

IV-285 – APLICAÇÃO DE MEIOS SELETIVOS PARA LEVEDURAS INDICADORAS DE QUALIDADE DA ÁGUA DO LAGO JUTURNAÍBA/RJ (ESTUDO DE CASO)

Marcos Tavares Carneiro⁽¹⁾

Biólogo pela Universidade Federal Fluminense. Especialista em Engenharia Sanitária e Ambiental pela Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP/FIOCRUZ). Mestre em Saúde Pública pela Fundação Oswaldo Cruz. Assistente Técnico de Gestão em Saúde na Fundação Oswaldo Cruz.

Dalton Marcondes Silva

Engenheiro Químico pela Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Mestre em Engenharia Nuclear e Planejamento Energético pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (COPPE/UFRJ). Doutor em Saúde Pública pela Fundação Oswaldo Cruz. Pesquisador da Fundação Oswaldo Cruz.

Allen Norton Hagler

Biólogo pela University of Puget Sound (UPS/USA). Mestre em Biologia pela University of California at Davis (UCD/USA). Doutor em Ciências pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Pós-Doutor em Biologia pelo Institute for Soil Fertility Research, (Italia), pelo Northern Regional Research Laboratory (EUA), pela University of California at Davis (EUA) e pela Georgia State University (EUA).

Endereço⁽¹⁾: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 sala 505 - Manguinhos – Rio de Janeiro - RJ - CEP: 21041-210 - Brasil - Tel: (21) 2598-2486 - e-mail: dalton@ensp.fiocruz.br

RESUMO

O uso da água, sem um tratamento adequado dos efluentes gerados, é o principal responsável pela poluição dos ecossistemas aquáticos. Na avaliação da qualidade da água e dos impactos ambientais são utilizados os coliformes termotolerantes, associados a poluição fecal, e parâmetros químicos, que refletem a qualidade da água no momento da coleta. Deste modo, é interessante utilizar indicadores complementares, associados ao equilíbrio e evolução dos ecossistemas. A contagem de leveduras como bioindicador da qualidade da água tem sido pesquisada e recomendada. A estrutura das comunidades de leveduras se altera devido a diversos fatores ambientais, tais como: os impactos antrópicos oriundos dos efluentes domésticos e industriais e das atividades agrícolas. Entretanto, as contagens de leveduras pelos métodos tradicionais de cultivo são dificultadas pela competição com os bolores. De maneira geral, os métodos de cultivo que inibem o crescimento dos bolores também inibem o crescimento das leveduras. Através de um método de cultivo e contagem de leveduras em amostras de água, que inibe apenas o crescimento dos bolores, foi possível obter contagens elevadas de leveduras sem a interferência dos bolores. Este método utiliza os meios BIL (base de isolamento de leveduras) seletivos para leveduras com diferentes características fenotípicas.

Este trabalho teve como objetivo avaliar as características das leveduras, como bioindicadores da qualidade da água: sua relação com os parâmetros físico-químicos e microbiológicos, as relações entre as espécies e os fatores ambientais que favorecem o seu crescimento.

O lago de Juturnaíba foi escolhido, para avaliação da qualidade da água, devido a sua variação morfofisiológica e de qualidade da água. Foram coletadas amostras entre agosto de 2009 e junho de 2010, de forma a avaliar a variação sazonal. As leveduras cultivadas em BILgalci apresentaram boa correlação com a DBO, correlação fraca com o pH e suas variações quantitativas refletiram as mudanças sazonais no lago. As leveduras cultivadas em BILglici apresentaram boa correlação com a *Escherichia coli* e com os coliformes totais. Assim, as leveduras isoladas nos meios BIL apresentaram características adequadas a um bioindicador complementar de qualidade da água.

PALAVRAS-CHAVE: Leveduras, Meios Seletivos, Bioindicadores, Qualidade da Água, Lago Juturnaíba/RJ.

INTRODUÇÃO

A resolução CONAMA 357/2005 e a Portaria 2914/2011 estabelecem que, na avaliação da qualidade das águas para inúmeros fins, sejam utilizados parâmetros microbiológicos, tais como: Coliformes totais e

termotolerantes, contagem de cianobactérias, bactérias heterotróficas e *Enterococcus*, e parâmetros físico-químicos.

Segundo Arias *et al* (2007), estas metodologias tradicionais de classificação de águas, baseadas em características físicas, químicas e bacteriológicas, não são suficientes para atender aos usos múltiplos da água. Não obstante a sua importante contribuição, a utilização dos coliformes como bioindicadores há muito tem sido alvo de críticas (ROSE & GRIMES, 2001). A *Escherichia coli*, que representa 95% do grupo termotolerante (SILVA FILHO & DE OLIVEIRA, 2007), tem sobrevida nas águas naturais menor que muitos patógenos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, vírus da hepatite A e E; *Adenovírus*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Cryptosporidium spp.* e *Giardia lamblia*. Além do que, a colimetria reflete apenas a poluição fecal recente, oriunda de animais de sangue quente (BARCELLOSA & QUITÉRIO, 2006; ROSE & GRIMES, 2001; ROSA *et al*, 1990; MORAIS *et al*, 1996; PESSANHA, 1996; MENDONÇA-HAGLER *et al*, 2001). Barcellosa & Quitério (2006), afirmam que esse indicador (colimetria) pode estar sujeito, em países tropicais, a interferências da presença de outros animais, temperatura e da alta concentração de nutrientes nas águas.

Os *Enterococcus faecalis*, são excretados nas fezes de humanos, embora em quantidade inferior à *E. coli*. No entanto, estes organismos ocorrem em número superior aos coliformes fecais nas fezes de outros animais homeotérmicos (ALMEIDA *et al*, 2004). Os enterococcus, principalmente, os *Streptococcus fecais*, têm a vantagem de serem mais resistentes aos processos de desinfecção e à salinidade da água do mar, razão pela qual são preferidos para avaliação de balneabilidade de praias (HAGLER *et al*, 1986). Além disto, eles têm sobrevida maior no ambiente, o que o sugere como indicador de poluição fecal não recente. Tem sido encontrada correlação positiva entre as contagens de *Streptococcus fecais* com casos de gastroenterites em banhistas no Reino Unido (KAY & DUFOUR, 2000). Não obstante, este indicador muitas vezes expressa um elevado número de falsos-positivos, em função de os resultados revelarem também a presença de outros *Streptococcus* não-fecais (MENDONÇA-HAGLER *et al*, 2001). Além disso, este indicador não reflete tão bem quanto os coliformes termotolerantes, os níveis de poluição fecal humana. Outros indicadores biológicos complementares têm sido propostos, como *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (ROSE & GRIMES, 2001; MENDONÇA-HAGLER *et al*, 2001).

Os métodos químicos, por sua vez, provêm informação sobre a qualidade momentânea da água (CALLISTO *et al*, 2004). Torna-se necessário um grande número de análises, geralmente custosas, o que inviabiliza seu uso como única ferramenta para a realização de um monitoramento temporal eficiente (BUSS *et al*, 2008). O texto da resolução Res. CONAMA 357/05 Art. 8º § 3º (BRASIL, 2005) veio abrir espaço legal para a busca de novos bioindicadores: “A qualidade dos ambientes aquáticos poderá ser avaliada por indicadores biológicos...utilizando-se organismos ou comunidades aquáticas”.

Organismos como as leveduras, pouco conhecidas como patógenos, têm se mostrado resistentes a antimicóticos, o que potencializaria o risco em caso de contato ou ingestão acidental, principalmente, levando-se em consideração o aumento no número de pessoas imunocomprometidas. Medeiros *et al*, (2008), estudou dois rios poluídos e dois lagos não poluídos em Minas Gerais. Entre os 134 isolados de leveduras que obteve, 68 foram hábeis em crescer a 37°C. Cinquenta por cento foram resistentes a Itraconazol, e 50% apresentaram sensibilidade dose-dependente. Todos os isolados de *Cryptococcus* testados foram isolados dos lagos não poluídos e eram resistentes a Cetoconazol. Três isolados de *Rhodotorula mucilaginosa* só foram susceptíveis a Anfotericina B. Dois isolados de *Candida krusei* e todos os de *C. tropicalis* foram resistentes a todos os antifúngicos testados. Estes mesmos autores salientam que os ambientes aquáticos abrigam grande diversidade de leveduras que apresentam variação de susceptibilidade a antifúngicos.

As leveduras são fungos que pertencem ao Reino Fungi, distribuídas nas Divisões Ascomycota, as que produzem esporos dentro de ascas, e Basidiomycota, as que os produzem externamente sobre basídios (KURTZMAN & FELL, 1998; GARCIA, 2007). As leveduras basidiomicéticas são habitantes comuns das superfícies de plantas, principalmente sobre as folhas, flores e frutos, como dito por Garcia (2007). Embora a fermentação seja uma característica comum a muitas leveduras, que por sua vez são aeróbias facultativas, existem muitas outras que não são fermentadoras. Por exemplo, na superfície de plantas saudáveis, nas folhas e nos frutos imaturos em geral, são prevalentes leveduras não fermentativas que são parcialmente disseminadas por correntes de ar. Essas comunidades são dominadas por basidiomicetos e seus anamorfs, especialmente espécies dos gêneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula* (GARCIA, 2007).

Diversos estudos têm mostrado que os ascomicetos de água doce podem desempenhar papéis importantes em *habitats* aquáticos como saprobiontes, endofitosibiontes, parasitos, decompositores de madeiras, além de servirem como recurso alimentar para invertebrados (SHEARER *et al*, 2004). Fora da água, encontramos os ascomicetos em substratos ricos em açúcares simples, como em frutos maduros (GARCIA, 2007). Em contraste com a aparente ubiquidade dos basidiomicetos, as leveduras ascomicéticas parecem ser mais responsivas à concentração de detritos orgânicos (PHAFF *et al*, 1996).

As leveduras são organismos eucariontes, aclorofilados, possuidores de parede celular rígida, e, quando pigmentadas, produzem estritamente carotenóides de cor amarela, laranja, rosa e vermelha como pigmentos, no caso dos basidiomicetos (KURTZMAN & FELL, 1998; PHAFF *et al*, 1996). São fungos verdadeiros que, em cultivo, crescem como formas unicelulares, vegetativas e sem motilidade. A célula leveduriforme pode ser entendida, em muitas espécies, como um tipo de esporo, chamado blastoconídeo (HAGLER, 2009). Ou seja, as leveduras distinguem-se dos outros fungos pela forma unicelular ser predominante em ao menos uma parte de seu ciclo vegetativo (PHAFF *et al*, 1996; RIBEIRO, 2009) e terem o brotamento e a fissão como principal forma de reprodução assexuada, não apresentando corpos de frutificação na reprodução sexuada (GARCIA, 2007; PHAFF *et al*, 1996). O termo levedura não indica uma classificação filogenética formal, mas constitui-se em um termo descritivo. Portanto, muitos fungos filamentosos apresentam fase leveduriforme, enquanto que, entre as leveduras, há também as que se apresentam, em algum momento, na forma filamentosa (HAGLER, 2009). As leveduras encontram-se amplamente distribuídas na natureza, no solo, sobre as plantas, nas águas continentais e marinhas e associadas a animais (HAGLER, 2006; KURTZMAN & FELL, 1998; GARCIA, 2007).

A quantificação das leveduras apresenta diversas dificuldades. As leveduras necessitam de substratos, temperatura e pH específicos e da adição de inibidores dos microrganismos que competem na placa de cultivo. As bactérias e os fungos filamentosos crescem mais rápido nos meios de isolamento tradicionais e causam sombreamento, o que limita o crescimento das leveduras. As leveduras são mais tolerantes a pHs baixos que as bactérias. Assim, através da acidificação limita-se o crescimento das bactérias. De forma a inibir o crescimento dos fungos filamentosos, podem ser utilizados antibióticos aos quais as leveduras apresentem elevada resistência. Entre estes, destaca-se o cloranfenicol pela sua resistência a autoclavação e a valores baixos de pH (CARVALHO, 2007; HAGLER & AHEARN, 1987).

Um dos objetivos deste trabalho foi isolar leveduras em quatro pontos do Lago Juturnaíba, dois de seus afluentes, em um ponto controle positivo e em um ponto controle negativo. Outro objetivo foi estudar as distribuições das leveduras isoladas com os quatro meios BIL, em águas eutróficas e águas poluídas por esgotos domésticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

CARACTERIZAÇÃO DO SÍTIO ESCOLHIDO PARA A PESQUISA

O Lago de Juturnaíba está situado entre os municípios de Silva Jardim e Araruama, pertence à Bacia de drenagem dos rios São João, Bacaxá e Capivari, e, portanto, possui afluentes com águas de diferentes qualidades e diversidade morfofisiológica. Na década de 70 foi construída, no Rio São João, a represa de Juturnaíba, visando acumular um volume de água adequado para o abastecimento, doméstico e industrial, da Região dos Lagos. Duas estações de tratamento de água, uma terceirizada e outra estadual, captam água do lago e abastecem a Região dos Lagos.

COLETA DE AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de 8 pontos em seis períodos diferentes. Estes pontos foram escolhidos tendo em conta as suas características ambientais: foz de rios que deságuam no lago (pontos 1, 2 e 3), proximidade a povoados (ponto 5), área de águas lênticas (ponto 4), o meio do lago (ponto 6), além do pontos-controle positivo de poluição (ponto 7) e negativo (ponto 8). Em busca de maior representatividade da coleta, em cada ponto foram coletadas quatro sub-amostras com aproximadamente 2L cada, distantes entre 5 e 10 metros. As amostras dos pontos 1, 7 e 8 foram coletadas a partir da margem e as dos pontos 2 a 6 foram coletadas em embarcação.

DESCRIÇÃO DOS PONTOS DE COLETA

O ponto 1 é situado no Rio Capivari, nas imediações da ponte da rodovia RJ 140, e junto ao entroncamento da estrada de Juturnaíba. Neste local as águas apresentam coloração escura e cheiro forte, provavelmente em função de esgotos e fezes de gado que pastam às margens, à exceção do momento das enxurradas, quando as águas se tornam barrentas.

O ponto 2 é situado na foz do Rio Bacaxá. Este rio percorre extensas áreas agropastoris. A foz é caracterizada pela densa vegetação de macrófitas. Estas chegam a formar ilhotas. A água tem odor objetável, embora não se apresente escura.

O ponto 3 é situado na foz do Rio São João, que deságua no lago junto à Reserva Ecológica de Poço das Antas. O rio percorre áreas agropastoris antes de entrar na reserva. A aparência é boa, com coloração amarela, mas sem cheiros.

O ponto 4 fica próximo à estrada da barragem que formou o lago, onde o represamento levou à inundação de áreas entre morros, formando um braço do lago, cujas águas têm menor mobilidade (lênticas).

O ponto 5 fica próximo à pousada “Peixe Vivo” e a antiga estação ferroviária de “Juturnaíba”. Este ponto é rodeado pela comunidade de Juturnaíba, e fica a 50 metros do “cais” dos barcos dos pescadores. De acordo com moradores, ali são despejados restos de peixes não comercializados. O aspecto local é de água poluída, escura, possivelmente pelo lançamento de resíduos do pescado, ou esverdeada, devido às florações de algas.

O ponto 6 fica próximo à estação de tratamento de água da “Águas de Juturnaíba” e a coleta é realizada muito próximo ao ponto de captação da estação de tratamento de água. Este ponto fica em uma região de hidrodinâmica intensa. Não se percebe cheiros ou poluição evidente.

O ponto 7 fica no Córrego “valão das caixas”, sob a ponte que leva à Secretaria Municipal de Agricultura. Este ponto é situado dentro do perímetro urbano da cidade. Neste ponto se observam inúmeras canalizações para lançamento de efluentes, principalmente domésticos. Percebem-se odores característicos de águas poluídas por esgotos. Este foi o ponto-controle positivo neste estudo.

O ponto 8 fica na saída da Mata do boqueirão, não tendo passado por nenhuma residência e apresentando água sem odores e de aparência cristalina. Este foi o ponto-controle negativo de poluição antrópica.

ANÁLISE DAS AMOSTRAS

No momento da coleta foram analisados diversos parâmetros: temperatura da água, pH, concentração de oxigênio dissolvido, saturação de oxigênio dissolvido, sólidos dissolvidos totais, condutividade, potencial de oxi-redução (pOx) e salinidade, através de uma sonda multiparamétrica imersa na água (Hanna Instruments modelo HI 9828).

As amostras foram analisadas, visando determinar as características físico-químicas e microbiológicas. Assim, foram realizadas análises de DBO₅, coliformes totais, *E.coli* e leveduras.

A DBO₅ foi analisada utilizando-se o método potenciométrico, com um eletrodo íon seletivo de oxigênio dissolvido.

Os coliformes totais e a *E. coli* foram analisados através do método do substrato cromogênico quantitativo (Kit de quantificação COLILLERT-18).

O isolamento das leveduras foi feito através do método da membrana filtrante, usando-se membranas com porosidade 0,8µm. No isolamento das leveduras foram empregadas duas variantes do meio BIL (Base de Isolamento de Leveduras) cuja composição foi apresentada por GARCIA (2007) e CARVALHO (2007). Estas variantes são apresentadas a seguir:

- BIL + glicose a 0,5% + extrato de leveduras a 0,5%

- BIL, sem a utilização de glicose, + extrato de leveduras a 0,1% + galactose a 0,5%

Estas variantes foram suplementadas com diferentes inibidores, apresentados a seguir. Esses meios foram empregados nas análises em membrana filtrante e em tubo (pH 5,5), à exceção do último, BILvbc, utilizado apenas em membrana filtrante:

- BILglici = BILglicose cicloexamina (BIL + 0,5% glicose + 1 ppm cicloexamina);

- BILgalci = BILgalactose cicloexamida (BIL + 0,5% galactose + 10 ppm cicloexamina);

- BILetanol = BILetanol 4% (BIL + 0,5% glicose + 4% etanol);
- BILvbc = BILvbc pH 4,0 (BIL + 0,5% glicose + 0,01% verde bromocresol

O meio BIL é constituído por: extrato de levedura (0,5%), (NH₄)SO₄ (0,1%), NaH₂PO₄ (0,2%), MgSO₄ (0,01%), KCl (0,04%), cloranfenicol (0,04%), amoxilina (0,05%) e o pH deve ser ajustado a 5,5.

No meio BIL + galactose reduz-se a concentração do extrato de levedura para 0,1%.

RESULTADOS OBTIDOS

Recuperamos leveduras desde 10¹ UFC/100ml em água com DBO₅ 4,63 mgO/L, até 10³ UFC/100 mL em água com DBO₅ 38,82 mgO/L. A Tabela 1, a seguir, apresenta o número de isolados obtidos nos diversos meios de cultura e os clados correspondentes. Das 236 colônias isoladas tivemos a distribuição: 52% foram do clado *Debaryomyces*, 6% do *Saccharomyces* e 19% do *Basidiomycetes*, sendo estes clados melhor isolados em BIL+galactose+cicloeximida. O meio BIL+etanol foi o mais adequado para o isolamento dos clados: *Pichia membranifaciens* (com 8% das culturas), *Wickerhamomyces* (com 5%) e outros clados (com 10%). Os resultados obtidos validam a pesquisa realizada por Hagler (2006), que preconiza o uso de leveduras como bioindicadores.

Os resultados das análises físico-químicas refletiram a qualidade da água de cada ponto. Deste modo, o ponto 7 (ponto-controle positivo) foi o que apresentou resultados fortemente associados à poluição por esgoto e, por outro lado, o ponto 8 (ponto-controle negativo) foi o que apresentou resultados associados a água de boa qualidade. As Tabelas 2, 3 e 4 a seguir, apresentam alguns dos resultados obtidos nos meses de fevereiro, abril e junho de 2010. Além do ponto 7, outros pontos apresentaram valores elevados de DBO₅, pontos 2,3, 4, 5 e 6. O ponto 6, que é localizado muito próximo do ponto de captação de água para a estação de tratamento de água, apresentou, matéria orgânica biodegradável inadequada para a finalidade de abastecimento.

Tabela 1 – Número de isolados obtidos com cada meio de cultivo e os clados correspondentes

Clados	Total	Meios de Cultivo			
		BIL Galactose	BILvbc	BIL Glicose	BIL Etanol
<i>Debaryomyces</i>	123	45	20	36	22
<i>Pichia membranifaciens</i>	19	1	5	4	9
<i>Saccharomyces</i>	14	7	3	4	0
<i>Basidiomycetes</i>	45	19	10	16	0
<i>Wickerhamomyces</i>	12	1	4	1	6
Outros	24	6	1	7	10

n = 237

Através da Tabela 2 observamos que o ponto 2, foz do rio Bacaxá, foi o que apresentou maior DBO₅. O ponto 4, região de águas lânticas, foi o que apresentou menor DBO₅ entre todos os pontos do lago. O controle negativo apresentou uma DBO₅ elevada para uma nascente. Este valor é explicado pelo fato da coleta se dar em um pequeno riacho, formado após a nascente de difícil acesso, onde habitam diversos animais silvestres, inclusive macacos cuja criação é incentivada pelo IBAMA. O ponto 6, próximo a captação da ETA, apresentou valor inadequado de DBO₅. Os valores de OD se apresentaram muito baixos na maior parte dos pontos, o que deve estar associado a poluição. Os valores de pH se apresentaram elevados para um lago, nos pontos 4, 5 e 6, o que pode estar associado a presença de algas ou a constituição do solo no fundo do lago. Os valores de pOx negativos obtidos nos pontos 2 e 7 devem estar associados a condição anóxica causada pela poluição.

Tabela 2 – Resultados de análises físico-químicas, das amostras coletadas, no mês de fevereiro, no lago e nos pontos-controle.

Ponto	OD (mgO/L)	Sat (%)	pH	pOx	Cond (μ S/cm)	DBO ₅ (mgO/L)
1	3,85	53,4	6,56	8,4	24	4
2	5,50	73,0	6,94	-14,0	57	49
3	7,80	104,1	6,29	101,7	0	17
4	4,69	61,1	7,08	94,4	32	4
5	5,50	74,4	7,40	62,9	33	24
6	5,20	68,2	7,32	48	30	14
7	1,74	24,1	6,65	-17,7	106	12
8	3,25	45,8	6,66	28,9	39	6

Em alguns períodos os resultados obtidos variaram sensivelmente em relação ao obtidos em fevereiro, ocorrendo alternância dos pontos do lago com águas de boa e má qualidade. Os períodos chuvosos diluíram a carga de poluentes e aumentaram a condutividade, os sólidos totais dissolvidos e a salinidade. O ponto-controle positivo, em períodos de intensa ocupação do município, apresentou valores de DBO₅ muito superiores ao do mês de fevereiro.

A coleta do mês de abril, cujos resultados das análises das amostras coletadas são apresentados na Tabela 3, ocorreu em um período chuvoso. Ocorreram inundações em diversas regiões do estado do Rio de Janeiro. Entretanto, no momento da coleta havia insolação intensa. A ocorrência de chuva causa alterações nos parâmetros físico-químicos; ocorre diluição da poluição pontual e aumento da poluição difusa, associada ao deflúvio superficial. Deste modo, os valores de OD, a exceção do ponto 3, aumentaram, provavelmente devido a aeração superficial pelas gotas de chuva. Os valores de pH nos pontos 4, 5 e 6 diminuíram devido a introdução da água de chuva cujo pH é, em geral, próximo de 6 devido ao gás carbônico dissolvido. Os valores de pOx aumentaram muito devido a chuva. Os valores de condutividade aumentaram em alguns pontos, devido ao deflúvio superficial, e diminuíram em outros, particularmente no ponto 7, devido a diluição. Os valores de DBO₅ aumentaram em alguns pontos e diminuíram em outros.

Na Tabela 4 observamos os resultados das análises das amostras coletadas em junho. Nesta tabela observamos valores elevados de OD, provavelmente associados à menor atividade turística nesta época do ano. Os valores de pH apresentaram valores elevados, o que deve estar associado a presença de algas e a redução da poluição, com exceção dos pontos 3 e 7. Nos pontos 4, 5 e 6 no momento da coleta foi possível observar uma intensa floração algal. Os valores de pOx apresentaram valores associados a uma condição aeróbia, com exceção do ponto 1 que apresentou condição anóxica. Os valores de condutividade aumentaram em alguns pontos e diminuíram em outros. Os valores de DBO₅, em geral, aumentaram.

Tabela 3 – Resultados de análises físico-químicas, das amostras coletadas, no mês de abril, no lago e nos pontos-controle.

Ponto	OD (mgO/L)	Sat (%)	pH	pOx	Cond (µS/cm)	DBO ₅ (mgO/L)
1	7,33	86,3	6,45	145,3	30	8
2	6,72	77,5	6,53	156,6	57	16
3	2,96	34,2	6,05	215,2	16	49
4	6,34	75,4	6,78	222,3	43	34
5	6,65	79,7	6,61	151,3	36	43
6	6,16	72,4	6,62	269,8	27	na
7	4,57	55,1	6,58	75,3	59	29
8	7,74	94,6	7,51	180,3	39	5

na = não avaliado

Tabela 4 – Resultados de análises físico-químicas, das amostras coletadas, no mês de junho, no lago e nos pontos-controle.

Ponto	OD (mgO/L)	Sat. (%)	pH	pOx	Cond. (µS/cm)	DBO ₅ (mgO/L)
1	8,67	91,7	6,74	24,7	37	10
2	8,29	89,3	6,63	61,4	89	48
3	7,44	81,3	6,12	88,8	21	18
4	8,01	89,0	6,83	88,1	40	35
5	9,57	111,3	7,61	91,9	50	55
6	8,68	96,9	6,98	90,2	48	34
7	5,32	56,8	6,45	65,2	44	44
8	9,03	100,7	7,04	104,0	51	3

Tendo em conta os resultados das análises de leveduras, coliformes totais, *E. coli* e dos parâmetros físico-químicos, foi avaliada a existência de uma relação funcional entre os valores de contagem de leveduras e os outros parâmetros. Devido, provavelmente, a grande complexidade dos fenômenos associados aos vários resultados não foi encontrada uma relação funcional. Entretanto, as médias geométricas das contagens de leveduras, obtidas em cada ponto de coleta, apresentam correlação com as médias geométricas dos resultados de *E. coli*, em cada ponto de coleta, e com a média aritmética do pH e da DBO₅, em cada ponto de coleta. A Tabela 5 apresenta as médias geométricas dos resultados de leveduras, de coliformes totais e *E. coli*. Esta tabela apresenta também as médias aritméticas dos resultados de pH e DBO₅. É interessante observar que as médias dos resultados das análises de coliformes totais e *E. coli* foram muito menores nos pontos 4, 5 e 6, que

nos outros pontos. Este fato deve estar associado à intensa floração de algas que ocorre no lago. Por outro lado, houve uma redução das contagens de leveduras nos mesmos pontos, proporcionalmente menor do que a redução nas contagens de coliformes totais e *E. coli*. De acordo com algumas pesquisas as leveduras são mais resistentes às toxinas das algas que as bactérias (HAGLER, 2006).

Tabela 5 – Média geométrica dos resultados das análises de leveduras, cultivadas em BILglici e BILgalci, de coliformes totais e *E. coli*, em cada ponto de coleta. Média aritmética dos resultados de pH e DBO₅, em cada ponto de coleta.

Ponto	BILglici UFC/100mL	BILgalci UFC/100mL	Colif. Totais(*)	<i>E. coli</i> (*)	pH	DBO ₅ (mgO/L)
1	1324	764	3868	199	6,80	15
2	1031	1224	281	12	6,75	34
3	666	3708	135	19	6,33	21
4	419	505	15	5	6,93	20
5	283	468	48	8	7,25	29
6	336	332	9	6	7,03	17
7	4017	5523	8898	270	6,55	28
8	202	16	203	11	7,07	5

(*) – NMP/100 mL

Os resultados das contagens de leveduras, cultivadas em meio BILglici, e os resultados de DBO₅, apresentados na Tabela 5, foram utilizados para obtenção de uma função exponencial relacionando estes dois parâmetros, que pode ser observada na figura 1. A função exponencial obtida não levou em consideração os pontos 2 e 5, que foram omitidos por serem considerados *outliers*. Embora o coeficiente de determinação seja elevado ($R^2 = 0,772$) é preciso observar que este resultado é fortemente dependente do resultado do ponto 7. Deste modo, seria necessário realizar muitas outras análises relacionando os dois parâmetros para aumentar a confiabilidade da correlação obtida.

Na figura 2 é apresentada a correlação obtida entre os resultados de leveduras, cultivadas em BILgalci, e o pH. Foi obtida uma correlação fraca entre os dois parâmetros ($R^2=0,522$), que está associada à sensibilidade, de algumas leveduras, a valores elevados de pH.

Na figura 3 é apresentada a correlação obtida entre os resultados de leveduras, cultivadas em BILglici, e os resultados de *E. coli*. Embora tenha sido obtida uma correlação elevada ($R^2=0,7906$), para uma relação entre parâmetros microbiológicos, é preciso observar que esta relação é muito dependente dos resultados das amostras 1 e 7. Deste modo, é necessário realizar muitas outras análises para aumentar a confiabilidade da relação obtida, entre os dois parâmetros.

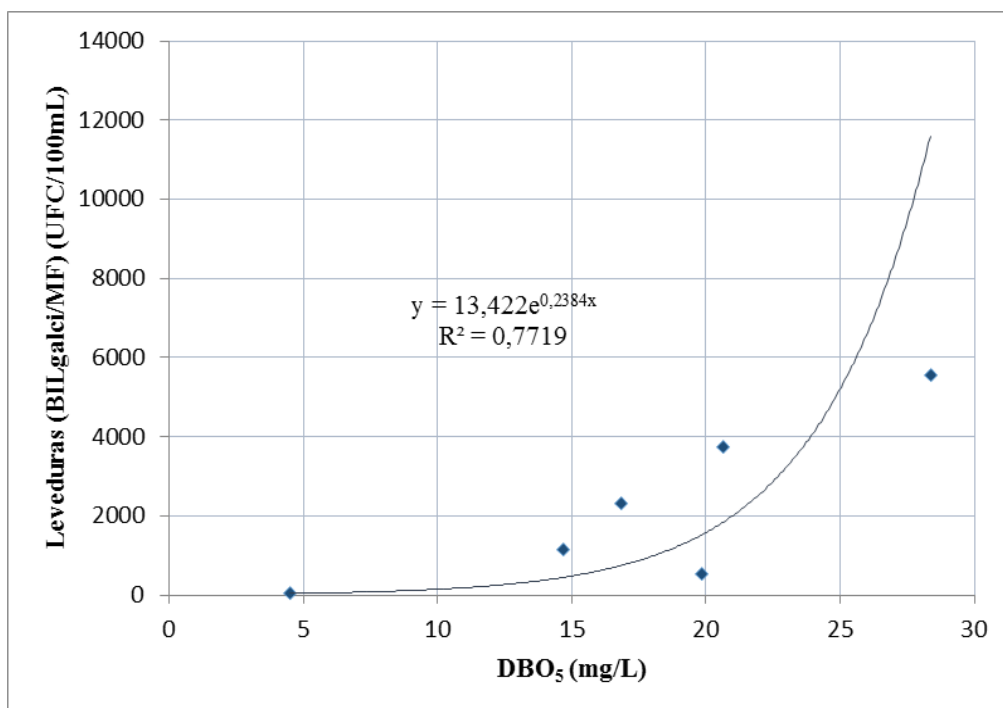


Figura 1 – Correlação exponencial entre as médias, por ponto de coleta, de DBO5 e leveduras (em meio BILgalci/MF), excluídos os pontos 2 e 5.

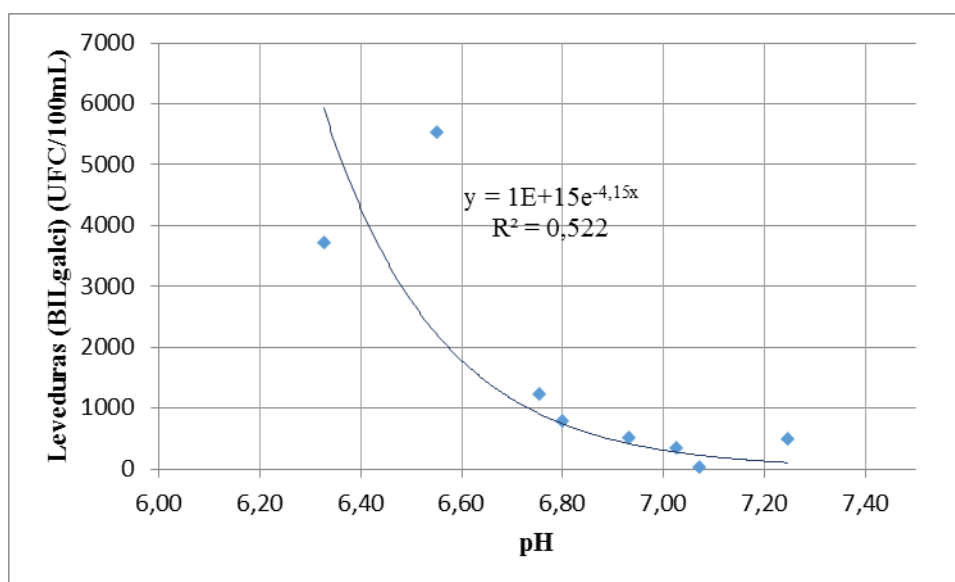


Figura 2 – Correlação entre as médias, por ponto de coleta, de leveduras (em meio BILgalci/MF) e o pH.

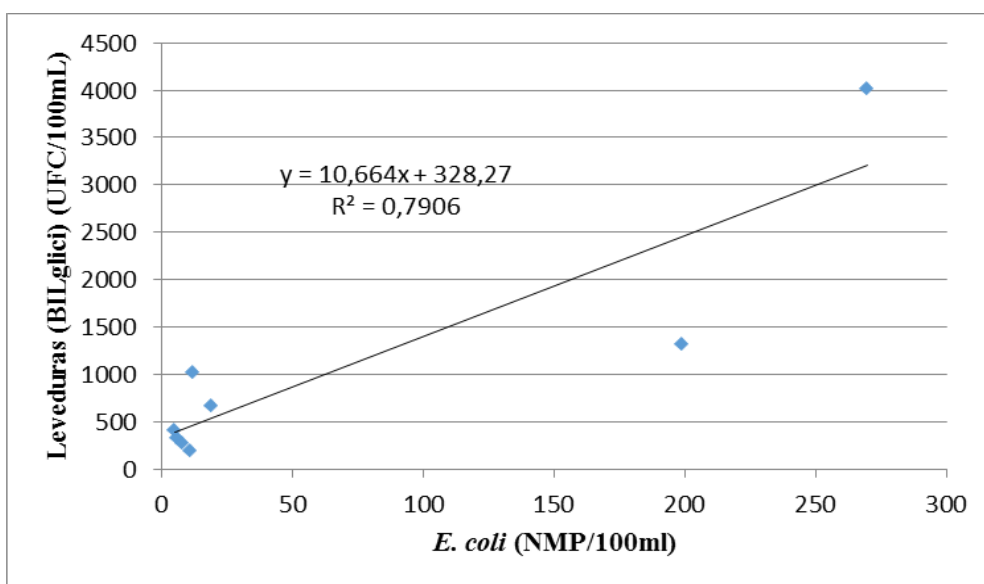


Figura 3 – Correlação entre as médias, por ponto de coleta, de leveduras (em meio BILglici/MF) e *E. coli* (NMP/100 mL).

CONCLUSÕES

Os meios seletivos BIL suplementados, ao restringirem grupos não-alvos, permitiram contagens maiores das espécies-alvo, que, provavelmente, respondem a eutrofização. Assim, esses meios poderiam ser usados em pesquisas e monitoramentos da água.

Foram encontrados clados representativos de ambientes poluídos e de ambientes eutróficos, que poderiam ser usados como bioindicadores.

As correlações obtidas entre as contagens de leveduras e a DBO₅, o pH e as contagens de foram baseadas em poucos resultados, o que reduz a confiabilidade das correlações. Deste modo, seria fundamental realizar novas análises de forma aumentar o banco de dados ambientais.

A sensibilidade das bactérias, em geral, às toxinas das algas é maior do que a sensibilidade das leveduras. Entretanto, existem poucos estudos que comparam a sensibilidade de bactérias e leveduras às toxinas das algas. Durante, as florações de algas o indicador leveduras torna-se melhor do que o indicador *E. coli*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARIAS, A.R.L. et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência & Saúde Coletiva*, v.12, n.1, p.61-72, 2007.
2. BARCELLOSA, C., QUITÉRIO, L.A.D. Vigilância ambiental em saúde e sua implantação no Sistema Único de Saúde. *Revista de Saúde Pública*, v.49, n.1, p.170-177, 2006.
3. BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente-Conama. Resolução Nº 357, de 17 de Março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências, MMA, 2005.
4. BRASIL. Portaria nº 2914 de 12 de dezembro de 2011 do Ministério da saúde. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. MS, Brasília, 2011.
5. BUSS, D.F., OLIVEIRA, R.B., BAPTISTA, D.F.. Monitoramento biológico de ecossistemas aquáticos continentais. *Oecol. Bras.*, v.12, n.3, p.339-345, 2008.

6. CALLISTO, M.; GOULART, M.; MEDEIROS, A. O.; MORENO, P.; E ROSA, C. A. A Diversity assessment of benthic macroinvertebrates, yeasts, and microbiological indicators along a longitudinal gradient in Serra do Cipó, Brazil. *Brazilian Journal of . Biology*, v.64, n.4, p.734-755, Nov.2004.
7. CARVALHO, P.M.B. Utilização de meios de enriquecimento para a bioprospecção de leveduras/Patrícia Maria Barroso de Carvalho, - Rio de Janeiro, 2007. 133 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal)– Universidade Federal do Rio de Janeiro, Biotecnologia Vegetal, Rio de Janeiro. 2007.
8. DE ALMEIDA, R.M.A., HUSSAR, G.J., PERES, M.R., FERRIANI JUNIOR, A.L. Qualidade microbiológica do córrego “ribeirão dos porcos” no município de Espírito Santo do Pinhal –SP. *Engenharia ambiental (UNIPINHAL)*, Espírito Santo do Pinhal, v.1, n.1, p.51-56, 2004.
9. GARCIA, K.M. Meios diferenciais para bioprospecção de leveduras endofíticas da bromélia *Neoregelia cruenta*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal): Universidade Federal do Rio de Janeiro, Biotecnologia Vegetal, Rio de Janeiro, 2007.
10. HAGLER, A.N., MENDONÇA-HAGLER, L.C., SANTOS, E.A., FARAGE, S., SIVA FILHO, J.B., SCHRANK, A. Microbial pollution indicators in Brazilian tropical and subtropical marine surface waters. *The science of the total environmental*, v.58, p.151-160, 1986.
11. HAGLER, A.N., AHEARN, D.G. Ecology of Aquatic Yeasts. In : ROSE, A.H., HARRISON, J.S. (Eds). *The Yeasts*. 2^{ed.}, Academic press, v.1, p.181-206, London, 1987.
12. HAGLER, A.N., Yeasts as Indicators of Environmental Quality. In: GÁBOR, P.(Ed) & ROSA C. Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Springer Berlin Heidelberg; p.515-532, 2006.
13. HAGLER, A.N. Application of old isolation methods to compliment modern methods in studies of yeast diversity. Rio de Janeiro: Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, C.C.S. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009. (Notas de aula).
14. KAY, D., DUFOUR, A. Epidemiology. In: WHO. *Monitoring Bathing Waters: A Practical Guide to the Design and Implementation of Assessments and Monitoring Programmes*. Ed. Jamie Bartram and Gareth Rees, Chapter 13, 2000.
15. KURTZMAN C., FELL J. (Ed.). **The Yeast, a Taxonomic Study**. 4th ed. Amsterdam: Elsevier; 1998.
16. MEDEIROS, A.O., KOHLER, L.M., HAMDAN, J.S., MISSAGIA, B.S., BARBOSA, F.A.R., ROSA, C.A. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. *Water research*. 2008;v.42, p.3921 –3929.
17. MENDONÇA-HAGLER, L.C., VIEIRA, R.H.S.F., HAGLER, A.N. Microbial quality of water, sediment, fish and shellfish in some Brazilian Coastal regions. *Apud FARIA, B.M., FARJALLA, V.F., ESTEVES, F.A. (Eds). Aquatic Microbial Ecology in Brazil. Series Oecologia Brasiliensis*, v.IX, p.197-216, 2001.
18. MORAIS, P.B., RESENDE, M.A., ROSA, C.A., BARBOSA, F.A.R. Occurrence and diel distribution of yeast in paleo-karstic lake of southeastern Brazil. *Revista de biologia*. v.27, n.A', p.183-188, 1996.
19. PEÇANHA, M. Yeasts and others parameters of pollution of the Ribeirão Claro stream in Rio Claro, São Paulo. *Revista de Microbiologia*, v.27, n.3, p.177-181, São Paulo, Set.1996.
20. PHAFF, H.J., MILLER, M.W., MRAK, E.M. The life of yeasts: Their nature, activity, ecology and relation to mankind. Cambridge: Harvard University; 1966.
21. RIBEIRO, J.R. de A. Diversidade e ecofisiologia de leveduras em plantio orgânico de cana-de-açúcar. Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. 2009. 167 f.
22. ROSA, C.A., DE RESENDE, M.A., FRANZOT, S.P., DE MORAIS, P.B., BARBOSA, F.A.R. Distribuição de leveduras e coliformes em um lago do karst do planalto de Lagoa Santa – MG, Brasil. *Revista de Microbiologia*, v.21, n.1, p.19-24, Brasil, 1990.
23. SHEARER, C.A., LANGSAM, D.M., LONGCORE, J.E. Fungi in freshwater habitats. In: MUELLER, G.M., BILLS, G.F., FOSTER, M.S.(Ed.). *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press, p.513-531, 2004.
24. SILVA FILHO, G.N., DE OLIVEIRA, V.L. *Microbiologia: manual de aulas práticas*. 2ª ed. rev. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.