Realizar a identificação molecular das AVL utilizando a técnica de PCR e sequenciamento.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Histórico

Entre as amebas de vida livre, os gêneros *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Naegleria*, *Sappinia*, *Paravahlkampfia* e *Vermamoeba* são considerados anfizoicos, podendo viver livremente na natureza (água, ar e solo) ou invadir um hospedeiro e viver como parasitas, nas mais diversas regiões do mundo. Os locais afetados pelas infecções dessas amebas são o cérebro, os olhos, a pele e o pulmão (Visvesvara & Schuster, 2008a; Magnet et al., 2013).

O primeiro relato de meningoencefalite amebiana primária (MAP) ocorreu em 1961, quando uma criança de nove anos morreu por meningite aguda, e identificaram a presença de amebas no cérebro e meninges, com morfologia diferente da conhecida *Entamoeba histolytica*. Em 1965 houve mais três casos, duas crianças e um adulto, em que a identificação feita post-mortem sugeriu que a infecção foi por *Acanthamoeba* spp., mas depois os casos foram atribuídos a uma espécie do gênero *Naegleria*, denominada *N. fowleri* em homenagem ao pesquisador Malcolm Fowler (Fowler e Carter, 1965). O primeiro caso de MAP no Brasil data de 1978 (Salles-Gomes et al., 1978).

No ano de 1972, após uma necropsia em um paciente com doença de Hodgkin, pesquisadores identificaram cistos amebianos no cérebro, com características associadas a amebas pertencentes ao gênero *Hartmannella* (Jager & Stamm, 1972). A infecção ficou conhecida como encefalite amebiana granulomatosa (EAG), que é causada por *Acanthamoeba* spp., sendo o primeiro caso relatado no Brasil em 1992 (Chimelli et al., 1992). Os primeiros casos de ceratite causados por *Acanthamoeba* ocorreram em 1974 no Reino Unido, 1975 nos Estados Unidos e 1988 no Brasil (Naginton et al., 1974; Jones et al., 1975; Alvarenga et al., 2000).

O primeiro caso de infecção causada por *Balamuthia* no sistema nervoso central (SNC) em uma babuína mandril ocorreu em 1986 (Visvesvara et al., 1990). No Brasil, o primeiro relato ocorreu em 2007, em um homem de 32 anos com HIV (Silva-Vergara et al., 2007).

No ano de 1991, um caso de ceratite foi associado a uma infecção mista de *Hartmannella* com *Vahlkampfia*, em um homem de 21 anos que utilizava lentes de contato (Aitken et al., 1996). Smirnov et al. em 2011 reclassificou a espécie *Hartmannella vermiformis* como sendo *V. vermiformis*. Um paciente de 27 anos, sem

histórico de infecção ocular, apresentou ulceração próximo do olho direito, tendo *V. vermiformis* como responsável (Scheid et al., 2019). A mesma espécie já foi correlacionada com o agravamento de um paciente que tinha meningoencefalite e broncopneumonia (Centeno et al., 1996).

Um caso reportado por Gelman et al. 2001, menciona a espécie *S. diploidea*, causando encefalite amebiana em um homem de 38 anos no ano de 2001, mas com avanços na tecnologia molecular, a espécie causadora indicada foi *S. pedata* (Qvarnstrom et al., 2009). O último caso que menciona uma nova espécie de ameba causando infecção em humano foi mencionado por Visvesvara et al. 2009, que isolou uma nova espécie do gênero *Paravahlkampfia*, nomeada como *P. francinae* n. sp., isolada do líquido cefalorraquidiano de um jovem de 18 anos, que apresentava sintomas típicos de meningoencefalite amebiana primária (MAP), que até então, era uma doença somente associada à *N. fowleri*.

3.2 Aspectos biológicos e morfologia das espécies

3.2.1 Taxonomia e classificação das AVL

Conforme ocorrem avanços em estudos de sequenciamento genético, a taxonomia das AVL vai sendo revisada e reagrupada de acordo com os dados obtidos. A Sociedade Internacional de Protozoologia substituiu a classificação taxonômica clássica por uma nova classificação que se baseia em abordagens morfológicas, bioquímicas e de filogenética molecular do sequenciamento do gene 18s do rDNA (Cavalier-Smith, 2002; da Rocha-Azevedo et al., 2009; Delafont et al., 2018).

O novo sistema que é utilizado, classifica os eucariotos em seis grupos (Figura 1) sendo eles: Amoebozoa, Archaeplastida, Chromalveolata, Excavata, Opisthokonta e Rhizaria. As AVL estão distribuídas entre dois grupos: *Acanthamoeba* spp. e *Balamuthia* spp. estão no supergrupo Amoebozoa: Acanthamoebidae; *Sappinia* spp. no Amoebozoa: Flabellinea: Thecamoebidae; *Vermamoeba* spp. no Amoebozoa: Tubulinea: Echinamoebidae.; *Naegleria* spp. e *Paravahlkampfia* sp. no supergrupo Excavata: Heterolobosia: Vahlkampfiidae (Page, 1967; Hampl et al., 2009; Visvesvara et al., 2009; Adl et al., 2012; Delafont et al., 2018).

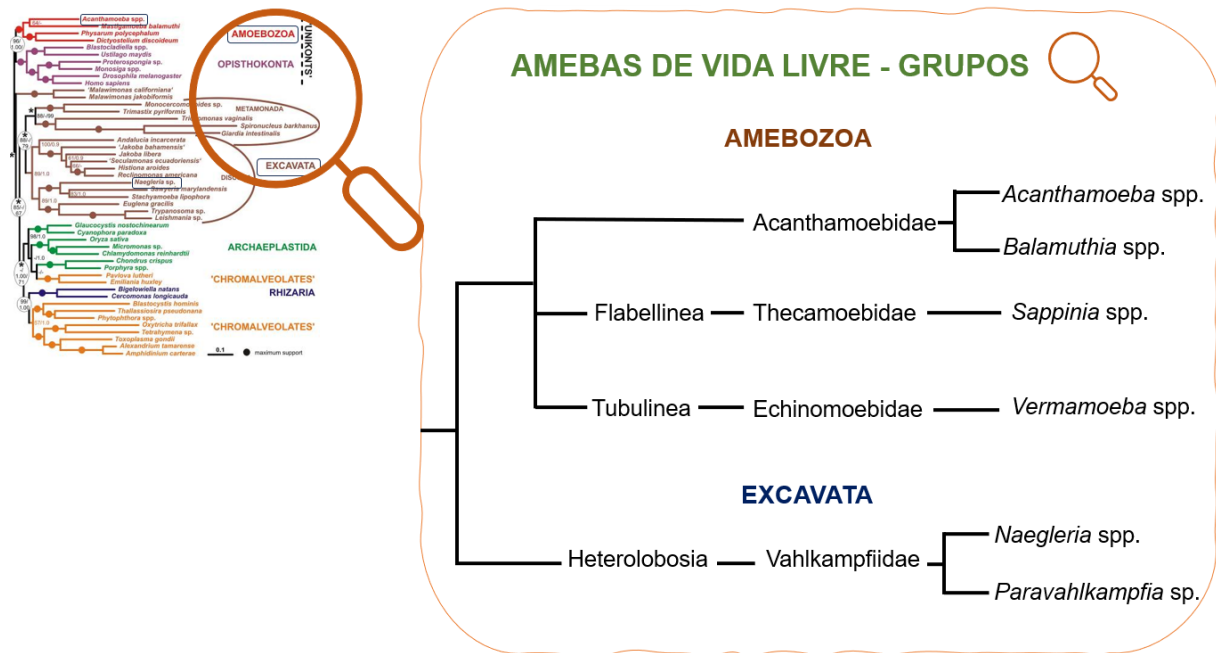


Figura 1. Árvore filogenética com a nova classificação dos seis grupos de eucariotos, imagem adaptada. Fonte: Hampl et al., 2009.

3.2.2 *Acanthamoeba* spp.

Acanthamoeba spp. têm distribuição cosmopolita, podendo ser isoladas em diversos ambientes como água doce, água do mar, águas termais, esgoto e estações de tratamento de esgoto, hospitais, lagoas, lagos, lentes de contato e estojos de armazenamento, piscinas, rios, solo, unidades de tratamento odontológico e diálise, poeira e vegetais (Siddiqui & Khan, 2012; Bullé et al., 2020).

Possui dois estágios no ciclo de vida (Figura 2): o de trofozoíto (forma ativa), com tamanho de 8-40 μm , presença de vacúolo contrátil, somente um núcleo, e acantopódios que são projeções semelhantes a espinhos em sua superfície; e cisto (forma de resistência), com tamanho de 8-29 μm (Khan, 2006; Calixto et al., 2014), com ostíolo na parede celular, que é dupla e composta por celulose. A forma cística confere proteção contra a dessecação, falta de nutrientes e mudanças no meio como alterações químicas e físicas (Schuster & Visvesvara, 2004).

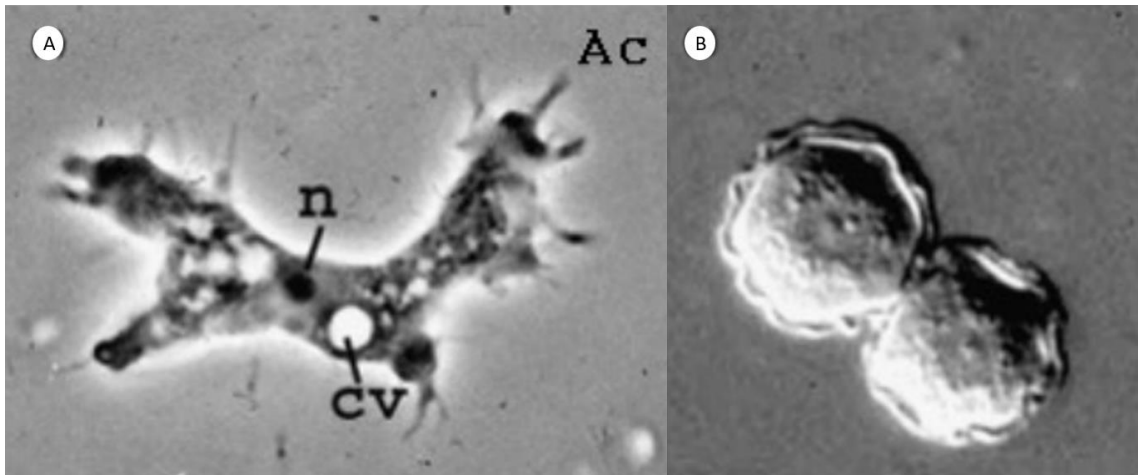


Figura 2. *Acanthamoeba* spp. A- Trofozoíto, n: núcleo, cv: vacúolo contrátil e ac: acantopódios; B- Cisto. Aumento de 1000x. Fonte: Visvesvara et al., 2007.

O gênero *Acanthamoeba* é dividido em três grupos e possui 24 espécies já identificadas. O grupo I é caracterizado por endocisto estrelado e o ectocisto liso ou rugoso, com diâmetro médio do cisto sendo maior ou igual a 18 μm . O grupo II tem ectocisto rugoso, e o endocisto pode ser encontrado com forma arredondada, oval, poligonal ou triangular, e cistos menores de 18 μm . Já o grupo III, tem endocisto arredondado e ectocisto fino e ondulado, apresentando cistos maiores que 18 μm , (Visvesvara, 1991). Algumas espécies do gênero são conhecidas por causar ceratite amebiana em indivíduos imunocompetentes, principalmente em usuários de lente de contato, EAG, infecções cutâneas e da nasofaringe em imunocomprometidos (Calixto et al., 2014; Rocha et al., 2022).

Para identificação genotípica, vem sendo amplamente utilizado o fragmento ASA.S1 (*Acanthamoeba Specific Amplimer S1*) do gene 18S rDNA (Schroeder et al., 2001; Trabelsi et al., 2012). O gênero *Acanthamoeba* é composto por 21 genótipos (T1 a T21), sendo o genótipo T2 dividido em T2a e T2b, por conta da dissimilaridade que existe intragenótipo de 4,9%, que é próximo do ponto de corte de 5% para se considerar um genótipo diferente (Corsaro et al., 2015; Tice et al., 2016; Corsaro et al., 2017). Os genótipos que estão relacionados com infecções nos humanos são: T1, T2a, T3, T4, T5, T6, T9, T10, T11, T12, T15 e T18 (Siddiqui & Khan, 2012; Hajjalilo et al., 2016).

A nutrição se dá por fagocitose de algas, bactérias e leveduras, e por pinocitose dos nutrientes que estão dissolvidos no ambiente (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Visvesvara & Schuster, 2008a; Castrillón & Orozco, 2013; Orozco et al.,

2021). Têm preferência por bactérias não capsuladas ou pigmentadas, visto que a cápsula bacteriana tem a capacidade de inibir a fagocitose e o pigmento causa toxicidade à ameba. O cultivo pode ser feito com placas de ágar não-nutriente cobertas com bactérias como, *Escherichia coli* ou *Enterobacter aerogenes* (Visvesvara et al., 2007; Visvesvara & Schuster, 2008a).

3.2.3 *Naegleria* spp.

O gênero *Naegleria* pode ser encontrado no solo e água, possuindo 47 espécies conhecidas. Realizam a replicação assexuada e alimentam-se de bactérias, cianobactérias e matéria orgânica. Um destaque é a espécie *N. fowleri* que é termofílica, sendo capaz de crescer em temperaturas de até 45 °C, e encontrada em ambientes aquáticos como, água doce, águas termais, aquários, canais de irrigação, esgoto, lagoas, lagos, piscinas e rios, já tendo sido isolada da mucosa nasal de crianças assintomáticas saudáveis (Trabelsi et al., 2012).

O gênero *Naegleria* possui três estágios no ciclo de vida (Figura 3): o trofozoíto possui dimensões de 10-25 µm, com um núcleo, e padrão de locomoção de limacina, que contém um ou mais pseudópodes ectoplasmáticos, que mudam de tamanho e forma constantemente; o estágio flagelado que possui dimensões de 10-16 µm, com dois flagelos, e ocorre quando o meio aquático onde a ameba encontra-se sofre alteração na concentração iônica, e com isto a ameba não se alimenta e nem se divide e o cisto que possui dimensões de 8-20 µm, com uma dupla parede de celulose e presença de poros (Visvesvara et al., 2010; Trabelsi et al., 2012). Algumas espécies como: *N. indonesiensis*, *N. chilensis*, *N. spitzbergenensis*, *N. paradobsoni* e *N. neochilensis*, não possuem forma flagelada (Jonckheere, 2014).

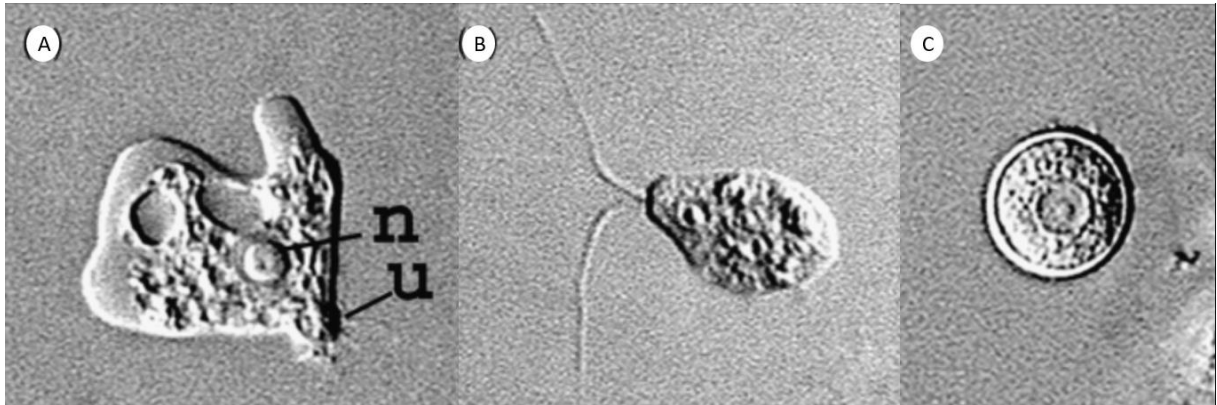


Figura 3. *Naegleria fowleri*. A- Trofozoíto com pseudópodes ectoplasmáticos, n: núcleo, u: uróide; B) Trofozoíto flagelado; C) Cisto. Aumento de 1000x. Fonte: Visvesvara et al., 2007

Das 47 espécies já descritas de *Naegleria*, cinco já foram identificadas como causadoras de infecções no SNC. *N. gruberi* já foi relacionada a um caso de meningoencefalite amebiana aguda (Cerva et al., 1969). As espécies, *N. australiensis*, *N. philippinenses* e *N. italica*, podem infectar camundongos causando encefalites, mas ainda não foram identificadas em humanos (Bellini et al., 2020).

N. fowleri pode fazer parte da microbiota natural da cavidade oro-bucal de alguns mamíferos e a infecção com essa ameba, normalmente ocorre em momentos recreativos na água, como mergulho e natação. No momento que a água penetra na cavidade nasal a ameba percorre o caminho do nariz até o cérebro, através do nervo olfativo (Rocha et al., 2022). *N. fowleri* é mundialmente relacionada a uma infecção aguda fulminante nos animais e humanos, chamada meningoencefalite amebiana primária (MAP) (Visvesvara & Schuster, 2008a; Henker et al., 2019). *Naegleria* spp. também podem abrigar microrganismos resistentes as AVL patogênicos, como por exemplo a *Legionella pneumophila* (Visvesvara & Schuster, 2008b).

Para o cultivo de *Naegleria* spp., utiliza-se placas de ágar não-nutriente inoculadas com bactérias, dando preferência a bactérias não mucóides, como *E. coli* ou *E. aerogenes*. (Visvesvara & Schuster, 2008b; Trabelsi et al., 2012).

3.2.4 *Balamuthia* spp.

Do gênero *Balamuthia*, a única espécie conhecida por causar infecções em humanos e animais, é a *B. mandrillaris* (Figura 4), que pode ser encontrada no solo, mas é de difícil isolamento e cultivo. Possui dois estágios no ciclo biológico: o

trofozoíto (forma ativa) mede de 50-60 μm , sendo pleomórfico e apresentando um núcleo vesicular com grande nucléolo central; o cisto (forma de resistência) mede de 12-30 μm , com um único núcleo, de aparência mais ou menos esférica, e possui parede com camada tripla, sem a presença de poros (Schuster & Visvesvara, 2004; Visvesvara & Schuster, 2008a; Trabelsi et al., 2012).

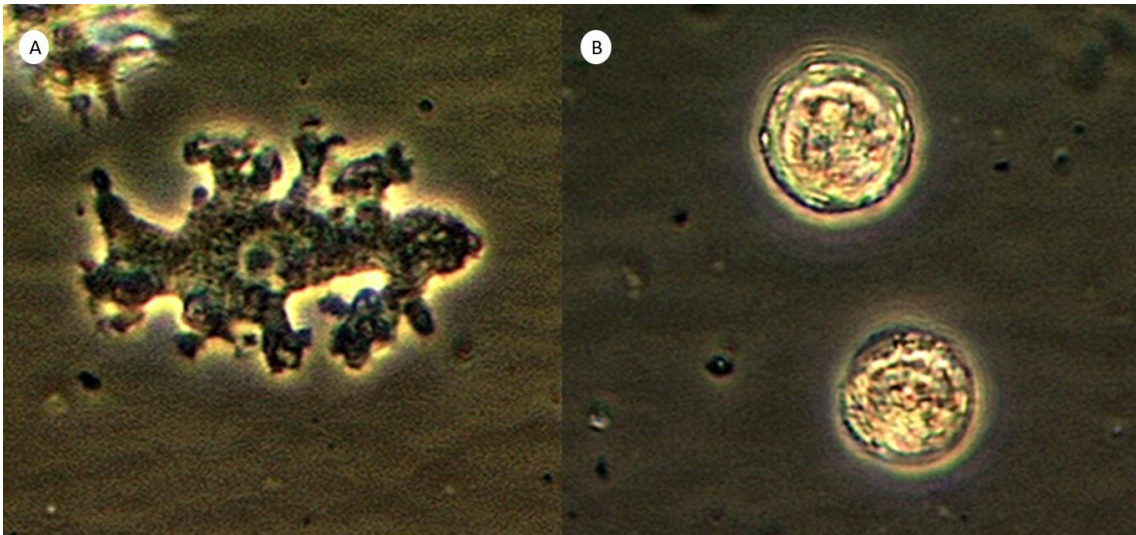


Figura 4. *Balamuthia mandrillaris*. A- Trofozoíto pleomórfico; B- Cisto com aparência esférica. Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2019.

A ameba pode invadir o cérebro, olhos, pele, pulmões e outros órgãos, causando encefalite amebiana granulomatosa fatal e/ou infecções cutâneas graves, que são semelhantes às causadas por *Acanthamoeba* spp., tanto em humanos quanto em animais, imunocompetentes (crianças e idosos) e pacientes imunocomprometidos com HIV e usuários de drogas intravenosas (Visvesvara et al., 2007; da Rocha-Azevedo et al., 2009; Trabelsi et al., 2012). *B. mandrillaris* pode abrigar microrganismos resistentes as AVL patogênicos como *Legionella* spp. (Shadrach et al., 2005; Trabelsi et al., 2012).

B. mandrillaris não se alimenta de bactérias, mas sim de células dos tecidos, e de amebas menores que elas, tais como *Acanthamoeba* spp. e *Naegleria* spp. O cultivo dessa espécie é diferente pois não pode ser cultivada em placa com ágar inoculadas com bactérias (Schuster & Visvesvara, 2004; Visvesvara & Schuster, 2008b; da Rocha-Azevedo et al., 2009).

3.2.5 *Vermamoeba* spp.

Vermamoeba spp. possui apenas uma espécie conhecida, que inicialmente teve sua taxonomia associada à *Hartmannella* (Page, 1967) mas, Smirnov et al., 2011 renomeou-a para *V. vermiformis*. É um organismo comumente encontrado em isolados do meio ambiente e ambientes aquáticos como água potável, água de origem hospitalar, águas recreativas e torres de resfriamento de ar-condicionado (Soares et al., 2017).

Apresenta duas formas de vida (Figura 5): a de trofozoíto (forma ativa) com comprimento de 22 a 42 μm , que pode possuir um vacúolo contrátil, tem locomoção de forma monopodial, podendo tornar-se bi ou multipodial conforme muda de direção com uma zona hialina anterior proeminente, sendo mais longa do que larga; e a forma de cisto (forma de resistência) mede de 6 a 9 μm , com a parede composta por duas camadas, e morfologia bilaminar arredondada ou relativamente oval (Page, 1991; Smirnov et al., 2011; Delafont et al., 2018).

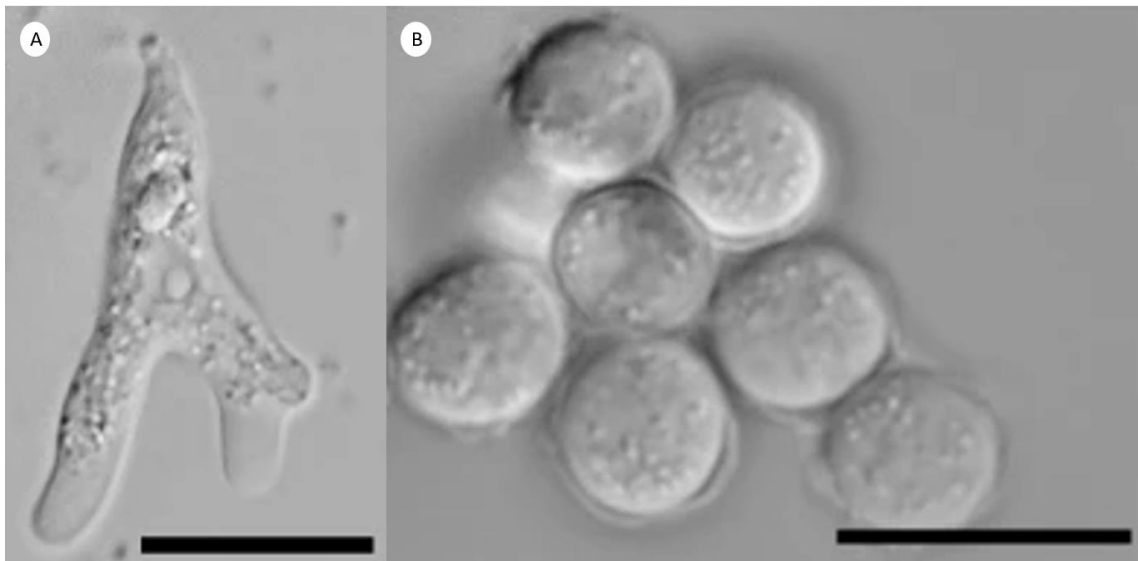


Figura 5. *Vermamoeba vermiformis*. A- Trofozoíto com zona hialina proeminente; B- Cisto com formato relativamente oval. O comprimento da barra representa 10 μm .
Fonte: Delafont et al., 2018.

V. vermiformis já foi associada com *Acanthamoeba* spp. em casos de ceratite, bem como, já foram encontrados microrganismos resistentes as AVL patogênicos no seu interior, como bactérias, fungos e vírus (Cateau, 2014; Soares et al., 2017; Delafont et al., 2018). *V. vermiformis* está associada ao agravamento de algumas doenças quando associadas ao principal agente (Centeno et al., 1996).

Com relação ao cultivo, a espécie pode ser cultivada em ágar não-nutriente com diferentes substratos, sejam bactérias ou leveduras, tais como: *E. coli* K12 viva ou morta, *E. aerogenes*, *Klebsiella aerogenes*, *K. oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Staphylococcus aureus* (Pagnier et al., 2015; Delafont et al., 2018).

3.2.6 *Sappinia* spp.

O gênero *Sappinia* spp. possui três espécies que estão presentes no solo, água doce, e já foram isolados de lixo florestal, fezes de mamíferos, e alguns animais como alce, bisão, gado e lagarto. As espécies são *S. pedata*, *S. diploidea* (Figura 6) e *Sappinia platani* (Visvesvara et al., 2007; Qvarnstrom et al., 2009; Trabelsi et al., 2012).

Possuem dois estágios no ciclo de vida: o de trofozoíto (forma ativa) com 50-60 µm de comprimento e 20-30 µm de largura, com dois núcleos em polos apostos da ameba e achatamento central. Possuem locomoção monopodial com grande hialoplasma na parte anterior da célula; O cisto (forma de resistência) com 18-25 µm de diâmetro (Qvarnstrom et al., 2009; Walochnik et al., 2010), são bicelulares por conta da cópula de dois trofozoítos, que posteriormente se transformando em cistos binucleados unicelulares, tem com parede dupla e apresentando poros nucleares (Qvarnstrom et al., 2009; Trabelsi et al., 2012).

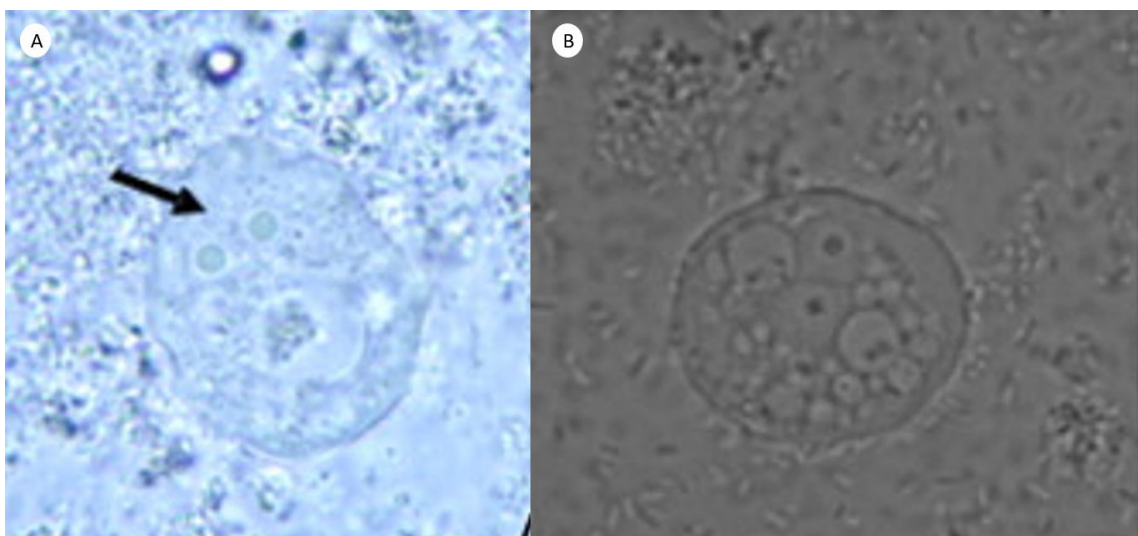


Figura 6. *Sappinia diploidea*. A- Trofozoíto com seta evidenciando os dois núcleos; B- Cisto binucleado unicelular. Fonte: Walochnik et al., 2010.

Sappinia spp. não haviam sido associadas a casos fatais nem patologias em humanos e animais (Trabelsi et al., 2012), até o momento que, Gelman et al., 2001 reportou um caso de um jovem imunocompetente que sobreviveu após ter uma encefalite. Ele apresentou sintomas como: convulsões, dores de cabeça bifrontais, fotofobia, inconsciência, náuseas, vômitos e visão embaçada por 2 a 3 dias. A priori, o caso foi associado a *S. diploidea*, mas com a utilização da técnica de PCR em tempo real, foi possível identificar a espécie *S. pedata* como a responsável pela encefalite (Wylezich et al., 2009).

Em relação ao desenvolvimento de *Sappinia* spp., ela pode ser cultivada em placas de ágar não-nutriente inoculadas com bactérias, tais como *Enterobacter cloacae* e *E. coli* (Walochnik et al., 2010; Qvarnstrom et al., 2009). O cultivo axênico até o presente momento não obteve sucesso. Supostamente *S. diploidea* têm reprodução sexuada, embora não se tenham evidências convincentes documentadas. O crescimento pode ser acelerado se incluído como fonte de alimento para pequenas amebas indefinidas (Walochnik et al., 2010).

3.2.7 *Paravahlkampfia francinae* n. sp.

P. francinae possui morfologia típica das outras amebas do gênero *Paravahlkampfia* (Figura 7). A espécie é caracterizada por ter um ciclo de vida com dois estágios: o de trofozoíto medindo de 15-25 µm, possui movimentos ameboides por meio de pseudópodes eruptivos; e o cisto medindo 15-21 µm, com parede dupla. A ameba pode abrigar bactérias resistentes às AVL, dentro dos trofozoítos, dentro do cisto e entre as camadas da parede do cisto, indicando um maior potencial de patogenicidade (Schuster et al., 2003; Visvesvara et al., 2009).

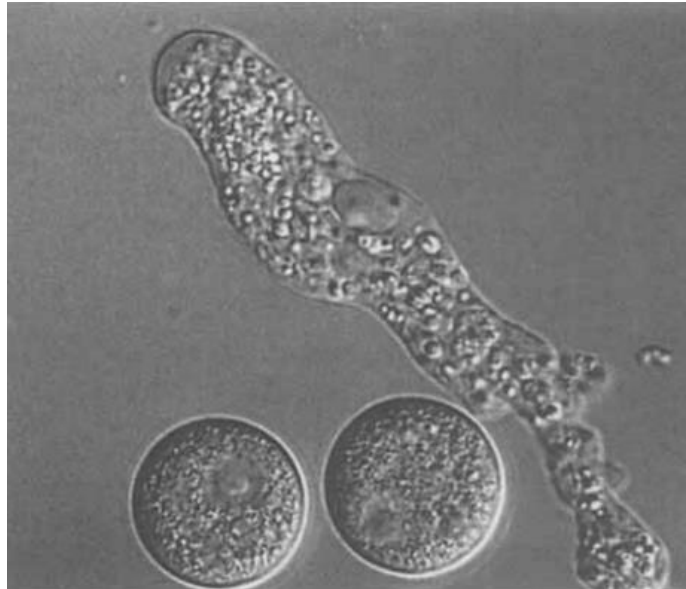


Figura 7. *Paravahlkampfia*. Trofozoíto com pseudópodes eruptivos e dois cistos.
Fonte: Schuster et al., 2003.

P. francinae cresce em diferentes temperaturas de 33° C, 37° C e 40° C, preferindo a temperatura de 37° C onde a locomoção é mais rápida, e não cresce em placas de ágar revestidas com *E. coli*, mas apresenta um bom crescimento em culturas de tecidos de mamíferos. Sua alimentação difere da espécie *Paravahlkampfia ustiana* que se alimenta de *E. coli* (Visvesvara et al., 2009).

3.3 Doenças causadas por amebas de vida livre

3.3.1 Encefalite amebiana granulomatosa

A EAG é uma doença oportunista e fatal, que é causada por *Acanthamoeba* spp., *B. mandrillaris* (Visvesvara et al., 1990; Trabelsi et al., 2012) e *S. pedata* (Qvarnstrom et al., 2009). Essa infecção afeta o sistema nervoso central (SNC) dos indivíduos imunocomprometidos ou que sejam debilitados como, os pacientes com HIV/AIDS, diabéticos ou aqueles submetidos a transplante de órgãos (Visvesvara et al., 2007; da Rocha-Azevedo et al., 2009). Existem problemas no reconhecimento de EAG, sendo provável que haja casos de EAG subnotificados, significando que outros casos podem ter ocorrido e não foram diagnosticados corretamente (Trabelsi et al., 2012).

EAG é uma infecção insidiosa desenvolvendo-se como uma doença crônica, que pode durar de várias semanas a meses, mas após dias ou semanas a infecção no SNC pode ser fatal (Trabelsi et al., 2012). A invasão e penetração das

amebas se dá pelas vias respiratórias inferiores e por lesões na pele (Martinez, 1991). As complicações envolvidas com o SNC incluem a indução das respostas pró-inflamatórias, invasão da barreira hematoencefálica e do tecido conjuntivo, e dano neuronal decorrente da alimentação ativa dos trofozoítos, que resulta na disfunção cerebral (Khan, 2006).

Os sintomas da EAG são: dores de cabeça, febre leve, hemiparesia, rigidez na nuca, paralisia dos nervos cranianos, alterações de personalidade e estado mental, náuseas, vômitos, letargia, distúrbios visuais, convulsões e coma. Mas esses sintomas não são específicos da EAG, logo o diagnóstico pode ser errôneo e confundido com outros tipos de encefalites causadas por bactérias, fungos, vírus ou outros protozoários (Visvesvara et al., 2007; da Rocha-Azevedo et al., 2009).

3.3.2 Ceratite amebiana

Nosé et al. descreveu em 1988 os primeiros casos de ceratite amebiana no Brasil, que é uma infecção que acomete a região da córnea sendo causada principalmente por *Acanthamoeba* spp. nos indivíduos saudáveis (Alvarenga et al., 2000; Calixto et al. 2014; Dos Santos et al., 2018). Algumas espécies já descritas como causadoras são: *A. astronyxis*, *A. castellani*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. lugdunensis*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhyodes* (Alvarenga et al., 2000). Estima-se que metade dos casos graves de ceratite, nos usuários de lente de contato, seja responsável por *Acanthamoeba* (Carnt et al., 2023). *V. vermiformis* também é relacionada à ceratite, seja em associação com *Acanthamoeba* ou sozinha (Delafont et al., 2018).

A infecção é conhecida por ocorrer principalmente em indivíduos que fazem mau uso das lentes de contato, mas ela também pode ocorrer em indivíduos não usuários de lentes de contato. Condições como: uso prolongado de lentes de contato, traumas na córnea, não utilizar soluções estéreis para limpeza e conservação de lentes, utilizar lente em momento de recreação que envolvam água como piscinas ou banhos, aumentam o risco de contaminação (Calixto et al., 2014; Dos Santos et al., 2018).

A adesão do protozoário à córnea é um passo importante para o início da infecção. Em geral, se não houver traumas na córnea, as defesas do hospedeiro conseguem remover os protozoários com o ato de piscar ou lacrimejar, mas condições como as mencionadas acima podem facilitar a proliferação e facilitação da adesão,

permitindo que haja acesso as camadas mais profundas do tecido (Carnt et al., 2016; Alvarenga et al., 2000).

A sintomatologia pode variar, desde visão borrada, dor intensa nos olhos até fotofobia (Obeid et al., 2003; Visvesvara et al., 2007; Dos Santos et al., 2018). Pode ser visualizado sinais de ruptura do epitélio da córnea e lesão resistente aos antibióticos usados (Visvesvara et al., 2007; Dos Santos et al., 2018), principalmente pela formação de cistos que podem se tornar resistentes ao tratamento utilizado. Por conta disso, utiliza-se uma terapêutica de 6-12 meses com combinação de fármacos (Obeid et al., 2003). A ceratite geralmente é unilateral, mas existem casos descritos de ceratite bilateral (Obeid et al., 2003; Visvesvara et al., 2007; Dos Santos et al., 2018).

Pelo difícil diagnóstico e tratamento de ceratite por *Acanthamoeba* alguns casos podem levar à cegueira (Dos Santos et al., 2018). Nos casos, em que não ocorre inflamação na córnea, os transplantes geralmente são bem-sucedidos, mas alguns insucessos são observados principalmente se houver inflamação, por isso o diagnóstico rápido e o tratamento imediato são tão necessários (Obeid et al., 2003).

3.3.3 Meningoencefalite Amebiana Primária

A MAP é uma meningoencefalite aguda, com início e evolução rápidos, e desfecho quase sempre fatal, ocorrendo principalmente em crianças e jovens saudáveis (Silva & Rosa, 2003; Visvesvara & Schuster, 2008b). É causada por *N. fowleri* (Silva & Rosa, 2003; Visvesvara & Schuster, 2008a; Siqueira-Batista et al., 2007) ou *P. francinae* n. sp. (Visvesvara et al., 2009) que acessam o sistema nervoso central pela cavidade nasal (Silva & Rosa, 2003; Visvesvara & Schuster, 2008b; Fowler & Carter, 1965), quando a forma flagelada ou de cisto é aspirada ou inalada (Silva & Rosa, 2003; Visvesvara & Schuster, 2008b).

Os locais de contaminação podem estar ou não poluídos, sendo os mais variados ambientes aquáticos, tais como: fontes de água doce, rios, lagos, rede pública de abastecimento, piscinas aquecidas e não aquecidas, piscinas com pouco cloro, lagos artificiais entre outros (Siqueira-Batista et al., 2007). O período de incubação é de aproximadamente sete dias (Visvesvara & Schuster, 2008b; Siqueira-Batista et al., 2007), apresentando início de sintomas rápidos como febre alta, dor de cabeça intensa, vômitos, irritação meníngea, rigidez na nuca e dor lombar. Em cerca

de uma semana o quadro clínico piora com alterações sensoriais, convulsões, coma e óbito (Visvesvara et al., 2007; Siqueira-Batista et al., 2007).

No Brasil, cinco casos de MAP foram relatados, dois no Ceará (Biasoli et al., 1981), um no Rio de Janeiro (Carvalho et al., 1983) e dois em São Paulo (Foronda. 1976; Campos et al., 1977). Já no EUA, 151 casos foram reportados, com apenas 5 sobreviventes (Yoder et al., 2010). A MAP apresenta uma letalidade de aproximadamente 95% nos casos de infecção, e por isso, há um grande apelo para o diagnóstico precoce, e uso de medicamentos como anfotericina B em associação com outros fármacos (Siqueira-Batista et al., 2007).

Mas não é somente em humanos que a MAP pode ocorrer, existem relatos da doença em animais como antas, bovinos e ovelhas, com dois casos da doença em animais de propriedades perto do estado Rio Grande do Sul (Henker et al., 2019).

3.4 Relação de endocitobiose

Existem alguns grupos de microrganismos que têm a capacidade de interagir com as AVL, e resistem ao processo de fagocitose, mantendo uma relação estável com a ameba, esse processo é conhecido como endocitobiose. Amebas do gênero *Acanthamoeba* e *V. vermiformis*, são conhecidos por servir como hospedeiros/reservatórios de patógenos, atuando como uma espécie de “cavalo de Troia”, abrigando os MRA em seu interior e os protegendo de condições adversas como processos de cloração (Barker & Brown, 1994; Khan, 2006; Greub & Raoult, 2004; Steenbergen et al., 2004; Winiecka-Krusnell et al., 2009; Scheid, 2019; Rocha et al., 2022).

Com relação aos patógenos bacterianos observados em *Acanthamoeba*, destacam-se diversas espécies, tais como: *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Chlamydomonas pneumoniae*, *E. coli* O157, *E. coli* K1 neuropatogênica, *Flavobacterium* spp., *Helicobacter pylori*, *L. pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *S. aureus* metilina-resistente, *Mycobacteria tuberculosis*, *M. avium*, *M. leprae*, *Parachlamydia acanthamoebae*, *P. aeruginosa*, *Rickettsia*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae* e *V. parahaemolyticus*, entre outros (Greub & Raoult, 2004; Steenbergen et al., 2004; Berger et al., 2006; Lorenzo-Morales et al., 2007; Moreira & Brochier-Armanet, 2008; Balczun & Scheid, 2017; Scheid, 2018).

Uma variedade de fungos, vírus e protozoários também são relatados como microrganismos resistentes à *Acanthamoeba* spp. incluindo Adenoviridae,

Blastomyces dermatitidi, *Coxsackievirus*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptosporidium parvum*, *Exophiala dermatitidis*, *Histoplasma capsulatum*, *Pandoravirus inopinatum*, *Pitovirus*, *Toxoplasma gondii* entre outros (Steenbergen et al., 2001; Steenbergen et al., 2004; Gómez-Couso et al., 2007; Winiecka-Krusnell et al., 2009; Balczun e Scheid, 2017).

Vale ressaltar que vários microrganismos resistentes à *Acanthamoeba* também parasitam macrófagos humanos, um exemplo é a bactéria *Legionella pneumophila*, onde a sua habilidade de sobreviver dentro da ameba, pode estar relacionado a uma fase pré-adaptativa para infectar posteriormente células humanas (Visvesvara & Schuster, 2008).

3.5 Testes fisiológicos

Para diferenciar isolados patogênicos de não-patogênicos, vem sendo utilizados ensaios de crescimento (De Jonckheere, 1980; Khan et al., 2001), que correlacionam a virulência de *Acanthamoeba* spp. com a capacidade de crescer a temperaturas acima de 37°C (Khan et al., 2001).

Khan et al. (2001) em seu estudo, apresentou isolados de *Acanthamoeba* não patogênicos que cresceram em temperaturas abaixo de 35°C, mas não cresceram em temperaturas mais altas de 37-42°C, apenas os isolados patogênicos cresceram nessas temperaturas. O teste fisiológico de tolerância a diferentes osmolaridades de Manitol (0,5M e 1M), inibem o crescimento de isolados não-patogênicos, por conta da alta osmolaridade, em 0,5M cepas patogênicas e algumas não patogênicas podem crescer, entretanto, a 1M apenas *Acanthamoeba* patogênica apresentou crescimento com trofozoíto viável. Sugerindo que *Acanthamoeba* patogênica teria a capacidade de crescer em osmolaridades mais altas.

3.6 Água

A qualidade da água é de grande preocupação, seja pela possibilidade de contaminação da água potável ou de fontes naturais (Jank et al., 2014). Conforme dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 85% das doenças conhecidas são transmitidas ou associadas à água (Monteiro et al., 2016).

O mundo todo está passando por uma escassez cada vez maior de água, e com isso se faz necessário, reutilizar as águas residuais (esgoto) tratadas ou não, já que a disponibilidade de água doce não é o suficiente (Nogueira, 2010; Kumar &

Pal, 2018). O esgoto doméstico, em alguns locais, é usado para a irrigação na agricultura, aquicultura e processos industriais (Yang et al., 2015; Cui et al., 2017; Oliveira & Buss, 2018). Entretanto, vários riscos para a saúde e o meio ambiente podem ocorrer pela reutilização de águas residuais. Logo, são necessárias medidas visando diminuir a poluição e evitar os riscos biológicos, com o intuito de garantir a segurança das águas residuais (Nogueira, 2010; Kumar & Pal, 2018).

3.7 Tipos de tratamento de esgoto

Aproximadamente um bilhão de pessoas não têm acesso a serviços de saneamento básico como: abastecimento de água, coleta de lixo e rede de esgoto, e a falta desses serviços eleva os riscos para a saúde (FUNASA, 2019). As estações de tratamento de esgoto (ETE) são importantes na proteção e manutenção da ecologia. Os processos do tratamento do esgoto para gerar o efluente (esgoto tratado), são afetados por condições como: característica do afluente (esgoto bruto), geologia, tamanho da estação de tratamento de esgoto, temperatura local entre outros (Zhang et al., 2018). Por conta disso, os diferentes tratamentos de esgoto possuem suas vantagens e desvantagens, com especialidades e condições de aplicação diferentes, dependendo do custo e local empregado para tal (Zhang et al., 2018).

No Brasil, a majoritária parte do esgoto que é gerado no país ainda não é tratado, esse problema é associado ao déficit de coleta de esgoto e capacidade de tratamento das ETEs. Os tratamentos de esgoto mais utilizados no Brasil são: lodo ativado, lagoas de estabilização e tratamentos anaeróbios de esgoto (INCT, 2019). As diferentes ETEs fazem um tratamento inicial mecânico, para remover grandes sólidos e areias, sendo feita com grades que evitam a passagem de roupas, móveis, pedaços de madeira, entre outros e utilizam tanques de flutuação para retirar os óleos e graxas (Nogueira, 2010).

O tratamento de esgoto por lodo ativado é considerado um tratamento aeróbio, visto que o lodo ativado é composto por uma massa de microrganismos (algas, bactérias, fungos e protozoários), que se alimentam da matéria orgânica presente do esgoto, na presença de oxigênio. O afluente é direcionado para um tanque para aeração, onde a matéria orgânica é consumida pelos microrganismos aeróbios e após isto, o efluente é encaminhado ao decantador onde a parte sólida (lodo), é separada do esgoto tratado. Esse tratamento necessita de um custo energético elevado e mecanização especializada, mas é ideal em situações em que não se tem muita área

disponível para as estações de tratamento (INCT, 2019; Manaia et al., 2018). Este é um dos tratamentos mais usualmente utilizados no Brasil, seja no tratamento dos esgotos municipais como o esgoto de indústrias (Gonzalez- Martinez et al., 2018; Marathe et al., 2016).

As lagoas de estabilização são sistemas mais simples de tratamento e implantadas em áreas escavadas. Os tratamentos podem ser divididos em algumas variantes conforme as condições disponíveis, como: lagoa aerada, lagoa anaeróbia, lagoa facultativa, lagoa de maturação, lagoa de polimento, além da conjugação de mais de um tipo de lagoa no mesmo sistema. O principal objetivo das lagoas é a degradar a matéria orgânica, mas nesses locais é possível que ocorra a remoção de microrganismos patogênicos. As degradações da matéria orgânica podem ocorrer em ambiente aeróbio, anaeróbio ou ambas, dependendo do tipo de lagoa. Uma desvantagem é que, a eficiência das lagoas, está intimamente relacionada ao clima do local, onde locais mais quentes favorecem a velocidade de metabolização dos microrganismos. Esse método é simples, efetivo, e não necessita de tecnologia de ponta, e o seu custo é reduzido. Entretanto, necessita de grandes áreas (INCT, 2019).

O tratamento anaeróbio do esgoto, ocorre com microrganismos anaeróbios que se alimentam da matéria orgânica, onde o afluente vai passar por um reator fechado e a matéria orgânica será degradada. No Brasil, existem dois tipos principais de reatores fechados: o Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente (RAFA) e o Reator Anaeróbio de Manta de Lodo de Fluxo Ascendente (UASB), mas a diferença entre eles é que o UASB tem capacidade de coletar biogás e este pode ser usado para produção de energia. Esses reatores não necessitam de tanta área, os custos de implantação e operação são baixos, produzem pouco lodo, consomem menos energia e removem uma quantidade satisfatória de sólidos e matéria orgânica. Contudo, geram maus odores, não toleram grandes cargas tóxicas, e precisam de uma etapa de pós-tratamento, para que o efluente se encaixe nos parâmetros pré-estabelecidos pela legislação. Esse é o tratamento mais utilizado no Brasil (INCT, 2019).

O tratamento do esgoto é realizado com o intuito de reduzir os poluentes e remover patógenos, a fim de garantir saúde pública e proteção ao meio ambiente. Existe um aumento da demanda de água potável com o aumento da população mundial, e com isso, a eficiência do tratamento de esgoto e liberação posterior de águas tratadas seguras são desafios a serem vencidos (Kumar et al., 2018).

4. METODOLOGIA

4.1 Local de desenvolvimento do projeto

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Protozoologia, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre - RS.

4.2 Área de Estudo

O estudo foi realizado em oito estações de tratamento de esgoto (ETE) em operação, presentes no município de Porto Alegre, capital do estado do Rio Grande do Sul. A capital apresenta uma extensão territorial de 495,390 km², está localizada em 30° 01' 58" ao Sul e 51° 13' 48" a Oeste, e conta com uma população estimada de 1.492.530 habitantes para o ano de 2021, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2022). As ETEs do estudo foram: ETE Belém Novo, ETE Navegantes, ETE Serraria, ETE Sarandi, ETE Rubem Berta, ETE Lami, ETE do Bosque e ETE Parque do Arvoredo.

4.3 Coletas

Foram coletadas 17 amostras no período do verão (Janeiro e Fevereiro) e 17 amostras no período do inverno (Julho e Agosto), no ano de 2021, sendo 2 amostras de cada ponto: afluente (1) e efluente (1) de cada estação, com exceção da ETE Rubem Berta que possui 2 módulos distintos em operação, cada um deles em uma fase do tratamento e por isso, foram coletados 3 amostras: afluente (1) e efluente (2), totalizando 34 amostras. As amostras foram coletadas em frascos de vidro esterilizados de 1L, identificadas, acondicionadas em caixas de isopor e transportadas para o laboratório de Protozoologia/ICBS da UFRGS.

4.3.1 Estações de tratamento de esgoto

As coletas foram realizadas nas oito estações de tratamento de esgoto (Figura 8) que estão em funcionamento em Porto Alegre. As características dos locais foram obtidas do Plano municipal de saneamento básico, 2013 (Tabela 1).



Figura 8. Mapa de Porto Alegre com as estações de tratamento de esgoto. Fonte: Daniel Leal dos Santos.

Tabela 1. Estações de tratamento de esgoto de Porto Alegre e suas características.

Estação de Tratamento de Esgoto (ETE)	Endereço	Tipo de tratamento	Vazão nominal (l/s)	Habitantes atendidos	Destino do esgoto tratado
Belém Novo	Av. Heitor Viêira, 1450	Lagoa de estabilização	60 l/s	≅ 13.679-21.558	Lago Guaíba
Navegantes	Av. A. J. Renner, 495	Lodo ativado convencional	444 l/s	≅ 180.443-184.800	Rio Gravataí
Serraria	Av. da Serraria, 2123	Lodo ativado + UASB	1600-4000 l/s	≅ 895.025-1.080.000	Lago Guaíba
Sarandi	Av. Fernando Ferrari, 4000	Lodo ativado + UASB	798 l/s	≅ 243.114-272.101	Rio Gravataí
Rubem Berta	R. Fernando Camarano, 380	Lodo ativado com valos de oxidação	42,56 l/s	≅ 54.840-72.760	Rio Gravataí
Lami	R. Luiz Correa da Silva, 315	Lagoa de estabilização	30 l/s	≅ 9.406-14.163	Lago Guaíba
Do Bosque	R. Algemiro Nunes da Costa, 1	UASB	7,34 l/s	≅ 1.800	Rio Gravataí
Parque do Arvoredo	R. Walir Zottis, 275	Lodo ativado	16,3 l/s	Conforme a população do loteamento Parque do Arvoredo	Rio Gravataí

4.4 Processamento das amostras

4.4.1 Preparação das amostras e inoculação

No laboratório, cada garrafa contendo 1L de amostra foi homogeneizada, e posteriormente, foi dividida em quatro cálices de sedimentação, contendo aproximadamente 250 mL cada, e não manipuladas por 24 horas. Após este período de decantação, o sobrenadante foi descartado de cada cálice e o sedimento homogeneizado e transferidos para um tubo Falcon de 50 mL, fazendo um *pool* dos quatro sedimentos de uma amostra. As amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 2500 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, 200 µL do material que sedimentou no tubo, foi pipetado e inoculado em uma placa de Petri contendo 1,5% de ágar não-nutriente (ANN), previamente inoculado com *E. coli* (ATCC 10536) inativada pelo calor, esse processo foi realizado em quintuplicata. Após a inoculação, as placas foram incubadas a uma temperatura de 30° C.

4.4.2 Crescimento amebiano e obtenção das culturas monoxênicas

Diariamente as placas foram observadas em microscópio óptico, utilizando a objetiva de 10X e monitoradas por até 15 dias. As placas que não obtiveram crescimento foram descartadas. Nas placas em que foi observada a presença de amebas, a região de crescimento foi marcada, e esta parte do ágar foi extraído com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril e em seguida, inoculado com a face voltada para baixo e arrastado em uma nova placa de ANN contendo *E. coli* (ATCC 10536) inativada. Com o intuito de evitar contaminação, todo o procedimento foi realizado dentro de uma capela de fluxo laminar ou próximo ao bico de Bunsen. O processo de subcultivo, para livrar as amostras dos contaminantes, foi realizado ao longo de 60 dias. Após isto obteve-se as culturas monoxênicas de interesse.

4.4.3 Clonagem dos isolados monoxênicos

Realizou-se a clonagem celular de cada amostra para obtenção de isolados. Dentro da capela de fluxo laminar as placas contendo as amebas foram colocadas sobre o gelo por 10 minutos. Na placa foi adicionado 10 mL de solução salina de Page 1X (Apêndice A), e utilizando-se a alça de Drigalski descartável esterilizada foram realizados movimentos suaves com o intuito de desprender as amebas da superfície do ágar.

A suspensão com a salina de Page 1X foi transferida para um tubo Falcon de 15 mL esterilizado utilizando uma pipeta automática. O tubo foi centrifugado a uma velocidade de 2500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado com 1 mL de tampão fosfato-salino (PBS) 1X com pH 7,2, e a amostra foi homogeneizada para a quantificação na câmara de Neubauer para que se obtivesse 200 amebas/mL (cerca de uma ameba para cada 5 µL da solução final).

Utilizando a metodologia de Diehl, Paes & Rott (2021), as placas com ágar não-nutrientes 1,5% inoculadas com *E. Coli* (ATCC 10536) foram cortadas em quadrados a fim de evitar o contato de um clone com outro, e em cada quadrado foram inoculados os 5 µL da solução final (Figura 9).



Figura 9. Método de Diehl, Paes & Rott (2021).

Após a inoculação, foi feita a visualização microscópica de cada quadrado, a fim de selecionar quadrados com apenas 1 trofozoíto ou cisto. Esses quadrados eram marcados, as placas incubadas a 30° C, e o seu crescimento acompanhado ao longo de 7 dias. Quando observado um bom crescimento de trofozoítos, o quadrado era então transferido para uma nova placa inoculada com *E. coli* (ATCC 10536) inativada por calor.

Os clones obtidos, foram utilizados para a continuação do estudo. Após o crescimento e bom desenvolvimento das amebas na placa, os clones foram fotografados e tiveram a morfologia analisada usando o microscópio óptico Olympus BX41 incorporado com o sistema 5.0 Megapixel Olympus Q-Color 5®.

4.5 Estudo morfológico dos clones

4.5.1 Caracterização morfológica

Cada clone selecionado, foi analisado quanto ao movimento, tamanho e aspectos morfológicos dos trofozoítos e cistos, presença de acantopódios e tempo de contração de vacúolos contráteis, utilizando os critérios descritos por Page (1967). Foram feitas análises do diâmetro em μm , dos trofozoítos e cistos, e contabilizado o tempo de contração do vacúolo pulsátil dos trofozoítos. Para a identificação de grupos do gênero de *Acanthamoeba*, a morfologia dos cistos foi analisada conforme proposto por Pussard & Pons (1977) três dias após o processo de encistamento.

A observação e medição das estruturas foi realizada sem o uso de métodos de coloração, com o uso de um microscópio óptico com a objetiva de 40 X. Para realizar a média do diâmetro dos trofozoítos e cistos, foram selecionadas randomicamente dez células de cada. Quanto ao tempo de contração do vacúolo, foi considerado o tempo da retração até a abertura do mesmo, e no cálculo da média, foram avaliados randomicamente os tempos de 5 células de cada isolado.

4.5.2 Teste de exflagelação

Para a identificação de espécies de *Naegleria* spp. que possuem a fase flagelar, por exemplo a *N. fowleri*, foi realizada a técnica de exflagelação. Para esta técnica, os trofozoítos que cresceram em placas de ANN, foram destacados com auxílio de uma alça de Drigalski passada gentilmente no ágar com um pouco de água estéril transferidos para uma garrafa de cultivo esterilizada contendo 3 mL de água destilada. As garrafas de cultivo foram incubadas a 37° C e a emissão dos flagelos foi acompanhada por meio da visualização em microscópio invertido (Precision® P400) a cada 30 minutos por 4 horas (Silva & Rosa, 2003).

4.5.3 Teste de osmotolerância

Para analisar o efeito do aumento da osmolaridade sobre o desenvolvimento das amebas, foram utilizadas placas de ANN (1,5%) contendo 0,5 M e 1,0 M de manitol, previamente inoculadas com *E. coli* (ATCC 10536) inativada por calor. Como controle foram usadas placas sem manitol submetidas às mesmas condições. Cerca de 1000 trofozoítos foram inoculados ao centro da placa (o halo de inoculação foi marcado com o auxílio de uma caneta permanente) e incubados a 30° C por 10 dias.

O crescimento foi determinado através da contagem do número de células presentes a uma distância de 20 mm a partir do halo de inoculação. O experimento foi realizado em triplicata e cepas de *Acanthamoeba castellanii* Neff (ATCC 30010) foram utilizadas como controle.

Para o teste de osmotolerância, foram utilizados os seguintes critérios, conforme Caumo et al. (2009):

-: Se nenhuma célula for encontrada fora do halo de inoculação;

+: Se houver crescimento inicial superior à 20 mm fora do halo de inoculação;

++: Se houver crescimento parcial na placa fora do halo de inoculação;

+++: Se houver crescimento por toda a superfície da placa.

4.5.4 Teste de termotolerância

Para analisar o efeito de diferentes temperaturas (37°C e 42°C) sobre o desenvolvimento das amebas, foram utilizadas placas de ANN (1,5%) previamente inoculadas com *E. coli* (ATCC 10536) inativada por calor. Como controle foram usadas placas submetidas a temperatura de 30°C. Cerca de 1000 trofozoítos foram inoculados ao centro da placa (o halo de inoculação foi marcado com o auxílio de uma caneta permanente) e incubados a 30° C (controle), 37°C e 42°C por 10 dias.

O crescimento foi determinado através da contagem do número de células presentes a uma distância de 20 mm a partir do halo de inoculação. O experimento foi realizado em triplicata e cepas de *Acanthamoeba castellanii* Neff (ATCC 30010) foram utilizadas como controle.

Para o teste de termotolerância, foram utilizados os seguintes critérios, conforme Caumo et al. (2009):

-: Se nenhuma célula for encontrada fora do halo de inoculação;

+: Se houver crescimento inicial superior à 20 mm fora do halo de inoculação;

++: Se houver crescimento parcial na placa fora do halo de inoculação;

+++: Se houver crescimento por toda a superfície da placa.

4.6 Identificação molecular dos clones

4.6.1 Extração de DNA dos clones

Para a extração do DNA total foi utilizado um protocolo adaptado da Embrapa (Oliveira et al., 2007). A descrição das etapas e os materiais utilizados no processo de extração estão apresentados no Apêndice B. A extração foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com gelRed (Loading Buffer 5x - Quatro G P&D Ltda.). A quantificação de DNA dos clones de amebas de vida livre foi determinada através do nano espectrofotômetro (Apêndice C) (Kasvi® K23-0002, versão 01/13).

4.7 Análise molecular dos clones

4.7.1 Identificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação de PCR foi realizada com um volume final de 25 µL que contém cerca de 50 ng do molde de DNA, 5mM de dNTP, 10pM de cada oligonucleotídeo, tampão de reação (50 mM KCl₂, 10 mM Tris-HCl), 50 mM MgCl₂ e 1U de Taq polimerase (Invitrogen®) e água ultrapura tipo 1 estéril para completar o volume. Os oligonucleotídeos específicos utilizados na PCR estão descritos na Tabela 2. As reações foram realizadas em um termociclador (SimpliAmp™ Thermal Cycler - Applied biosystems® by Life Technologies™). As condições de ciclagem térmica foram programadas conforme cada microrganismo de interesse.

A reação de amplificação de *Acanthamoeba* spp., *B. mandrillaris*, *Naegleria* spp e *Vermamoeba* spp., teve: desnaturação inicial a 94° C, durante 5 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94° C por 45 segundos e anelamento conforme a Tabela 2, e extensão a 72° C por: 1 minuto e 15 segundos (*Acanthamoeba* spp., *B. mandrillaris* e *Naegleria* spp) e 30 segundos (*Vermamoeba* spp.). Para o Domínio Bacteria foi realizado: desnaturação inicial a 94° C, durante 3 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94° C por 60 segundos, anelamento conforme a Tabela 2 e extensão a 72° C por 2 minutos. Ao final dos ciclos, as reações ficaram mantidas a 72°C por 5 minutos (com exceção do domínio Bacteria que teve a extensão final a 72° C por 8 minutos) e resfriadas a 4°C.

O controle negativo continha todos os reagentes exceto o DNA. Os controles positivos foram: *Acanthamoeba Castellani* Neff (ATCC 30010); *Naegleria* spp. (isolado clínico MZ243214); *Vermamoeba* spp. (isolado ambiental); *E. coli* (ATCC 10536); e *Balamuthia* (isolado ambiental). Após a PCR, os produtos foram analisados em gel de agarose a 1,2%, corado com GelRed (Loading Buffer 5x - Quatro G P&D Ltda.), os géis foram visualizados sob luz ultravioleta com o fotodocumentador

(Syngene® - GENi2). Os fragmentos amplificados (amplicons) foram analisados por comparação com um marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Ludwig Biotec®).

Tabela 2. Oligonucleotídeos específicos utilizados.

Organismo	Gene-alvo	Sequência 5' – 3'	Anelamento	Tamanho do Amplicon (pb)	Bibliografia
<i>Acanthamoeba</i>	Região ASA.S1	JDP1: GGCCCAGATCG TTTACCGTGAA JDP2: TCTCACAAGCT GCTAGGGGATA	60° C por 40 segundos	450-500	Booton et al., 2005
<i>Balamuthia</i>	16S rRNA	5' Balspec16S: CGCATGTATGA AGAAGACCA 3' Balspec16S: TTACCTATATAAT TGTCGATACCA	48° C por 40 segundos	1075	Booton et al., 2003
Domínio Bactéria	16S rDNA	27F: AGAGTTTGATC CTGGCTCAG 1492R: GGTTACCTTGTT ACGACTT	55° C por 60 segundos	1200-1600	Silva et al., 2015
<i>Naegleria</i>	Região ITS	ITS1: GAACCRGCGTA GGGATCATT ITS2: TTTCTTTTCCTC CCCTTATTA	55° C por 40 segundos	400-453	Pélandakis et al., 2000
<i>Vermamoeba</i>	18S rDNA	Hv1227F: TTACGAGGTC GGACACTGT Hv1728R: GACCATCCGGA GTTCTCG	58° C por 40 segundos	505	Kuiper et al., 2006

4.7.2 Sequenciamento e análise dos amplicons

Para o sequenciamento, os primers usados foram os mesmos da reação de PCR, sendo as amostras enviadas para ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS - Brasil). O método de sequenciamento foi realizado através do método de Sanger e o sequenciamento foi realizado usando o sequenciador automático ABI Prism 3500 Genetic Analyzer -

Applied Biosystems®. As sequências obtidas, foram analisadas no BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool), otimizada para sequências altamente similares (megablast), alinhadas pelo Clustal W 2.1 e depositadas no banco de dados do GenBank.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características da área de estudo

As coletas foram realizadas no verão (Janeiro e Fevereiro) e no inverno (Julho e Agosto) do ano de 2022. Os dados meteorológicos dos referidos períodos, encontram-se no ©WeatherSpark.com e baseiam-se nos dados presentes na página do Aeroporto Internacional Salgado Filho, Porto Alegre, Brasil (Figura 10).

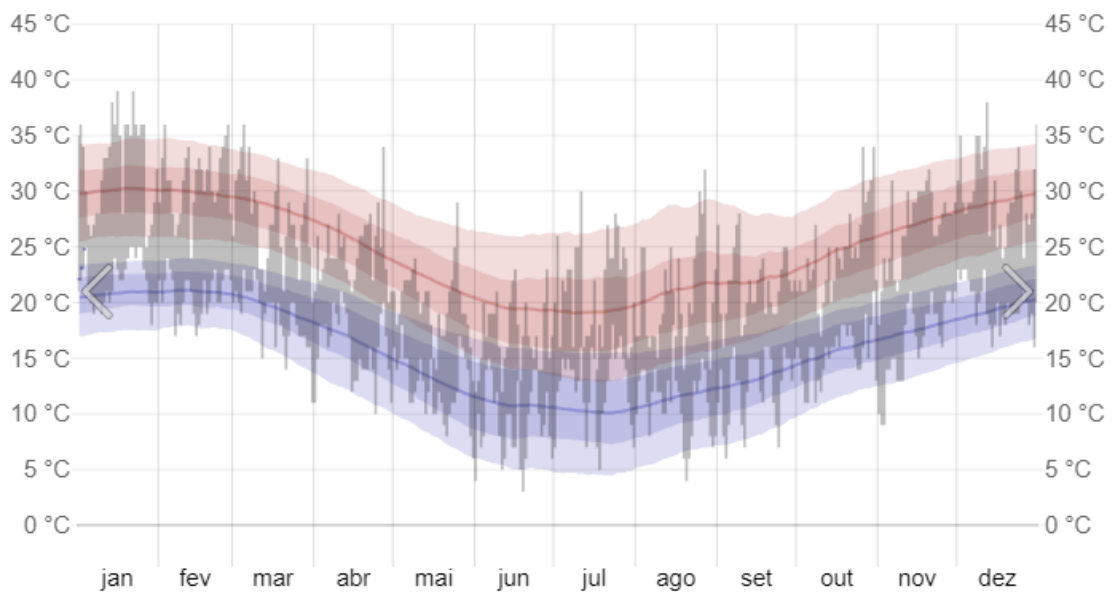


Figura 10. Temperaturas mensais no ano de 2022 em Porto Alegre, Brasil. Fonte: © WeatherSpark.com

As estações do ano foram escolhidas com base no contraste de temperatura entre as duas estações. Esses dados podem ser observados na Figura 3, onde o verão apresenta temperaturas médias entre $\cong 20\text{-}30^{\circ}\text{C}$ e o inverno entre $\cong 10\text{-}20^{\circ}\text{C}$. Nos meses de janeiro, fevereiro e março, as temperaturas máximas chegaram a 35°C , e são nesses meses que as pessoas mais procuram locais de recreação para se refrescar. Essas temperaturas elevadas propiciam um ambiente de

crescimento para microrganismos termotolerantes, e esta é uma característica que as AVL possivelmente patogênicas possuem (Griffin, 1972; Patz et al., 2000).

Como apresentado na Tabela 1, as ETEs de Belém novo, Serraria e Lami, liberam o esgoto tratado no Lago Guaíba (Figura 11), as ETEs Rubem Berta, Sarandi, do Bosque e Parque do Arvoredo, liberam o esgoto tratado no Rio Gravataí (Figura 11). Ambos os ambientes são impróprios para banho na maioria da sua extensão, porém é utilizado, por algumas pessoas para recreação (Andrade et al., 2019).



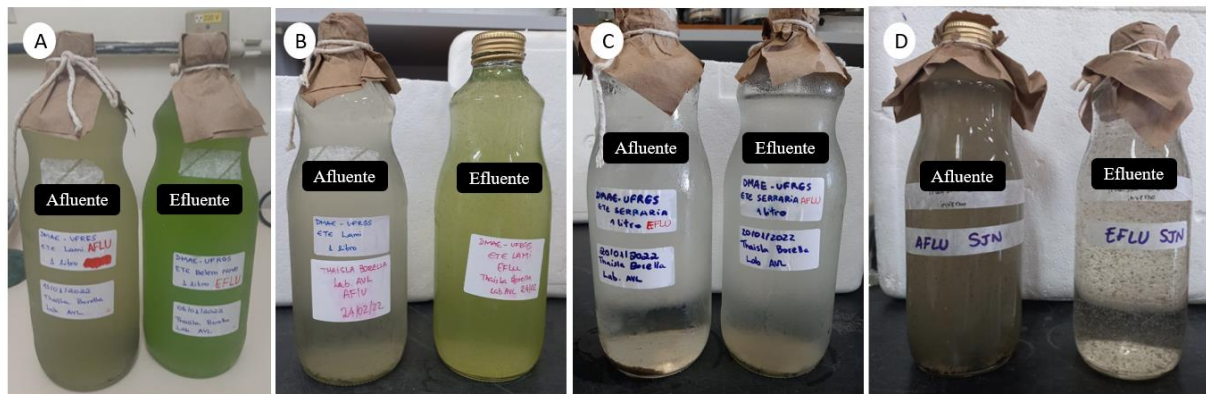
Figura 11. Momentos de recreação. A- Lago Guaíba sendo usado para momentos de recreação; B- Rio Gravataí sendo usado para momentos de recreação. Fonte: GZH – CLICRBS- Anderson Fetter, 2014 e Gravataí um rio em minha vida, 2013, respectivamente.

Os períodos em que o calor é prolongado junto com a seca, nos corpos d'água ocorre aumento da densidade de amebas, e propicia mais momentos em que as pessoas fazem uso dessas águas para recreação (Siddiqui & Khan, 2014; Leal et al., 2022). Nas mudanças climáticas que ocorrem atualmente, podemos presenciar verões prolongados e mais quentes, que também vão aumentar as práticas de recreação nos corpos d'água. Esses ambientes aquáticos são ricos em nutrientes que em combinação com o aumento da temperatura da água, favorecem a proliferação dos microrganismos, tais como *N. fowleri* (Leal et al., 2022).

A presença de microrganismos patogênicos no esgoto, é preocupante, uma vez que quando o esgoto entra em contato com a água de rios e lagos, há um espalhamento de microrganismos que podem entrar em contato com os indivíduos que ali se banham, colocando em risco sua saúde.

5.2 Características visuais das amostras

Nos frascos de coleta, tanto do verão (Figura 12 e 13) quanto do inverno (Figura 14 e 15), vê-se uma diferença conforme os diferentes tratamentos do esgoto (Tabela 1). As amostras da ETE Belém Novo e ETE Lami, apresentam um efluente de coloração verde, característica que se deve à utilização de simbiose entre bactérias e algas para o tratamento por lagoa de estabilização, sendo as algas responsáveis por essa pigmentação no efluente resultante dessas estações (Von Sperling, 2006).



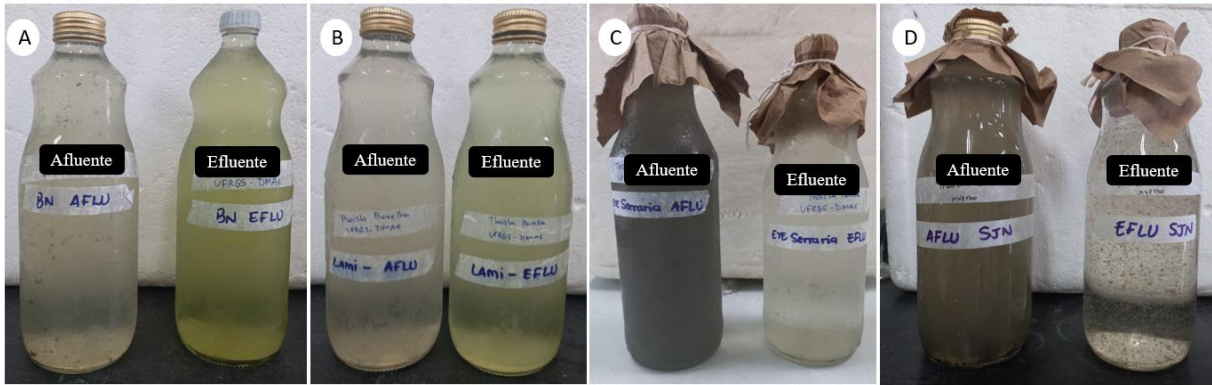
ETE Belém Novo ETE Lami ETE Serraria ETE Navegantes

Figura 12. Coleta das amostras do verão. A- ETE Belém Novo; B- ETE Lami; C- ETE Serraria; D- ETE Navegantes.



ETE Sarandi ETE Rubem Berta ETE do Bosque ETE Parque do Arvoredo

Figura 13. Coleta das amostras do verão. A- ETE Sarandi; B- ETE Rubem Berta; C- ETE do Bosque; D- ETE Parque do Arvoredo.



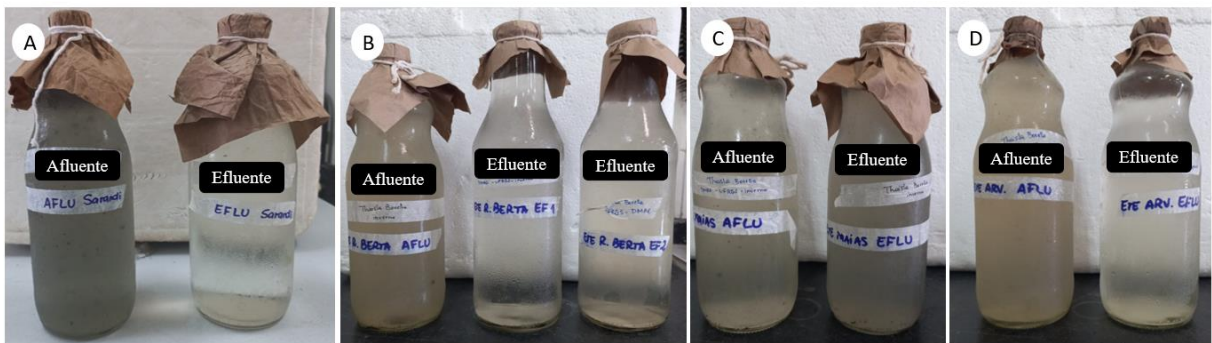
ETE Belém Novo

ETE Lami

ETE Serraria

ETE Navegantes

Figura 14. Coleta das amostras do inverno. A- ETE Belém Novo; B- ETE Lami; C- ETE Serraria; D- ETE Navegantes.



ETE Sarandi

ETE Rubem Berta

ETE do Bosque

ETE Parque
do Arvoredo

Figura 15. Coleta das amostras do inverno. A- ETE Sarandi; B- ETE Rubem Berta; C- ETE do Bosque; D- ETE Parque do Arvoredo.

As ETEs Navegantes, Serraria, Sarandi, Rubem Berta e Parque do Arvoredo que utilizam o tratamento por lodo ativado e/ou UASB, apresentam um afluente com coloração amarronzada, e isto pode ocorrer por conta de que o afluente possui alta carga orgânica, e com o decorrer do processo de tratamento, ocorre diminuição da matéria orgânica e detritos.

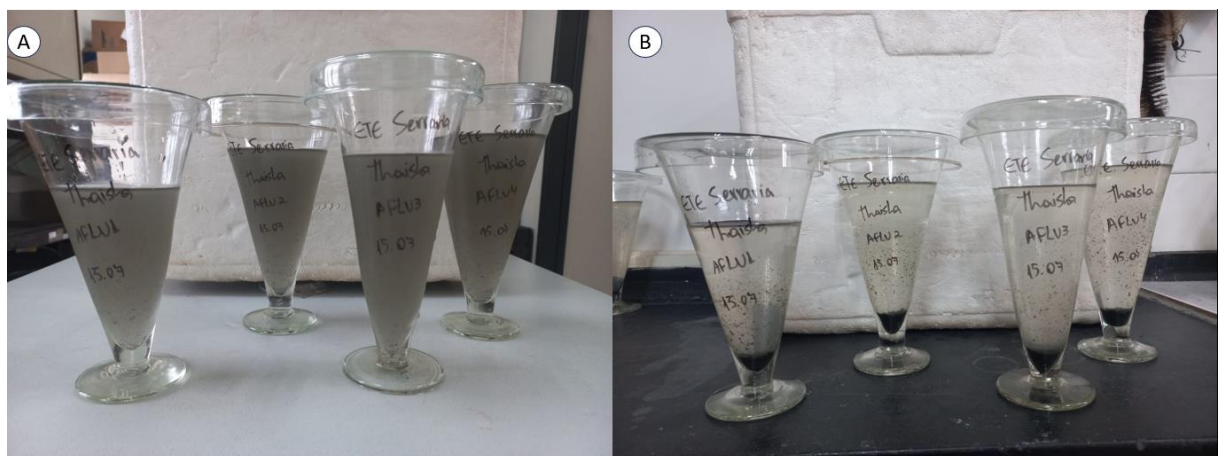
A ETE do Bosque, apesar de parecer que o efluente está com mais matéria orgânica que o afluente, no momento da homogeneização para dispor nos cálices, o afluente apresentou-se menos límpido que o efluente, apresentando então mais matéria orgânica pequena dissolvida.

Utilizando da técnica de sedimentação, foram obtidos os sedimentos para o isolamento (Figura 16 e 17), a sedimentação foi bem-sucedida. A sedimentação espontânea é utilizada para pesquisar ovos/larvas de helmintos e cistos de

protozoários (De Carli, 2001), por conta do seu amplo espectro na observação/identificação de espécies parasitas e baixo custo quando comparada com outras técnicas (Sant'Anna et al., 2013).



Figura 16. Sedimentação das amostras do verão. Afluente ETE Parque do Arvoredo: A) Dia da coleta; B) Após 24 horas. Afluente ETE Rubem Berta: A) Dia da coleta; B) Após 24 horas.



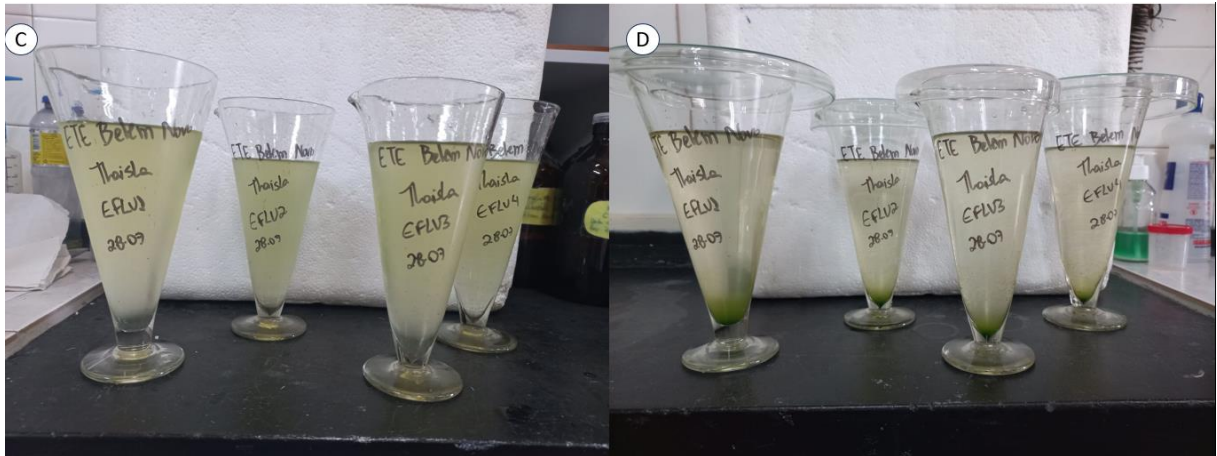


Figura 17. Sedimentação das amostras do inverno. Afluentes ETE Serraria: A) Dia da coleta; B) Após 24 horas. Efluente ETE Belém Novo: A) Dia da coleta; B) Após 24 horas.

5.3 Isolamento de AVL das amostras coletadas

Das 34 amostras que foram coletadas nas estações de tratamento de esgoto, todas (100%) foram positivas para a presença de AVL. A partir do segundo dia após o plaqueamento das amostras, já era possível identificar diversos microrganismos como microalgas, bactérias, fungos, protozoários (ciliados, anelídeos e AVL) e nematódeos (Figura 18).

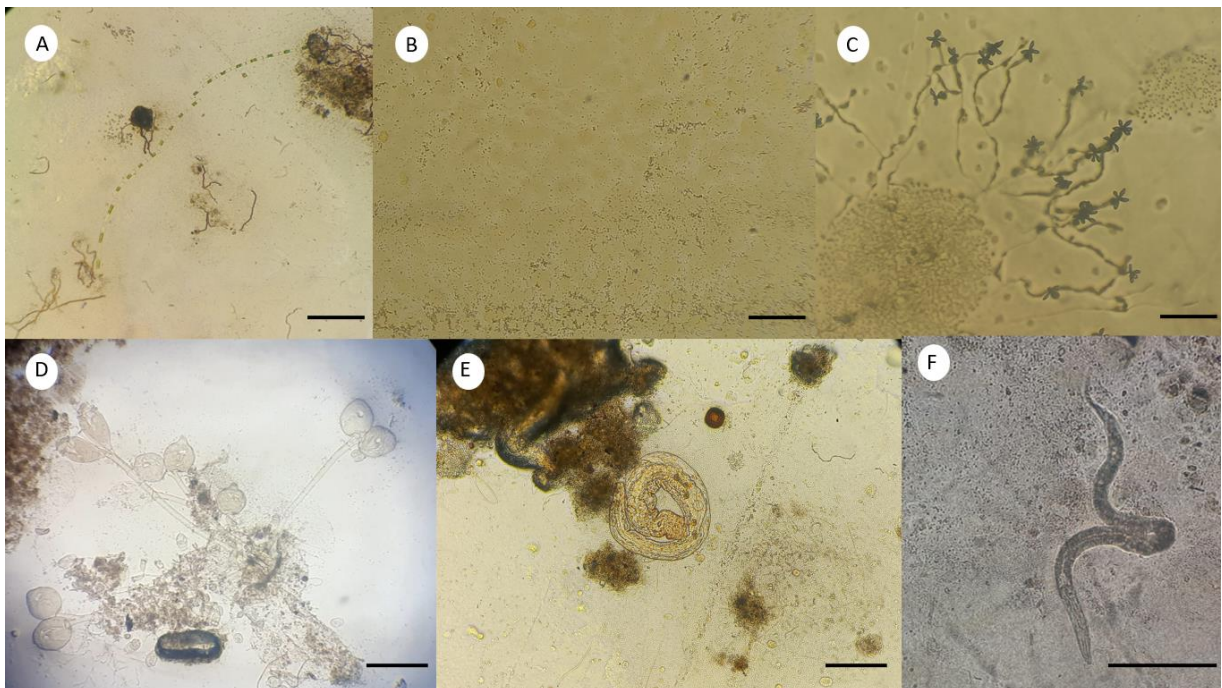


Figura 18. Placas contendo microrganismos. A- Microalgas, barra= 75 µm; B- Bactérias, barra= 100 µm; C- Fungos, barra= 60 µm; D- Protozoários ciliados fixo, barra= 160 µm; E- Protozoário anelídeo, barra= 160 µm; F- Nematódeos, barra= 500 µm. Aumento de 40x.

Para obtenção de culturas sem contaminantes, somente com amebas de vida livre, foram feitos diversos repiques, com o intuito de obter culturas monoxênicas, que contivessem apenas AVL e *E. coli* inativada (nutriente para as amebas) (Figura 19).

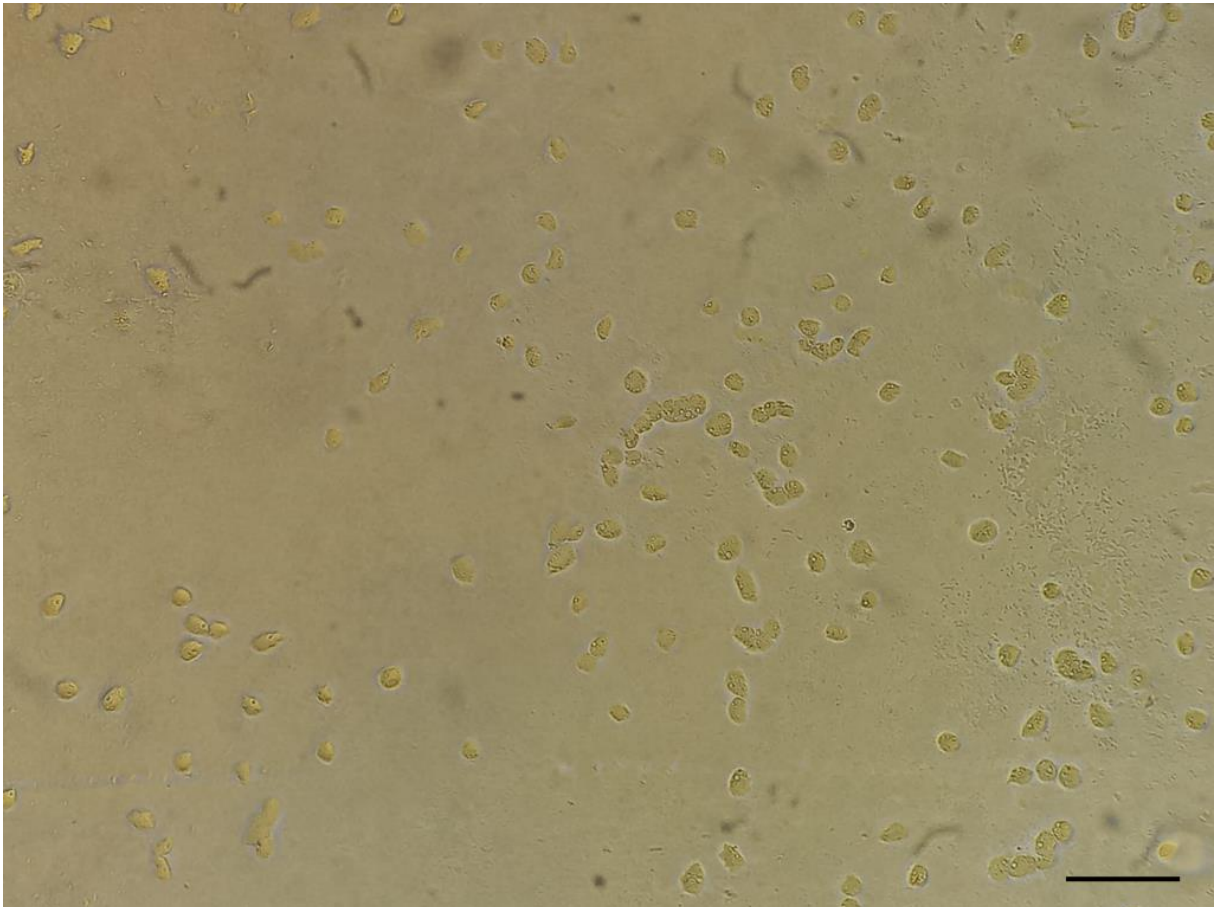


Figura 19. Cultura com amebas de vida livre monoxênica. Placa de afluente da ETE Serraria no período do verão, barra= 90 μm . Aumento de 40x.

5.4 Clonagem das culturas monoxênicas

Utilizando-se da técnica de clonagem celular, inicialmente foram selecionados três clones de cada uma das 34 amostras, posteriormente analisando características morfológicas das amebas, foram selecionados para os experimentos subsequentes, apenas os clones de cada amostras que tivessem diferenças na morfologia do trofozoíto ou cisto.

Através desta triagem para as amostras do verão (Figura 20), obtiveram-se 19 clones no total, sendo um clone das amostras do afluente e um clone do efluente,

no período do verão para as ETEs Belém Novo, Navegantes, Sarandi, Rubem Berta, do Bosque e Parque do Arvoredo. Nas ETEs Serraria e Lami, foram obtidos 1 clone do afluente e 2 clones do efluente, de cada ETE. As amostras evidenciavam no geral, morfologia compatível com a ameboide e vacúolo contrátil característico.

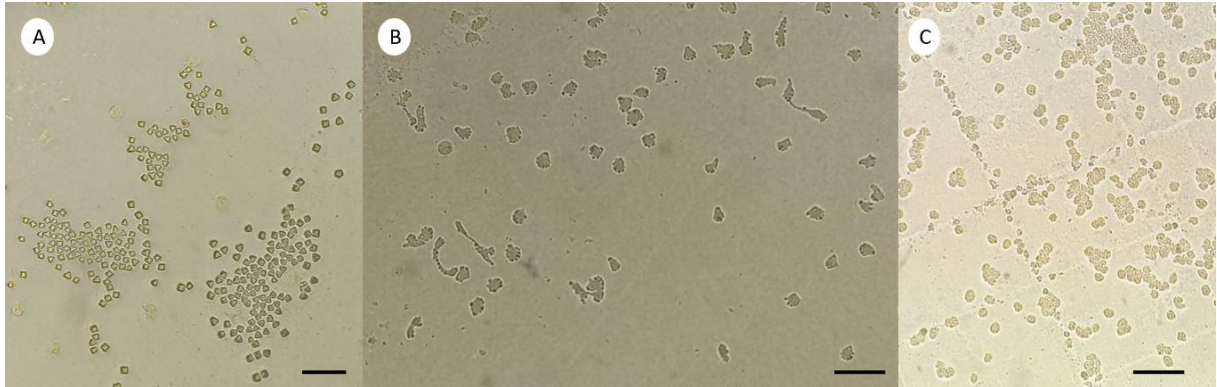


Figura 20. Ameba de vida livre das amostras do verão. A- Cistos do efluente da ETE Sarandi, barra= 74 μm ; B- Trofozoítos do afluente da ETE Lami, barra= 90 μm ; C- Trofozoítos do efluente da ETE do Bosque, barra= 90 μm . Aumento de 40x.

Através da triagem para as amostras do inverno (Figura 21), obtiveram-se 18 clones no total, sendo um clone das amostras do afluente e um clone do efluente, no período do verão para as ETEs Belém Novo, Navegantes, Sarandi, Rubem Berta, Lami, do Bosque e Parque do Arvoredo. Na ETE Serraria, foram obtidos 1 clone do afluente e 2 clones do efluente, de cada ETE. As amostras mostraram no geral, morfologia compatível com a ameboide e vacúolo contrátil característico.

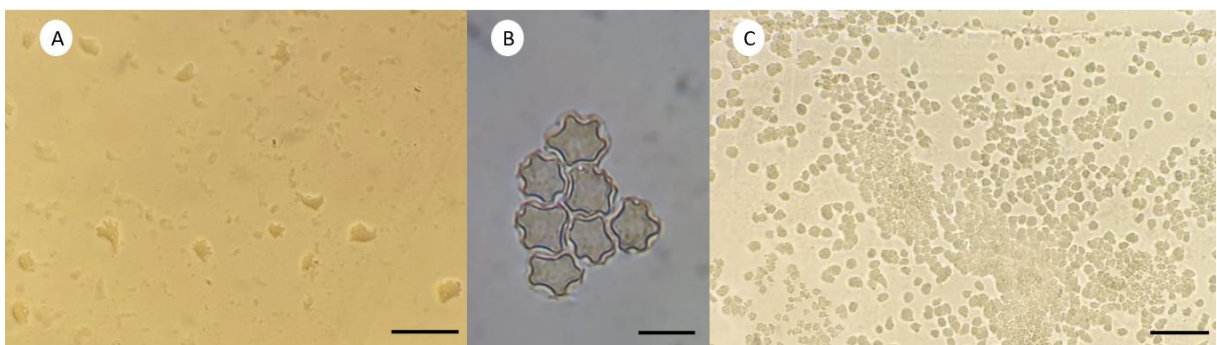


Figura 21. Ameba de vida livre das amostras do inverno. A- Trofozoítos do afluente da ETE Belém Novo, barra= 36 μm ; B- Cistos do afluente da ETE Rubem Berta, barra= 18,5 μm ; C- Trofozoítos do efluente da ETE Parque do Arvoredo, barra= 90 μm . Aumento de 40x (Imagem A e C) e aumento de 400x (Imagem B).

5.5 Caracterização morfológicas dos clones

Os clones tiveram as suas características morfológicas analisadas. Os resultados referentes aos diâmetros e as contrações dos vacúolos pulsáteis das amostras do verão (Figura 22) estão apresentados nas Tabela 3 e do inverno (Figura 23) na Tabela 4. Algumas amebas tiveram as suas dimensões compatíveis com espécies dos gêneros *Acanthamoeba* e *Naegleria*. Nenhuma das amostras apresentou dimensões que coincidissem com espécies dos gêneros *Balamuthia*, *Vermamoeba*, *Paravahlkampfia* ou *Sappinia*.

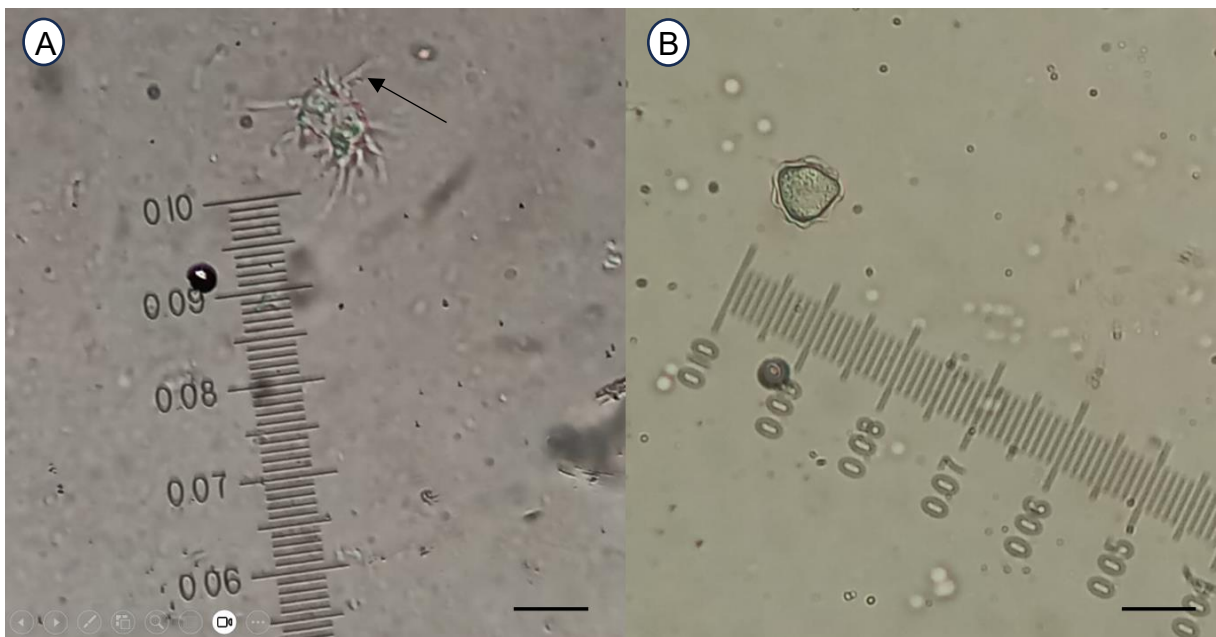


Figura 22. Amostra do verão do efluente da ETE Belém Novo. A- Trofozoíto com acantopódio evidenciado pela seta, barra= 18 μm ; B- Cisto poligonal, barra= 18,5 μm . Aumento de 400x.

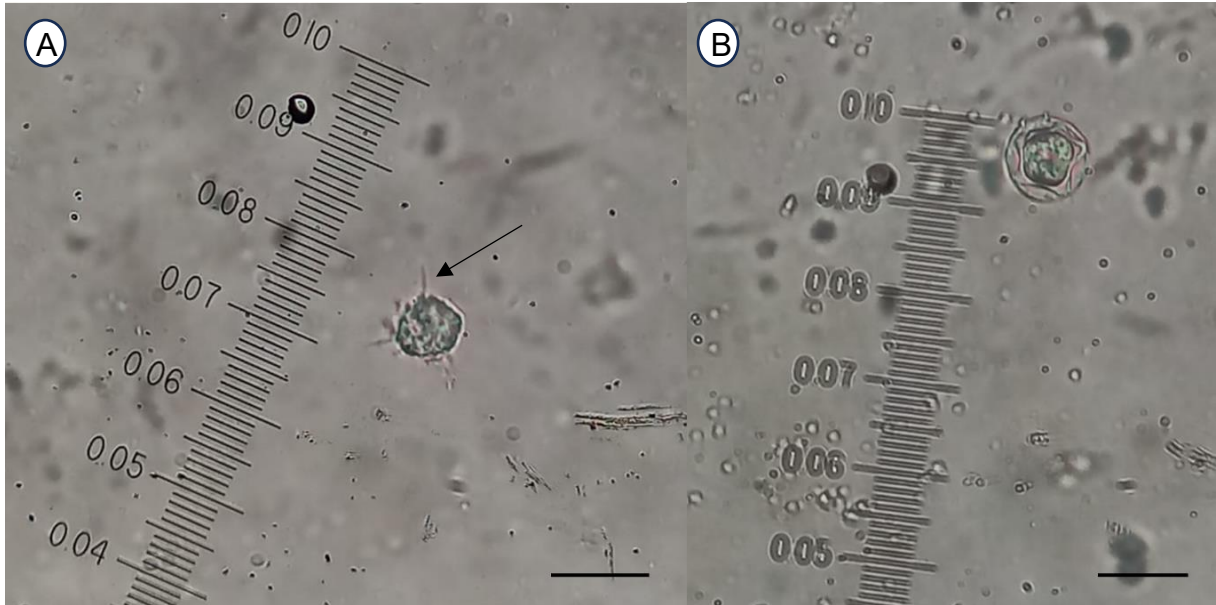


Figura 23. Amostra do inverno do efluente da ETE Navegantes. A- Trofozoíto com acantopódio evidenciado pela seta, barra= 18 μm ; B- Cisto poligonal, barra= 18,5 μm . Aumento de 400x.

Os vacúolos pulsáteis estiveram presentes em todos os clones, e tiveram o tempo de contração cronometrado (Tabela 3 e 4). A média de intervalo de contração dos clones do verão foram de 40 a 49 segundos e dos clones do inverno foram de 40 a 47 segundos. Estes valores se assemelham aos tempos de contração encontrados no gênero *Acanthamoeba* spp. (De Carli, 2001).

Tabela 3. Caracterização morfológica dos clones das amostras do verão.

Ponto	Tipo	Clone	Diâmetro Médio dos Trofozoítos ($\mu\text{m} - \text{DP}$)	Diâmetro Médio dos Cistos ($\mu\text{m} - \text{DP}$)	Tempo Médio de Contração do Vacúolo Pulsátil (s- DP)
Belém Novo	AFLU	B	12,5 \pm 1,6	13,1 \pm 1,6	41 \pm 1
	EFLU	B	16,3 \pm 1,8	15,5 \pm 1,6	47,2 \pm 1,3
Navegantes	AFLU	C	15,1 \pm 1,1	13,2 \pm 0,8	43,8 \pm 1,3
	EFLU	C	16,3 \pm 0,9	14,8 \pm 0,9	46,8 \pm 1,6
	AFLU	C	15,5 \pm 1,1	14,3 \pm 0,8	49 \pm 0,7
Serraria	EFLU	A	15,3 \pm 1,5	15,0 \pm 0,8	46,6 \pm 1,5
	EFLU	C	12,2 \pm 0,5	13,0 \pm 0,8	40,6 \pm 1,5
Sarandi	AFLU	B	16,3 \pm 1,8	12,9 \pm 1,2	47,6 \pm 0,9
	EFLU	A	11,7 \pm 0,7	12,8 \pm 0,8	42,6 \pm 0,5
	AFLU	A	14,6 \pm 0,9	14,1 \pm 1,1	41,6 \pm 1,1
Rubem Berta	EFLU1	B	13,2 \pm 1,1	14,1 \pm 1,1	43,8 \pm 0,8
	EFLU2	A	13,2 \pm 1,2	12,7 \pm 0,9	43,6 \pm 1,9
	AFLU	B	12,2 \pm 1,5	14,5 \pm 1,4	41,2 \pm 0,8
Lami	EFLU	A	14,6 \pm 1,20	13,5 \pm 0,8	45,2 \pm 1,3
	EFLU	B	14,1 \pm 0,7	13,2 \pm 0,9	40 \pm 1
Do Bosque	AFLU	C	12,0 \pm 0,8	16,5 \pm 0,9	44 \pm 0,7
	EFLU	C	15,0 \pm 1,4	12,7 \pm 1,2	44,4 \pm 0,5
Parque do Arvoredo	AFLU	A	11,3 \pm 0,9	13,7 \pm 0,7	49,4 \pm 0,5
	EFLU	B	11,7 \pm 1,8	12,9 \pm 0,8	49,6 \pm 0,5

*AFLU – Afluente, EFLU – Efluente, DP- Desvio Padrão.

Tabela 4. Caracterização morfológica dos clones das amostras do inverno.

Ponto	Tipo	Clone	Diâmetro Médio dos Trofozoítos ($\mu\text{m} - \text{DP}$)	Diâmetro Médio dos Cistos ($\mu\text{m} - \text{DP}$)	Tempo Médio de Contração do Vacúolo Pulsátil (s- DP)
Belém Novo	AFLU	A	14,4 \pm 1,2	13,6 \pm 1,5	41,6 \pm 1,14
	EFLU	A	21,1 \pm 1,6	17,7 \pm 2,1	47 \pm 1
Navegantes	AFLU	A	22,7 \pm 1,9	17,1 \pm 0,5	44,8 \pm 0,44
	EFLU	A	15,8 \pm 0,7	14,4 \pm 1,2	46,8 \pm 1,6
Serraria	AFLU	A	18,2 \pm 3	15,3 \pm 1,3	41,6 \pm 1,14
	EFLU	A	17 \pm 0,5	14,6 \pm 0,9	46,6 \pm 1,5
	EFLU	B	12,7 \pm 0,9	9,8 \pm 0,8	40,6 \pm 1,5
Sarandi	AFLU	A	17 \pm 1,3	12,4 \pm 1,1	42 \pm 1,8
	EFLU	A	16,7 \pm 2	11,5 \pm 0,8	42,6 \pm 0,5
Rubem Berta	AFLU	A	16,5 \pm 0,9	13,6 \pm 0,5	41,6 \pm 1,4
	EFLU1	A	16,5 \pm 1,4	14,3 \pm 0,8	44 \pm 0,7
	EFLU2	B	18,6 \pm 0,7	14 \pm 0,5	43,6 \pm 1,9
Lami	AFLU	A	15 \pm 0,8	13 \pm 0,9	41,2 \pm 0,8
	EFLU	A	15,6 \pm 0,5	11,5 \pm 0,8	45,2 \pm 1,3
Do Bosque	AFLU	A	14 \pm 1	12 \pm 0,5	44 \pm 0,7
	EFLU	A	15,8 \pm 0,7	12,4 \pm 0,7	44,4 \pm 0,5
Parque do Arvoredo	AFLU	A	15,6 \pm 0,5	11,3 \pm 0,9	41,6 \pm 1,5
	EFLU	A	15,1 \pm 0,7	10,8 \pm 0,8	42 \pm 2

*AFLU – Afluente, EFLU – Efluente, DP- Desvio Padrão.

5.6 Classificação morfológica segundo Pussard & Pons

Segundo a classificação de Pussard & Pons (1977), o gênero *Acanthamoeba* é dividido em três grupos, conforme as dimensões e os aspectos morfológicos gerais dos cistos. A classificação foi utilizada em todas as amostras, visto que apresentaram características morfológicas compatíveis com *Acanthamoeba*, como locomoção lenta, citoplasma com endoplasma e ectoplasma bem definidos, presença de acantopódios e presença de um núcleo com halo perinuclear.

Cistos de 35 amostras, foram compatíveis com o Grupo II (Figura 24), que apresentam endocistos arredondados, poligonais, quadrangulares e triangulares, característico do Grupo II na classificação (Visvesvara & Schuster, 2008b). Cistos de 2 amostras, foram compatíveis com o Grupo III, que apresentam endocisto arredondado ou levemente angular, característico do Grupo III na classificação (Visvesvara & Schuster, 2008b).

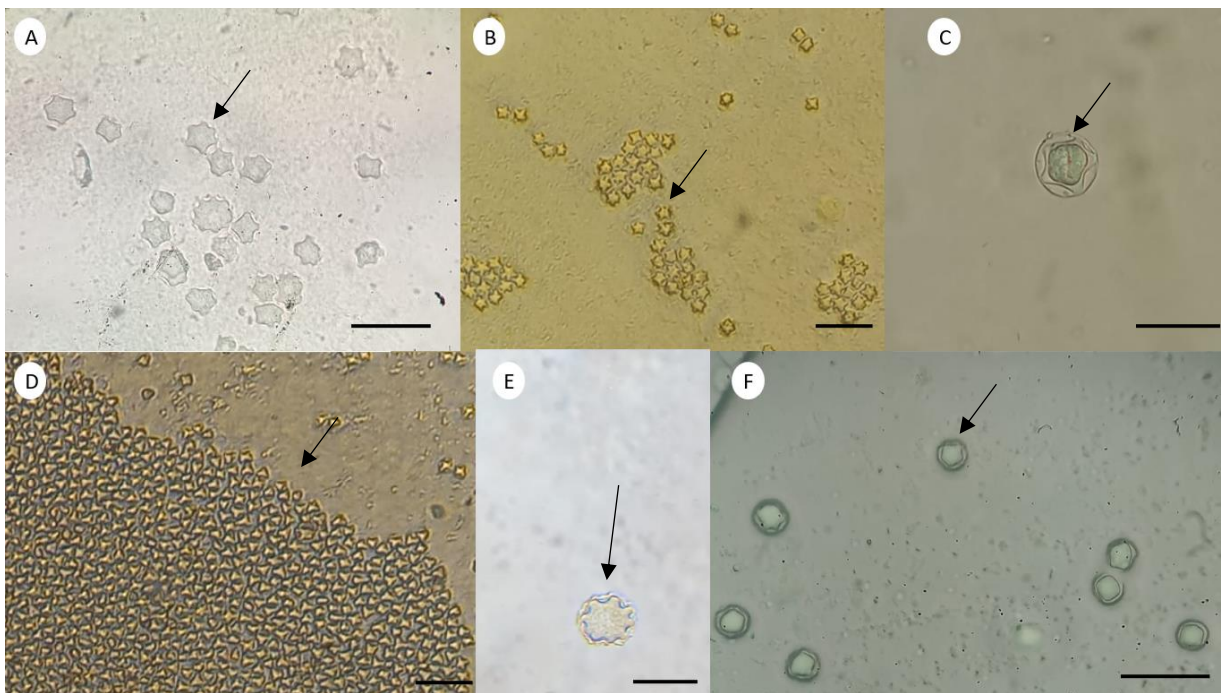


Figura 24. Cistos com características do Grupo II. A- Clone C (verão) do efluente da ETE Navegantes, barra= 37 μm ; B- Clone A (verão) do afluente da ETE Rubem Berta, barra= 74 μm ; C- Clone A (verão) do afluente da Parque do Arvoredo, barra= 18,5 μm ; D- Clone A (inverno) do afluente da ETE Serraria, barra= 74 μm ; E- Clone A (inverno) do efluente da ETE do Bosque, barra= 18 μm ; F- Clone A (inverno) do efluente da ETE Lami, barra= 37 μm . Fonte: Aumento de 400x (Imagens A, C e E) e aumento de 40x (Imagens B, D e F).

5.7 Potencial de patogenicidade dos clones

O potencial de patogenicidade dos isolados foi norteada com base nos critérios estabelecidos e investigados por Khan et al. 2001, em que amebas do gênero *Acanthamoeba*, patogênicas e não patogênicas foram submetidas a diferentes temperaturas e osmolaridades, com o intuito de investigar o nível de patogenicidade das amebas em questão, utilizando-se desses dois critérios, onde as patogênicas apresentam-se mais tolerantes às maiores molaridades e temperaturas.

Vale ressaltar, que o ambiente encontrado nas ETEs é altamente seletivo, uma vez que ao longo do tratamento de esgoto são utilizados produtos químicos como cloro, hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio (PCC Group, 2020). Além do próprio esgoto tratado e não tratado, ser um ambiente hostil com uma mistura de agentes químicos e biológicos que podem interagir entre si, com a presença de compostos derivados do nitrogênio e fósforo, fármacos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, metais pesados e pesticidas (Del-Guercio et al., 2017).

No teste de termotolerância, as amebas foram termotolerantes em ambas as temperaturas testadas, em três amostras coletadas do verão e em seis amostras coletas no inverno (Tabela 5 e 6). As outras amostras demonstraram termotolerância em apenas uma das temperaturas submetidas ou não apresentaram termotolerância. As Tabelas 5 e 6 detalham os resultados obtidos.

O citoplasma de *Acanthamoeba* spp. contém diversos vacúolos, o vacúolo contrátil realiza movimento de sístole-diástole, para controlar a osmolaridade da célula, em ambientes com alta osmolaridade permitindo à ameba adaptar-se ao ambiente (Lloyd et al., 1983; Neil et al., 2006). O tempo obtido nas amostras para a contração do vacúolo pulsátil, pode ter relação com o crescimento dos clones nas condições de osmolaridade testadas, de 0,5M e 1M de manitol, visto que 100% das amostras cresceram em todas as osmolaridades analisadas.

Conforme os dados encontrados (Tabela 5 e 6), 32 clones (86,5%) cresceram em temperatura de 37° C e 0,5 M de manitol; 32 clones (86,5%) cresceram em temperatura de 37° C e 1,0 M de manitol; 9 clones (24%) cresceram em temperatura de 42° C e 0,5 M de manitol, sendo considerado clones patogênicos; 9 clones (24%) cresceram em temperatura de 42° C e 1,0 M de manitol, sendo considerado clones altamente patogênicos; e 5 clones (13,5%) cresceram em 0,5 e 1,0 M de manitol, mas não nas temperaturas de 37° C e 42° C. O controle positivo utilizado foi *A. castellanii* Neff (ATCC 30010), que é uma cepa ambiental, e apresentou

o resultado esperado, não crescendo em condições de 1 M de manitol e temperatura de 42° C.

O potencial de patogenicidade de um isolado, pode ter relação com a virulência da ameba, já que a virulência tem relação com sua habilidade de adaptação ao meio e viabilidade dentro do hospedeiro. Logo, a capacidade de tolerar altas temperaturas e osmolaridades, pode estar relacionado de maneira indireta, à capacidade de crescimento desses microrganismos no meio ambiente e dentro de um possível hospedeiro (Khan, 2006).

A maioria das amebas com potencial de patogenicidade, vieram das ETEs que liberam seu esgoto tratado no Rio Gravataí (7/9). São elas: os clones do afluente e efluentes da ETE Rubem Berta, tanto no verão quanto no inverno; e o clone do efluente da ETE Sarandi no inverno. Das amebas que vieram de ETEs que liberam seu esgoto tratado no Lago Guaíba (2/9), temos: o clone do efluente da ETE Serraria, no inverno; e o clone do efluente da ETE Lami no inverno. Todos 9 clones apresentaram o mesmo provável potencial patogênico.

Tabela 5. Patogenicidade dos clones das amostras do verão.

Ponto	Tipo	Clone	Temperatura de Crescimento		Crescimento em Manitol		Patogenicidade
			37° C	42° C	0,5M	1,0 M	
Belém	AFLU	B	+++	-	+++	+++	Baixa
	EFLU	B	+++	-	+++	+++	Baixa
Novo Navegantes	AFLU	C	+++	-	+++	+++	Baixa
	EFLU	C	+++	-	+++	+++	Baixa
Serraria	AFLU	C	+++	-	+++	+++	Baixa
	EFLU	A	+++	-	+++	+++	Baixa
Sarandi	EFLU	C	+++	-	+++	+++	Baixa
	AFLU	B	+++	-	+++	+++	Baixa
Rubem Berta	EFLU	A	+++	-	+++	+++	Baixa
	AFLU	A	+++	+++	+++	+++	Alta
Rubem Berta	EFLU1	B	+++	+++	+++	+++	Alta
	EFLU2	A	+++	+++	+++	+++	Alta
Lami	AFLU	B	+++	-	+++	+++	Baixa
	EFLU	A	+++	-	+++	+++	Baixa
Do Bosque	EFLU	B	+++	-	+++	+++	Baixa
	AFLU	C	+++	-	+++	+++	Baixa
Parque do Arvoredo	EFLU	C	+++	-	+++	+++	Baixa
	AFLU	A	-	-	+++	+++	Baixa
	EFLU	B	-	-	+++	+++	Baixa

*AFLU – Afluente, EFLU – Efluente. Conforme Khan, Jarroll & Paget, 2001.

Tabela 6. Patogenicidade dos clones das amostras do inverno.

Ponto	Tipo	Clone	Temperatura de Crescimento		Crescimento em Manitol		Patogenicidade
			37° C	42° C	0,5M	1,0 M	
Belém	AFLU	A	+++	-	+++	+++	Baixa
Novo	EFLU	A	+++	-	+++	+++	Baixa
Navegantes	AFLU	A	+++	-	+++	+++	Baixa
	EFLU	A	+++	-	+++	+++	Baixa
	AFLU	A	-	-	+++	+++	Baixa
Serraria	EFLU	A	+++	-	+++	+++	Baixa
	EFLU	B	+++	+++	+++	+++	Alta
Sarandi	AFLU	A	-	-	+++	+++	Baixa
	EFLU	A	+++	+++	+++	+++	Alta
Rubem	AFLU	A	+++	+++	+++	+++	Alta
Berta	EFLU1	A	+++	+++	+++	+++	Alta
	EFLU2	B	+++	+++	+++	+++	Alta
Lami	AFLU	A	+++	-	+++	+++	Baixa
	EFLU	A	+++	+++	+++	+++	Alta
Do Bosque	AFLU	A	+++	-	+++	+++	Baixa
	EFLU	A	+++	-	+++	+++	Baixa
Parque do Arvoredo	AFLU	A	+++	-	+++	+++	Baixa
	EFLU	A	-	-	+++	+++	Baixa

* AFLU – Afluente, EFLU – Efluente. Conforme Khan, Jarroll & Paget, 2001.

5.8 Identificação molecular

A PCR foi utilizada como ferramenta molecular para a identificação. A PCR foi realizada para os 37 clones obtidos. Por serem clones, quando a PCR foi realizada e a positividade foi obtida, a amostra em questão não foi submetida a análise com primers específicos para os outros gêneros.

Os resultados da PCR indicaram positividade para o gênero *Acanthamoeba*, em 100% das amostras (Tabela 7). Um dado interessante, foi a alta prevalência encontrada de *Acanthamoeba* spp., no esgoto tratado, o que demonstra uma alta capacidade de resistência a processos de cloração e biocidas (Greub and Raoult, 2004; Gomes et al., 2020). Os dados encontrados no presente estudo, são semelhantes aos da literatura, que indicam que o gênero *Acanthamoeba* spp., é o mais isolado mundialmente, estando presente nos mais diversos ambientes aquáticos, além de ser o que apresenta o maior número de espécies e genótipos patogênicos (Carlesso et al., 2007; Bellini et al., 2022; Milanez et al., 2022).

Acanthamoeba é um gênero conhecido por servir de “cavalo de Troia” e carrear microrganismos potencialmente patogênicos para dentro dos hospedeiros (Delafont et al., 2018). Pelas extrações de DNA terem sido feitas a partir de uma

cultura monoxênica, que continha *E. coli* inativada como alimento para as amebas. A análise de bactérias resistentes as AVL, foi feita utilizando primers de Domínio Bacteria, padrão de peso molecular e como controle positivo *E. coli*. Assim, o resultado no gel não apresentou bandas para as amostras, somente no controle positivo. Com isso, as amebas isoladas não apresentaram bactérias resistentes as AVL.

Tabela 7. Resultado do PCR dos clones das amostras do verão e inverno.

Ponto	Tipo	Clone		Resultado do PCR/Região ASA.S1
		Verão	Inverno	
Belém Novo	AFLU	B	A	<i>Acanthamoeba</i> spp.
	EFLU	B	A	<i>Acanthamoeba</i> spp.
Navegantes	AFLU	C	A	<i>Acanthamoeba</i> spp.
	EFLU	C	A	<i>Acanthamoeba</i> spp.
	AFLU	C	A	<i>Acanthamoeba</i> spp.
Serraria	EFLU	A	A	<i>Acanthamoeba</i> spp.
	EFLU	C	B	<i>Acanthamoeba</i> spp.
Sarandi	AFLU	B	A	<i>Acanthamoeba</i> spp.
	EFLU	A	A	<i>Acanthamoeba</i> spp.
Rubem	AFLU	A	A	<i>Acanthamoeba</i> spp.
Berta	EFLU1	B	A	<i>Acanthamoeba</i> spp.
	EFLU2	A	B	<i>Acanthamoeba</i> spp.
Lami	AFLU	B	A	<i>Acanthamoeba</i> spp.
	EFLU	A	A	<i>Acanthamoeba</i> spp.
	EFLU	B	-	<i>Acanthamoeba</i> spp.
Do Bosque	AFLU	C	A	<i>Acanthamoeba</i> spp.
	EFLU	C	A	<i>Acanthamoeba</i> spp.
Parque do Arvoredo	AFLU	A	A	<i>Acanthamoeba</i> spp.
	EFLU	B	A	<i>Acanthamoeba</i> spp.

*AFLU – Afluente, EFLU – Efluente

5.9 Teste de exflagelação

O teste de exflagelação foi realizado para todas as amostras, mesmo com resultado negativo para *Naegleria* spp. na PCR. A negatividade no teste corroborou os resultados encontrados na PCR, onde houve a positividade de 100% para o gênero *Acanthamoeba* spp. que não apresenta fase flagelar.

5.10 Sequenciamento dos amplicons obtidos

O resultado obtido foi submetido a análise no banco de dados do Blast para a indicação de uma possível espécie. As sequências obtidas foram alinhadas utilizando a ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programa do US National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) a fim de

classificar os isolados de *Acanthamoeba* spp. Todos os isolados obtiveram identidade superior a 95,4% chegando a 99,76% (Tabela 8 e 9). A identidade é utilizada para relacionar espécies e confirmar identificações (CIUFO et al., 2018). Todas as sequências obtidas foram depositadas no GenBank (Tabela 10 e 11).

Os dados encontrados na classificação morfológica segundo Pussard & Pons, foram corroborados pelo sequenciamento, uma vez que foram encontrados 35 isolados, classificados no Grupo II, que é onde se encontra a espécie *A. polyphaga*; e 2 isolados classificados no Grupo II, que é onde se encontra a espécie *A. lenticulata* (Visvesvara & Schuster, 2008b).

Tabela 8. Análise da identidade dos clones do verão.

Clone	Nome científico	Genótipo	Sequência comparada no GenBank	Coertura	Valor de E	Identidade
BN_AFLU_B_F	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	T5	MF076633.1	88%	2e-149	95,40%
BN_EFLU_B_F	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	T5	MF076633.1	88%	2e-149	95,40%
NA_AFLU_C_R	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KT892910.1	97%	0,0	99,27%
NA_EFLU_C_R	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KY934458.1	98%	0,0	99,30%
SE_AFLU_C_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KY934458.1	99%	0,0	99,30%
SE_EFLU_A_R	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KR780551.1	99%	0,0	99,06%
SE_EFLU_C_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	HQ833414.1	92%	0,0	99,49%
SA_AFLU_B_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KT892910.1	98%	0,0	99,76%
SA_EFLU_A_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	HQ833414.1	94%	0,0	99,50%
RB_AFLU_A_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KT892910.1	99%	0,0	99,53%
RB_EFLU_1_B_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KT892907.1	97%	0,0	97,52%
RB_EFLU_2_A_R	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	MF576062.1	90%	0,0	99,49%
LA_AFLU_B_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KT892907.1	93%	0,0	99,25%
LA_AFLU_A_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KT894164.1	96%	6e-155	97,86%
LA_AFLU_B_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KY934458.1	97%	0,0	99,28%
BO_AFLU_C_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KT892907.1	98%	0,0	99,28%
BO_EFLU_C_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	HQ833414.1	93%	0,0	99,49%
AR_AFLU_A_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KT892907.1	97%	0,0	99,51%
AR_EFLU_B_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KT892907.1	95%	0,0	99,75%

*AFLU – Afluente, EFLU – Efluente, F – Forward, R – Reverse.

Tabela 9. Análise da identidade dos clones do inverno.

Clone	Nome científico	Genótipo	Sequência comparada no GenBank	Cobertura	Valor de E	Identidade
BN_AFLU_A_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	JQ408989.1	94%	0,0	98,51%
BN_EFLU_A_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KX688025.1	94%	0,0	98,24%
NA_AFLU_A_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KT892907.1	95%	0,0	99,75%
NA_EFLU_A_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KX688025.1	92%	1e-172	95,44%
SE_AFLU_A_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KX688025.1	92%	0,0	99,24%
SE_EFLU_A_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KR780551.1	95%	0,0	98,25%
SE_EFLU_B_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KT892907.1	98%	0,0	99,28%
SA_AFLU_A_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	HQ833414.1	93%	0,0	99,75%
SA_EFLU_A_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	HQ833414.1	93%	0,0	99,75%
RB_AFLU_A_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KR780551.1	95%	0,0	97,75%
RB_EFLU_1_A_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KR780551.1	94%	0,0	98,00%
RB_EFLU_2_B_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KR780551.1	94%	0,0	98,25%
LA_AFLU_A_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KX688025.1	94%	0,0	98,73%
LA_AFLU_A_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KR780551.1	94%	0,0	97,75%
BO_AFLU_A_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	HQ833414.1	94%	0,0	98,49%
BO_EFLU_A_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KT892907.1	95%	0,0	99,49%
AR_AFLU_A_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KR780551.1	95%	0,0	98,00%
AR_EFLU_A_F	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	T4	KX688025.1	94%	0,0	98,48%

*AFLU – Afluente, EFLU - Efluente, F – Forward, R – Reverse.

Tabela 10. Registro dos depósitos no GenBank das amostras do verão.

Clone	Nome científico	Registro no Genbank
BN_AFLU_B_VERAO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T5	OR243669
BN_EFLU_B_VERAO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T5	OR233173
NA_AFLU_C_VERAO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR288588
NA_EFLU_C_VERAO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR288650
SE_AFLU_C_VERAO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR289670
SE_EFLU_A_VERAO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR364831
SE_EFLU_C_VERAO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241303
SA_AFLU_B_VERAO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR288579
SA_EFLU_A_VERAO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241300
RB_AFLU_A_VERAO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR288523
RB_EFLU1_B_VERAO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241297
RB_EFLU2_A_VERAO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241299
LA_AFLU_B_VERAO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241295
LA_AFLU_A_VERAO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241292
LA_AFLU_B_VERAO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241289
BO_AFLU_C_VERAO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241293
BO_EFLU_C_VERAO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241286
AR_AFLU_A_VERAO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241283
AR_EFLU_B_VERAO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241284

*AFLU – Afluente, EFLU – Efluente.

Tabela 11. Registro dos depósitos no GenBank das amostras do inverno.

Clone	Nome científico	Registro no Genbank
BN_AFLU_A_INVERNO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241290
BN_EFLU_A_INVERNO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241302
NA_AFLU_A_INVERNO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241282
NA_EFLU_A_INVERNO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241281
SE_AFLU_A_INVERNO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241287
SE_EFLU_A_INVERNO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241291
SE_EFLU_B_INVERNO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241285
SA_AFLU_A_INVERNO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241280
SA_EFLU_A_INVERNO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241301
RB_AFLU_A_INVERNO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241294
RB_EFLU1_A_INVERNO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241298
RB_EFLU2_B_INVERNO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241288
LA_AFLU_A_INVERNO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR241296
LA_AFLU_A_INVERNO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR233179
BO_AFLU_A_INVERNO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR233178
BO_EFLU_A_INVERNO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR233175
AR_AFLU_A_INVERNO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR233176
AR_EFLU_A_INVERNO	<i>Acanthamoeba</i> spp. T4	OR233174

*AFLU – Afluente, EFLU – Efluente.

As amebas de vida livre, são conhecidas por se alimentarem de microrganismos como algas, bactérias, fungos, protozoários e matéria orgânica, atuando na manutenção do ecossistema (Pickup et al., 2007). Apesar de não terem sido identificados, com os oligonucleotídeos utilizados, bactérias resistentes as AVL nas amostras deste estudo, a capacidade de *Acanthamoeba* spp. em abrigar microrganismos resistentes as AVL é um risco para a saúde humana, uma vez que os microrganismos patogênicos se encontram protegidos dentro da ameba, podendo sobreviver a processos de cloração, que ocorrem nas estações de tratamento de esgoto, e biocidas, que são utilizados para combater microrganismos. Assim *Acanthamoeba* spp. atuam como reservatório de microrganismos e podem veiculá-los até o hospedeiro nos indivíduos (Delafont et al., 2018).

O gênero *Acanthamoeba*, foi o mais prevalente no presente estudo, com 100% dos isolados pertencendo a esse gênero. Esse dado assemelha-se aos encontrados na literatura, vindo de estudos realizados em ambientes aquáticos em que o gênero *Acanthamoeba* é o mais isolado mundialmente, e é também aquele que apresenta a maior quantidade de espécies e genótipos patogênicos (Carlesso et al., 2007; Bellini et al., 2022; Milanez et al., 2022). Os isolados apresentaram 2 espécies com genótipo T5 e 35 com genótipo T4. Esses genótipos estão relacionados com infecções em humanos (Siddiqui & Khan, 2012; Hajjalilo et al., 2016).

Marín et al. (2015), analisou uma estação de tratamento de esgoto doméstico por um ano, e demonstrou encontrar *Acanthamoeba* spp. no esgoto bruto e tratado, mencionando que o tratamento que é utilizado nessas estações não é eficaz na sua remoção. Ramirez et al. (2014), encontrou *Acanthamoeba* spp., *Naegleria* spp. e *Vermamoeba vermiformis* em uma estação de tratamento de esgoto têxtil, um dado preocupante visto que, o efluente têxtil possui diversos resíduos de corantes, fixadores e tensoativos, reforçando assim, a capacidade de resistência das AVL em diferentes ambientes.

Um estudo analisou a presença de AVL, em uma estação de tratamento de esgoto de uma refinaria de óleo, ambiente este, que possui variações de pH e altas cargas de componentes tóxicos na água. E era de se esperar que não houvesse muitos microrganismos que resistissem a esse ambiente, mas o estudo encontrou *Acanthamoeba* spp. com genótipo T4 e T11 (Saied et al., 2022). Moreno et al. (2019) isolou *L. pneumophila*, que é conhecida por causar doença em humanos, como bactéria resistente a *Acanthamoeba* em amostras de esgoto na Espanha. No EUA,

um estudo encontrou *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp. e *P. aeruginosa* no esgoto, junto com *Acanthamoeba* em biofilme (Garner et al., 2018).

A espécie *A. polyphaga* é conhecida por causar ceratite em humanos (Marciano-Cabral e Cabral, 2003; Schuster e Visvesvara, 2004; Caumo et al., 2009) e a espécie *A. lenticulata* é associada a casos de ceratite e EAG (Cabello-Vilchez, 2015). A presença dessas espécies no esgoto tratado e não tratado em nosso trabalho é preocupante, uma vez que representam risco aos indivíduos que utilizarem o lago Guaíba e o rio Gravataí, para atividades aquáticas.

A presença de *Acanthamoeba* spp. no esgoto tratado e não tratado, é estudada pelo mundo, em países como, África do Sul, China, Egito, Espanha, Estados Unidos da América (EUA), Irã, México, Reino Unido e Taiwan (Griffin, 1983; Rivera et al., 1986; Ramirez et al., 1993; Hsu et al., 2009; Garcia et al., 2011; Gaze et al., 2011; Magnet et al., 2013; Mosteo et al., 2013; Muchesa et al., 2014; Ramirez et al., 2014; Marín et al., 2015; Behnia et al., 2017; Lass et al., 2017; Moreno-Mesonero et al., 2017; Garner et al., 2018; Moreno et al., 2019; Koteit et al., 2020; Salahuldeen et al., 2021; Saeid et al., 2022). Até o presente momento no Brasil, nenhum estudo foi realizado investigando amebas de vida livre patogênicas em estações de tratamento de esgoto, sendo o presente estudo o primeiro realizado em nosso país.

Apesar das AVL estarem presentes em diversos ambientes, mais dados são necessários sobre sua presença nos esgotos do Brasil.

6. CONCLUSÃO

O cultivo de amebas de vida livre foi bem-sucedido, visto que permitiu o isolamento de amebas em todas as amostras. Alguns isolados apresentaram potencial de patogenicidade determinado a partir de testes de termotolerância e osmotelância, tendo maior potencial de patogenicidade nos isolados de esgoto tratado.

Utilizando-se de técnicas morfológicas e moleculares, foi possível identificar o gênero *Acanthamoeba* spp. em todas as amostras analisadas e o sequenciamento mostrou tratarem-se das espécies *A. polyphaga* e *A. lenticulata*, que possuíam genótipos T4 e T5, considerados patogênicos para humanos.

O presente estudo teve importância ambiental e de saúde pública, já que, o gênero encontrado nos isolados é conhecido por causar doenças como ceratite, encefalite amebiana granulomatosa e infecções cutâneas e pulmonares, nos humanos. O ambiente aquático, local onde ocorre a descarga do esgoto tratado, pode ter contato com indivíduos imunocompetentes ou não, apresentando risco para as pessoas, seja por infecções causadas pelas próprias AVL, ou por doenças causadas por possíveis microrganismos resistentes as AVL carregados por elas. Como foi o primeiro estudo realizado em estações de tratamento de esgoto do Brasil, sugere-se que sejam realizadas novas pesquisas nesse campo ambiental, para levantamento de mais dados desses ambientes naturais e antropogênicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW. 2012. The revised classification of eukaryotes. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 59(5):429-93. doi: 10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x.
- Aitken D, Hay J, Kinnear FB, Kirkness CM, Lee WR, Seal DV. 1996. Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hatmannella* infection. *Ophthalmology*. 103(3):485-94. doi: 10.1016/s0161-6420(96)30667-2.
- Al-Lahham O, El Assi NM, Fayyad M. 2003. Impact of treated wastewater irrigation on quality attributes and contamination of tomato fruit. *Agricultural Water Management*. 61(1):51-62. doi: 10.1016/S0378-3774(02)00173-7.
- Alvarenga LS, de Freitas D, Hofling-Lima AL. 2000. Ceratite por *Acanthamoeba*. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 63(2). doi: 10.1590/S0004-27492000000200013.
- Andrade LC de, Rodrigues LR; Andrezza R, Camargo FA de O. 2019. Lake Guaíba: a historical and cultural analysis of water pollution in Porto Alegre, RS, Brazil. *Engenharia Sanitária e Ambiental*. 24(2):229-237. doi: 10.1590/S1413-41522019155281.
- Balczun C, Scheid PL. 2017. Free-Living Amoebae as Hosts for and Vectors of Intracellular Microorganisms with Public Health Significance. *Viruses*. 9(4):65. doi: 10.3390/v9040065.
- Barker J, Brown MR. 1994. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiology (Reading)*. 140(6):1253-9. doi: 10.1099/00221287-140-6-1253.
- Bastos RKX. 1999. **Utilização agrícola de esgotos Sanitários**. Apostila de Curso, ABES-Recife. 116p.
- Behnia M, Hatam-Nahavandi K, Hajialilo E, Niyayati M, Tarighi F, Bakhtiar Akram A, Salimi M, Rezaeian M. 2017. Occurrence of *Acanthamoeba* Genotypes in Wastewater Samples in Tehran, Iran. *Iran Journal Parasitology*. 12(4):516-521.
- Bellini NK, Fonseca ALMD, Reyes-Battle M, Lorenzo-Morales J, Rocha O, Thiemann OH. 2020. Isolation of *Naegleria* spp. from a Brazilian Water Source. *Pathogens*. 9(2):90. doi: 10.3390/pathogens9020090.
- Bellini NK, Thiemann OH, Reyes-Battle M, Lorenzo-Morales J, Costa AO. 2022. A history of over 40 years of potentially pathogenic free-living amoeba studies in Brazil - a systematic review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 117:e210373. doi: 10.1590/0074-02760210373.
- Berger P, Papazian L, Drancourt M, La Scola B, Auffray JP, Raoult D. 2006. Ameba-associated microorganisms and diagnosis of nosocomial pneumonia. *Emerging Infectious Diseases*. 12(2):248-55. doi: 10.3201/eid1202.050434.
- Biasoli WM, Araripe CA, Lima JMO, Lopes, E. 1981. **Meningoencefalite amebiana de origem hídrica diagnosticada pelo exame do liquor**. Apresentação de dois casos. In: XV Congresso Brasileiro de Patologia Clínica, São Paulo.
- Booton GC, Carmichael JR, Visvesvara GS, Byers TJ, Fuerst PA. 2003. Identification of *Balamuthia mandrillaris* by PCR assay using the mitochondrial 16S rRNA gene as a target. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(1):453-5. doi: 10.1128/JCM.41.1.453-455.2003.

- Booton GC, Visvesvara GS, Byers TJ, Kelly DJ, Fuerst PA. 2005. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(4):1689-93. doi: 10.1128/JCM.43.4.1689-1693.2005.
- Bullé DJ, Benitez LB, Rott MB. 2020. Occurrence of *Acanthamoeba* in hospitals: a literature review. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*. 2(10):174-1180. doi: 10.17058/jeic.v10i2.13702.
- Cabello-Vílchez AM. 2015. *Acanthamoeba* spp. um agente oportunista em infecciones humanas. *Revista de Investigación de la Universidad Norbert Wiener*. 4(1). doi: 10.37768/unw.rinv.04.01.002.
- Calixto PHM, Trindade FR, Ballarini AJ, Dias CAG de M, Campos, CEC, Oliveira JCS de. 2014. Aspectos biológicos das principais amebas de vida-livre de importância médica. *Biota Amazônica*. 4(2):124-129. doi: 10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v4n2p124-129.
- Campos R, Gomes MCO, Pringenzi LS., Stecca J. 1977. Meningoencefalite por ameba de vida livre. Apresentação do primeiro caso latino-americano. *Ver Inst Med Trop SP*. 19:349-51.
- Carlesso AM, Simonetti AB, Artuso GL, Rott MB. 2007. Isolation and identification of potentially pathogenic free-living amoebae in samples. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 40(3):316-320. doi: 10.1590/S0037-86822007000300013.
- Carnt N, Minassian DC, Dart JKG. 2023. *Acanthamoeba* Keratitis Risk Factors for Daily Wear Contact Lens Users: A Case-Control Study. *Ophthalmology*. 130(1):48-55. doi: 10.1016/j.ophtha.2022.08.002.
- Carnt N, Stapleton F. 2016. Strategies for the prevention of contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis: a review. *Ophthalmic and Physiological Optics*. 36(2):77-92. doi: 10.1111/opo.12271.
- Carvalho FG, Moura H, Guimarães Neto FD, Salazar HC, Gonçalves AJ, Lomelino MR, Avila CM. 1983. Primary amoebic meningoencephalitis. A case report. *Rev Bras Neurol*. 19:83-6.
- Castrllón JC, OROZCO LP. 2013. *Acanthamoeba* spp. como parasitos patógenos y oportunistas. *Revista Chilena de Infectología*. 30(2):147-155. doi: 10.4067/S0716-10182013000200005.
- Cateau E, Maisonneuve E, Peguilhan S, Quellard N, Hechard Y, Rodier MH. 2014. *Stenotrophomonas maltophilia* and *Vermamoeba vermiformis* relationships: bacterial multiplication and protection in amoebal-derived structures. *Research in Microbiology*. 165(10):847-51. doi: 10.1016/j.resmic.2014.10.004.
- Caumo K, Frasson AP, Pens CJ, Panatieri LF, Frazzon AP, Rott MB. 2009. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian city of Porto Alegre. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 103(6):477-85. doi: 10.1179/136485909X451825.
- Cavalier-Smith T. 2002. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52:297–354. doi: 10.1099/ijs.0.02058-0.
- Centeno M, Rivera F, Cerva L, Tsutsumi V, Gallegos E, Calderón A, Ortiz R, Bonilla P, Ramírez E, Suárez G. 1996. *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitis and bronchopneumonia. *Archives of Medical Research*. 27(4):579-86.

- Centers for Disease Control and Prevention. 2019. ***Balamuthia Mandrillaris***. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED).
- Cerva L. 1969. Amoebic meningoencephalitis: axenic culture of *Naegleria*. *Science*. 163(3867):576. doi: 10.1126/science.163.3867.576.
- Cerva L. 1971. Experimental infection of laboratory animals by the pathogenic *Naegleria gruberi* strain Vitek. *Folia Parasitology (Praha)*. 18(2):171-6.
- Chimelli L, Hahn MD, Scaravilli F, Wallace S, Visvesvara GS. 1992. Granulomatous amoebic encephalitis due to leptomyxid amoebae: report of the first Brazilian case. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 86(6):635. doi: 10.1016/0035-9203(92)90164-8.
- Ciufo S, Kannan S, Sharma S, Badretdin A, Clark K, Turner S, Brover S, Schoch CL, Kimchi A, DiCuccio M. 2018. Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 68(7):2386-2392. doi: 10.1099/ijsem.0.002809.
- Corsaro D, Walochnik J, Köhler M, Rott MB. 2015. *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitology Research*. 114(7):2481-90. doi: 10.1007/s00436-015-4445-8.
- Corsaro D, Köhler M, Montalbano Di Filippo M, Venditti D, Monno R, Di Cave D, Berrilli F, Walochnik J. 2017. Update on *Acanthamoeba jacobsi* genotype T15, including full-length 18S rDNA molecular phylogeny. *Parasitology Research*. 116(4):1273-1284. doi: 10.1007/s00436-017-5406-1.
- Cui B, Luo J, Jin D, Jin B, Zhuang X, Bai Z. 2017. Investigating the bacterial community and amoebae population in rural domestic wastewater reclamation for irrigation. *Journal of Environmental Sciences*. 70:97-105. doi: 10.1016/j.jes.2017.11.018.
- Da Rocha-Azevedo B, Tanowitz HB, Marciano-Cabral F. 2009. Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2009:251406. doi: 10.1155/2009/251406.
- De Carli GA (Eds). 2001. **Parasitologia clínica: seleção de métodos e técnicas de laboratório para diagnóstico das parasitoses humanas**. 2^a ed. São Paulo, SP: Atheneu. 810p.
- De Jonckheere JF. 1980. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *Appl Environmental Microbiology*. 39(4):681-5. doi: 10.1128/aem.39.4.681-685.1980.
- De Jonckheere. 1991. Ecology of *Acanthamoeba*. *Reviews of Infectious Diseases*. 13:385-387. doi: 10.1093/clind/13.supplement_5.s385.
- De Jonckheere JF. 2014. What do we know by now about the genus *Naegleria*? *Experimental Parasitology*. 145 Suppl:S2-9. doi: 10.1016/j.exppara.2014.07.011.
- Delafont V, Rodier MH, Maisonneuve, Cateau E. 2018. *Vermamoeba vermiformis*: a Free-Living Amoeba of Interest. *Microbial Ecology*. 76:991–1001. doi: 10.1007/s00248-018-1199-8.
- Del-Guercio AMF, Christofolletti CA, Fontanetti CS. 2017. Evaluation of the domestic wastewater treatment efficiency by micronucleus test on

- Oreochromis niloticus* (Cichlidae). Eng Sanit Ambient. 22(6):1121-1128. doi: 10.1590/S1413-4152201773709.
- Diehl MLN, Paes J, Rott MB. 2021. Single cell cloning of free-living amoebae with isolated square agar. Parasitology Research. 120(9):3331-3333. doi: 10.1007/s00436-021-07275-9.
- Dos Santos DL, Kwitko S, Marinho DR, de Araújo BS, Locatelli CI, Rott MB. 2018. *Acanthamoeba keratitis* in Porto Alegre (southern Brazil): 28 cases and risk factors. Parasitology Research. 117(3):747-750. doi: 10.1007/s00436-017-5745-y.
- Farra A, Bekondi C, Tricou V, Mbecko JR, Talarmin A. 2017. Free-living amoebae isolated in the Central African Republic: epidemiological and molecular aspects. Pan African Medical Journal. 26:57. doi: 10.11604/pamj.2017.26.57.9021.
- Foronda AS. 1976. Crescimento de amebas de vida livre em meios semeados com líquido cefalorraquidiano humano. Nota Prévia. Rev Paul Med. 87:140.
- Fowler M, Carter RF. 1965. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. British Medical Journal. 2(5464):740-2. doi: 10.1136/bmj.2.5464.734-a.
- FUNASA – Fundação Nacional de Saúde. **Manual de Saneamento**, 5ª edição, 2019. Disponível em: < <https://repositorio.funasa.gov.br/handle/123456789/506> >. Acesso em: 30 de julho de 2023.
- García A, Goñi P, Clavel A, Lobez S, Fernandez MT, Ormad MP. 2011. Potentially pathogenic free-living amoebae (FLA) isolated in Spanish wastewater treatment plants. Environmental Microbiology Reports. 3(5):622-6. doi: 10.1111/j.1758-2229.2011.00271.x.
- Garner E, McLain J, Bowers J, Engelthaler DM, Edwards MA, Pruden A. 2017. Microbial Ecology and Water Chemistry Impact Regrowth of Opportunistic Pathogens in Full-Scale Reclaimed Water Distribution Systems. Environmental Science and Technology. 52(16):9056–9068. doi: 10.1021/acs.est.8b02818.
- Gaze WH, Morgan G, Zhang L, Wellington EMH. 2011. Mimivirus-like Particles in *Acanthamoebae* from Sewage Sludge. Emerging Infectious Diseases. 17(6):1127-1129. doi: 10.3201/eid1706.101282.
- Gelman BB, Rauf SJ, Nader R, Popov V, Borkowski J, Chaljub G, Nauta HW, Visvesvara GS. 2001. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. JAMA. 285(19):2450-1. doi: 10.1001/jama.285.19.2450.
- Gomes TS, Vaccaro L, Magnet A, Izquierdo F, Ollero D, Martínez-Fernández C, Mayo L, Moran M, Pozuelo MJ, Fenoy S, Hurtado C, Del Águila C. 2020. Presence and interaction of free-living amoebae and amoeba-resisting bacteria in water from drinking water treatment plants. The Science of the Total Environment. 719:137080. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.137080.
- Gómez-Couso H, Paniagua-Crespo E, Ares-Mazás E. 2007. *Acanthamoeba* as a temporal vehicle of *Cryptosporidium*. Parasitology Research. 100(5):1151-1154. doi: 10.1007/s00436-006-0377-7.
- Gonzalez-Martinez A, Sihvonen M, Muñoz-Palazon B, Rodriguez-Sanchez A, Mikola A, Vahala R. 2018. Microbial ecology of full-scale wastewater treatment systems in the Polar Arctic Circle: Archaea, Bacteria and Fungi. Nature - Scientific Reports. 8(1):2208. doi: 10.1038/s41598-018-20633-5.

- Gravataí um rio em minha vida. 2013. **O rio Gravataí está bem vivo**. Disponível em: < <http://gravataiumrioeminhavida.blogspot.com/2013/07/o-rio-gravatai-esta-bem-vivo-o.html>>. Acesso em: 02 de agosto de 2023.
- Greub G, Raoult D. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical Microbiology Reviews*. 17(2):413-433. doi: 10.1128/CMR.17.2.413-433.2004.
- Griffin JL. 1972. Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. *Science*. 178(4063):869-70. doi: 10.1126/science.178.4063.869.
- Griffin JL. 1983. The pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*: environmental isolations, competitors, ecologic interactions, and the flagellate-empty habitat hypothesis. *Journal Protozoology*. 30(2):403-409. doi: 10.1111/j.1550-7408.1983.tb02939.x.
- GZH - CLICRBS - Anderson Fetter. 2014. **Reportagem percorre orla do Guaíba para mostrar sujeira nas margens**. Disponível em: <<https://gauchazh.clicrbs.com.br/saude/vida/noticia/2014/07/Reportagem-percorre-orla-do-Guaiba-para-mostrar-sujeira-nas-margens-4560025.html>>. Acesso em: 02 de agosto de 2023.
- Hajjalilo E, Behnia M, Tarighi F, Niyyati M, Rezaeian M. 2016. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains (T4, T9, and T11) from amoebic keratitis patients in Iran. *Parasitology Research*. 115(8):3147-51. doi: 10.1007/s00436-016-5072-8.
- Hampel V, Hug L, Leigh JW, Dacks JB, Lang BF, Simpson AG, Roger AJ. 2009. Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic "supergroups". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(10):3859-64. doi: 10.1073/pnas.0807880106.
- Henker LC, Cruz RASD, Silva FSD, Driemeier D, Sonne L, Uzal FA, Pavarini SP. 2019. Meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri* in cattle in southern Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 28(3):514-517. doi: 10.1590/S1984-29612019021.
- Hsu B-M, Lin C-L, Shis F-C. 2009. Survey of pathogenic free-living amoebae and *Legionella* spp. in mud spring recreation area. *Water Research*. 43(11):2817–2828. doi: 10.1016/j.watres.2009.04.002.
- INCT Sustentáveis – UFMG. 2019. **Principais métodos de tratamento de esgoto**. Disponível em: <<https://etes-sustentaveis.org/metodos-tratamento-de-esgoto/>>. Acesso em: 30 de julho de 2023.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. 2022. **Cidades e estados - Porto Alegre**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/rs/porto-alegre.html>>. Acesso em: 17 de maio de 2023.
- Jacobi PR, Empinotti VL, Schmidt L. 2016. Escassez Hídrica e Direitos Humanos. *Ambiente e Sociedade*. 19(1). doi: 10.1590/1809-4422ASOCeditorialV1912016.
- Jager BV, Stamm WP. 1972. Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *The Lancet*. 2(7791):1343-5. doi: 10.1016/s0140-6736(72)92781-x.
- Jank L, Hoff RB, Costa FJ da, Pizzolato TM. 2014. Simultaneous determination of eight antibiotics from distinct classes in surface and wastewater samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *International Journal of*

- Environmental Analytical Chemistry. 94(10):1013-1037. doi: 10.1080/03067319.2014.914184.
- Javanmard E, Niyyati M, Lorenzo-Morales J, Lasjerdi Z, Behniafar H, Mirjalali H. 2017. Molecular identification of waterborne free living amoebae (*Acanthamoeba*, *Naegleria* and *Vermamoeba*) isolated from municipal drinking water and environmental sources, Semnan province, north half of Iran. *Experimental Parasitology*. 183:240-244. doi: 10.1016/j.exppara.2017.09.016.
- Jones DB, Visvesvara GS, Robinson NM. 1975. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba uveitis* associated with fatal meningoencephalitis. *Transactions of the Ophthalmological Societies of the United Kingdom* (1962). 95(2):221-32.
- Khan NA, Jarroll EL, Paget TA. 2001. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. *Current Microbiology*. 43(3):204-8. doi: 10.1007/s002840010288.
- Khan NA. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews*. 30(4):564-95. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x.
- Koteit H, Elowa SE, Al-Herrawy AZ. 2020. Distribution of potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolates in the environment of Helwan University, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*. 24(3):61-73, 2020. doi: 10.21608/EJABF.2020.87814.
- Kuiper MW, Valster RM, Wullings BA, Boonstra H, Smidt H, van der Kooij D. 2006. Quantitative detection of the free-living amoeba *Hartmannella vermiformis* in surface water by using real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(9):5750-6. doi: 10.1128/AEM.00085-06.
- Kumar A, Pal D. 2018. Antibiotic resistance and wastewater: Correlation, impact and critical human health challenges. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 6:52-58, 2018. doi: 10.1016/j.jece.2017.11.059.
- Lass A, Guerrero M, Li X, Karanis G, Ma L, Karanis P. 2017. Detection of *Acanthamoeba* spp. in water samples collected from natural water reservoirs, sewages, and pharmaceutical factory drains using LAMP and PCR in China. *The Science of the Total Environment*. 584-585:489-494. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.01.046.
- Leal Dos Santos D, Chaúque BJM, Virginio VG, Cossa VC, Pettan-Brewer C, Schrekker HS, Rott MB. 2022. Occurrence of *Naegleria fowleri* and their implication for health - a look under the One Health approaches. *Int Journal Hygiene Environmental Health*. 246:114053. doi: 10.1016/j.ijheh.2022.114053.
- Lloyd D, Mellor H, Williams JL. 1983. Oxygen affinity of the respiratory chain of *Acanthamoeba castellanii*. *The Biochemical Journal*. 214(1):47-51. doi: 10.1042/bj2140047.
- Lorenzo-Morales J, Martínez-Carretero E, Batista N, Alvarez-Marin J, Bahaya Y, Walochnik J, Valladares B. 2007. Early diagnosis of amoebic keratitis due to a mixed infection with *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. *Parasitology Research*. 102(1),167-169. doi: 10.1007/s00436-007-0754-x.
- Magnet A, Fenov S, Galván AL, Izquierdo F, Rueda C, Fernandez VC, Aguila C del. 2013. A year long study of the presence of free living amoeba in Spain. *Water Research*. 47(19):6966-6972. doi: 10.1016/j.watres.2013.09.065.
- Manaia CM, Rocha J, Scaccia N, Marano R, Radu E, Biancullo F, Cerqueira F, Fortunato G, Iakovides IC, Zammit I, Kampouris I, Vaz-Moreira I, Nunes OC. 2018. Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black

- box. *Environmental International*. 115:312-324. doi: 10.1016/j.envint.2018.03.044.
- Marathe NP, Shetty SA, Shouche YS, Larsson DG. 2016. Limited Bacterial Diversity within a Treatment Plant Receiving Antibiotic-Containing Waste from Bulk Drug Production. *PLoS One*. 11(11):e0165914. doi: 10.1371/journal.pone.0165914.
- Marciano-Cabral F, Cabral G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agent of disease in humans. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(2):273-307. doi: 10.1128/CMR.16.2.273-307.2003.
- Marín I, Goñi P, Lasheras AM, Ormad MP. 2015. Efficiency of a Spanish wastewater treatment plant for removal potentially pathogens: Characterization of bacteria and protozoa along water and sludge treatment lines. *Ecological Engineering*. 74:28-32. doi: 10.1016/j.ecoleng.2014.09.027.
- Martinez AJ. 1991. Infection of the central nervous system due to *Acanthamoeba*. *Reviews of Infections Diseases*. 13 Suppl 5:S399-402. doi: 10.1093/clind/13.supplement_5.s399.
- Milanez GD, Carlos KB, Adao ME, Ayson BB, Dicon AV, Gahol RAM, Lacre SKS, Marquez FPE, Perez AJM, Karanis P. 2023. Epidemiology of free-living amoebae infections in Africa: a review. *Pathogens and Global Health*. 117(6):527-534. doi: 10.1080/20477724.2022.2160890.
- Monteiro MA, Spisso BF, Santos JRP dos, Costa RP da, Ferreira RG, Pereira UM, Miranda T da S, Andrade BRG de, D'Avila LA. 2016. Occurrence of Antimicrobials in River Water Samples from Rural Region of the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Environmental Protection*. 7:230-241. doi: 10.4236/jep.2016.72020.
- Moreira D, Brochier-Armanet C. 2008. Giant viruses, giant chimeras: The multiple evolutionary histories of Mimivirus genes. *BMC Evolutionary Biology*. 8-12. doi: 10.1186/1471-2148-8-12.
- Moreno Y, Moreno-Mesonero L, García-Hernández J. 2019. DVC-FISH to identify potentially pathogenic *Legionella* inside free-living amoebae from water sources. *Environmental Research*. 176:108521. doi: 10.1016/j.envres.2019.06.002.
- Moreno-Mesonero L, Moreno Y, Alonso JL, Ferrús MA. 2017. Detection of viable *Helicobacter pylori* inside free-living amoebae in wastewater and drinking water samples from Eastern Spain. *Environmental Microbiology*. 19(10):4103-4112. doi: 10.1111/1462-2920.13856.
- Mosteo R, Ormad MP, Goñi P, Rodríguez-Chueca J, García A, Clavel A. 2013. Identification of pathogen bacteria and protozoa in treated urban wastewaters discharged in the Ebro River (Spain): water reuse possibilities. *Water Science and Technology*. 68(3):575-583. doi: 10.2166/wst.2013.201.
- Muchesa P, Mwamba O, Barnard TG, Bartie C. 2014. Detection of free-living amoebae using amoebal enrichment in a wastewater treatment plant of Gauteng Province, South Africa. *Biomedical Research International*. 575297. doi: 10.1155/2014/575297.
- Naginton J, Watson PG, Playfair TJ, McGill J, Jones BR, Steele AD. 1974. Amoebic infection of the eye. *The Lancet*. 2(7896):1537-40. doi: 10.1016/s0140-6736(74)90285-2.
- Neil AT, Biagini GA, Lloyd D. 1997. Anaerobiosis-induced differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiology Letters*. 157(1):149-153. doi: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb12766.x

- Nogueira MR de S. 2010. Otimização econômica do uso do esgoto tratado uma análise do transporte da água de reuso em busca da sustentabilidade. Dissertação (Mestrado em Engenharia de produção) - COPPE, Universidade Federal do Rio Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.
- Nosé W, Sato EH, Freitas D de, Ribeiro MP, Foronda AS, Kwittko S, Belfort JR, Bunier JM, Font R. 1988. Úlcera de córnea por *Acanthamoeba*: quatro primeiros casos de Brasil. Arq Bras. Oftalmology. 51(6):226-226.
- Obeid WN, Araújo R de, Vieira LA, Machado MAC. 2003. Bilateral *Acanthamoeba* keratitis: case report. Arq Bras Oftalmology. 66:876-880. doi: 10.1590/S0004-27492003000700025.
- Oliveira MC de S, Regitano LC de A, Roese AD, Anthonisen DG, Patrocínio E do, Parma MM, Scagliusi SMM, Timóteo WHB, Jardim SN. 2007. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia da polimerase. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste.
- Oliveira TF de, Buss DF. 2018. A protocol for evaluating the probability of the recreational use of rivers and its application in risk analysis. Ciência e saúde coletiva. 23(11):3705-3717. doi: 10.1590/1413-812320182311.22232016.
- Orozco VR, García NAG, Torres PME, Orozco DL, Teles GH, Amorim LC de, Silva RS da. 2021. Isolamento e caracterização morfológica de *Acanthamoeba* spp em caixas d'água de edifícios residenciais. Investigação, Sociedade e Desenvolvimento. 10(2):e36110212639. doi: 10.33448/rsd-v10i2.12639.
- Page FC. 1967. Taxonomic criteria for limax amoebae, with descriptions of 3 new species of *Hartmannella* and 3 of *Vahlkampfia*. The Journal of Protozoology. 14(3):499-521. doi: 10.1111/j.1550-7408.1967.tb02036.x.
- Page FC, Siemensma FJ. 1991. Nackte Rhizopoda und Heliozoa. Gustav Fischer Verlag. 2.
- Pagnier I, Valles C, Raoult D, La Scola B. 2015. Isolation of *Vermamoeba vermiformis* and associated bacteria in hospital water. Microbial Pathogenesis. 80:14-20. doi: 10.1016/j.micpath.2015.02.006.
- Panda A, Khalil S, Mirdha BR, Singh Y, Kaushik S. 2015. Prevalence of *Naegleria fowleri* in Environmental Samples from Northern Part of India. PLoS One. 10(10):e0137736. doi: 10.1371/journal.pone.0137736.
- Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vittor AY. 2000. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. International Journal for Parasitology. 30(12-13):1395-405. doi: 10.1016/s0020-7519(00)00141-7.
- PCC Group. 2020. **Tratamento de água e esgoto**. Disponível em: <

- Prefeitura municipal de porto alegre - departamento municipal de água e esgoto. 2013. Plano municipal de saneamento básico.
- Pussard M, Pons R. 1977. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*. 13:557-598.
- Qvarnstrom Y, da Silva AJ, Schuster FL, Gelman BB, Visvesvara GS. 2009. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. *The Journal of Infectious Diseases*. 199(8):1139-42. doi: 10.1086/597473.
- Ramírez E, Warren A, Rivera F, Bonilla P, Rodriguez S, Calderón A, Ortiz R, Gallegos E. 1993. An investigation of the pathogenic and non-pathogenic free-living amoebae in an activated-sludge plant. *Water, Air and Soil Pollution*. 69:135–139. doi: 10.1007/BF00478354.
- Ramirez E, Robles E, Martinez B, Ayala R, Sainz G, Martinez ME, Gonzalez ME. 2014. Distribution of free-living amoebae in a treatment system of textile industrial wastewater. *Experimental Parasitology*. 145 Suppl:S34-8. doi: 10.1016/j.exppara.2014.07.006.
- Rivera F, Garcia G, Lugo A, Zierold E, Islas J, Ramirez E, Bonilla P. 1986. Amoebae in a waste stabilization pond system in Mexico. *Water, Air and Soil Pollution*. 28:185–198. doi: 10.1007/BF00184080.
- Rocha MJ da, Sousa KK, Carneiro JLS, Weber DM. 2022. Isolation of potentially pathogenic free-living amoebae in swimming pools for collective use located in the municipality of Redenção, Pará, Brazil. *Revista de Ciências Médicas*. 31:225222. doi: 10.24220/2318-0897v31e2022a5222.
- Rodríguez-Zaragoza S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critical Reviews in Microbiology*. 20(3):225-41. doi: 10.3109/10408419409114556.
- Salles-Gomes Jr. CE, Barbosa ER, Nóbrega JPS, Scaff M, Spina-Franca A. 1978. Meningoencefalomielite amebiana primária: registro de caso. *Arq Neuropsiquiatria*. 36:139-42. doi: 10.1590/S0004-282X1978000200006.
- Saeid A, Rahimi HM, Niyuati M, Shalilieh F, Nemati S, Rouhani S, Zali MR, Mirjalali H, Karanis P. 2022. Free-living amoebae in an oil refinery wastewater treatment facility. *Science of The Total Environment*. 839:156301. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.156301.
- Salahuldeen A, El-Aziz AA, Gad MA, El-Nour MFA, Al-Herrawy AZ. 2021. An investigation on potentially pathogenic *Acanthamoeba* species from a wastewater treatment plant in Alexandria, Egypt. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*. 25(2):1067–1079. doi: 10.21608/EJABF.2021.170934.
- Sant'Anna LML, Oliveira FJ, de Melo CM. 2013. ESTUDO COMPARATIVO DE TÉCNICAS PARASITOLÓGICAS BASEADA NO PRINCÍPIO DE SEDIMENTAÇÃO ESPONTÂNEA (HOFFMAN) E PARASITOKIT®. *Scire Saltis*. 3(1). doi: 10.6008/ESS2236-9600.2013.001.0001.
- Scheid P. 2018. Free-Living Amoebae as Human Parasites and Hosts for Pathogenic Microorganisms. *Proceedings*. 2(11):692. doi: 10.3390/proceedings2110692.
- Scheid P. 2019. Free-Living Amoebae in Rivers and Ponds and Their Multiple Role in Environmental Health. *Parasitology Research Monographs*. 12:431-444. doi: 10.1007/978-3-030-29061-0_20.
- Scheid PL, Lâm TT, Sinsch U, Balczun C. 2019. *Vermamoeba vermiformis* as etiological agent of a painful ulcer close to the eye. *Parasitology Research*. 118(6):1999-2004. doi: 10.1007/s00436-019-06312-y.

- Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, Fuerst PA, Byers TJ. 2001. Use of subgenetic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. *Journal of Clinical Microbiology*. 39(5):1903-11. doi: 10.1128/JCM.39.5.1903-1911.2001.
- Schuster FL, De Jonckheere JF, Moura H, Sriram R, Garner MM, Visvesvara GS. 2003. Isolation of a thermotolerant *Paravahlkampfia* sp. from lizard intestine: biology and molecular identification. *Journal Eukaryotic Microbiology*. 50(5):373-8. doi: 10.1111/j.1550-7408.2003.tb00152.x.
- Schuster FL, Visvesvara GS. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*. 34(9):1001-27. doi: 10.1016/j.ijpara.2004.06.004.
- Shadrach WS, Rydzewski K, Laube U, Holland G, Ozel M, Kiderlen AF, Flieger A. 2005. *Balamuthia mandrillaris*, free-living amoeba and opportunistic agent of encephalitis, is a potential host for *Legionella pneumophila* bacteria. *Appl Environmental Microbiology*. 71(5):2244-9. doi: 10.1128/AEM.71.5.2244-2249.2005.
- Siddiqui R, Khan NA. 2012. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites and Vectors*. 5:6. doi: 10.1186/1756-3305-5-6.
- Siddiqui R, Khan NA. 2014. Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*: an old enemy presenting new challenges. *PLoS Negl Trop Dis*. 8(8):e3017. doi: 10.1371/journal.pntd.0003017.
- Silva MA, Rosa JA. 2003. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. *Revista de Saúde Pública*. 37:242-246. doi: 10.1590/S0034-89102003000200013.
- Silva TNLopes, Chaves MA, Granjeiro PA, Valadares HM, Lopes D de O; Magalhães JT de. 2011. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS LÁCTICAS COM POTENCIAL PROBIÓTICO PRESENTES EM QUEIJO MINAS PADRÃO ARTESANAL. 87. In: Anais da V Jornada Acadêmica Internacional de Bioquímica [= Blucher Biochemistry Proceedings, v.1, n.1]. São Paulo: Blucher. doi: 10.5151/biochem-jaibqi-0093.
- Silva-Vergara ML, Da Cunha Colombo ER, De Figueiredo Vissotto E, Silva AC, Chica JE, Etchebehere RM, Adad SJ. 2007. Disseminated *Balamuthia mandrillaris* amoeba infection in an AIDS patient from Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 77(6):1096-8.
- Simões K da S, Peixoto M de F da SP, Almeida AT, Ledo CA da S, Peixoto CP, Pereira FA de C. 2013. Água residuária de esgoto doméstico tratado na atividade microbiana do solo e crescimento da mamoneira. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 17(5):310-316. doi: 10.1590/S1415-43662013000500008.
- Siqueira-Batista R, Gomes AP, Oddó DB, Viana LEO, Pinto RCT, Bbraga BD, Rôças G, Geller M, Antonio VE. 2007. Neuroinfecção por *Naegleria fowleri*: aspectos clínico-terapêuticos, epidemiológicos e ecológicos. *Revista de Neurociências*. 15(4):310-316.
- Soares SS, Souza TK, Berté FK, Cantarelli VV, Rott MB. 2017. Occurrence of Infected Free-Living Amoebae in Cooling Towers of Southern Brazil. *Curr Microbiology*. 74(12):1461-1468. doi: 10.1007/s00284-017-1341-8.
- Solgi R, Niyiyati M, Haghighi A, Mojarad EN. 2012. Occurrence of Thermotolerant *Hartmannella vermiformis* and *Naegleria* spp. in Hot Springs of Ardebil Province, Northwest Iran. *Iran Journal Parasitology*. 7(2):47-52.

- Soller JÁ, Schoen ME, Bartrand T, Ravenscroft JE, Ashbolt NJ. 2010. Estimated human health risks from exposure to recreational waters impacted by human and non-human sources of faecal contamination. *Water Research*. 44(16):4674-4691. doi: 10.1016/j.watres.2010.06.049.
- Smirnov AV, Chao E, Nasonova ES, Cavalier-Smith T. 2011. A revised classification of naked lobose amoebae (Amoebozoa: lobosa). *Protist*. 162(4):545-70. doi: 10.1016/j.protis.2011.04.004.
- Steenbergen JN, Shuman HA, Casadevall A. 2001. *Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages. *Infection and Immunity*. 98(26):3478-3488. doi: 10.1073/pnas.261418798.
- Steenbergen JN, Nosanchuk JD, Malliaris SD, Casadevall A. 2004. Interaction of *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, and *Histoplasma capsulatum* with *Acanthamoeba castellanii*. *Infection and Immunity*. 72(6):3478-3488. doi: 10.1128/IAI.72.6.3478-3488.2004.
- Tice AK, Shadwick LL, Fiore-Donno AM, Geisen S, Kang S, Schuler GA, Spiegel FW, Wilkinson KA, Bonkowski M, Dumack K, Lahr DJ, Voelcker E, Clauß S, Zhang J, Brown MW. 2016. Expansion of the molecular and morphological diversity of Acanthamoebidae (Centramoebida, Amoebozoa) and identification of a novel life cycle type within the group. *Biology Direct*. 11(1):69. doi: 10.1186/s13062-016-0171-0.
- Trabelsi H, Dendana F, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Neji S, Makni F, Ayadi A. 2012. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathologie Biologie (Paris)*. 60(6):399-405. doi: 10.1016/j.patbio.2012.03.002.
- Visvesvara GS, Martinez AJ, Schuster FL, Leitch GJ, Wallace SV, Sawyer TK, Anderson M. 1990. Leptomyxid ameba, a new agent of amebic meningoencephalitis in humans and animals. *Journal of Clinical Microbiology*. 28(12):2750-6. doi: 10.1128/jcm.28.12.2750-2756.1990.
- Visvesvara GS. 1991. Classification of *Acanthamoeba*. *Reviews of Infections Diseases*. 13 Suppl 5:S369-72. doi: 10.1093/clind/13.supplement_5.s369.
- Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 50(1):1-26. doi: 10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x.
- Visvesvara GS, Schuster FL. 2008a. Opportunistic free-living amebae, part I. *Clinical Microbiology Newsletter*. 30(20):151-158. doi: 10.1016/j.clinmicnews.2008.09.004.
- Visvesvara GS, Schuster FL. 2008b. Opportunistic free-living amebae, part II. *Clinical Microbiology Newsletter*. 30(21):159-166. doi: 10.1016/j.clinmicnews.2008.10.001.
- Visvesvara GS, Sriram R, Qvarnstrom Y, Bandyopadhyay K, Da Silva AJ, Pieniazek NJ, Cabral GA. 2009. *Paravahlkampfia francinae* n. sp. masquerading as an agent of primary amoebic meningoencephalitis. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*. 56(4):357-66. doi: 10.1111/j.1550-7408.2009.00410.x.
- Visvesvara GS, Shoff ME, Sriram R, Booton GC, Crary M, Fuerst PA, Hanley CS, Garner MM. 2010. Isolation, morphologic, serologic and molecular identification of *Acanthamoeba* T4 genotype from the liver of a Temminck's

- tragopan (*Tragopan temminckii*). *Veterinary Parasitology*. 170(3-4):197-200. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.02.028.
- Von Sperling M (Eds). 2006. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos – princípios do tratamento biológico das águas residuárias**. 3. ed. Belo Horizonte, Vol. 1, DESA/UFMG.
- Walochnik J, Wylezich C, Michel R. 2010. The genus *Sappinia*: history, phylogeny and medical relevance. *Experimental Parasitology*. 126(1):4-13. doi: 10.1016/j.exppara.2009.11.017.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 173(2):697-703. doi: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991.
- Winięcka-Krusnell J, Dellacasa-Lindberg I, Dubey JP, Barragan A. 2009. *Toxoplasma gondii*: uptake and survival of oocysts in free-living amoebae. *Experimental Parasitology*. 121(2):124-131. doi: 10.1016/j.exppara.2008.09.022.
- Wylezich C, Walochnik J, Michel R. 2009. High genetic diversity of *Sappinia*-like strains (Amoebozoa, Thecamoebidae) revealed by SSU rRNA investigations. *Parasitology Research*. 105(3):869-73. doi: 10.1007/s00436-009-1482-1.
- Yang B, Kong X, Cui B, Jin DY, Deng Y, Zhuang X, Zhuang G, Bai Z. 2015. Impact of Rural Domestic Wastewater Irrigation on the Physicochemical and Microbiological Properties of Pakchoi and soil. *Water*. 7(5):1825-1839. doi: 10.3390/w7051825.
- Yoder JS, Eddy BA, Visvesvara GS, Capewell L, Beach MJ. 2010. The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in the USA, 1962-2008. *Epidemiol Infect*. 138:968-75. doi: 10.1017/S0950268809991014.
- Zhang B, Yu Q, Yan G, Zhu H, Xu XY, Zhu L. 2018. Seasonal bacterial community succession in four typical wastewater treatment plants: correlations between core microbes and process performance. *Nature - Scientific Reports*. 8(4566). doi: 10.1038/s41598-018-22683-1.

APÊNDICE A

Solução Salina de PAGE 10X (De Carli, 2001) – Adaptado

Reagentes	Concentração 10X
Cloreto de Sódio (NaCl)	1,2 g
Sulfato de Magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,04 g
Hidrogenofosfato Dissódico Anidro (Na ₂ HPO ₄)	1,42 g
Diidrogenofosfato de Potássio (KH ₂ PO ₄)	1,36 g
Cloreto de Cálcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0,04 g
Água Destilada	1000 mL

Modo de Preparo:

- Em um Becker homogeneize os reagentes em 1L de água destilada, use um vórtex para deixar a solução completamente dissolvida;
- Verifique o pH. Se necessário ajuste para 7,4;
- Esterilize em autoclave a 121° C por 15 minutos e armazene entre 4° C;
- Para a solução de uso, que é a solução de PAGE 1X, é necessário diluir 100 mL da solução 10X em 900 mL de água destilada.

APÊNDICE B

Protocolo de Extração de DNA Genômico para Amebas de Vida Livre baseado no protocolo de Extração da EMBRAPA

Material:

- Caixa de isopor com gelo
- PBS 1X (Solução de tampão fosfato-salina)
- Raspador de células
- Micropipeta de 1000 μ L e 20 μ L
- Ponteira de 1000 μ L e 20 μ L
- Tubo Falcon de 15mL
- Tubo Eppendorf de 2mL
- Proteinase K
- SDS 20% (Docedil Sulfato de Sódio)
- Solução de precipitação proteica (3M acetato de potássio com 6,6 M ácido acético glacial)
- Etanol absoluto 70% gelado
- Etanol 99% gelado
- TE (10mM de Tris HCl e 1mM de EDTA)
- RNase

Metodologia:

1. Colocar a placa com as amebas invertida sobre o gelo;
2. Adicionar 3mL de PBS 1X dentro da placa;
3. No tempo 0 min, usando um raspador de células faça movimento suaves para desprender as amebas da superfície do ágar, após 7 min repita o mesmo passo;
4. Após 15min, com o auxílio de uma micropipeta retire todo o conteúdo de PBS 1X e passe para um tubo Falcon de 15mL;
5. Centrifugue o tubo à 1800rpm por 10 minutos;
6. Descarte o sobrenadante, e ressuspenda o pellet adicionando ao tubo 500 μ L de PBS 1X e homogeneize gentilmente de maneira manual;
7. Com uma pipeta transfira 300 μ L do conteúdo do tubo Falcon para um tubo Eppendorf de 2mL;
8. Adicione 2,2 μ L de proteinase K e 500 μ L de SDS 20% no Eppendorf;

9. Homogeneíze no vórtex e incube em banho-maria ou banho seco, por 1 hora e 30 minutos à 60°C;
10. Após, adicione ao Eppendorf 800µL de clorofórmio e agite no vórtex;
11. Adicione 350µL de solução de precipitação proteica e homogeneize 3 vezes o Eppendorf manualmente
12. Centrifugue o Eppendorf à 11000rpm por 15 minutos;
13. Transfira o sobrenadante (aproximadamente 1mL) à um novo tubo Eppendorf de 2mL e descarte o antigo contendo o restante do conteúdo;
14. Adicione 1mL de etanol absoluto 99% gelado e homogeneize por inversão durante 2 minutos;
15. Centrifugue novamente o Eppendorf por 15 minutos à 11000rpm
16. Retire o sobrenadante (aproximadamente 2mL) e descarte;
17. Adicione 1mL de etanol 70% gelado ao Eppendorf contendo o pellet;
18. Centrifugue o Eppendorf à 11000rpm por 5 minutos;
19. Despreze o sobrenadante (aproximadamente 1mL) e inverta o Eppendorf em uma superfície plana e deixe o pellet secar por 10 minutos;
20. Adicione no Eppendorf, 30µL de TE e 3µL de RNase;
21. Incube-o à 37°C por 1 hora;
22. Armaze o Eppendorf em freezer.

Obs.: As etapas de 1-8 devem ser realizadas em um ambiente estéril.

APÊNDICE C

Resultado da Extração de DNA Genômico das amostras.

Tabela i. Quantificação do DNA extraído dos clones das amostras do verão.

Ponto	Tipo	Clone	A260/A280	Taxa A260/A230	Concentração (ng/μL)
Belém Novo	AFLU	B	1,835	1,873	62,75
	EFLU	B	1,798	1,835	77,09
Navegantes	AFLU	C	1,801	1,920	81,39
	EFLU	C	1,809	1,989	69,75
	AFLU	C	1,812	1,835	125,05
Serraria	EFLU	A	1,821	1,879	90,55
	EFLU	C	1,721	1,920	67,00
Sarandi	AFLU	B	1,901	1,789	89,19
	EFLU	A	1,831	1,732	68,46
	AFLU	A	1,801	1,925	61,23
Rubem	EFLU1	B	1,649	1,722	91,00
Berta	EFLU2	A	1,839	1,889	81,24
	AFLU	B	1,801	1,849	96,38
Lami	EFLU	A	1,789	1,832	69,49
	EFLU	B	1,803	1,885	71,98
Do Bosque	AFLU	C	1,833	1,839	87,76
	EFLU	C	1,801	1,892	60,37
Parque do Arvoredo	AFLU	A	1,889	1,893	79,69
	EFLU	B	1,836	1,899	89,91

*AFLU – Afluente, EFLU – Efluente.

Tabela ii. Quantificação do DNA extraído dos clones das amostras do inverno.

Ponto	Tipo	Clone	A260/A280	Taxa A260/A230	Concentração (ng/μL)
Belém Novo	AFLU	A	1,849	1,899	60,83
	EFLU	A	1,821	1,863	71,62
Navegantes	AFLU	A	1,888	1,922	67,75
	EFLU	A	1,732	1,855	97,89
	AFLU	A	1,789	1,732	87,99
Serraria	EFLU	A	1,822	1,764	67,89
	EFLU	B	1,874	1,755	90,67
Sarandi	AFLU	A	1,899	1,822	82,46
	EFLU	A	1,832	1,902	91,12
	AFLU	A	1,902	1,885	61,14
Rubem Berta	EFLU1	A	1,905	1,755	60,65
	EFLU2	B	1,837	1,655	87,81
Lami	AFLU	A	1,877	1,922	75,36
	EFLU	A	1,811	1,866	61,85
Do Bosque	AFLU	A	1,888	1,854	76,30
	EFLU	A	1,688	1,991	84,01
Parque do Arvoredo	AFLU	A	1,889	1,905	76,34
	EFLU	A	1,855	1,807	89,90

*AFLU – Afluente, EFLU – Efluente.