



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA SÉRGIO AROUCA
MESTRADO EM SAÚDE PÚBLICA

MARCOS TAVARES CARNEIRO

Desenvolvimento de meios seletivos para contagem de
leveduras em membrana filtrante para monitorar a poluição no
lago Juturnaíba, Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
2011

Desenvolvimento de meios seletivos para contagem de
leveduras em membrana filtrante para monitorar a poluição no
lago Juturnaíba, Rio de Janeiro

MARCOS TAVARES CARNEIRO

Dissertação apresentada à Pós-
Graduação em Saúde Pública da
Escola Nacional de Saúde
Pública Sérgio Arouca/FioCruz,
como requisito parcial para
obtenção do grau de Mestre em
Ciências.

Orientadores:

Dr. Dalton Marcondes Silva

Dr. Allen Norton Hagler

Rio de Janeiro
2011

MARCOS TAVARES CARNEIRO

Desenvolvimento de meios seletivos para contagem de
leveduras em membrana filtrante para monitorar a poluição no
lago Juturnaíba, Rio de Janeiro

Dissertação apresentada à Pós-Graduação
em Saúde Pública da Escola Nacional de
Saúde Pública Sérgio Arouca/FioCruz,
como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Ciências.

Orientadores:

Dr. Dalton Marcondes Silva

Dr. Allen Norton Hagler

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Dr. Dalton Marcondes Silva

Dr. Allen Norton Hagler

Dr. Marcelo Motta Veiga

Dr. Fábio Vieira de Araujo

Dra. Adriana Sotero Martins

C289 Carneiro, Marcos Tavares

Desenvolvimento de meios seletivos para contagem de leveduras em membrana filtrante para monitorar a poluição no Lago Juturnaíba, Rio de Janeiro. / Marcos Tavares Carneiro. -- 2011.

109 f. : tab. ; graf. ; mapas

Orientador: Silva, Dalton Marcondes

Hagler, Allen Norton

Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2011

1. Qualidade da Água. 2. Leveduras. 3. Indicadores Biológicos. 4. Poluição de Lagos e Barragens - análise. 5. Meios Seletivos. I. Título.

CDD - 22.ed. – 363.7098153

Aos meus pais, esposa e filhos,
por todo apoio,
amor e
compreensão.

Agradecimentos

A Deus por tantas bênçãos, sobretudo, por aqueles que pôs em meu caminho para me ajudar, por mais uma vitória;

A minha mãe e minha esposa, alicerces de cada passo que firmo.

Aos meus filhos que doam para eu estudar, horas de atenção que eram suas, por direito.

Ao meu Orientador Allen Norton Hagler, por tanta atenção e dedicação quando já fizera jus ao descanso profissional, e doação de conhecimentos tão específicos;

Ao meu Orientador Dalton Marcondes Silva, por tanta atenção e dedicação, principalmente nos cansativos trabalhos de campo;

À Dra Leda Cristina Mendonça-Hagler, pelo acesso ao laboratório de biologia molecular;

À Dra. Joseli, pelas prestativas contribuições;

À Dra. Débora Cynamon Kligerman por ceder equipamentos indispensáveis;

Ao amigo Jorge Teixeira pela grande contribuição nos trabalhos de campo;

Aos amigos Olavo e Renato, Patrícia Carvalho, José Roberto, pelos contribuições e ensinamentos fundamentais, sem os quais eu não conseguiria concluir a parte laboratorial da pesquisa, e para cujas contribuições me faltam adjetivos para fazer justiça;

Aos amigos Adriana Fróes, Ângela, Marcela, Anderson, Pedro e Ingrid, pela contribuição tão valiosa, pelos socorros, tantas vezes;

Aos pesquisadores e equipes dos laboratórios do IOC, participantes da pesquisa, pelas análises de parâmetros complementares;

À técnica Sandra pelas análises físico-químicas;

Ao Departamento de Saneamento e Saúde ambiental pela viabilização deste Mestrado;

À CAPES/PPGSP/ENSP, IOC/Fiocruz e IMPPGUFRRJ/ FAPERJ/CNPQ-Pronex pelo financiamento da pesquisa;

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste mestrado acadêmico.

O temor ao Senhor é o princípio de toda sabedoria (provérbios 1:07).

Carneiro, M.T. Desenvolvimento de meios seletivos para contagem de leveduras em membrana filtrante para monitorar a poluição no lago Juturnaíba, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) ENSPSA/FioCruz.

RESUMO

Os múltiplos e intensos usos da água têm causado crescente poluição e impactos nos ecossistemas aquáticos. Considerando que os coliformes termotolerantes refletem a poluição fecal, e os parâmetros químicos a qualidade imediata da água, seria desejável usá-los juntamente a indicadores complementares. O uso da contagem de leveduras como bioindicador da qualidade da água tem sido proposto. A estrutura de suas comunidades muda de acordo com os fatores ambientais, incluindo os impactos antrópicos oriundos dos efluentes domésticos e das atividades agrícolas. No entanto, as contagens de leveduras pelos métodos de cultivo são dificultadas pela competição com os bolores, além do que, as técnicas que reduzem os bolores, também afetam as leveduras. Buscamos desenvolver um método para contagem de leveduras em amostras de água, através dos meios BIL (Base de isolamento de leveduras) seletivos, e avaliar preliminarmente o potencial das leveduras isoladas como bioindicadoras da qualidade da água. Coletamos 46 amostras de 08 pontos no Lago de Juturnaíba/RJ. Foram aferidos os parâmetros temperatura, pH, OD, Saturação de OD, SDT, condutividade e DBO₅. Analisamos leveduras utilizando o método de membrana filtrante, incubada sobre suporte, com novas variações seletivas da Base de Isolamento de Leveduras (BIL) em caldo, suplementada com diferentes fontes de Carbono e inibidores. Procedemos as contagens de UFC/100mL e isolamos os diferentes morfotipos observados. Procedemos a identificação polifásica das culturas. Foram feitas as análises do NMP de *Escherichia coli*, Coliformes Totais e *Enterococcus* sp. e foram realizadas análises qualitativas das bactérias potencialmente patogênicas. Buscamos relacionar as médias geométricas dos resultados microbiológicos e as médias aritméticas dos dados físico-químicos através da correlação linear de Pearson e de Regressão Múltipla. Obtivemos contagens significativas de leveduras de até mais que 10.000/100mL nos pontos-controle de águas limpas e águas poluídas na região. Foram usados como inibidores Cicloeximida, etanol ou corante verde-bromo-cresol e como fonte de carbono glicose ou galactose. Não houve interferências significativas de bolores quando usamos esses meios seletivos. Duzentos e trinta e cinco culturas de leveduras foram isoladas e identificadas por taxonomia convencional e vinte e cinco culturas representativas tiveram suas identificações confirmadas pelo seqüenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do rDNA. Muitas leveduras encontradas são de prováveis novas espécies ou novos biotipos de espécies conhecidas. As leveduras prevalentes no lago foram *Candida guilliermondii* ou linhagem similar de *Candida famata* que foram seletivamente favorecidas pelo meio BIL-galactose cicloeximida. O meio BIL-etanol favoreceu *Candida krusei* e outras espécies anamorfias de *Pichia*, que foram mais frequentes nos pontos de maior poluição doméstica. Os meios BIL glicose-cicloeximida e BIL verde-bromocresol favoreceram o isolamento de maior diversidade de espécies. A alta frequência de ascomycetes isolados neste estudo foi consistente com sua associação a águas de ambientes poluídos por matéria orgânica. Um aumento na frequência de basidiomycetes observado depois das chuvas, pode ter sido relacionado à influência do *run-off*. O isolamento das espécies relacionadas a diferentes tipos de poluição sugere o uso destes meios no estudo de leveduras como indicador de eutroficação por fontes diversas, tais como as atividades agrícolas e o lançamento de efluentes domésticos.

Palavras-chave: 1. qualidade da água 2. meios seletivos 3. leveduras 4. bioindicadores 5. poluição.

Carneiro, M.T. Selective culture media for MF yeast counts to monitor pollution in Lake Juturnaiba, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2011. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) ENSPSA/FioCruz.

Abstract

Multiple and intensive use of water supplies cause increased impact of pollution on aquatic ecosystems. Since the fecal coliform reflect fecal pollution, and chemical parameters of immediate water quality, it would be desirable use these with complimentary indicators. The use of yeast counts as bioindicators of water quality has been proposed. Their community structures change in accord with environmental factors including human impact from agricultural and domestic wastes. Unfortunately yeast counts by cultivation methods are complicated by competition with mold growth and factors that reduce mold growth also have impact on yeasts. We intended developed a count yeast method in water samples through select yeast isolation basal medium (BIL), and to undergo a preliminary evaluation the isolated yeast potential as bioindicator. 46 water samples were collected from from 8 sites with in and near Lake Juturnaíba/RJ and pH, DO, DO saturation, Dissolved solids, conductivity, and BOD5 were determined. The membrane filter method used with selective variations of a yeast isolation basal medium (BIL) on cellulose pads, did allow significant yeast counts of up to over 10,000 / 100ml to be made from water of Lake Juturnaíba / RJ and clean and polluted control waters from the same region. Cyclohehimide, ethanol or the dye brom-cresol-green were used as inhibitors and galactose as a selective carbon source. There was no significant interference from molds when using these selective media. Two hundred and thirty five yeast cultures were isolated and identified by conventional taxonomy and 25 representative cultures had identity confirmed by sequencing the D1/D2 region of the large subunit rDNA. MPN of *Escherichia coli*, total coliforms and enterococfcus were determined and P/A of some potentially pathogenic bacteria. Correlations were determined between geometric means of microbial counts and arithmetic means of other parameters by Pearson's and multi step regression analysis. Statistically significant yeast counts of up to 10,000/ 100mL were obtained from sites with various levels of eutrophication from agricultural runoff and domestic sewage contamination. Many of the yeasts were found to be probable new species or new biotypes of known species. The prevalent yeasts from the lake sites were *Candida guilliermondii* or similar *Candida famata* strains that were selectively favored by the BIL-galactose cyclohehimide medium. The BIL-ethanol medium favored *Candida krusei* and other anamorphs of *Pichia* species that were more frequent in sites with more domestic pollution. The BIL glucose-cyclohehimide and BIL brom-cresol-green media favored isolation of more species diversity. The high frequency of ascomycetous yeasts isolated in this study was consistent with their association with aquatic environments polluted by organic matter. An increased frequency of basidiomycetes observed after rains may have been related influence from run-off. The isolation of species related to different types of pollution suggests the use of these media in the study of yeasts as indicators of eutrophication from different sources such as agricultural and domestic wastes

Keywords: Water quality, selective media, yeast, bioindicators, pollution.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O ESCARCEAMENTO DA ÁGUA PARA DIVERSOS FINS	1
1.2 A LEGISLAÇÃO BRASILEIRA E OS PARÂMETROS DE QUALIDADE DA ÁGUA	3
1.3 RELEVÂNCIA DOS INDICADORES DE QUALIDADE DA ÁGUA	5
1.3.1 Relevância científica	5
1.3.2 Relevância para a saúde pública	7
1.3.3 Relevância para o meio ambiente	8
1.4 ASPECTOS BIOLÓGICOS DAS LEVEDURAS AQUÁTICAS	9
1.5 LEVEDURAS COMO INDICADORES DE QUALIDADE DA ÁGUA	13
1.6 MÉTODOS DE PESQUISA COM LEVEDURAS EM AMBIENTES AQUÁTICOS	15
1.7 PROPOSTA DE ESTUDO	18
1.8 ÁREA MODELO PARA O ESTUDO	19
2 OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAIS	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 COLETA DE AMOSTRAS	24
3.2.1 Descrição dos pontos de coleta	25
3.2.2 Procedimentos de coleta	27
3.3 ANÁLISE LABORATORIAL	28
3.3.1 Análise das amostras	28
3.3.1.1 Análise de coliformes totais e <i>E.coli</i> .	28
3.3.1.2 Análise de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> :	28
3.3.1.3 Análise de Bactérias heterotróficas e Enterobactérias	29
3.3.1.4 Análise de leveduras	29
3.3.1.4.1 Meios de cultura	29
3.3.1.4.2 Processamento das amostras em membrana Filtrante	30

3.3.1.4.3	Processamento das amostras em culturas de enriquecimento	30
3.4	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA	31
3.4.1	Análise da morfologia da colônia	32
3.4.2	Análise da micromorfologia da célula	32
3.4.3	Análise de assimilação de fontes de carbono	33
3.4.4	Análise de assimilação de fontes de Nitrogênio	33
3.4.5	Análise de tolerância a inibidores	34
3.4.6	Análise de crescimento em diferentes temperaturas	34
3.5	AGRUPAMENTO FENOTÍPICO E IDENTIFICAÇÃO DAS CULTURAS	34
3.6	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CULTURAS	35
3.6.1	Extração de DNA	35
3.6.2	Amplificação das regiões gênicas estudadas	35
3.6.3	Sequenciamento das regiões gênicas estudadas	36
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
3.7.1	Tabela de médias paramétricas	36
3.7.2	Tabela de frequência dos isolamentos das leveduras	37
4	RESULTADOS	38
4.1	CONTAGENS DE LEVEDURAS EM MEIOS BIL, E OUTRAS VARIÁVEIS DE QUALIDADE DA ÁGUA	38
4.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS E QUÍMICOS	41
4.3	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS	42
4.4	FREQUÊNCIA DOS ISOLAMENTOS DAS LEVEDURAS	43
5	DISCUSSÃO	45
6	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
	Anexo	59
	Anexo 1. Tabela 05: condições locais no dia da coleta e parâmetros microbiológicos	66
	Anexo 2. Tabela 06: condições locais no dia da coleta e parâmetros físico-químicos	68
	Anexo 3. Tabela 07: Relação qualitativa das bactérias isoladas por amostra	69
	Anexo 4. Tabela 08: Resultados das análises de Regressão Múltipla	71
	Anexo 5. Tabela 09: Resultados das análises Correlação linear de Pearson	73
	Anexo 6. Tabela 10: Morfologia da colônia dos isolados de Juturnaíba	74
	Anexo 7. Tabela 11: Resultados dos testes de assimilação, tolerância e crescimento	87

Anexo 08: Figura 03: Eletroforese em gel agarose 1,75%, da região D1/D2 e ITS do rDNA	102
Anexo 9: Tabela 12: identificação polifásica dos isolados.	105
Anexo 10: Base para isolamento de leveduras – BIL	106
Anexo 11: Protocolo para extração de ácidos nucléicos	108
Anexo 12: Amplificação dos fragmentos da região estudada	109

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Desenho esquemático do lago de Juturnaíba e adjacências	24
Figura 02: Gráfico de Dispersão <i>quantile-quantile</i> leveduras em BILgalci/MF/ DBO ₅	41
Figura 03: Fotografia da Eletroforese de DNAs, em gel de agarose 1,75%, da região D1/D2 e ITS do DNA ribossomal.	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: contagens de leveduras e outros parâmetros	39
Tabela 02: médias geométricas das contagens microbiológicas e médias aritméticas das variáveis físico-químicas	41
Tabela 03: Resumo dos resultados das análises estatísticas, realizadas com as médias geométricas dos dados microbiológicos e as médias aritméticas dos dados físico-químicos	42
Tabela 04: Frequência das leveduras de maiores ocorrências no estudo e no ponto 08	43
Tabela 05: Condições locais no dia da coleta e parâmetros microbiológicos	66
Tabela 06: Condições locais no dia da coleta e parâmetros físico-químicos	68
Tabela 07: Relação qualitativa das bactérias isoladas por amostra	69
Tabela 08: Resultados das análises de Regressão Múltipla	71
Tabela 09: Resultados das análises de correlação linear de <i>Pearson</i>	73
Tabela 10: Morfologia da colônia dos isolados de Juturnaíba	74
Tabela 11: Resultados dos testes de assimilação, tolerância e crescimento	87
Tabela 12: Identificação polifásica dos isolados.	105

LISTA DE ABREVIACOES

ASM : American Society for Microbiology

BIL: Base de isolamento de leveduras

BILglici: BIL+glicose 0,5% + Cicloeximida 1ppm (parte por milhão)

BILgalci: BIL + galactose 0,5% + Cicloeximida 10 ppm

BILvbc: BIL + glicose 0,5% + Verde Bromocresol 0,01%

BILetanol : BIL + glicose 0,5% + etanol 4%

Cfg : *Candida famata*/ *C. guilliermondii*

CONAMA : Conselho Nacional do Meio Ambiente

DBO₅: Demanda Bioquímica de Oxigênio em um período de cinco dias

DNA: cido desoxirribonucleico

DNOS: Departamento Nacional de Obras e Saneamento

Enr: Cultivo em enriquecimento

FEEMA: Fundao Estadual de Engenharia do Meio Ambiente

GYP: Meio de cultura composto de glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, peptona 1% e agar.

Ibid: na mesma obra, idem  citao anterior.

LSU: sub-unidade maior do ribossoma

MF: Membrana filtrante

N.I.: Número Indicado

Na: Não analisado

NMP: Número Mais Provável

OD: Oxigênio Dissolvido

rDNA : cido desoxirribonucleico ribossomal

RM: Regressão Múltipla

SDT: Sólidos Dissolvidos Totais

UFC: Unidade Formadora de Colônia

YCB: base para cultivo de leveduras que contm Carbono, mas nenhuma de Nitrogênio

YM: Meio de cultura composto de 1% glicose, 0,5% peptone, 0,3% extrato de malte, 0,3% extrato de leveduras, 2,0% gar.

YNB: base para cultivo de leveduras que contm Nitrogênio, mas nenhuma fonte de Carbono

1 INTRODUÇÃO

1.1 O ESCARCEAMENTO DA ÁGUA, PARA DIVERSOS FINS

A atual crise ambiental global pode ser destrinchada em “crises”. São crises de diversas naturezas que se interconectam e se somam para gerar um quadro preocupante, que muitas vezes é denominado de “A questão ambiental” (1). Entre essas, há a crise do aquecimento global, a crise da camada de ozônio, a crise dos resíduos, dos desmatamentos, dos recursos naturais, e dentre estes, sobretudo, a água. Para alguns, a crise ambiental é, ainda, uma crise de consumo, pois o modelo capitalista eleva o consumo a níveis cada vez maiores (2). Proporcional é, portanto, a demanda pelos recursos naturais (2-4). Recursos naturais como o ar, os solos, as florestas e a água são classificados como renováveis, pois seu tempo de geração pode ser compreendido dentro do ciclo de vida do homem. Outra forma de entender esta classificação é que, se um recurso pode ser repostado tão rápido quanto é utilizado, então este é renovável. É curioso que, enquanto recursos exauríveis como o petróleo tem as reservas exploráveis ampliadas pelo avanço tecnológico, o recurso água, renovável, torna-se crítico pelo aumento da demanda e poluição (3). A água é, seguramente, um dos recursos naturais mais necessários à sociedade (4,5). No entanto, ela tem uma distribuição desigual pelo planeta, e só 2,5% do total existente é de água doce. Mesmo assim, graças a estes 35,5 milhões de km³ de água doce, dificilmente faltaria água no planeta; a questão complexa é a gestão e o acesso à água com qualidade e quantidade suficientes (6). Assim, até 2002, em torno de 1,7 milhões de crianças morriam anualmente em função de doenças veiculadas pela água e falta de saneamento adequado (7, 8).

Segundo Tosetto (9), pelo menos 8% da reserva mundial de água doce estão no Brasil ou 12% segundo Conejo (10). Em torno de 80% deste volume concentra-se na Região Amazônica e somente 20% encontra-se distribuído nas regiões onde vivem 95 % da população brasileira. Na verdade, estima-se que somando a água necessária para consumo humano, animal, para irrigação e industrial, a demanda média total nacional estaria entre 2.044 a 2.141 m³/s contra uma vazão total média de longo período de seus rios de 179.000

m³/s a 182.633 m³/s, além de 89.000 m³ que fluem em nossos rios oriundas de territórios estrangeiros (6, 10). Situações críticas são encontradas apenas na região do Rio Tietê e nas bacias hidrográficas no entorno da Baía da Guanabara, em função da associação de baixa disponibilidade e qualidade, e alta demanda. Além destes, inclui-se ainda a Região Atlântico Nordeste Oriental e Atlântico Leste (Nordeste geográfico), por baixa disponibilidade (10). No mais, há problemas de crescente poluição dos recursos hídricos, com encarecimento do tratamento.

Nas últimas décadas, os ecossistemas aquáticos têm sido alterados em função de diversos impactos ambientais decorrentes das atividades antrópicas. Muitos rios, córregos, lagos e até mesmo reservatórios têm sido impactados devido ao aumento desordenado dessas atividades (3, 4, 11, 12, 13, 14). Os impactos causados sobre os sistemas hídricos assumem especial magnitude, em função da dependência que a sociedade tem pelo abastecimento da água para consumo direto e indireto, na produção agrícola, na higiene, para o lazer e o afastamento dos próprios efluentes (4,5,15), atendendo, assim, aos seus múltiplos usos. Atender aos múltiplos usos não significa apenas que haja água em quantidade, mas também na qualidade adequada à dada finalidade (5). As múltiplas atividades que demandam água, muitas vezes são exercidas sem levar em contas os demais usos, por isto, o mesmo rio ou lago chamado de manancial quando da captação para o abastecimento pode vir a ser chamado apenas como corpo receptor ou hídrico, no momento do lançamento dos efluentes domésticos e industriais (4). Outra autora que denuncia esta incoerência é Arias (16):

A descarga de lixos tóxicos provenientes de efluentes industriais, os processos de drenagem agrícola, os derrames acidentais de lixos químicos e os esgotos domésticos lançados em rios e mares contribuem para a contaminação dos ecossistemas aquáticos com ampla gama de agentes tóxicos como metais pesados, agrotóxicos, compostos orgânicos...

Nos últimos anos, o nível de Compostos xenobióticos nos ecossistemas aquáticos vem aumentando de forma alarmante como resultado da atividade antropogênica sobre o meio ambiente. Tal fato tem contribuído para a redução da qualidade ambiental, bem como para o comprometimento da saúde dos seres vivos que habitam esses ecossistemas.

Talvez em consequência desta maneira de cuidar dos mananciais é que uma das principais formas de veiculação de doenças se dá por contato direto, constituindo um problema de saúde pública (17). Segundo a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (18), em 2008 apenas 55% dos municípios brasileiros dispunha de rede de esgotamento sanitário. Na maioria das vezes, o esgoto da rede é despejado *in natura* nos corpos de água, já que só recebe tratamento 68,7% do esgoto transportado. Isso repercute em desequilíbrio ecológico nos mananciais, escassez de água de boa qualidade para os diversos fins, e, invariavelmente, na saúde pública, com aumento de casos de doenças parasitárias. No campo, há também problemas com o arraste, para os mananciais, dos fertilizantes e agrotóxicos empregados nas atividades agrícolas.

1.2 A LEGISLAÇÃO BRASILEIRA E OS PARÂMETROS DE QUALIDADE DA ÁGUA

Através das Resoluções CONAMA 274/2000 (19), da portaria MS 518/2004 (20) e CONAMA 357/05 (21), foram estabelecidos os critérios de uso e qualidade da água, no Brasil. A resolução CONAMA 274 (19), de 29 de novembro de 2000, estabelece parâmetros e indicadores específicos, de modo a assegurar as condições de balneabilidade. A portaria 518 do Ministério da Saúde, de 25 de março de 2004 (20), estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. A resolução 357, de 17 de março de 2005 (21), 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. De forma geral, através destas normas, a avaliação da qualidade das águas para inúmeros fins, dá-se a partir de parâmetros como Coliformes totais e termotolerantes, contagem de cianobactérias, bactérias heterotróficas, *Enterococcus*, além dos parâmetros físico-químicos, inferindo-se assim se são próprias para este ou aquele uso.

Segundo Arias (16), estas metodologias tradicionais de classificação de águas, baseadas em características físicas, químicas e bacteriológicas, não são suficientes para

atender aos seus múltiplos usos. Não obstante sua importante contribuição, a utilização dos coliformes como bioindicadores há muito tem sido alvo de críticas (22). A *Escherichia coli*, que representa 95% do grupo termotolerante (23), tem sobrevivido 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 (17, 22, 24, 25, 26, 27). Ainda Barcellosa & Quitério(17), 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.

A contagem de bactérias heterotróficas é outro parâmetro microbiológico usado, e refere-se a contagem destas bactérias, quando cultiváveis em ágar nutriente (ou equivalente), a $35\pm 0,5^{\circ}\text{C}/48\pm 3$ horas. Esta contagem mantém relação proporcional aos níveis de nutrientes presentes na água, e, assim também, à existência de patógenos (28). Discute-se, porém, que os métodos empregados resultam no crescimento de pequena percentagem da comunidade de bactérias presentes. Neste sentido, estudos apontam que apenas entre $<0,1$ a 1% dos microrganismos, dependendo do habitat, são cultiváveis através do emprego de métodos microbiológicos convencionais (29). Também Araújo *et al.* (30), expõe que a qualidade da água em um dado ponto, pode variar consideravelmente devido à diversos fatores como correntes, marés, efluentes, chuvas e outros. Desta forma, em pouco tempo, ou a poucos metros, pode haver mudanças de várias ordens de magnitude nos níveis da população microbiana. Ainda Araújo *et al.* (30) sugere que, em função desses fatos, aliado à pequena acurácia oferecida pelos métodos de análise microbiológicos, deve-se proceder com cautela a classificação das águas para critérios de balneabilidade, aplicando-se escala logarítmica no tratamento dos dados, e dando pouco significado a pequenas diferenças nas contagens.

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 (31). Os enterococcus, principalmente, os *Streptococcus faecalis*, 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 (28). Além disto, eles tem 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 (32). 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 (27). Além disso, este indicador não reflete tão bem quanto os coliformes termotolerantes, os níveis de poluição fecal humana. Outros indicadores biológicas complementares têm sido propostos, como *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* (22,27).

Os métodos químicos, por sua vez, provêm informação sobre a qualidade momentânea da água (15). 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 (33). O texto da resolução Res. CONAMA 357/05 Art. 8º§ 3º (21) 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”.

1.3 RELEVÂNCIA DOS BIOINDICADORES DE QUALIDADE DA ÁGUA.

1.3.1 Relevância científica

Segundo Rose & Grimes (22), os possíveis e esperados avanços científico na área da saúde pública e ambiental, principalmente no que tange aos usos da água, vão muito além das técnicas de cultivo, leitura de placas e tubos com crescimento de microorganismos. As novas tecnologias, como *Gene probes*, *Biosensors*, *imunomagnetic capture approach*, *Gene chip*, *solid-state* e *Biochip* tornarão possível a adequação do tratamento e gerenciamento para cada

água em questão. Esperam-se tecnologias e sistemas de organismos sentinelas integrados *on-line* a sistemas de gerenciamento, os quais poderiam ajustar rapidamente o tratamento da água e disparar alertas de risco à saúde, bem como dar sustentação ao diagnóstico médico, resultando em melhores tratamentos, bem como menores períodos de internação e até em menores perdas humanas. Ainda nesta perspectiva, a balneabilidade da água poderá vir a ser acessada em tempo real.

Mesmo considerando esses possíveis dividendos sociais dos iminentes avanços científicos, eles só serão possíveis se houver investimento em conhecimento básico de microbiologia, tais como ecologia de microrganismos, fisiologia de microrganismos e sistemas bioindicadores. Estes conhecimentos darão suporte e comporão, obrigatoriamente, os sistemas bioinformatizados que se espera. Ainda segundo Rose & Grimes (22), a melhor maneira de superar os obstáculos da complacência com os antigos indicadores e a relutância em usar os novos, é continuar desenvolvendo e padronizando novos métodos, assim como registrar os respectivos sucessos obtidos. A deficiência na avaliação do risco à saúde no contato com a água deve-se à carência de conhecimentos sobre os organismos e sua prevalência. Vale dizer que a inexistência de um bom sistema bioindicador de qualidade da água, reside nas mesmas carências (*ibid*). O conhecimento do sequenciamento de organismos aquáticos pode vir a ser utilizado em bancos de dados que integrarão futuramente em modo *on-line*, sistemas de gerenciamento de risco à saúde e ao ambiente. Além do que, a partir do sequenciamento, torna-se possível o desenvolvimento de outras técnicas para a detecção específica do bioindicador, ou diretamente de um agente patogênico (*ibid.*).

1.3.2 Relevância para a saúde pública

A importância de se continuar estudando bioindicadores de qualidade da água está diretamente relacionada à insuficiência do sistema coliforme (*ibid.*). Segundo ASM (34), anualmente, os Estados Unidos registram 900.000 casos de doenças, e possivelmente 900 mortes, em função de infecções veiculadas pela água.

Os riscos de infecção e adoecimento de uma população estão relacionados as suas condições de habitação, de hábitos, à concentração e ao tipo de agente patogênico ingerido e à suscetibilidade e estado geral de saúde da população. ... A água servida à população pode ser um veículo de disseminação rápida de agentes infecciosos (17).

Em relação aos outros usos, que não o consumo, o principal componente do risco à saúde no contato com a água, advém de patógenos capazes de infeccionar quando em contato com a pele e mucosas. Estes patógenos não são obrigatoriamente de origem fecal, como é o caso de dermatófitos, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (27). O deflúvio superficial do solo, dos solos agrícolas, os efluentes não domésticos, o lançamento de resíduos e efluentes industriais, os despejos de óleos combustíveis, as atividades de lazer, como o banho, os resíduos de atividades alimentícias, como os rejeitos de pescado e de laticínios, os resíduos domésticos e urbanos (de varrição) são exemplos de fontes de poluição não fecal (4), que não só alteram a composição da microbiota aquática, como também o risco à saúde (35). Segundo Rose & Grimes (22), alguns vírus enteropatogênicos tem sido encontrados em águas costeiras e mariscos, mesmo na ausência dos indicadores bacterianos tradicionais ou fontes específicas de poluição, mas sim do deflúvio superficial consequentes das chuvas.

Como há diversos tipos de poluição, além da fecal, há necessidade de se buscar indicadores complementares aos já existentes e que, de forma agregada, traria uma informação mais segura sobre a qualidade da água. Segundo Arias (16), “O emprego de uma bateria de bioindicadores... possibilita o conhecimento sobre a que nível o poluente interage com o organismo, e a que nível este é mais suscetível à ação daquele”. Segundo Kanzler *et al* (36), a água pode ser uma importante fonte de infecções fúngicas, principalmente durante o banho e em pacientes imunocomprometidos, em função da aspiração dos esporos. Estes autores encontraram alto percentual de amostras de água contaminadas com fungos como *Aspergillus* spp. 15,4% e *Fusarium* spp 2,6%, no sistema de abastecimento, e em reservatórios de água, na Áustria. Os autores concluíram também que os reservatórios de água são propícios ao continuo crescimento dos fungos em função da umidade.

Organismos como as leveduras, pouco conhecidas como patógenos, têm se mostrado resistentes a anti-micóticos, 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*, (37), estudou dois rios (poluídos) e dois lagos (não poluídos) em Minas Gerais. Entre 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.

1.3.3 Relevância para o meio ambiente

Buss, Batista & Nessimiam (38) afirmam que o primeiro passo para a resolução dos problemas sócio-ambientais gerados pela má gestão dos recursos hídricos é o desenvolvimento de metodologias de diagnósticos eficientes. A lógica da abordagem biológica baseia-se nas respostas dos organismos em relação ao meio onde vivem, pois a biota aquática é capaz de responder a uma série de distúrbios, sintetizando a história recente das condições ambientais (39). Mendonça-Hagler, Vieira & Hagler (27), ressaltam a importância de programas de monitoramento e pesquisas que avaliem o significado das informações obtidas em diferentes ambientes aquáticos e diferentes usos para se conhecer os riscos advindos da poluição microbiana. Shah *et al* (35) salientam que é de primordial interesse o desenvolvimento de meios custo-eficientes e efetivos de monitoramento da qualidade da água dos mananciais. Sem formas de identificação (indicadores), um contaminante pode permanecer despercebido, assim como a origem de seus malefícios (22). Entretanto, ainda há muito por se estudar sobre a microbiota aquática em ecossistemas tropicais, inclusive no Brasil. No entanto, as novas possibilidades tecnológicas só farão sentido para nós, se as nossas comunidades microbianas estiverem sendo estudadas e descritas geneticamente. Neste

sentido, e também em função da contínua perda de diversidade, há uma urgente necessidade de conhecer e documentar a biodiversidade aquática (14, 40).

1.4 ASPECTOS BIOLÓGICOS DAS LEVEDURAS AQUÁTICAS

As leveduras são fungos que pertencem ao Reino Fungi, distribuídas nas Divisões Ascomicota, as que produzem esporos dentro de ascos, e Basidiomicota, as que os produzem externamente sobre basídios (41, 42). As leveduras basidiomicéticas são habitantes comuns das superfícies de plantas, principalmente sobre as folhas, flores e frutos, como dito por Garcia (42). 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 anamorfos, especialmente espécies dos gêneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula*(*ibid.*).

Os estudos realizados tem 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 (43). Fora da água, encontramos os ascomicetos em substratos ricos em açúcares simples, como em frutos maduros (42). Em contraste com a aparente ubiquidade dos basidiomicetos, as leveduras ascomicéticas parecem ser mais responsivas à concentração de detritos orgânicos (44).

Assim, portanto, 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 (41,45). 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 (46). Ou seja, as leveduras distinguem-se dos outros fungos pela forma unicelular ser predominante em ao menos uma parte de seu ciclo vegetativo (41, 47) e terem o brotamento e a fissão como principal forma de reprodução assexuada, não apresentando corpos de frutificação na reprodução sexuada (42,45). 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 (46). As leveduras encontram-se amplamente distribuídas na natureza, no solo, sobre as plantas, nas águas continentais e marinhas e associadas a animais (13,41,42).

Outra característica das leveduras é a reprodução através de brotamento, embora também neste quesito haja exceção, pois no gênero *Schizosaccharomyces* sp. ocorre reprodução por fissão binária. Neste caso, o organismo é considerado levedura por ser fermentativo e ser predominantemente unicelular. Existem organismos similares às leveduras e que são chamados *Yeast-like*. *Aureobasidium* sp., por exemplo, forma colônias que se assemelham às das leveduras, mas com o envelhecimento, tornam-se pretas com bordos rizóides.

Embora se tenha uma boa idéia das espécies de leveduras prevalentes em alguns ecossistemas brasileiros, os métodos de isolamento convencionais já descritos e usados nos estudos que resultaram neste conhecimento, provavelmente levaram a algumas distorções e, certamente, deixaram de detectar muitas espécies que se encontram em menores proporções na comunidade. Isto porque essas espécies são mais dificilmente capturadas nos pequenos volumes de inóculos (0,1; 1 e 10mL) geralmente empregados, e assim, aparecem com pequena frequência, ou não aparecem, nos resultados (44,46). Medeiros *et al* (37) afirmam que a maior parte dos isolados de leveduras em água tem sido dos gêneros *Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Pichia* e *Rhodotorula*, e as principais espécies tem sido *Aureobasidium pullulans*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus laurentii*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia guilliermondii*, e *Rhodotorula mucilaginosa*. Isto encontra amparo nos resultados obtidos por Roth *et. Al* (48) quase meio século atrás, que em um trabalho realizado em ambiente marinho, na Florida/Estados Unidos, regiões do Golfo e Bahamas, encontraram

em 498 amostras (220 das quais de água, e as demais em sedimento, peixes e algas), 900 morfotipos diferentes de leveduras, que perteceram principalmente aos gêneros, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Trichosporon* e *Rhodotorula*. Isto também pode ser confirmado pela leitura de outros trabalhos (26,49,50,51,52), entre outros.

Os habitats das leveduras são mais freqüentemente líquidos ou com umidade muito elevada, ácidos ou ocasionalmente alcalinos, ricos em carbono orgânico simples e nutricionalmente complexos. Como a maioria das espécies é mesofílica em relação á temperatura e cresce em faixas de pH similares, depois das substâncias inibidoras ou tóxicas, a competição por nutrientes é, provavelmente o fator isolado mais importante na ecologia de leveduras (44). Por exemplo, a existência de leveduras na superfície, ou sub-superfície da coluna da água, pode sugerir sua origem alóctone, assim como o maior influxo de materiais orgânicos no limnon. O material alóctone carregado para o sistema aquático pode prover e sustentar uma maior diversidade de leveduras nas águas sujeitas à eutroficação (25).

Em geral perto das nascentes dos rios, o número de fungos é pequeno. Em rios não poluídos existe maior número de fungos aquáticos verdadeiros, “Aquatic phycomycetes”, que de fungos do solo. Águas altamente poluídas apresentam populações densas de fungos do solo, incluindo as leveduras (53, 54). Ao contrário do que às vezes se pensa, as contagens de leveduras podem ser até maiores em rios que em lagos, como mostrado por Hagler & Ahearn, (49), que compararam os resultados de 73 amostras coletadas em rios e 106 em lagos no sudeste americano e no Rio de Janeiro/Brasil. As amostras em rios foram 93% positivas, contra 78% em lagos. As amostras de rios tiveram média geométrica de 448 células/L contra 113/L nos lagos.

Os atributos fisiológicos de uma levedura e de sua comunidade constituem um indicador das características do habitat e este fator é determinante no perfil daquela (49,55), esta particularidade é importante enquanto um grupo bioindicador da qualidade ambiental (13). Geralmente, as contagem de leveduras em águas oligotróficas ficam abaixo de cem células por litro; em águas mesotróficas, as contagens ficam entre 100-500 células, 500-1000 em águas poluídas, ainda não classificadas como eutróficas e em águas eutróficas e esgotos

alcançam 1000 ou mais células por litro (37,49,51). Assim, as comunidades de leveduras em águas limpas são dominadas por populações esparsas de espécies não fermentativas. As leveduras róseas, comuns em ambientes aquáticos, frequentemente compreendem mais que 50% da população, especialmente, em ambientes oligotróficos (49). A maioria dessas leveduras é do gênero *Rhodotorula*. Espécies de *Rhodotorula* são, geralmente, encontradas amplamente distribuídas na natureza, e predominantes proporcionalmente em ambientes não poluídos. *Cryptococcus sp.*, especialmente *Cr. albidus* e *Cr. laurentii*, ocorrem em águas limpas, embora possa aparecer em pequena frequência, em águas poluídas. Em função de que estas espécies serem comuns na superfície de folhas e no solo, é esperado que sejam levados pelo *deflúvio superficial*, para o ambiente aquático. Também *Rhodosporidium sp.* (teleomórfico do gênero *Rhodotorula*) e *Sporobolomyces sp.* entram no *limnom* através do “*deflúvio superficial*” do ecossistema terrestre (51).

Em outro tipo de ambiente, Russo *et al* (56), encontraram uma comunidade de leveduras acidófilas, com algumas espécies autóctones, em um ecossistema de águas ácidas do lago Caviahu, Patagonia/Argentina. Em ambientes contaminados por matéria orgânica, sobre tudo por esgotos, ocorrem altas proporções de espécies fermentadoras, as quais incluem *Candida krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (37,49). *C. parapsilosis* foi um dos ascomicetos mais isolados no estuário de Tagus concomitante ao período de maior poluição fecal (57). *Candida krusei* tem boa tolerância aos detergentes alquil-benzeno sulfonados, o que explicaria ser encontrada viável em águas doce poluídas por efluentes domésticos (49). Brandão (14) citando Reissig (58) relata que em esgotos domésticos, as contagens passam em torno de 10^5 células/L, já tendo sido encontradas 10^8 células/L. Em condições específicas, como em biofilmes e em *blooms* de algas, as contagens também podem ultrapassar as 10^3 células/L. *Candida parapsilosis*, espécie associada ao homem, é persistente em ambientes aquáticos, de água doce ou salgada. *Candida intermedia* também é encontrada em esgotos, águas eutróficas, e em ambientes marinhos litorâneos (51).

Embora seja conhecida a pequena frequência de leveduras em mar aberto, elas são mais frequentes na planctonsfera. Hagler & Ahearn(49) apontam que, nos trabalhos de Suehiro(59) e Suehiro & Tomiyasu (60), a sucessão de leveduras no decaimento *in vitro* de algas teve como dominantes iniciais *Rhodotorula sp.* e *Cryptococcus sp.* e após dezesseis dias

Candida sp. O crescimento das leveduras associadas às algas, provavelmente, se deva ao aproveitamento dos exudatos excretados por essas, os quais são ricos em carbono orgânico e compostos nitrogenados, especialmente durante períodos de dessecação nas mares baixas. Neste caso, o aumento no número leveduras indicaria o aumento das concentrações de material orgânicos, assim como sua diversidade seria indicativa de adaptação da população a este tipo ambiente (61).

1.5 LEVEDURAS COMO INDICADORES DE QUALIDADE DA ÁGUA

Neste contexto, muitos trabalhos, desde cooke (62) e Simard (63), têm estudado as leveduras como bioindicadoras de poluição. Hagler (51) encontrou uma boa correlação dos totais de leveduras e o número de leveduras fermentativas com o nível de poluição. Segundo Hagler (13), em função da grande distribuição das leveduras, a facilidade de cultivo, o estágio bem desenvolvido da taxonomia destes organismos, e a quantidade de estudos já realizados sobre estes no ambiente, surpreende serem tão pouco utilizados como indicadores de qualidade ambiental. Isto porque, as comunidades de leveduras estão associadas com o tipo de habitat, e mudanças nestas comunidades pode refletir as mudanças do habitat. Além disto, Há espécies cosmopolitas em ambientes aquáticos, sejam limnológicos ou marinhos, como *Debaryomyces hansenii* e seu estado anamórfico *Cândida famata*, a qual também se beneficia de poder utilizar uma variedade grande de fontes de carbono (37,48,49), e que poderia ser usada como bioindicadora.

Kluyveromyces aestuarii e *Candida krusei* são bons exemplos de potenciais indicadores. Enquanto o primeiro é comumente encontrado dentro da área de domínio do ecossistema manguezal com vegetação bem conservada, é ausente nas áreas externas aos manguezais. Por outro lado, *Candida krusei* é reconhecidamente ligada a poluição orgânica e fecal (49) . Um sistema que considere estas duas espécies pode ser usados para avaliação da conservação e qualidade ambiental deste ecossistema (13). Também a espécie *C. lipolytica* (=

Yarrowia lipolytica) tem sido sugerida com um indicador de poluição relacionada ao petróleo em ambientes marinhos e estuarinos. Esta espécie usa poucas fontes de carbono, e não ocorre comumente na água, embora seja capaz de crescer nas condições típicas dos estuários, com pH levemente alcalino, o que por sua vez, restringe muitas leveduras no ambiente marinho. Estas características fazem dela uma boa espécie-candidata para o monitoramento do referido ecossistema (ibid.). Ainda neste sentido, Prabhakaran & Sivadas (64) em um trabalho de bioprospecção de leveduras com potencial de biodegradar petróleo, numa região fortemente contaminada por esse poluente, obteve 35 isolados, dos quais 27 foram capazes de usar óleo cru, diesel ou querosene (mais de um destes, em todos os casos) como única fonte de carbono. Ainda segundo Hagler (13), para que esses sistemas de monitoramento como estes funcionem, é necessário que se desenvolvam meios de cultivo, ou métodos genéticos moleculares, que possibilitem a detecção e estimativa mais precisas das populações dessas espécies, e uma gama de dados ambientais que permitam correlacionar o estado dessas populações aos níveis de influência antrópica.

Almeida (57) fez amostragens de água no estuário de Tagus/Portugal, e encontrou correlação ($R^2 = 0,84$) entre a contagem de leveduras em amostras incubadas a 37°C com a ocorrência de *Echerichia coli*. Ainda nesse estudo, *Debaryomyces hansenii* foi um dos mais isolados, independentemente do ciclo de marés. No entanto, com o início do período de maior descarga do rio Plume, a população desta espécie parece ter sido arrastada do estuário.

Além da importância do monitoramento da água para fins de balneabilidade, também o consumo de água tratada e o de água mineral, requerem indicadores complementares. Yamaguchi (65), por exemplo, realizou um estudo com água do sistema de tratamento urbano e de água mineral em galões na cidade de Maringá/Paraná. Nesse trabalho, leveduras foram detectadas em 36,6% e 11,6% das amostras de água mineral de garrafão em dispensadores de água e água de torneira do sistema municipal, respectivamente. Vinte e uma (35,5%) das amostras de água mineral de garrafão e duas (3,3%) das amostras de água de torneira foram positivas para fungos filamentosos. Em relação às bactérias heterotróficas, 35% das amostras de água mineral superaram os limites estabelecidos pela portaria 518/04 (20).

1.6 MÉTODOS DE PESQUISA COM LEVEDURAS EM AMBIENTES AQUÁTICOS

Os métodos de pesquisa de leveduras em água foram revisados por Hagler e Ahearn, (49). Esses consistiram tradicionalmente em coleta com frascos estéreis. Para amostragem da camada suprasuperficial, tem sido utilizadas membranas policarbonadas absorventes, as quais são dispostas sobre a superfície da água. A amostragem em camadas profundas é, geralmente, feita com auxílio de garrafas de Van Dorn ou de Nansen. Os estudos mais antigos nem sempre relataram se tais garrafas foram rinsadas com álcool antes da coleta. Mais tarde, passou-se a utilização de utensílios estéreis, como o amostrador *Niskin*. Independentemente de qual desses seja utilizado, é importante que, após a coleta, a amostra seja logo processada, ou mantida sobre refrigeração (entre 0°C e 4°C), sob pena de alterações importantes na composição das populações em estudo.

A forma de inoculação das amostras, dá-se pelo espalhamento, em placa, de 0,1 mL de inóculo da amostra. Outra forma é a passagem dos inóculos, cujos volumes podem variar de 0,1mL; 1 mL, 10mL, 100mL ou mais, para águas muito limpas, em membrana filtrante com porosidade 0,45µm a 0,80µm. As membranas com porosidades 0,80µm têm a vantagem de serem mais seletivas, e deixam que boa parte das bactérias, presentes no inóculo, passem para o filtrado, retendo as leveduras (Ibid.). Esses autores, salientam que no processamento da amostra, a utilização de membrana filtrante resulta em maiores frequências que aquelas observadas em culturas *Pour plate* ou espalhamento. O plaqueamento *Pour-plate* consiste em juntar o meio ainda fundido, em temperatura em torno de 47°C, ao inóculo (1,0 mL), e proceder a homogeneização por meio de movimentos horizontais, como se escrevendo um “8”. Este métodos enfocam um resultado quantitativo da amostra, permitindo contagens de UFC (unidades formadoras de colônias), ao mesmo tempo que facilitam o isolamento dos morfotipos diferentes que cresçam juntamente sobre a placa, embora muitas colônias possam ficar submersas.

Outros métodos de análise quantitativa são: a análise em tubos múltiplos, na qual se inocula diferentes volumes de inóculo (0,1mL, 1,0mL e 10mL), em tubos de ensaio contendo um tubo de Durham invertido(usa-se 03 tubos para cada volume de inóculo). O resultado é expresso em NMP (Número Mais Provável), ao qual se chega com o auxílio de uma tabela, que traduz o número de tubos no qual houve crescimento e formação de gás, em cada volume, em número provável de células por 100 mL do inóculo (53). Uma variação deste é o Número Indicado (NI), no qual se utiliza apenas um tubo por volume inoculado (0,1mL, 1,0mL e 10mL). O resultado é a indicação da ordem de grandeza do número de células /100mL da amostra (13,62). As contagens de número mais provável (NPM) em tubos de diluições sucessivas são tipicamente maiores que as contagens em placa (28, 66), embora os métodos de tubos múltiplos, ou número indicado, enfoquem um resultado numérico, quando se pretende a obtenção de culturas puras, requerer-se-á uma nova fase de cultivo, em meio sólido, para o esgotamento das culturas advindas desses tubos.

Em relação aos meios de cultivo, segundo Silva Filho (23), meios acrescidos de substâncias complexas (de composição indeterminada como é o caso dos extratos de carne e malte e de levedura) são chamados meios enriquecidos, e que permitem o crescimento de ampla variedade de organismos, até os mais exigentes (ou fastidiosos) e são diferentes dos meios de enriquecimento, que seriam aqueles que permitem o crescimento diferenciado de espécies, em função de sua seletividade e condições de cultivo. Segundo Carvalho (44), o emprego de métodos de enriquecimento permite combinar grandes volumes de inóculo e o uso de meios mais seletivos com substâncias inibidoras. Técnicas de enriquecimento são abordagens qualitativas que, mesmo não sendo indicadas para definir os componentes principais de uma comunidade, são necessárias para encorajar o crescimento de leveduras que formam uma porção diminuta da microbiota total (Ibid.).

Os meios seletivos são aqueles cuja composição inibe o crescimento de organismos que não sejam o alvo do cultivo, ou não contém algo indispensável a estes. Desta forma, os organismos-alvos encontram melhores condições para crescerem, e principalmente, enfrentam menor competição no cultivo. Ainda, Hagler & Ahearn (49), expõem que não existem meios padronizados para o isolamento de leveduras, e que um meio que resulte em bom crescimento para amostras de um lugar, pode não render bem em outro. Os meios usados para isolamento

e enumeração de leveduras do ambiente são geralmente complexos e nutricionalmente ricos. Principalmente, utiliza-se uma fonte de carbono (glicose, frutose, sacarose) uma fonte de nitrogênio, como uma proteína hidrolisada (peptona, triptona, casitona) e um suplemento complexo (extrato de levedura ou extrato de malte) (44).

Quando se tem o intuito de obter culturas puras dos morfotipos crescidos nas placas de isolamento, faz-se o esgotamento das culturas em placas contendo meios ricos em nutrientes, tais como Y-M (1% glicose, 0.5% peptona, 0.3% extrato de malte, 0.3% extrato de leveduras, 2.0% Ágar) ou Ágar GYP (glicose 2%- extrato de leveduras 0,5%- peptona 1% e Ágar) ou Ágar Malte (44). As placas são incubadas por 48h e então procede-se a leitura. Tal procedimento é repetido até que se visualize, na placa de esgotamento, um único morfotipo de colônia, que é aquela que se quer isolar, a qual pode ser caracterizada e identificada.

Além da especificidade dos requerimentos metabólicos das leveduras, como exigências nutricionais, de temperatura e pH, uma dificuldade adicional é a competição na placa de cultivo. As bactérias, seus compostos inibidores, e os fungos filamentosos crescem mais rápido nos meios de isolamento e causam sombreamento, limitando o crescimento das leveduras. Em função de as leveduras serem mais tolerantes que as bactérias a pH baixos, pode-se utilizar a acidificação para a inibição do seu crescimento. Tal inibição, no entanto, pode ser feita com a utilização de antibióticos, preferencialmente o cloranfenicol, em concentrações entre 50 a 500 mg/L. Sua vantagem é que este antibiótico resiste bem a autoclavação e às condições ácidas, mantendo sua atividade (44, 49).

Os kits utilizados em microbiologia clínica não funcionam bem em microbiologia ambiental. Segundo Allen Hagler¹ estes kits são específicos para um número pequeno de organismos de interesse médico, e não tem emprego em análises em ambientes cuja microbiota é mais diversa, e nem de todo conhecida. Assim, as etapas de caracterização e identificação requerem um trabalho intenso e demorado. Estas etapas consistem na determinação das fontes de carbono e nitrogênio assimiláveis pelas

¹ Comunicação do Dr. Allen Norton Hagler do IMPPG (UFRJ) Rio de Janeiro.

leveduras, e nas faixas de pH, temperatura e salinidade em que vivem, além dos limites de tolerância a várias substâncias inibidoras. Consistem ainda, na descrição da macromorfologia da colônia e da morfologia das estruturas celulares (micromorfologia). No entanto, a identificação de muitas leveduras ainda requer o emprego de técnicas moleculares, a fim de se obter a identificação específica (identificação da espécie) daquela colônia que fora isolada do ambiente. Ao tipo de identificação específica que seja resultante deste conjunto de etapas de caracterização fisio-morfológicas e moleculares dá-se o nome de identificação polifásica.

Uma das dificuldades operacionais no emprego das leveduras no monitoramento ambiental, que requer métodos simples e de baixo custo, é a dificuldade de discernir colônias de espécies ou grupos diferentes, que se mostram morfotipicamente muito semelhantes quando jovens, ou recém plaqueadas. À exceção das chamadas leveduras rosas, além de *Trichosporon* sp. e *Getrichum* spp., em meios tradicionais como ágar Sabouraud, a maioria das leveduras se mostram como colônias brancas, lisas, convexas e bordas inteiras e regulares. O emprego de meios diferenciais tem se mostrado úteis neste aspecto, pois baseiam-se nas características metabólicas de diferentes grupos, resultando em colônias morfotipicamente distinguíveis (44,46).

Os métodos genéticos moleculares estão suficientemente desenvolvidos para terem aplicação prática na identificação rápida e acurada. Sequências parciais das regiões D1/D2 e ITS do rDNA têm se revelado muito úteis para este propósito, principalmente em estudos de ecossistemas pouco estudados, onde é comum encontrarem-se espécies ainda desconhecidas (46).

1.7 PROPOSTA DE ESTUDO

Este projeto propôs testar o potencial dos meios de cultivo BIL(Base de isolamento de leveduras) com alterações, para isolamento e contagem de leveduras da água, e

consequentemente, para o monitoramento da água. Propôs ainda estudar o potencial de leveduras como bioindicadoras da qualidade da água. Além disso, também buscou-se sequenciar a região D1-D2 do gene codificador da sub-unidade maior do ribossoma (LSU), das regiões espaçadoras intergênica (ITS1 e ITS2) e do gene codificador da sub-unidade ribossomal 5.8 S ITS1-NL4 do DNA das leveduras isoladas, o que visou aumentar a base de dados genéticos desses organismos, potencializando futuros empregos biotecnológicos, sobretudo, na redução do risco à saúde. Como contribuições, buscou-se trazer no âmbito do conhecimento e, sobretudo para a Saúde Pública, um método para estudo, e o entendimento de relações entre as espécies ou grupos de leveduras e os fatores ambientais que favorecem seu crescimento. As análises de leveduras poderão vir a complementar uma gama de análises físico-químicas e biológicas, constituindo-se bioindicadoras da qualidade da água e assim, ferramenta para gestão da água e dos riscos à saúde que dela possam advir. A coleção de isolados formada durante a pesquisa poderá ainda, futuramente, ser pesquisada para outros fins taxonômicos e biotecnológicos.

1.8 ÁREA MODELO PARA O ESTUDO

Para tal, o Lago de Juturnaíba foi escolhido como unidade hidrológica de estudo. Este lago possui afluentes com águas de diferentes qualidades, suas águas não são nem muito poluídas nem muito limpas quando avaliadas através de suas propriedades organolépticas (Águas de qualidades intermediárias). Além do que, o lago possui diversidade morfofisionômica de ambientes. Em função da variação na qualidade de suas águas, o lago constituir-se-ia em um bom modelo experimental para o estudo.

O lago situa-se entre os municípios de Silva Jardim e Araruama/RJ (22° 33'S e 42° 18'W), e pertence à Bacia de drenagem do Rio São João. Segundo Marinho & Huszar (67) o lago se encontra em região de clima quente e úmido, com estação chuvosa no verão e estiagem no inverno, cujo mês mais frio tem média superior a 18°C. O nome Juturnaíba é originário da palavra indígena “Nhetoronoa-aba” ou “Nhetoranga-aíba”, que significa “lago

medonho” ou “mal - Assombrado”. O nome foi dado devido à presença de urutaus (*Nyctibius griseus*) nas matas: aves noturnas de grande porte cujo canto melancólico provavelmente era temido pelos índios Tamoios (68). Originalmente o lago media cerca de 1.600 m de largura por 3.700 m de comprimento e profundidade máxima de 4,0 m, perfazendo 6,0 Km² de área. Com esta conformação, o lago abrigava um volume de 20 milhões de metros cúbicos, que afluíam principalmente dos Rios Bacaxá e Capivari, embora recebesse os efluentes também do Rio do Ouro, o Rio da Onça, de menores vazões, além de inúmeras valetas. Neste período, o rio São João recebia o eflúvio da porção Sul do lago de Juturnaíba (69). O Departamento Nacional de Obras e Saneamento (DNOS) construiu, entre 1979 e 1984, um dique-barragem no rio São João, formando um lago maior, para o qual este rio, agora, também aflui(68).

Os principais objetivos do DNOS ao construir a barragem eram: acumular maior volume de água para garantir o abastecimento domiciliar e industrial na Região dos Lagos, controlar as cheias na baixada do rio São João no trecho a jusante da barragem e assegurar água para irrigação de 31.800 ha de terras agrícolas nas baixadas selecionadas pelo Pró-alcool e outros diferentes cultivos (ibid). O novo lago tem dimensões de até 4 Km de largura por 15 Km de comprimento, perímetro de 85 km e área de 43 Km², com volume final de cerca de 100 milhões de metros cúbicos. A área drenada pelos 3 principais rios é de 1370 Km². De acordo com dados da FEEMA, quando cheio, o nível da água atinge a cota de 8,4 m acima do nível do mar. A profundidade máxima atinge 8,0 m, enquanto que a média é de 2,3 m. A zona litorânea é ocupada por uma vegetação baixa de gramíneas, com exemplares isolados de árvores como ingás (*Inga ingoide*, *I. affinis* e *I. fagifolia*). Vem em seguida uma zona de plantas flutuantes e, já nas áreas um pouco afastadas da margem, notam-se as plantas submersas. Dentre as plantas litorâneas destacam-se piripiris (*Cyperus giganteus*), tabuas (*Typha dominguensis*) e outras como *Scirpus cubensis*, *Bacopa* sp e *Hydromystia* sp. As flutuantes são representadas por aguapés (*Eichornia crassipes* e *E. azurea*) em grande quantidade. Das submersas, mencionam-se cabombas (*Cabomba* sp) e *Myriophyllum brasiliense* (ibid.).

O regime dos três principais rios (Rio São João, Capivari e Bacaxá) é marcado por um período de águas altas entre os meses de novembro a março, com as maiores vazões ocorrendo em fevereiro. As menores vazões ocorrem entre os meses de junho a outubro,

sendo a mais baixa vazão registrada em agosto. A média anual é de 29 m³/s. Outro fator importante envolvido se refere ao tempo de residência da água. Na represa ele é de 38 dias, ou seja, elevado. Um tempo de residência alto favorece a concentração de nutrientes, estimulando a proliferação de plantas aquáticas (Ibid.).

Durante a formação da represa e nos seus primeiros anos, houve um aumento considerável de plantas aquáticas, que chegaram a formar ilhas flutuantes, e um decréscimo considerável de oxigênio. Após vinte anos de seu enchimento, o problema da proliferação de plantas aquáticas persiste podendo ainda ser observado hoje, (2010), provavelmente estimulado pelos nutrientes dos esgotos que lhe chegam através dos rios. Atualmente o lago está sujeito à intensa ação antropogênica e freqüentes florações de cianobactérias (67). O fechamento da barragem causou mudanças morfológicas no lago, que assumiu uma forma dendrítica, e alagou extensas áreas com formação de brejos (69). Segundo Primo & Volcker (68), entre os principais processos suscetíveis de ocorrer devido à inundação da vegetação durante a formação de reservatórios, destacam-se:

- A decomposição da matéria orgânica;
- A dissolução de nutrientes oriundos da vegetação e dos solos alagados, principalmente dos macronutrientes nitrogênio e fósforo;
- O aumento da cor e da turbidez da água pela liberação de substâncias fenólicas, taninos e ligninas;
- Mudanças na composição de espécies de algas e microrganismos aquáticos, decorrentes dos processos acima descritos, em função do seu papel fundamental nos ciclos do fósforo, do nitrogênio, do enxofre, do carbono e dos demais elementos na represa.

Além desses processos, existe o problema do aporte de esgotos domésticos:

Chegam à represa de Juturnaíba as sobras dos esgotos não depurados pelos rios ao longo de seus trajetos. ... são lançados os esgotos de diversas localidades como Gaviões e Correntezas. ... da cidade de Silva Jardim e dos povoados de Varginha, Boqueirão e Imbaú. ... povoados de Lavras, Rio Vermelho, Catimbau Grande, Prainha, Boa Esperança, Nova Cidade, Bacaxá, Jacundá, Latino Melo e Morro Grande, além da parte oeste da cidade de Rio Bonito(68).

Ainda segundo esses autores (68), em função do aporte de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, classifica o reservatório como mesotrófico. A quantidade de sólidos totais recebida pelo reservatório é da ordem de 100 mg/l, dos quais 35% constituem resíduos orgânicos. Por esta razão, a transparência da água é baixa, da ordem de 0,75 m em média, inferida pelo disco de Sechi. Ainda este autor destaca os principais usos dos recursos hídricos da Bacia do rio São João: Abastecimento Público; Irrigação; Consumo Industrial; Extração de Areia; Criação de Peixes e Patus; Dessedentação de Animais Domésticos; Manutenção da Biodiversidade; Pesca; Recreação; Navegação. Quanto ao abastecimento público, são beneficiadas as populações das cidades de Rio Bonito (parte), Silva Jardim, Casemiro de Abreu, Araruama, São Pedro da Aldeia, Cabo Frio, que fazem parte da Bacia do São João, além de Armação dos Búzios, Iguaba, Iguaba Grande, Arraial do Cabo e Saquarema. Os municípios de Cachoeiras de Macacu e Rio das Ostras, não usam tais recursos no abastecimento público embora pertençam à bacia.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver um método de cultivo que permita contagens significativas (acima de 30 colônias por placa) de leveduras em águas-doce eutroficadas.

Avaliar o desempenho das variações do meio BIL no estudo de leveduras em água doce.

Realizar uma avaliação preliminar do potencial das espécies de leveduras isoladas como indicadoras da qualidade da água.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Testar o potencial de significância das contagens de leveduras obtidas nos meios BILglici, BILgalci, BILetanol e BILvbc em águas-doce eutróficas em culturas de enriquecimento pelos métodos do número indicado e membrana filtrante sobre os suportes (pads)

Testar as correlações das contagens de leveduras com outros parâmetros nos oito pontos de coleta do lago de Juturnaíba e seus afluentes.

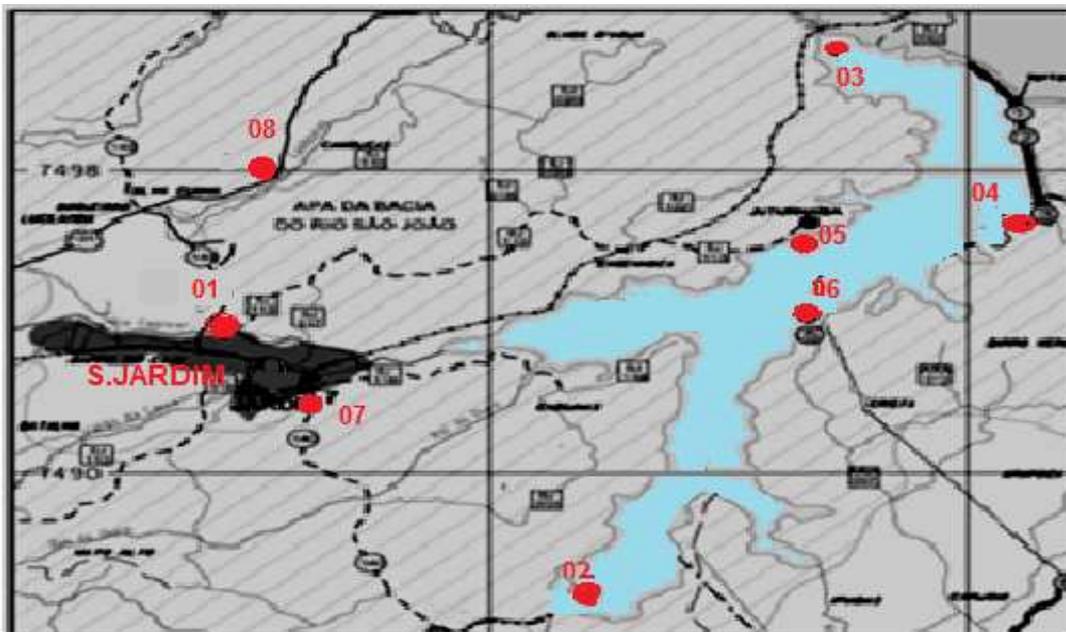
Estudar a distribuição das leveduras isoladas com os quatro meios BIL em águas eutróficas e águas poluídas por esgotos domésticos.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COLETA DE AMOSTRAS

Foram obtidos dados biológicos e físico-químicos, a partir de amostragens da água nos diferentes pontos do lago de Juturnaíba. Foram feitas seis campanhas de coletas, em julho, agosto e setembro/2009 e fevereiro, abril e junho/2010. Foram coletadas amostras de 08 pontos. Estes pontos foram escolhidos em avaliação prévia, quando buscou-se pontos sob diferentes condições ambientais como fozes de rios (pontos 1, 2 e 3), proximidade a povoados (ponto 5), áreas de águas lânticas (ponto 4), o meio do lago (ponto 6), além de pontos-controle positivo de poluição (ponto 7) e negativo (ponto 8), acrescentados a partir das três campanhas de 2010, em função da discussão dos resultados nas três coleta de 2009. Em busca de maior representatividade da coleta, em cada ponto foram coletadas quatro sub-amostras de aproximadamente 2L cada, distantes entre 5 e 10 metros.

Figura 01: Desenho esquemático do lago de Juturnaíba e adjacências



3.2.1 Descrição dos pontos de coleta

O primeiro ponto é situado no Rio Capivari, nas imediações da ponte da rodovia RJ 140, e junto ao entroncamento da estrada de Juturnaíba ($22^{\circ}38'29.29''S$ e $42^{\circ}23'46.40''O$). Neste ponto coleta-se a água antes de ser diluída pelo lago. Neste local as águas apresentam coloração escura e cheiro forte, talvez em função de esgotos e fezes de gado que pastam às margens, à exceção de momento de enxurradas, quando as águas se tornam barrentas. Outro dado importante é que, 30 metros à montante, há a saída dos efluentes da *Wetland* de Silva Jardim, que, no entanto, são constituídos de um efluente de vazão bem pequena e clarificado. No local, percebem-se ainda atividades de retirada de areia por métodos não mecanizados (braçal).

O segundo ponto é situado na foz do Rio Bacaxá ($22^{\circ}41'07.07''S$ e $42^{\circ}19'53.68''O$). O rio percorre extensas áreas agropastoris. A foz é caracterizada por densa vegetação de macrófitas, que são especificadas por Primo e Volker (68). Estas chegam a formar ilhotas, e por vezes, bloqueiam a passagem do barco. A água tem odor objetável, embora não se apresente escura.

O terceiro fica situado na foz do Rio São João, que deságua no lago junto à Reserva Ecológica de Poço das Antas ($22^{\circ}35'25.13''S$ e $42^{\circ}16'34.58''O$). O rio São João percorre áreas agropastoris antes de entrar na reserva. A foz situa-se entre margens densamente vegetadas por macrófitas e gramíneas terrestres. A aparência é boa, com coloração amarelada, mas sem cheiros.

O quarto ponto fica próximo à estrada da barragem que formou o lago ($22^{\circ}37'15.20''S$ e $42^{\circ}15'46.60''O$), onde o represamento levou à inundação de áreas entre morros, formando um braço do lago, cujas águas têm menor mobilidade (lênticas). Numa coleta prévia este ponto apresentava intensa floração de algas de pigmentação verde.

O quinto ponto de coleta fica próximo à pousada “Peixe vivo” e à antiga estação ferroviária de “Juturnaíba”(22°37'06.78”S e 42°18'15.05”O). Este ponto é rodeado pela comunidade de Juturnaíba, e fica a 50 metros do “cais” dos barcos dos pescadores. Deste, partem as embarcações motorizadas para atividades de pesca comercial e esportiva. Como observado pessoalmente, ali são despejados restos de peixes não comercializados. Embora a comunidade não seja beneficiada com rede de esgotos, não se observa encanamentos ou valas negras. Segundo depoimentos dos moradores, as casas dispõem de sistema Tanque-séptico (fossa séptica) e sumidouro. O aspecto local é de água poluída, escura, possivelmente pelo lançamento de resíduos de pescado, ou esverdeada, por ocasião de florações de algas.

O sexto ponto de coleta fica próximo à estação de tratamento de água da “Águas de Juturnaíba”(22°38'07.21”S e 42°18'00.18”O). Este ponto fica mais para o meio do lago, onde a hidrodinâmica se apresenta mais forte. Não há fixação de vegetação neste ponto. Não se percebe cheiros ou poluição evidente.

O sétimo ponto fica no Córrego “valão das caixas”, sob a ponte que leva à Secretaria Municipal de Agricultura(22°39'17.34”S e 42°23'15.99”O). O ponto é situado dentro do perímetro urbano da Cidade, no qual se observam inúmeras canalizações para lançamentos de efluentes, principalmente domésticos. Percebem-se odores característicos de águas poluídas por esgotos, podendo ser entendido como ponto-controle positivo para o tipo de poluição mencionado.

O oitavo ponto fica na saída da Mata do boqueirão (22°36'06.21”S e 42°23'40.48”O), quando ainda não passou por nenhuma residência, apresentando água sem odores e aparência cristalina. Este ponto foi incluído para constituir um controle negativo de poluição antrópica.

3.2.2 Procedimentos de coleta

As amostras dos pontos 1, 7 e 8 foram colhidas a partir da margem. As dos pontos 2 a 6 foram colhidas em embarcação. Foram utilizados os seguintes procedimentos:

- Desinfecção da garrafa de *Van Dorn* e Balde de coleta com álcool (92%);
- Enxágüe desses utensílios com água do próprio ponto de coleta;
- Imersão da garrafa de *Van Dorn* (2L) no primeiro sub-ponto, aberta, até aproximadamente 30 cm da superfície;
- Fechamento da garrafa e recolhimento da mesma;
- Passagem da sub-amostra para o balde de coleta;
- Repetição do procedimento em mais três sub-pontos;
- Transferência do balde para os frascos, os quais serão numerados e identificados.
- Acondicionamento dos frascos em bolsas térmicas com gelo.

Concomitantemente à coleta da água, os parâmetros: Temperatura da água, pH, Concentração de Oxigênio Dissolvido, Saturação de Oxigênio Dissolvido, Total de Sólidos Dissolvidos, Condutividade, Salinidade e Altitude foram aferidos com uma sonda multiparamétrica (Hanna Instruments modelo HI 9828) imersa.

Nas amostragens feitas a partir da margem foi feita uma única sub-amostra no ponto 01 e duas no ponto 07, em função da difícil acessibilidade, e no ponto 08, em função da baixa vazão (pequeno córrego). Nesses pontos, a amostra foi feita sem o uso da garrafa de Van Dorn, utilizando-se, porém, o lançamento do balde de coleta, ou o próprio frasco de coleta, no caso do ponto 08.

3.3 ANÁLISE LABORATORIAL

3.3.1 Análise das amostras

As amostras foram mantidas refrigeradas em solução água e gelo até chegarem ao laboratório, sendo analisadas em seguida. As amostras foram conduzidas diretamente aos laboratórios.

3.3.1.1 Análise de coliformes totais e *E.coli*

Foi utilizado um volume de 100 mL de cada ponto coletado para aplicação no *Kit* de quantificação COLILLERT-18. Após 18 h. de incubação a 37°C, foram contados os poços com crescimento. Considerando-se, cor amarela para a presença de coliformes totais e cor fluorescente sob o ultravioleta para a presença de *E. coli*.

3.3.1.2 Análise de *Pseudomonas aeruginosa*:

Foram semeados 100 mL da amostra de água no meio de Agar Cetrimide, após foi feita a incubação por 18h, com observação e contagem no dia seguinte de colônias de coloração esverdeada ou incolor sugestivas de *P. aeruginosa*. As colônias foram repicadas para identificação bioquímica.

3.3.1.3 Análise de Enterobactérias e bactérias heterotróficas:

Foram semeados 100 microlitros da amostra de água nos meios de Agar Nutriente, Agar Eosina-azul de metileno e Agar Bile Esculina acrescido de Azida sódica as 0,025%, após foi feita a incubação por 18h a 37°C, com observação e contagem no dia seguinte. As colônias foram repicadas para identificação bioquímica.

3.3.1.4 Análise de leveduras

3.3.1.4.1 Meios de cultura

O isolamento das leveduras foi feito com o emprego de duas variantes do meio BIL (Base de Isolamento de Leveduras) cuja composição consta no anexo 10, e foi apresentada por Garcia, (42) e Carvalho, (44). As variantes são:

- a) – BIL + glicose(0,5%) + extrato de leveduras (0,5%) e,
- b) – BIL, sem a utilização de glicose + 0,1% de extrato de leveduras + 0,5% galactose

Estas variantes foram suplementadas com diferentes inibidores, como se segue. 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 Cicloeximida (BIL + 0,5 % glicose + 1 mg/L cicloeximida.);
- BILgalci = Bilgalactose cicloeximida(BIL + 0,5 % galactose + 10 mg/L cicloex.);
- BILetanol = BILetanol 4%(BIL+ glicose (0,5 %) + etanol (4 %));
- BILvbc = BILvbc pH 4,0 (BIL + 0,5 % glicose + verde bromocresol 0,01%+ ácido propiônico 0,05%).

Em Junho/2009 foi feita uma coleta ensaio, cujas amostras foram processadas e incubadas a 28°C, com o meio GYP+cloranfenicol 400mg/L+ amoxicilina 500mg/L.

3.3.1.4.2 Processamento das amostras em membrana filtrante

As amostras foram homogeneizadas 25 vezes manualmente antes de serem aliqotadas. Sobre as membranas, primeiramente, foram vertidos aproximadamente 30 mL de água destilada estéril, para tornar mais uniforme a distribuição das células, contidas na amostra, sobre a membrana. Em seguida foram pipetadas as alíquotas de 0,1 mL, 1 mL e 10 mL das amostras sobre as membranas-filtrantes, com porosidade 0,8 µm, pretas e quadriculadas (o meio BILvbc foi empregado em membranas brancas 0,8 µm).

As alíquotas foram filtradas com o auxílio de um sistema bomba-de-vácuo/Kitassato/funil-inox, e sobrepostas em placas de Petri 60mm, contendo 2,6 mL dos meios de cultura em caldo, além de suporte absorvente fornecido pelo fabricante. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa a 28+/- 0,5°C por 48h.

Após 48 horas, as placas foram lidas, e as contagens das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) foram convertidas para o número correspondente para UFC/100mL, e as colônias representativas dos diferentes morfotipos foram repicadas em meio GYP (2% glicose, 0.5% extrato de leveduras e 1% peptona) para obtenção de culturas puras, e posterior identificação.

3.3.1.4.3 Processamento das amostras em culturas de enriquecimento

Alíquotas de 0,1 mL, 01 ml e 10 mL de cada amostra foram inoculadas em tubos contendo 9,9 mL, 9 ml e 10 ml de BIL(glicose, etanol e galactose), concentrados 1x, 1x e 2x

(nos inóculos 0,1 mL, 1,0 mL e 10 mL, respectivamente). Para os inóculos de volumes 0,1 mL e 1,0 mL foram usados tubos de 10 mL (16 x 150 mm), e para os inóculos 10 mL foram usados tubos de 20 mL (18 x 150 mm).

Após 07 dias de incubação a 28°C, foi feita a estimativa do número indicado (N.I.) (46,53, 62). Para tal, entende-se que tenha sido inoculado, juntamente com a alíquota da amostra, **ao menos uma célula de levedura** nos tubos que apresentaram crescimento positivo. O crescimento típico de leveduras é evidenciado pela turvação do meio, precipitação de massa celular típica e formação de bolhas de gás, muitas vezes formam-se hifas de fungos filamentosos, principalmente na superfície. A formação de gás representa mais a fermentação do tipo de açúcar utilizado no meio de cultivo. Quando os tubos mostraram crescimento positivo, converteu-se, através de uma regra de três simples, o número de **ao menos uma célula de levedura** presente no volume da amostra que foi inoculado, para o número correspondente em 100 mL da amostra. Levou-se em conta o resultado positivo obtido na leitura do menor inóculo empregado em cada amostra.

No mesmo prazo, estriou-se uma alçada de cada cultura em meio GYP para isolamento das colônias e obtenção de culturas puras dos diferentes morfotipos de colônias e posterior identificação.

3.4 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

As culturas foram analisadas fenotipicamente de acordo com caracterização preconizada por Yarrow (70) e Carvalho (44), e consistiu nas etapas apresentadas nas seções 3.4.1. a 3.4.6.

3.4.1 Análise da morfologia da colônia

Cada colônia isolada foi analisada quanto às suas características macromorfológicas, segundo critérios descritos por Yarrow (70):

- Cor do pigmento da colônia;
- Pigmentação do meio de cultura;
- Tamanho da colônia;
- Característica da margem;
- Característica da superfície;
- Textura;
- Brilho;
- Forma da superfície.

3.4.2 Análise da micromorfologia da célula

Foram feitas lâminas das culturas e analisadas quanto à morfologia da célula, segundo critérios descritos por Yarrow (70):

- Forma da célula;
- Existência e tipo de hifa;
- Posição do brotamento;
- Divisão por fissão celular;
- Formação de balistosporos;
- Formação de artrosporo;
- Formação de Ascosporo;
- Forma do ascosporo;
- Número do ascosporo;
- Forma do ascus.

3.4.3 Análise de assimilação de fontes de carbono

As análises de assimilação de fontes de carbono foram procedidas conforme os trabalhos de Yarrow (70), Carvalho (44), Garcia (42) e Ribeiro (47). As culturas obtidas na etapa de isolamento foram esgotadas por um período de 5 dias em 2 mL de meio contendo 0,7% de YNB (Yeast Nitrogen Base - Difco) e 0,1% de glicose, de forma a consumirem toda a reserva de açúcares endógenos. A fim de se analisar quais fontes de carbono as leveduras em cultura poderiam utilizar, alíquotas dos esgotamentos foram transferidas como inóculo para os testes de assimilação. Esses testes também foram realizados com o meio 0,7% de YNB (Yeast Nitrogen Base – Difco), acrescido 2% de ágar e 0,5% de uma fonte de carbono.

Ao todo foram testadas 34 fontes de carbono (Arbutina, celobiose, citrato, D-arabinose, D-glucito, ID-manitol, eritritol, Etanol, galactitol, galactose, glicerol, glucose, glucosamina, Inulina, lactato, lactose, L-arabinose, maltose, melezitose, melibiose, Metanol, mio-inositol, rafinose, ramnose, ribitol, ribose, sacarose, salicina, sorbose, succinato, trealose, xilitol, xilose, α -D-glucoside). A inoculação foi realizada utilizando a técnica de “*replica-plate*”, que consiste na inoculação simultânea de 32 culturas com o auxílio de um multi-inoculador de aço inoxidável em placas, as quais, cada uma, contém um meio de cultivo com um tipo de açúcar diferente.

3.4.4 Análise de assimilação de fontes de Nitrogênio

Ainda com base nos mesmos trabalhos, a fim de se saber quais fontes de nitrogênio as leveduras em cultura poderiam utilizar, estas foram esgotadas por um período de 5 dias em 2 mL de meio contendo 0,7% de YCB (Yeast Carbon Base - Difco), de forma a consumirem toda a reserva de nitrogênio endógeno. Alíquotas dos esgotamentos foram utilizadas como inóculo nos testes para verificação de quais fontes são assimiláveis. Esses testes foram realizados utilizando o meio contendo 0,7% de YCB (Yeast Nitrogen Base – Difco), 2% de

ágar e 0,5% de uma de duas fontes de nitrogênio: nitrito e nitrato. A inoculação seguiu o mesmo procedimento exposto na seção 3.4.3

3.4.5 Análise de tolerância a inibidores

Os testes de tolerância a inibidores foram realizados empregando-se os mesmos procedimentos descritos na seção 3.4.3. Neste caso, utilizou-se meio GYP como base, acrescido, em cada placa, com um dos seguintes inibidores: cicloeximida 0,1% e 0,01% e cloreto de sódio 10% e 15%.

3.4.6 Análise de crescimento em diferentes temperaturas

Os testes de crescimento em diferentes temperaturas foram realizados empregando-se os mesmos procedimentos descritos na seção 3.4.5, sem os inibidores, e incubando-se as placas sob as temperaturas de 28 °C, 37 °C e 40 °C, controladas ($\pm 1,0$ °C).

3.5 AGRUPAMENTO FENOTÍPICO E IDENTIFICAÇÃO DAS CULTURAS

Os resultados das etapas análise de assimilação de nutrientes, análise de tolerância a inibidores, análise de crescimento sob diferentes temperaturas, análise da morfologia da colônia e análise da micromorfologia da célula, foram organizados em uma tabela para agrupamento fenotípico das culturas obtidas na fase de isolamento. Os agrupamentos foram feitos por semelhança baseada nos resultados dessas análises e, a seguir, empregou-se as

chaves de identificação de Barnett *et al.* (71) e as chaves de identificação polifásica da página eletrônica da CBS (72).

As identificações foram checadas com as descrições de espécies de Kurtzman & Fell (41) e CBS (Kew Fungal Biodiversity Centre) (72). A partir de então, culturas representativas de cada grupo foram escolhidas para a caracterização molecular.

3.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS CULTURAS

3.6.1 Extração de DNA

Após a identificação, foi procedida a extração de DNA das culturas representativas de cada grupo fenotípico. A extração seguiu o protocolo otimizado por Ribeiro (47) constante no anexo 11.

3.6.2 Amplificação das regiões gênicas estudadas

A partir das extrações de DNA, procedeu-se a amplificação das sequências-alvo para a identificação. A amplificação foi procedida com os iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e NL-4 (GGTCCGTGTTTCAAGACGG), de forma a polimerizar a região que contém essas sequências: região D1-D2 do gene codificador das sub-unidade maior do ribossoma (LSU), as regiões espaçadoras intergênica (ITS1 e ITS2) e o gene codificador da sub-unidade ribossomal 5.8S. Utilizou-se o protocolo de amplificação de Ribeiro (47), constante no anexo 12.

3.6.3 Sequenciamento da região D1/D2 do gene da sub-unidade grande do ribossomo

O PCR foi purificado para retirada de iniciadores e enzimas utilizadas na reação de amplificação. A purificação foi realizada com o sistema de purificação Ilustra GFX PCR DNA & Gel Band da G&E Healthcare, conforme orientação do fabricante, e também de acordo com o trabalho de Ribeiro (47). O *amplicon* da região em estudo foi distribuído em placa de 96 poços (Applied Biosystems- PN.:N8010560) juntamente com os respectivos iniciadores e água deionizada (quando necessário), perfazendo um volume final 7,5 µL por poço; e enviado para sequenciamento e posterior identificação das amostras, na PLATAFORMA DE SEQÜENCIAMENTO DE DNA PDTIS/FIOCRUZ (Seqüenciador 48-Capilar ABI3730, que emprega o *Kit ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction V3*).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em busca de correlações que permitam entender melhor as contagens e a distribuição das leveduras obtidas no estudo, foram conduzidas análises de dados:

3.7.1 Tabela de médias paramétricas

A tabela de médias paramétricas consistiu nas médias geométricas das contagens de microrganismos e médias aritméticas dos resultados físico-químicos por ponto de coleta.

Os dados dessa tabela foram analisados utilizando o método de Regressão Múltipla (RM) e correlações de *Pearson (P)*.

3.7.2 Tabela de frequência dos isolamentos das leveduras

Foram montadas tabelas das frequências das leveduras divididas pelos pontos de coleta, e também pelas frequências das leveduras pelas espécies mais isoladas durante o estudo, assim como nos pontos que se mostraram distintos em termos de poluição.

4. RESULTADOS

4.1 CONTAGENS DE LEVEDURAS EM MEIOS BIL, E OUTRAS VARIÁVEIS DE QUALIDADE DA ÁGUA.

Em Junho/2009 foi feita uma coleta ensaio, cujas amostras foram processadas e incubadas a 28°C, com o meio GYP + Cloranfenicol 400mg/L + amoxicilina 500mg/L. Não foram obtidas leituras com contagens significativas em função do crescimento excessivo de fungos filamentosos. A tabela 01 mostra os resultados das contagens de leveduras em enriquecimento (N.I. células/ 100mL) e em membrana filtrante em (UFC/100mL), com as variações do meio BIL (glicose, galactose, VBC e etanol), realizadas de acordo com a seção 3.3.1.4.1. Também são apresentados os resultados de outras variáveis biológicas e físico-químicas.

As coletas de Agosto/2009, foram feitas sob sol. Em setembro, período de menor vazão dos rios, a coleta foi feita sob chuva moderada. As coletas de fevereiro/10 (verão), Abril/10 (após período de inundações em todo o Estado do Rio de Janeiro) e Junho/10 (final do Outono), foram realizadas sob sol. Em junho/2010 verificou-se intensa floração fitoplanctônica nos pontos 04, 05 e 06. O NMP de *E. coli* estiveram sempre abaixo de 1000 células/100mL, nos pontos amostrados (anexo 05).

O pH (anexo 02) variou entre 6,1 na amostra 03 e 7,6 na amostra 05, ambos em junho. A Demanda Bioquímica de Oxigênio medida em cinco dias (DBO₅) variou de 3,16 mgO/L na amostra 08 em junho a 54,7 na amostra 05 também em junho (tabela 01).

Tabela 01: contagens de leveduras e outros parâmetros.

Amostra	BIL _{glc} /enr (cels/100mL)	BIL _{galc} /enr (cels/100mL)	BIL _{etanol} /enr (cels/100mL)	BIL _{glc} /MF UFC/ 100mL	BIL _{galc} /MF UFC/ 100mL	BIL _{bc} /MF UFC/ 100mL	BIL _{etanol} /MF UFC/ 100 ml	DBO mgO /L	OD mgO/L	SDT mg/L	Colifor mes totais UFC/ 100mL	<i>E. coli</i> UFC/ 100mL
Ago P1	>=10	>=10	<10	na	1,70 x10 ²	1,20 x10 ²	na	9,44	7,8	9	8,86 x10 ³	6,30 x 10 ²
Ago P2	>=1000	>=10	>=100	2,18 x10 ³	2,16 x10 ³	1,69 x10 ³	na	17,33	6,7	46	2,93 x10 ²	3,0 x 10 ¹
Ago P3	>=1000	>=10	>=100	4,50 x10 ³	3,30x10 ⁴	3,60 x10 ⁴	na	7,27	4,0	3,5	2,43 x10 ²	3,1 x 10 ¹
Ago P4	>=1000	>=10	>=100	8,00 x10 ³	9,10 x10 ³	8,00 x10 ³	na	12	5,67	18	<10	<10
Ago P5	>=1000	>=10	>=100	4,70 x10 ³	4,50 x10 ³	2,50 x10 ³	na	9,69	7,44	19,5	<10	<10
Ago P6	>=1000	>=10	>=100	4,50 x10 ³	5,50 x10 ³	5,50 x10 ²	na	5,74	6,57	18,5	<10	<10
Set P1 ^{Ch}	>=1000	>=10	<10	1,21 x10 ³	1,82 x10 ⁴	1,12 x10 ⁴	na	37,42	10,18	12	4,82 x10 ²	6,2 x 10 ¹
Set P2 ^{Ch}	>=1000	>=10	>=100	5,46 x10 ³	7,08 x10 ³	6,11 x10 ³	na	38,82	9,25	42	5,2 x10 ¹	1,0 x 10 ¹
Set P3 ^{Ch}	>=1000	>=10	>=100	5,74 x10 ³	1,093 x10 ⁴	1,62 x10 ³	na	11,68	9,25	<1	6,2 x10 ¹	4,1 x 10 ¹
Set P4 ^{Ch}	>=1000	>=10	>=100	1,80 x10 ³	4,00 x10 ⁴	3,00 x10 ⁴	na	14,1	10,19	18	<10	<10
Set P5 ^{Ch}	>=10	>=10	>=100	5,12 x10 ³	6,24 x10 ³	4,43 x10 ³	na	11,9	11,36	19	8,4 x10 ¹	2,0 x 10 ¹
Set P6 ^{Ch}	>=100	>=10	>=100	4,74 x10 ³	3,68 x10 ³	4,54 x10 ³	na	13,56	11,09	19	<10	<10
Fev P1	>=10	>=10	>=100	3,90 x10 ²	1,50 x10 ³	1,70 x10 ²	2,01 x10 ²	4	3,85	11	9,85x10 ³	2,00 x 10 ²
Fev P2	<10	>=100	>=100	3,00 x10 ²	30 x10 ²	4,00 x10 ²	3,80 x10 ²	48,95	5,5	29	6,30 x10 ²	< 10
Fev P3	>=1000	>=100	>=100	2,41 x10 ³	2,70 x10 ³	8,10 x10 ²	1,70 x10 ³	17,15	7,8	<1	4,62 x10 ²	1,0 x 10 ¹
Fev P4	<10	>=100	>=10	9,00 x10 ²	9,00 x10 ²	5,30 x10 ²	4,40 x10 ²	4,46	4,7	16	7,0 x10 ¹	< 10
Fev P5	>=100	>10	>=10	2,50 x10 ²	8,00 x10 ²	2,40 x10 ²	3,00 x10 ²	23,88	5,5	16	1,31 x10 ²	< 10
Fev P6	>=1000	>10	>=100	6,00 x10 ²	6,00 x10 ²	7,00 x10 ²	4,20 x10 ²	14,19	5,2	15	1,0 x10 ¹	< 10
Fev P7	>=1000	>=100	>=100	2,70 x10 ³	7,00 x10 ³	1,57 x10 ²	2,10 x10 ³	12,23	1,73	53	5,34x10 ³	1,42 x 10 ²
Fev P8	<10	<10	<10	4,10 x10 ²	4,00 x10 ³	2,00 x10 ²	6,00 x10 ¹	5,74	3,25	20	1,86x10 ³	3,1 x 10 ¹
Abri P1	>=1000	>=100	>=100	4,00 x10 ²	1,40 x10 ²	9,00 x10 ¹	3,00 x10 ²	7,62	7,33	15	5,28x10 ³	2,00 x 10 ²
Abri P2	>=100	>10	>=100	4,00 x10 ²	6,00 x10 ²	4,10 x10 ²	<1	15,6	6,72	28	9,59x10 ²	2,0 x 10 ¹
Abri P3	>=1000	>=100	>=100	<1	8,00 x10 ²	1,70 x10 ²	1,80 x10 ³	49,36	2,96	8	8,6 x10 ¹	2,0 x 10 ¹
Abri P4	>10	<10	<10	<1	<1	<1	<1	34,05	6,34	22	4,1x10 ¹	< 10
Abri P5	>10	<10	>=10	<1	1,00 x10 ¹	2,00 x10 ¹	1,00 x10 ²	42,71	6,65	17,5	4,81x10 ²	1,0 x 10 ¹
Abri P7	>=100	>=100	>=100	4,00 x10 ³	5,12 x10 ³	2,9 x10 ³	1,80 x10 ³	28,98	4,57	29	1,01x10 ⁴	8,1 x 10 ¹
Abri P8	>=10	<10	>=100	1,00 x10 ²	<1	<1	<1	4,63	7,74	19	2,92x10 ³	4,1 x 10 ¹

Por simplificação, as leituras dos enriquecimentos, referem-se aos limites da ordem de grandeza a que correspondem, situando-se de fato, na faixa de valores que não chegam à ordem de grandeza seguinte. Na= não analisado. ^{Ch} = coleta realizada sob chuva moderada. ^{FA} = coleta realiza em momento de floração algal.

Tabela 01(continuação): contagens de leveduras, e outros parâmetros.

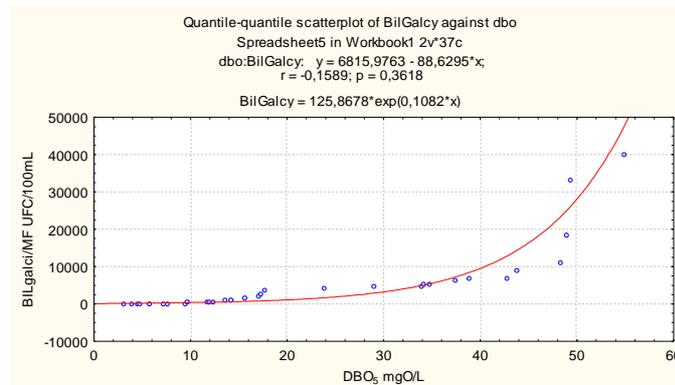
	BILgalci/ enr	BILgalci/ enr	BILetanol /enr	BILgalci/ MF	BILgalci/ MF	BILvbc/ MF	BILetanol/ MF	DBO	OD	SDT	Coliformes totais	<i>E.coli</i>
Amostra	(ce/s/100mL)	(ce/s/100mL)	(ce/s/100mL)	UFC/ 100mL	UFC/ 100mL	UFC/ 100mL	UFC/ 100 ml	mgO /L	mgO/L	mg/L	UFC/100mL	UFC/ 100mL
Jun P1	>=10	<10	>=10	1,63 x10 ³	4,00 x10 ²	2,10 x10 ²	8,00 x10 ²	9,67	8,67	18	4,43x10 ³	2,00 x10 ²
Jun P2	<10	<10	>=10	8,14 x10 ²	1,00 x10 ³	1,00 x10 ²	1,08 x10 ³	48,25	8,29	44	1,89x10 ²	1,0 x10 ¹
Jun P3	<10	<10	>=100	2,10 x10 ³	9,00x10 ²	5,00 x10 ²	7,60 x10 ²	17,64	7,43	11	7,4x10 ¹	1,0 x10 ¹
Jun P4 FA	<10	>=10	>=10	1,00 x10 ²	1,00 x10 ²	1,70 x10 ²	4,10 x10 ²	34,64	8,01	20	1,0x10 ¹	< 10
Jun P5 FA	<10	<10	<10	3,00 x10 ²	1,00 x10 ²	2,00 x10 ¹	1,50 x10 ²	54,77	9,56	25	1,0x10 ¹	< 10
Jun P6 FA	>=100	<10	>=10	<1	<1	2,10 x10 ²	1,10 x10 ²	33,83	8,67	24	< 10	< 10
Jun P7	>=1000	>=10	>=100	6,00 x10 ³	4,70x10 ³	5,50 x10 ³	5,40 x10 ³	43,86	5,64	51	1,01x10 ⁴	5,00 x10 ²
Jun P8	>=10	<10	>=10	2,00x10 ²	<1	5,00 x10 ¹	1,20 x10 ²	3,16	9,03	25	4,0x10 ¹	< 10

Por simplificação, as leituras dos enriquecimentos, referem-se aos limites da ordem de grandeza a que correspondem, situando-se de fato, na faixa de valores que não chegam à ordem de grandeza seguinte. Na= não analisado. ^{Ch} = coleta realizada sob chuva moderada. ^{FA} = coleta realiza em momento de floração algal.

O Oxigênio dissolvido esteve entre 1,73mg/O/L na amostra 07 em fevereiro a 11,4 em setembro na amostra 05(tabela 01). O Sólidos Dissolvidos Total (SDT) variou de 0 (zero) mg/L no ponto 03 em Setembro e fevereiro, a 51 mg/L em junho, ponto 04 (tabela 01). As demais variáveis microbiológicas utilizadas no estudo encontram-se no anexo 01. As demais variáveis físico-químicas encontram-se no anexo 02, e a relação das bactérias potencialmente patogênicas no anexo 03. Os resultados das análises de Caracterização fenotípica encontram-se nos anexos 06 e 07.

As análises dos dados brutos retornaram poucos resultados significativos ou elucidativos. Um resultado a se destacar foi a relação não linear das contagens de leveduras em BILgalci/MF com a DBO₅, como se vê no gráfico do tipo *quantile-quantile* (fig.02), à baixo. A curvado, que se inicia paralela ao eixo X (eixo das abscissas), começa uma inflexão após os valores da DBO₅ passarem de 20 mgO/L, e se torna ainda mais evidente após os valores o valor de 40 mgO/L, o que poderia significar uma correlação do tipo exponencial entre as variáveis.

Figura 02: Gráfico de Dispersão *quantile-quantile* leveduras BILgalci/MF/ DBO₅



4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS E QUÍMICOS

Tabela 02: médias geométricas das contagens microbiológicas e médias aritméticas das variáveis físico-químicas.

	BILglíci/enr	Bilgalci/enr	BILetanol/enr	BILglíci/MF	BILgalci/MF	BILVBC/MF	BILetanol/MF	Coliformes totais	<i>E. Coli</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>	DBO ₅	SDT	O D	pH
Unidade	cels/100mL	cels/100mL	cels/100mL	UFC/100mL	UFC/100mL	UFC/100mL	UFC/100mL	NMP/100mL	NMP/100mL	UFC/100mL	mgO/L	(mg/L)	(mgO/L)	-log [H ⁺]
Ponto														
<i>p1</i>	16	6	4	1324	764	337	364	3968	199	1913	13,6	13,0	7,6	6,8
<i>p2</i>	38	7	42	1031	1224	701	74	281	9	4136	33,8	37,8	7,3	6,8
<i>p3</i>	63	25	63	666	3708	1321	1325	135	19	14310	20,6	4,5	6,3	6,4
<i>p4</i>	4	10	25	1897	2392	2156	425	15	5	15849	19,9	18,8	7,0	6,9
<i>p5</i>	4	4	10	448	468	254	165	48	8	5653	28,6	19,4	8,1	7,2
<i>p6</i>	18	2	32	598	590	778	215	9	6	9960	18,4	18,0	7,5	7,0
<i>p7</i>	1000	63	100	6157	6190	4450	4326	8171	179	1000	28,4	39,3	4,0	6,6
<i>p8</i>	16	2	10	218	16	31	46	601	36	794	4,5	21,3	6,7	7,1

A tabela 02 mostra as médias geométricas dos parâmetros microbiológicos e as médias aritméticas dos parâmetros químicos, por ponto de coleta. O ponto 07 teve as maiores médias entre as contagens microbiológicas, exceto para *Pseudomonas aeruginosa* e *E.coli*. As menores médias colimétricas foram encontradas no meio do lago. O ponto 08 obteve as menores contagens de leveduras em MF com os meios BILgalci, BILVBC e BILetanol.

As análises de Correlação e de Regressão Múltipla da tabela 02 encontram-se nos anexos 04 e 05. A tabela 03, abaixo, resume os resultados dessas análises realizadas com as médias geométricas dos dados microbiológicos e com as médias aritméticas dos dados físico-químicos.

Tabela 03: Resumo dos resultados das análises estatísticas, realizadas com as médias geométricas dos dados microbiológicos e as médias aritméticas dos dados físico-químicos

Meio de cultura	R Pearson		Regressão Múltipla	
BILglici enr	+ C.totais	p<0,05	+ C.totais	p = ,00198
BILgalci enr	-O ₂ , + C. totais	p<0,05	+temperatura	p = ,00030
BILetanol enr	- O ₂ , - pH	p<0,05	-	
BILglici MF	+ coliformes totais - O ₂	p<0,05	+ coliformes totais, + <i>Pseudomonas</i> sp.	p=,001491
BILgalci MF	- pH	p<0,05	- O ₂ , + <i>Pseudomonas</i> sp., +DBO ₅ , + <i>E. coli</i>	p=,001491
BILVBC MF	+ coliformes totais - O ₂	p<0,05	-	
BILetanol MF	+ coliformes totais - O ₂	p<0,05	- Condutividade	p = ,017589

4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS

Os isolados de todas as amostras identificados como os resultados das análises morfológicas e fisiológicas encontram-se listados nos anexos 06 e 07. Nas fotografias constantes no anexo 08, foram destacados em Eletroforese em gel de agarose 1,75%, os *amplicons* dos isolados de leveduras que seguiram para amplificação (PCR), juntamente com

os padrões de peso molecular 100 pb e LML. No total, foram identificados 236 isolados de 47 espécies, dos quais 25, após agrupamento fenotípico, foram seqüenciados e identificados por biologia molecular. A tabela 12, que mostra as identificações dos isolados seqüenciados, a percentagem de similaridade com as espécies relacionadas, assim como os meios de cultura utilizados, consta no anexo 09.

4.4 FREQUÊNCIA DOS ISOLAMENTOS DAS LEVEDURAS

Como pode ser observado na tabela 04, abaixo, o complexo *Candida famata/C. guilliermondii* foi predominante, e presente em todas as amostras dos pontos internos ao lago (4, 5 e 6).

Tabela 04: Frequência das leveduras de maiores ocorrências no estudo e ponto 08. Pontos: 01 e 07, Locais que apresentam contaminação por esgoto doméstico. Pontos 2-3: Fozes de rios, no do lago. Pontos 4,5 e 6: localizados dentro do Lago de Juturnaíba. Ponto 08: águas comparativamente limpas, sob fragmento bem conservado de mata atlântica.

Pontos de coleta	.1 & 7	.2-3	.4-6	.8
Número de amostras	7	10	15	2
Espécies	Frequências			
<i>Candida famata/C. guilliermondii</i> ?	5	8	14	0
<i>Candida krusei</i>	5	0	1	0
<i>Candida tropicalis</i>	2	0	0	0
<i>Candida valida</i>	2	3	2	0
<i>Candida parapsilosis</i>	2	0	2	0
<i>Rhodotorula sp.</i>	4	3	1	1
<i>Kloeckera sp.</i>	3	0	3	1
<i>Candida intermedia</i>	1	1	2	0
<i>Trichosporon dermatis</i>	0	5	7	0
<i>Candida norvegica</i>	0	0	0	2
Espécies	Frequências relativas			
	1-7	2-3	4-6	8
<i>Candida famata/C. guilliermondii</i> ?	0,71	0,80	1,00	0,00
<i>Candida krusei</i>	0,71	0,00	0,07	0,00
<i>Candida tropicalis</i>	0,29	0,00	0,00	0,00
<i>Candida valida</i>	0,29	0,30	0,14	0,00
<i>Candida parapsilosis</i>	0,29	0,00	0,14	0,00
<i>Rhodotorula sp</i>	0,57	0,30	0,07	0,50
<i>Kloeckera sp.</i>	0,43	0,00	0,21	0,50
<i>Candida intermedia</i>	0,14	0,10	0,14	0,00
<i>Trichosporon dermatis</i>	0,00	0,50	0,50	0,00
<i>Candida norvegica</i>	0,00	0,00	0,00	1,00

Trichosporon dermatis foi o segundo em frequência. Ambos os quais, no entanto, não ocorreram no ponto 08. *C. norvegica* (presente apenas no ponto 08) não foi encontradas nos pontos mais poluídos, (1 e 7). Das 06 ocorrências de *Candida krusei*, 05 foram nos pontos 1 e 7. *Candida tropicalis* também foi isolada no ponto mais impactado por esgotos.

5 DISCUSSÃO

A intensificação das atividades antrópicas, a diversidade de usos que demandam a água, assim como o adensamento populacional, conseqüentemente impactam os mananciais aquáticos, e levam a contínua e crescente necessidade de monitoramento e gerenciamento destes (3,4,11, 14), o que requer, entre outras coisas, um sistema de bioindicadores que confira informações mais seguras à vigilância ambiental e à população (12, 13, 22, 27).

As águas de mananciais bem conservados, devido elas serem cristalinas, são geralmente consideradas próprias pela população, e de tal aspecto que não é raro alguém utilizarem-nas diretamente para o consumo, durante uma caminhada ou excursão, o que, por vezes, pode significar risco à saúde, o que já fora observado por Silva Filho (73). Também não são para as águas mais poluídas a maior carência de informação pois, para estas, os sentidos do olfato e da visão podem ser suficientes para causar objeção ao banho e a outros contatos primários. Evidentemente, não se está aqui considerando questões sociais que impliquem a que muitas vezes pessoas permaneçam em contato com águas nitidamente poluídas; trata-se da existência de conhecimento e informações sobre ser a água própria ou não para o consumo, contato primário ou até secundário. Portanto, seriam as águas de qualidade intermediária, aqui entendidas como aquelas que não se encaixam em nenhum dos casos anteriores, que poderiam representar riscos não perceptíveis aos nossos sentidos, ou não conhecidos por pessoas leigas, ao menos em parte. Em ambos os casos, a existência de informação pode representar uma significativa diferença nas taxas de incidência de doenças infecciosas veiculadas pela água (8, 74).

Concomitantemente a isto, potenciais bioindicadores de qualidade da água aguardam mais estudos que os entenda como tal, e que os qualifique, ou não, para este fim (22). Este seria também o caso das leveduras, que há muito tempo são citadas como potenciais indicadores de qualidade da água (13, 51, 53, 62). Também para este grupo, e para sua

utilização adequada e significativa, são necessários estudos que, agregados a outros já realizados (15, 24, 44, 48, 49, 50, 51, 55, 57, 61, 62, 63) possam ajudar a responder questões como, meios-de-cultura adequados, inibição de interferentes, protocolos de análises, além de mais inventários microbiológicos nos diversos Biomas brasileiros e massa de dados que sustentem análises conclusivas quanto a espécies ou grupos de espécies bioindicadoras. Este projeto buscou situar-se na intercessão dessas necessidades, de forma a contribuir em algumas das lacunas referidas, principalmente em relação aos meios de cultura, à bioprospecção de espécies potencialmente indicadoras e à busca de correlações entre as contagens de leveduras nesses meios com outros parâmetros de qualidade da água.

O lago de Juturnaíba, e coleções aquáticas adjacentes, pareceram boa alternativa como um sistema hídrico modelo, em função de sintetizar em si uma complexa diversidade de microambientes, que coexistem aos variados usos das águas e dos solos em seu entorno (68). Além disso, hipoteticamente, as águas do lago se encaixariam na condição de não ser a avaliação dos sentidos, da visão e olfato, suficiente para classificá-las como próprias ou não ao contato, mas, significativamente diferentes aqui e ali, para uma abordagem analítica. Ou seja, teoricamente, tal diversidade poderia resultar em diferentes “qualidades” de águas, formando um gradiente que interessaria à pesquisa. Foi com base nessas premissas que o lago, e os pontos de coleta, foram escolhidos. Iniciando as coletas, a análise das variáveis descritoras (demais variáveis excluídas as contagens de leveduras) constatou que a qualidade da água não variava tanto, na mesma amostragem, entre os pontos, o que contrariou a premissa que orientara a escolha dos pontos.

Durante o estudo, o NMP de *Escherichia coli* nas amostras do lago não ultrapassou 10^2 células/100mL (tabela 01), o que atenderia ao padrão de balneabilidade estabelecido pela CONAMA 274/00, caracterizando no mínimo aquelas águas como “satisfatórias”, embora não tenhamos “realizado um conjunto de amostras obtidas em cada uma das cinco semanas anteriores” como preconiza a norma. No mesmo período, as bactérias potencialmente patogênicas variaram de 2 a 3 taxa (tabela 07). A existência de 2 a 3 das referidas taxa, concomitante à baixa colimetria do lago, reforça a necessidade de indicadores complementares aos tradicionais (22,74). A análise de risco à saúde representado pelo contato com essas bactérias não foi alvo deste trabalho, mas as chances de um banhista ou trabalhador

entrar em contato com essas bactérias, provavelmente não seriam menores que as chances de serem elas recolhidas em uma amostra de 100 mL dentre os 100 milhões de m³ do lago.

Sendo assim, como o lago recebe esgotos de diversas localidades através de seus afluentes (68), a pequena colimetria observada em suas águas, talvez se dê em função da diluição dos efluentes em um grande volume de água. Assim, esses resultados podem refletir que a entrada de esgotos em Juturnaíba seria relativamente alta, ao contrário do que possa parecer, e que a pesar da diluição, o indicador deste tipo de poluente ainda alcança a ordem de magnitude citada. Além disto, o tempo de residência do Juturnaíba que, ainda segundo os mesmos autores, seria de 38 dias, é, portanto, grande em relação ao pequeno tempo de viabilidade dos coliformes em águas doce, igual ou menor que 58 horas para 90% dos coliformes totais (74), o que é um dos motivos pelo qual este indicador é tantas vezes criticado (17,22-27). Em magnitudes diferentes, estes fatores estarão presentes nos muitos lagos e represas que servem ao consumo, à agricultura, à pesca e ao lazer no Brasil, forçando à redução colimétrica, mas não necessariamente à redução de outras bactérias. Nestes casos organismos que respondam melhor a eutroficação, como as leveduras, seriam mais representativas da qualidade ambiental que os coliformes.

A escolha do lago, como modelo de estudo, mostrou-se acertada, visto serem suas águas reconhecidas como mesotróficas, tanto pela literatura, quando pela análise dos resultados de DBO₅, e ainda em vista da exuberância da vegetação aquática e das propriedades organolépticas observadas pessoalmente no local, o que esteve de acordo com o tipo de água a que se pretendia trabalhar, como consta no capítulo “Objetivo”, além da importância do lago por ser o manancial que abastece uma região balneária, a Região dos lagos, e pelos múltiplos usos a que se prestam suas águas. No entanto, em razão da pequena variação nos níveis de poluição dentro do lago, mostrou-se inconsistente a premissa que orientara a escolha inicial dos pontos amostrados. Em função disto, decidiu-se pelo acréscimo de dois pontos cujas águas eram de qualidades nitidamente “muito” e “pouco poluídas” respectivamente: os pontos 07 e 08. Nesse aspecto, o ponto 07 apresentou a carga de contaminação prevista, e foi descrito pelas variáveis como o de piores águas no estudo, mas as amostras do ponto 08 evidenciaram que durante as incursões e excursões a córregos em ambientes bem conservados, não se deve ter tanta certeza sobre a qualidade da água, ao

menos para consumo, pois ali encontramos até $10^3/100\text{mL}$ coliformes totais. Esses números não devem ser surpresa, dado que nos ambientes florestados, a fauna residente visita os corpos hídricos, às margens dos quais também defeca, além de remexer o sedimento (73). Portanto, poderia não ser desprezível a carga microbiana de origem animal, ou a que colonizaria a matéria orgânica oriunda do dossel arbóreo, da serrapilheira e do sedimento. Não obstante a carga microbiológica, as amostras do ponto 08 mostraram média de DBO_5 muito menores, e nenhum aspecto de florações algais, o que talvez sejam os fatores responsáveis pelo ótimo aspecto visual dessas amostras. Fora os resultados advindos do ponto 07, os resultados dos outros pontos não mostravam diferenças claras e significativas. Isto decorreria de ser a qualidade da água no ambiente algo não estático, mas dinâmico e transiente, o que em cada caso se expressa com maior ou menor intensidade. Se a microbiota reflete tal qualidade, e com ela se correlaciona, então provavelmente com ela também flutua. A análise dos dados de água baseada em pontos de coleta pode ser prejudicada por essas flutuações, que por si, seriam um fator de confundimento nos dados microbiológicos (30, 74). Sendo assim, ao menos em regiões de estações climáticas pouco pronunciadas, as variações da qualidade em curto prazo, decorrentes de precipitações pontuais, ou da simples lavagem de um chiqueiro de porcos dezenas de metros acima no rio, poderiam suplantar os efeitos das variações sazonais, e exacerbar a variância dos dados amostrais.

Os primeiros ensaios do estudo mostraram que a utilização do tradicional meio GYP, em membrana filtrante e espalhamento em placa, resultava em placas repletas de filamentosos e, nas poucas áreas visíveis, observavam-se pequenas contagens de leveduras, que não ultrapassavam uma ordem de magnitude de $10^1 \text{ UFC}/100\text{mL}$. Isto poderia não significar apenas que a população acessada teria sido pequena, mas também que a fração da comunidade acessada teria sido muito pequena. Naturalmente, não interessaria a um estudo de bioprospecção e pesquisa de bioindicadores, que houvessem isolamentos qualitativamente tão pobres. Uma alternativa para fugir dessa interferência seria a diminuição do inóculo; porém, menores inóculos contêm menos células, e, geralmente, resultam em números não significativos de colônias. Por outro lado, a simples inibição de filamentosos, embora resulte maior expressão numérica das leveduras, não elimina a competição entre suas diferentes espécies. Buck & Bubucis (75), enfrentaram esses mesmos fenômenos, de interferência de filamentosos e competição interespecífica, ao tentar isolar

Candida albicans em águas naturais, o que foi superado pelo desenvolvimento de um meio seletivo para esta espécie.

Em nosso estudo, a busca de outro meio de cultivo foi facilitada pela pré-existência da Base de Isolamento de leveduras (BIL), meio que permite o cultivo generalista desses organismos, mas que, porém, também os filamentosos, como visto no trabalho de Carvalho (44). A vantagem encontrada foi a fácil suplementação dos meios BIL, com diferentes inibidores, açúcares e formas de cultivo, que em conjunto renderam sete variantes, as quais puderam favorecer diferentes grupos de leveduras, reduzindo a competição que, nos métodos tradicionais, eliminava parte das espécies da amostra durante o cultivo, semelhantemente ao descrito por Bubucis & Buck (75) ao mesmo tempo em que inibiram os bolores. Os detalhes das formulações das variantes BIL empregadas no estudo podem ser consultadas na seção 3.3.1.4.1. Em linhas gerais, a cicloeximida, um inibidor de filamentosos amplamente conhecido, foi associada à galactose, para formar a variante BILgalci. A mudança para este tipo de açúcar visou conferir seletividade ao meio, focando as leveduras do clado *Debaryomyces*, que inclui *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. famata* e *C. guilliermondii*. Por outro lado, a variante BILglici, utilizou também as propriedades inibitórias da cicloeximida, em menor concentração, associada a um açúcar não seletivo, a glicose, obtendo-se assim, uma variante mais generalista. No BILetanol também se utilizou a glicose, porém associada a um inibidor de fungos filamentosos, bactérias e diversos outros microrganismos, o etanol. Ao mesmo tempo, com esta formulação, buscou-se selecionar espécies fermentadoras resistentes ao etanol, como *Candida krusei* e outras do clado *Pichia membranifaciens*. Por último, o BILvbc, combinou a glicose com o verde de bromo-cresol e ácido propiônico, como forma de tamponar e indicador o pH próximo a 4, quando vira para verde. Colônias de leveduras que reduzam o pH do meio tornam-no amarelo, ou, se fazem aumentar o pH, tornam-no azul. Desta forma, facilitou-se a diferenciação das colônias a partir da fisiologia. Nesta faixa de pH próximo a 04, o meio é apropriado para um número grande de leveduras, mas inibe muitas bactérias e alguns filamentosos. No geral, conseguiu-se alcançar maior expressão quantitativa das espécies selecionadas por cada variante do meio.

Mais especificamente, em relação às leveduras, é conhecido que as populações destas podem ser divididas em dois tipos: o das leveduras oxidativas estritas, e o daquelas que

também podem fermentar (25, 44). Meios ricos e complexos favorecem o isolamento de leveduras ascomicéticas, fermentativas e de crescimento rápido(44). Da mesma forma, águas eutróficas, enriquecidas naturalmente ou artificialmente por esgotos ou fertilizantes; salvo pelas florações algais, ou ainda, as partes profundas de lagos que permanecem estratificados por longos períodos, apresentam menores concentrações de O_2 (4), e poderiam favorecer às leveduras com capacidade fermentativa, que passariam a prevalecer sobre as oxidativas. Tal vantagem não haveria em águas com crescente saldo positivo de Oxigênio. Assim, também, as condições de cultivo em tubos de enriquecimento favoreceriam a anaerobicidade dos meios e às fermentativas, enquanto que o cultivo em membrana daria chances ao crescimento de ambos os tipos.

As contagens de leveduras em Juturnaíba, com os meios BIL, mostraram a alternância destes dois perfis metabólicos. Em nosso estudo, as contagens em meios de enriquecimento foram sempre menores que seus correspondentes em membrana filtrante. Ou seja, provavelmente, os enriquecimentos refletiram prevalentemente as leveduras fermentativas presentes nas amostras. Por este raciocínio, maiores contagens de leveduras nos meios BIL/enriquecimentos refletiriam indiretamente que as amostras se originaram em locais proporcionalmente colonizados por populações adaptadas à águas eutróficas (49, 51).

Em relação às análises em membrana filtrante, há de se destacar o bom rendimento quali-quantitativo dos cultivos realizados com este método. As variantes dos meios BIL apresentaram placas com pouca interferência de bolores. Isto foi mais evidente para BILetanol e BILvbc, um pouco menos para BILgalci, e por último BILglici, o que era esperado por ser, este último, o menos seletivo dos meios testados. Para os três primeiros, houve casos de ser visualmente quase imperceptível a presença de bolores, o que implicou em maior facilidade de discernimento, caracterização, contagem e isolamento das colônias. A utilização de membranas pretas também contribuiu muito neste aspecto, exceto para BILvbc, que resulta em muitas colônias verdes e azuis, as quais contrastam melhor em membranas brancas.

Poderia ser esperado que a utilização de inibidores, ou a mudança de tipo de açúcar, no caso de Bilgalci, resultaria em pequeno número de colônias, em função do efeito seletivo

dos meios. No entanto, o efeito observado foi que as espécies selecionadas, sob menor competição na placa, puderam se expressar melhor, resultando em contagens de até 10^4 UFC/100mL, algo que não é muito comum neste tipo de trabalho (13,49).

As médias de contagens em MF (membrana filtrante), só foram relativamente baixas no ponto 08, onde ocorreram médias menores que 100 UFC/100 mL, exceto em BILglici, onde chegou a 200 UFC/100 mL. Ressalta-se que esta última pode ser considerada uma contagem alta, para um local bem conservado, sob floresta e que tende ao estado oligotrófico. Para este tipo de água, geralmente a literatura relata valores menores que 100 UFC/100 mL (49). O ponto 08 foi o de menor média de DBO_5 , e suas amostras obtiveram contagens que muito se contrastaram com aquelas dos pontos 02 e 07. As contagens médias em BILgalci/MF para o ponto 08 chegaram a ser 80 vezes menores que as do ponto 02, e até quase 400 vezes menores que as do ponto 07. De fato, as contagens em BILgalci/MF já mostravam correlação (não linear) com a DBO_5 nas primeiras análises estatísticas, ainda com os dados brutos (Figura 02), o que veio a ser reforçado na análise de Regressão Multipla (RM) (anexo 04). A RM apontou, além da DBO_5 , também as *Pseudomonas* sp., e *E. coli* como variáveis que corroboram as contagens em BILgalci/MF, além de OD (Oxigênio Dissolvido), com o qual haveria correlação negativa. Um aumento nos valores dessas variáveis, em conjunto, podem apontar para a eutroficação da água. Estes resultados, aliados ao fato de que a filtração em membrana já é uma técnica conhecida, e que as análises foram realizadas com aproximadamente 2,5 mL de meio líquido, sobre os suportes fornecidos em conjunto com a membrana, deu ao método o rendimento, praticidade conveniente às necessidades de um sistema de monitoramento.

Essas vantagens propiciaram as mais de duas centenas de isolamentos representativos dos morfotipos de colônias visualizadas, assim como o avanço da pesquisa no sentido de se estudar o potencial de espécies indicadoras da qualidade da água no complexo hídrico de Juturnaíba. Por outro lado, o agrupamento destes isolados baseado nos meios BILDiferenciais descritos por Garcia (42) deu resultados diferentes para todos os isolados. Isto provevelmente se relaciona ao fato de que se originaram em *habitat* fluido em que não teria havido desenvolvido colônias representativas de um único clone. É mais provável que em um *habitat* assim, as populações sejam continuamente misturadas, em vez de formarem colônias discretas.

A identificação polifásica permitiu encontrar variações fisiológicas entre as descrições padrões de algumas espécies e aquelas observadas nos nossos isolados. O estudo da região D1/D2 do DNA ribossomal mostrou por exemplo, que um isolado teve 100% de similaridade com *Debaryomyces polymorphus*, enquanto que as análises fisiológicas demonstraram que este fermentou fortemente glicose, galactose, sacarose e maltose, o que não está de acordo com a descrição padrão para esta espécie, que é de fermentação lenta a fraca ou negativa (41). Outras espécies, cujos isolados apresentaram diferenças fisiológicas em relação aos padrões específicos seriam *Candida guilliermondii*, *Wickerhamomyces onychis*?, *Candida peltata*, *Candida rhagii*? *Candida* aff. *sorbophila* e *Candida dajiaensis* galactose(+), cujas caracterizações podem ser vistas no anexos 06 e 07, e que precisam ser confirmados posteriormente.

No entanto, o que mais chamou a atenção, foi um grupo de isolados com características que ora os tornam similares a *Candida famata*, anamorfo de *Debaryomyces hansenii*, ora similares à *Candida guilliermondii*. Tipicamente, *C. famata* não cresce a 40°C. Muitos dos nossos isolados, similares a esta espécie, cresceram nessa condição, o que, no entanto, é comum nas descrições (72) de *C. guilliermondii*. Por outro lado, um isolado que demonstrou alta similaridade (100%) com a cultura tipo de *C. guilliermondii*, fermentou maltose, o que não é típico. Além do que, nenhum dos isolados, os quais demonstraram 100% de similaridade com esta espécie, cresceu a 40°C. Desta forma, para a maioria desses isolados, a separação entre as duas espécies foi impraticável. Também não foi possível afirmar se trata-se aqui apenas de variações fenotípicas de uma única espécie, características das populações acessadas, o que demonstra uma limitação das descrições padronizadas, e indica necessidade de mais estudos de cunho genético dos isolados em questão. Deste modo, para fins de análise de frequência, esses isolados foram contados sob a identificação de *Candida famata/guilliermondii* (Cfg).

Justamente, este foi o grupo de maior frequência durante o estudo (tabela 04). *C. famata*, *C. guilliermondii* e *C. famata/guilliermondii*(Cfg), em conjunto, foram encontradas dos pontos 01 ao 07, mas não no ponto 08. Em estudos como este, com pequeno número de amostras e alta diversidade de espécies, a ocorrência de um organismo em um ponto, ou

amostra, deve ser levada mais em conta que a ausência, a qual pode decorrer de várias deficiências, desde a coleta até o cultivo. Assim, inicialmente, a ausência do grupo no ponto 08 pode não ter tanto significado, principalmente em função do pequeno número de amostras colhidas, das quais se fez isolamentos. A frequência relativa (0,80) do grupo Cfg no ponto 01, à montante do lago e nos 02 e 03 (0,80), nas fozes dos rios para o lago foi um pouco menor que a dos pontos internos ao lago, pontos 04 a 06, aonde chegou a 100% das amostras (tabela 04). Seriam necessários mais estudos de campo para se entender melhor, e com maior acerto, a autoecologia destas espécies.

Apenas teoricamente, poderíamos formular um quadro da ocorrência temporal e espacial dessas no complexo hídrico de Juturnaíba. Para tal, precisa-se considerar que as maiores contagens obtidas no lago foram em BILgal/MF, como também, as correlações exponenciais das UFC neste meio com a DBO₅, o perfil metabólico de parte das populações acessadas, assim como a distribuição geográfica dos isolamentos identificados. A partir dessas considerações, seria possível que este grupo, não isolado na nascente (ponto 08), crescesse melhor a partir dos trechos de planícies dos rios (pontos 01, 02 e 03), onde as algas e macrófitas são comuns (68), e os exudatos ricos em açúcares, ganham relativa importância tanto na composição da matéria orgânica biodisponível, quanto para as leveduras ascomicéticas (49). *C. famata* e *C. guilliermondii* estão entre as espécies mais encontradas associadas a algas, em várias partes do mundo (49). Dentro do lago, além da matéria orgânica, eventos, como o regime de chuvas (57) e as florações algais (59,60) influenciariam fortemente tais populações. Assim, como no trabalho de Almeida (57), *D. hansenii* (Teleomorfo de *C. famata*) teria sido removido do lago de Juturnaíba no período chuvoso de abril de 2010.

Além desse grupo, outras espécies menos frequentes, também se destacaram pela distribuição de suas ocorrências. Neste caso, *C. krusei* foi isolada seis vezes, das quais cinco nos pontos 01 e 07, que são aqueles que alcançaram maiores contagens de coliformes e também foi isolada uma vez no meio do lago. *C. krusei* não foi isolada em BILgalci, o que era esperado em função de que esta espécie não pode assimilar galactose. Essa, no entanto, foi isolada em MF, com os meios BILvbc e BILetanol, e enriquecimentos, com BILglici. A literatura consta inúmeras alusões à ocorrência de *C. krusei* em locais impactados por

poluição fecal (13,37,49) o que apóia os achados nos rios Capivari(p 01) e valão das caixas(p 07). Sendo sua origem ligada a contaminação fecal, sua frequência no lago tornar-se-ia rara em função da diluição e da não adaptação ao meio.

C. intermedia não ocorreu no ponto 08, mas em função da baixa frequência de isolamentos nos rios e no lago (Tabala 04), seria de se esperar que se requeresse mais coletas para se verificar sua presença na nascente (p 08), e assim, poder fazer-se alguma inferência sobre as espécies. Inversamente, *C. norvegica* foi detectada nas duas amostragens do ponto 08 das quais se buscou fazer isolamentos, mas não foi isolada nos outros pontos, apesar de neles serem feitas 31 outras amostras. Parece então, que *C. norvegica* se beneficia das condições prevalentes no ponto 08. O que não foi possível explicar melhor, requerendo mais dados para tal. No entanto, segundo Allen Hagler², esta espécie assimila bem celobiose, estando associada à degradação da celulose nos ecossistemas florestais.

Kloeckera sp., que ocorreu bem distribuidamente, mas em baixa frequência (tabela 04), e mais concentradamente nas amostras de abril. *Kloeckera* sp. ocorreu nos pontos mais poluídos e também no controle negativo de poluição. Parece assim, que sua dinâmica também foi mais influenciada pelas chuvas do verão, e nos pontos aparentemente mais influenciáveis pelo *deflúvio superficial*. Este foi o caso dos pontos 01 e 07, cujas margens se mostram muito alteradas pelo homem; do ponto 05, que fica num ancoradouro em uma pequena enseada; do ponto 04, que fica próximo a estrada de chão que leva à barragem e do ponto 08, estreito e com pequeno fluxo de água. No entanto, o gênero *Kloeckera* não ocorreu no meio do lago, ponto 06, e nem nos pontos 02 e 03, cujas margens encontram-se após um trecho considerável de cobertura vegetal e macrófitas litorâneas. Por outro lado, as *Kloeckera* sp. também estão associadas a celobiose, e seriam esperadas nesses.

Trichosporon dermatis foi isolado em 12/24 amostras dos pontos 02 ao 06, mas não ocorreu nos pontos controles (07 e 08), nem no ponto 01. Porém, *T. dermatis* também não foi isolado em nenhuma amostra de Fevereiro a Abril. Assim, sua ausência nos pontos controles

² Comunicação do Dr. Allen Hagler do IMPPG (UFRJ) Rio de Janeiro.

não deve ser considerada, visto que estes foram introduzidos justamente a partir de fevereiro. Destaca-se que *T. dermatis* formou colônias fáceis de serem percebidas e distinguidas nas leituras das membranas. As principais mudanças observadas entre setembro e fevereiro, foram o aumento da DBO5, o aumento da temperatura e consequente redução do OD. A média da temperatura das amostras das quais esta espécie foi isolada até setembro, foi de 24 °C, só ficando uma vez em 25 °C, enquanto que a temperatura média entre todos os pontos em fevereiro foi de 31°C, com mínima de 29°C no ponto 06, e máxima de 32°C, nos pontos 01, 07 e 08. Porém, *T. dermatis* cresceu bem a 37°C nos testes de temperatura. Considerando Hagler (13) citando Hinzelin(76), este basidiomiceto seria esperado nos pontos 01 e 07, em função da poluição por esgotos ricos em materiais queratinosos, substrato com o qual tem afinidade. Os *T. dermatis* isolados mostraram não fermentar glicose, mesmo após três semanas em nossos cultivos/testes, poderiam então, ter uma dinâmica menos ligada ao deflúvio superficial, e, autoctones, seria mais frequente nos períodos secos do ano, o que concordaria com os trabalhos de Rosa (24) e Morais et al (25). Outros *Trichosporon* spp. foram isolados nos pontos 01 e 07, inclusive em abril.

Também foram isolados outros basidiomicetos, principalmente *Rhodotorula mucilaginosa* e *Cryptococcus* spp. e no período chuvoso. Visto serem os basidiomicetos comumente encontrados sobre vegetais e no solo, poderiam ter chegado aos rios em função do deflúvio superficial após as chuvas naquele período (42, 44, 49,51 e 77). Não teriam, assim, sua ocorrência ligada à poluição orgânica, e às condições propícias à fermentação (44), de modo que maiores frequências relativas destas poderiam indicar águas de boas qualidades (13,51). No entanto, o próprio deflúvio superficial, leva para o *limnon* nutrientes dos solos, os quais contribuem com a poluição e consequentemente, com à eutroficação (4,22,74). Por outro lado, sendo o Juturnaíba considerado um lago mesotrófico (68), o grande número de ascomicetos isolados com os meios BIL durante o estudo está em consonância com sua associação com ambientes aquáticos poluídos por matéria orgânica(49).

Outras espécies foram encontradas, mas com frequências ainda menores, o que torna difícil tecer considerações plausíveis. Alguns isolados sequenciados, e guardados em coleção, não foram suficientemente correlacionados às descrições de nenhuma espécie conhecida, obtendo percentuais de similaridades menores de 99% com as espécies mais próximas, e

poderão resultar na descrição de novas espécies. Este também é o caso de *C. rugopellocosa* com 99,3% de similaridade, mas que apresentou teste positivo para metanol, o que não é o padrão da espécie. A proporção do número de isolamentos e o de espécies identificadas (5/1), além de muitas espécies serem representadas por um único isolado, leva a considerar que não se alcançou toda a fração da comunidade do complexo de Juturnaíba, cultivável com os meios BIL. Novas campanhas na região, com maior esforço de coleta e isolamento, poderão render maior riqueza de espécies. As coletas nessa região reforçaram a idéia do potencial da biodiversidade de leveduras nos ecossistemas tropicais de águas doces, o que instiga e justifica novos inventários semelhantes (14, 42). Da mesma forma, o pequeno número de coletas realizado, permitiu vislumbrar correlações que corroboram a idéia de que, com mais estudos, as leveduras poderão ser usadas como bioindicadores de qualidade da água.

Não se pretende que as leveduras venham a substituir a colimetria como bioindicador, mas propõe-se que sejam complementares a esta. Visto que as comunidades de leveduras aquáticas refletem em seu perfil as condições de seu ambiente, um método que permita caracterizar qualitativa e quantitativamente grupos-alvo reconhecidamente relacionados a determinados tipos de contaminantes, poderá retratar tais condições a curto e médio prazos. Com os meios BIL seletivos em membrana filtrante, temos agora, este método. Necessariamente, deverão ser feitos outros inventários em rios e lagos nos diferentes Biomas do Brasil a fim de aumentar e robustecer a base de dados e o conhecimento sobre estes organismos e suas relações com os diferentes tipos de contaminantes. Também será necessário testar os meios BILseletivos em ambientes marinhos, visto serem estas muito utilizadas para o banho e outras atividades de lazer e profissionais. Assim que obtivermos uma quantidade suficiente de dados que representem bem a diversidade ambiental brasileira, possivelmente poderemos oferecer à sociedade mais uma ferramenta para o monitoramento de nossas águas e gestão dos riscos à saúde que dessas possam advir. Leveduras são um grupo supra-taxonômico, que compreende em torno de duas mil espécies, e não podem ser entendidas com uma coisa só, ou como se fossem uma única espécie, ou ainda, como se todas as espécies de leveduras tivessem as mesmas características. Com mais estudos poderemos também estar mais hábeis a responder quais leveduras podem vir a ser utilizadas como bioindicadores, e não mais se as leveduras o podem.

6 CONCLUSÕES

O método de contagem de leveduras em água aqui apresentado, e que consiste em filtrar as amostras em membrana filtrante (MF) e incubá-las em placa com uma das variantes dos meios BIL seletivos, permite efetivamente contar leveduras em águas eutrofizadas.

As variantes de BIL foram avaliadas quanto ao seu potencial emprego no estudo de leveduras em água doce. Utilizando os meios BIL seletivos, conseguimos obter contagens significativas, acima de trinta colônias, e, até centenas ou mais por membrana filtrante, com pouca interferência de fungos filamentosos, o que não havíamos conseguido, preliminarmente, empregando o meio GYP. Além disso, o pequeno volume de meio utilizado torna o método mais econômico e prático que o emprego de meio líquido em tubos. O uso do meio em caldo sobre o suporte de celulose para a membrana fornecido juntamente com as membranas, permitiu a preparação desses meios, que, sendo ácidos, normalmente causariam problemas de não solidificação do ágar. A menor interferência de filamentosos tornou factível a contagem, isolamento e caracterização das colônias.

As diferenças qualitativas nos isolamentos de leveduras em amostras de águas com características diferentes reforçaram a idéia do potencial destas como bioindicadoras da qualidade da água. A eutroficação, e o decorrente desenvolvimento intenso de algas e macrófitas observado em Juturnaíba, provavelmente favorecem o crescimento das leveduras. De acordo com nossos resultados, *Candida guilliermondii* e espécies similares do clado *Debaryomyces*, incluindo *D. polymorphus*, *Candida tropicalis* e *Candida parapsilosis*, que são comuns em água poluída por compostos orgânicos ou eutroficação, foram isoladas com sucesso por BILgalci e BILvbc. Também houve contagens significantes em BILetanol, o qual selecionou leveduras do clado *Pichia*, incluindo *Candida krusei*, que é comum em águas poluídas por esgotos domésticos.

Portanto, os meios BILseletivos usados neste trabalho, renderam resultados estatisticamente mais confiáveis que uma contagem de leveduras em geral ou total, e com foco em grupos de leveduras conhecidas e associadas com poluição orgânica e eutroficação. Isto em função de as contagens serem mais significativas, e do isolamento de espécies conhecidamente relacionadas a diferentes tipos de poluição, além da menor interferência de bolores. Assim, o método demonstra potencial aplicação no monitoramento de águas eutroficadas.

Outras formas de análise de dados poderiam ser utilizadas e comparadas com aquelas mais comumente empregadas. Por exemplo, em trabalhos futuros poderia ser feito o agrupamento dos resultados não só por pontos de coletas, mas, paralelamente, também pelas amostras com caracterização da qualidade da água semelhantes. Isto poderia reforçar correlações entre contagens em uma determinada variante do meio BIL e a qualidade da água analisada, ou entre estas e espécies de leveduras prevalentes.

A continuação da pesquisa realizada no mestrado consistirá em testar os meios BILseletivos em açudes, em outros rios e lagos dos Estado do Rio de Janeiro. Posteriormente, baseado nos dados regionais, deve ser avaliada a possibilidade de testar águas de outras regiões, como nos rios do Pantanal, no semi-árido, na região amazônica, no Cerrado, assim como nos Campos do Sul, e nos lagos e lagoas do litoral brasileiro.

É importante avaliar o método em águas sob poluição industrial de diversas naturezas, como da indústria petrolífera e detritos dessa atividade. Também Indústria da cadeia produtiva de mineração; Indústria alimentícia e agrícola

As amostragens nestes ambientes aumentarão a base de dados, permitindo resultados mais significativos das análises de leveduras, e maior possibilidade de recomendação futura destas como parâmetro de qualidade da água.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bárcena A. Cidadania Ambiental. In: Prado GFC. Ecopedagogia e Cidadania Planetária (Guia da escola cidadã). 2 ed. São Paulo: Cortez; 2000. p.13-19.
2. Carta da terra. 1992. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/agenda21/arquivos/carta_terra.doc . Acessado em 19/07/2007.
3. May P H, Lustosa MC & da Vinha V (Orgs). Economia do meio ambiente: Teoria e prática. 5ª reimpressão. Rio de Janeiro: Elsevier; 2003.
4. Esteves FA. Fundamentos de Limnologia. 2 ed. Rio de Janeiro: Interciência; 1998
5. Sardinha DS, Conceição FT, Souza ADG de, Silveira, A, Julio, M. de, Gonçalves JCSI. Avaliação da qualidade da água e autodepuração do ribeirão do meio, Leme (SP). Eng. sanit. Ambient. 2008; Vol.13(3): jul/set, 329-38.
6. Rebouças A. Uso inteligente da água. Escrituras; 2004.
7. Suk WA, Ruchirawat KM, Balakrishnan K, Berger M, Carpenter D, Damstra T, et al. Environmental Threats to Children's Health in Southeast Asia and the Western Pacific. Environmental Health Perspectives. 2003; 111 (10):1340-7.
8. World Health Organization (WHO). The gateway to children's environmental health. 2000.
9. Tosetto MS. Tratamento terciário de esgoto sanitário para fins de reúso urbano. Campinas, SP: [s.n.]; 2005.
10. Conejo JGL (Coord.) Disponibilidade e Demandas de Recursos Hídricos no Brasil. Agência Nacional de águas. BRASIL; 2007. Disponível em <http://www.ana.gov.br/sprtew/2/2-ANA.swf>. acessado em 23/06/2009.
11. Mcallister DE, Hamilton AL, Harvey B. Global freshwater biodiversity: striving for the integrity of freshwater ecosystems. Sea Wind. 1997; v. 11, n. 3, p.1-142.
12. Petrucio MM, Medeiros AO, Rosa CA, Barbosa FAR. Trophic State and Microorganisms Community of Major Sub-Basins of the Middle Rio Doce Basin, Southeast Brazil. Brazilian Archives of Biology and Thechnology. 2005; 48(4) : 625-33.
13. Hagler AN. Yeasts as Indicators of Environmental Quality. In: Gábor P(Ed) & Rosa C. Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Springer Berlin Heidelberg; 2006; 515-32.
14. Brandão LR, Rosa CA, Medeiros AO. Yeast diversity in freshwater ecosystems. Advances in Environmental Research. 2010; 5: 1-18.

15. 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. *Braz. J. Biol.* 2004; 64(4): 743-55.
16. Arias ARL, Buss DF, Albuquerque C de, Inácio AF, Freire MM; Egler M, et al. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência & Saúde Coletiva.* 2007; 12(1): 61-72.
17. Barcellosa C, Quitério LAD. Vigilância ambiental em saúde e sua implantação no Sistema Único de Saúde. *Rev. Saúde Pública.* 2006; 40 (1):170-177.
18. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico (PNSB) 2000. Rio de Janeiro: IBGE. BRASIL; 2002. CEF-OPAS/BRASIL. Disponível em www.ibge.gov.br/estatistica/populacao/condicaodevida/pnsb.pdf. Acessado 28/03/08.
19. BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente - Conama. Resolução CONAMA nº 274, de 29 de novembro de 2000. estabelece parâmetros e indicadores específicos, de modo a assegurar as condições de balneabilidade.
20. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. Portaria MS n.º 518/2004 – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005. 28 p. – (Série E. Legislação em Saúde).
21. 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.
22. Rose JB & Grimes DJ. Reevaluation of Microbial Water Quality: Powerful New Tools for Detection and Risk Assessment. Washington: American Academy of Microbiology; 2001.
23. Silva Filho GN, de Oliveira VL. Microbiologia: manual de aulas práticas. 2 ed. Florianópolis: rev UFSC; 2007.
24. Rosa CA, de Resende MA, Franzot SP. de Moraes PB, Barbosa FAR. Distribuição de leveduras e coliformes em um lago do karst do planalto de Lagoa Santa – MG, Brasil. *Rev. Microbiol.* 1990; 21(1):19-24.
25. Moraes PB, Resende MA, Rosa CA, Barbosa FAR. Occurrence and diel distribution of yeast in paleo-karstic lake of southeastern Brazil. *Revista de biologia.* 1996; 27:182-8(A').

26. Peçanha M. Yeasts and others parameters of pollution of the Ribeirão Claro stream in Rio Claro, São Paulo. *Rev. Microbiol.* set. 1996; 27(3):177-81.
27. Mendonça-Hagler LC; Vieira RHSF, Hagler AN. Microbial quality of water, sediment, fish and shellfish in some Brazilian Coastal regions. *Apud* Faria BM, Farjalla VF, Esteves FA(eds). *Aquatic Microbial Ecology in Brazil. Series Oecologia Brasiliensis.* 2001; vol. IX: 197-216.
28. Hagler AN, Mendonça-Hagler LC, Santos EA, Farage S, Siva Filho JB, Schrank A. Microbial pollution indicators in Brazilian tropical and subtropical marine surface waters. *The science of the total environmental.* 1986; 58:151-60
29. Manfio GP(Rel.). Avaliação do Estado Atual do Conhecimento Sobre a Diversidade Microbiana no Brasil. Relatório Final – Revisado. Campinas: PRONABIO. Projeto: Estratégia Nacional Biodiversidade - MMA/GEF/PNUD. Brasil. Ministério do Meio Ambiente – MMA. Secretaria de Biodiversidade e Florestas – SBF. DCBio; Janeiro/2000.
30. Araújo FV, Van Weerelt MDM, Franco GMO, Soares CAG, Hagler NA, Mendonça-Hagler LC. Classification based on coliform counts of coastal waters in metropolitan Rio de Janeiro, Brazil. *Coastal Zone.* 1991; 04:3246-58.
31. Almeida RMA de, Hussar GJ, Peres MR, Ferriani Junior AL. Qualidade microbiológica do córrego “ribeirão dos porcos” no município de Espírito Santo do Pinhal –SP. *Eng.ambient.* 2004; 01(1):.51-56.
32. 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. 2000. Chapter 13.
33. Buss DF, Oliveira RB, Baptista DF. Monitoramento biológico de ecossistemas aquáticos continentais. *Oecol. Bras.,* 12 (3): 339-345. 2008.
34. ASM. Microbial pollutants in our nation’s water: environmental and public health issues. Washington D.C: American Society for Microbiology; 1998.
35. Shah VG, Dunstan RH, Geary PM, Coombes P, Roberts TK, Rothkirch T. Comparisons of water quality parameters from diverse catchments during dry periods and following rain events. *Water Research.* 2007; 41:3655-66.
36. Kanzler D, BuzinaW, Paulitsch A, Haas D, Platzer S, Marth E, et al. Occurrence and hygienic relevance of fungi in drinking water. *Mycoses.* 2007; 51:165–9.

37. Medeiros AO, Kohler LM, Hamdan JS, Missagia BS, Barbosa FAR, Rosa CA. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. *Water research*. 2008; 42: 3921 –29.
38. Buss DF, Baptista DF, Nessimian, JL. Bases conceituais para aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. *Cad. Saúde Pública*. 2003; 19(2): 465-473.
39. Cairns J, Pratt JR. A history of biological monitoring using benthic Macroinvertebrates. 10-27. *In: Rosenberg DM, Resh VH (eds.). Freshwater Biology and Benthic Macroinvertebrates*. Chapman & Hall, New York. 1993.
40. Wurzbacher CM, Brlocher F, Grossart HP. Fungi in lake ecosystems. *Aquat microb ecol*. 2010; 59:125-49.
41. Kurtzman C, Fell J. (Ed.). *The Yeast, a Taxonomic Study*. 4th ed. Amsterdam: Elsevier; 1998.
42. Garcia KM. 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.
43. Shearer CA, Langsam DM, Longcore JE. Fungi in freshwater habitats. *In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS(ed.). Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press. 2004; 513-31.
44. Carvalho PMB. 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.
45. Phaff HJ, Miller MW, Mrak EM. *The life of yeasts: Their nature, activity, ecology and relation to mankind*. Cambridge: Harvard University; 1966.
46. Hagler AN. Application of old isolation methods to compliment modern methods in studies of yeast diversity. Extended abstract. *In: Anais V Congresso Latino Americano de Micologia, Brasilia.. 2005; 207-209*.
47. Ribeiro JR 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. : il.

48. Roth Jr, Frank J, Ahearn DG, Fell JW, Meyers SP, Meyer SA. Ecology and Taxonomy of Yeasts Isolated from Various Marine Substrates. *Limnology and Oceanography*. 1962; 7(2): 178-85.
49. Hagler AN, Ahearn DG. Ecology of Aquatic Yeasts. In: Rose AH, Harrison JS (eds). *The Yeasts*. 2^{ed}. London: Academic press; 1987. 1:181-206.
50. Fell JW, Ahearn DG, Meyers SP, Roth FJJr. Isolation of yeasts from Biscayne bay, Florida and adjacent benthic areas. *Limnology and Oceanography*. 1960; 5(4):366-71.
51. Hagler AN. Ecologia e taxonomia de leveduras em um estuário poluído e ambientes marinhos do Rio de Janeiro. Tese apresentada ao instituto de microbiologia (Doutorado). Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1978.
52. Ceballos BSO de, Lima EO de, König A, Martins MT. Spatial and temporal distribution of fecal coliforms, coliphages, moulds and yeasts in freshwater at the semi-arid tropic northeast region in Brazil (Paraíba State). *Rev Microbiol*. 1995; 26(2): 90-100.
53. APHA; AWWA; WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19th. Belmont: United Book Press inc; 1995.
54. Moreira CG. Avaliação da diversidade e biomassa de fungos associados a folhas em decomposição de *Tibouchina pulchra* cogn. submersas em reservatórios do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. (dissertação). São Paulo 2006.
55. Rose AH, Harrison JS. *The yeast*. 2^a ed. Academic Press Inc. (London) LTD. 1987.
56. Russo G, Libking D, Sampaio JP, Broock MR van. Yeast diversity in the acidic Rio Agrio-Lake Caviahue volcanic environment (Patagonia, Argentina). *FEMS Microbiol Ecol*. 2008; 65:415-24.
57. Almeida JMGCF de. Yeast community survey in the Tagus estuary. *FEMS Microbiology Ecology*. 2005; 53: 295–303.
58. Reissing M, Trochine C, Queimalinos C, Balseiro E, Modenutti B. Impacto of fish introduction on planktonic food webs in lakes of Patagonia Plateau. *Biological Conservation*, 132:437-47
59. Suehiro S. Studies on the marine yeasts. II. Yeasts isolated from *Thalassiosira subtilis* (marine diatom) decayed in flasks. *Science Bulletin of the Faculty of Agriculture Kyushu University*. 1962; 20:101-5.
60. Suehiro S, Tomiyasu Y. Studies on the marine yeasts. V. Yeasts isolated from seaweeds. *Science Bulletin of the faculty of agriculture Kyushu University*. 1962; 12:163-9.

61. Rodrigues PC. Contribuição ao estudo das leveduras em praias da Baixada Santista. São Paulo, Tese(Mestrado) Instituto de Ciências biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Microbiologia e Imunologia. 1978.
62. Cooke WB, Phaff HJ, Miller MW, Shifrine M, Knapp EP. Yeasts in polluted water and sewage. *Mycology*. 1960; 52:210–30.
63. Simard RE. Yeast as an indicator of pollution. *Marine Pollution Bulletin*. 1971; 2: 123-125.
64. Prabhakaran N, Sivadas P. Hydrocarbons degrading yeasts from cochin backwater. *J Mar boil Ass India*. 1995; 37(1& 2): 226-30.
65. Yamaguchi MU, Rampazzo R de CP, Yamada-Ogatta SF, Nakamura CV, Ueda-Nakamura DF, Benedito TP. Yeasts and Filamentous Fungi in Bottled Mineral Water and Tap Water from Municipal Supplies. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2007; 50 (1): 1-9.
66. Schrank A. Método de Número Mais Provável para Contagem de Leveduras em ambientes Aquáticos Poluídos. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Rio de Janeiro: Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1982.
67. Marinho M M, Huszar VL de M. Nutrient availability and physical conditions as controlling factors of phytoplankton composition and biomass in a tropical reservoir (southern, Brazil). *Arch. Hydrobiol*. 2002; 153(3): 443-68.
68. Primo PB da S, Völcker CM. Bacias Hidrográficas dos rios São João e das Ostras. Águas, terras e conservação ambiental. Rio de Janeiro: Escalagrafit;; 1:170. 2003.
69. Marinho M M, Huszar VL de M, Sampaio-Pinto G. Estrutura da comunidade fitoplanctônica da Lagoa de Juturnaíba, Araruama, RJ, Brazil.: Uma comparação entre os períodos anterior e posterior a construção da barragem no Rio São João. *Rev. Brasil. Biol*. 1993. 53(3):453-67.
70. YARROW, D. Methods for isolation, maintenance and identification of yeasts In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. (Org.). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, ed. 4, Amsterdam:Elsevier Science, 1998. p.13-19.
71. Barnett, J. A.; Payne, R. W.; Yarrow, D. 1990. *Yeast Characteristics and Identification*. 2nd ed. Cambridge: University Press, Cambridge. 1200 pp.
72. CBS-KNAW Fungal biodiversity center. An institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. Disponível em: www.cbs.knaw.nl/yeast/BioloMICSID.aspx. Acessado em 10/03/2011.

73. Silva Filho JB da. Avaliação de coliformes e leveduras como indicadores de poluição aquática em rios da floresta da Tijuca, Rio de Janeiro. Tese de Mestrado. Rio de Janeiro: IMPPG/ UFRJ, 1988.
74. World Health Organization (WHO). Monitoring Bathing Waters. In: Approaches to microbiological monitoring - A Practical Guide to the Design and Implementation of Assessments and Monitoring Programmes. Edited by Jamie Bartram and Gareth Rees. 2000.
75. Bubucis PM , Buck JD. Membrane filter procedure for enumeration of *Candida albicans* in natural waters. Applied and Environmental Microbiology. 1978; 3(2):237-42.
76. Hinzelin F, Lactard P. Les levures dans les eaux ecosystems de la Moselle. Hydrobiologia. 1978; 61:209-24
77. Hagler AN, Mendonça-Hagler LC, Rosa CA, Morais PB. Yeasts as an example of microbial diversity in brazilian ecosystems. Oecologia Brasiliensis. 1995; 01: 225-44

ANEXO

Anexo 01. Tabela 05: condições locais no dia da coleta e parâmetros microbiológicos

Observações	Coleta/ponto	BILglici UFC/100mL	BILgalci UFC/100mL	BILVBC UFC/100mL	BILetanol UFC/100mL	<i>Pseudomonas</i> sp UFC/100mL	<i>Enterococcus Sp</i> NMP/100mL
dia de sol - Enxurrada no momento da coleta, >volume, água barrenta	Ago P1	na	170	120	na	2000	0
Dia de sol	Ago P2	2180	2160	1690	na	11000	0
Dia de sol	Ago P3	4500	33000	36000	na	> 50000	0
Dia de sol	Ago P4	8000	9100	8000	na	> 50000	0
Dia de sol	Ago P5	4700	4500	2500	na	42000	0
Dia de sol	Ago P6	4500	5500	550	na	> 50000	0
Coleta realizada sob chuva moderada.	Set P1	12105	18210	11215	na	16000	0
período de menor vazão afluyente durante as coletas(dados prolagos)	Set P2	5460	7080	6110	na	11000	0
Coleta realizada sob chuva moderada.	Set P3	5740	10930	1620	na	6000	0
período de menor vazão afluyente durante as coletas(dados prolagos)	Set P4	18000	40000	30000	na	20000	50000
Coleta realizada sob chuva moderada.	Set P5	5120	6240	4430	na	11000	0
período de menor vazão afluyente durante as coletas(dados prolagos)	Set P6	4740	3680	4540	na	7000	0
verão - dia de sol	Fev P1	390	1500	170	201	8000	0
verão - dia de sol	Fev P2	300	300	400	380	20000	0
verão - dia de sol	Fev P3	2410	2700	810	1700	> 50000	0
verão - dia de sol	Fev P4	900	900	530	440	> 50000	0
verão - dia de sol	Fev P5	250	800	240	300	25000	0
verão - dia de sol	Fev P6	600	600	700	420	40000	0
verão - dia de sol	Fev P7	2700	7000	1570	2100	> 50000	16000
verão - houve resuspensão de sedimento no momento da coleta	Fev P8	410	4000	200	60	5000	3000

Anexo 01. Tabela 05: condições locais no dia da coleta e parâmetros microbiológicos

Observações sobre o dia da coleta	Coleta/ponto	BILglici UFC/100mL	BILgalci UFC/100mL	BILVBC UFC/100mL	BILetanol UFC/100mL	<i>Pseudomonas</i> sp UFC/100mL	<i>Enterococcus</i> Sp NMP/100mL
coleta realizada após as enchentes de abril	Abri P1	400	140	90	300	1000	0
coleta realizada após as enchentes de abril	Abri P2	400	600	410	0	5000	0
coleta realizada após as enchentes de abril	Abri P3	0	800	170	1800	> 50000	0
coleta realizada após as enchentes de abril	Abri P4	0	0	0	0	50000	0
coleta realizada após as enchentes de abril	Abri P5	0	10	20	100	1000	0
coleta realizada após as enchentes de abril	Abri P6	na	na	na	na	7000	0
coleta realizada após as enchentes de abril	Abri P7	4000	5120	2900	1800	0	> 50000
coleta realizada após as enchentes de abril	Abri P8	100	0	0	0	1000	1000
final do outno -sol	Jun P1	1628	400	210	800	0	9000
final do outno -sol	Jun P2	814	1000	100	1080	0	5000
final do outno -sol	Jun P3	2100	900	500	760	0	7000
final do outno - intensa floração fitoplanctônica verde - sol	Jun P4	100	100	170	410	0	2000
final do outno - intensa floração fitoplanctônica verde - sol	Jun P5	300	100	20	150	0	500
final do outno - intensa floração fitoplanctônica verde - sol	Jun P6	0	0	210	110	0	3000
final do outno - sol	Jun P7 A	6000	4700	5500	5400	0	> 50000
final do outno - sol	Jun P7 B	15000	7600	8400	9900	0	> 50000
final do outno - sol	Jun P7 C	9100	7100	8300	7500	0	> 50000
final do outno - sol	Jun P8 A	200	0	50	120	0	44000
final do outno - sol	Jun P8 B	100	300	100	150	0	44000
final do outno - sol	Jun P8 C	600	0	30	190	0	44000

Anexo 2. Tabela 06: condições locais no dia da coleta e parâmetros físico-químicos .

Observações sobre o dia da coleta	Coleta	pH	DBO₅ (mgO/L)	Condutividade de (mS/cm)	Temperatura (°C)	Saturação Oxigênio (%)
dia de sol - Enxurrada no momento da coleta, >volume, água barrenta	Ago P1	7,21	9,44	19,00	22,48	90,5
Dia de sol	Ago P2	6,86	17,33	93,00	24,17	79,6
Dia de sol	Ago P3	6,64	7,27	4,00	23,26	47,2
Dia de sol	Ago P4	7,06	12	36,50	23,93	67,5
Dia de sol	Ago P5	7,24	9,69	37,50	23,33	90,95
Dia de sol	Ago P6	7,29	5,74	36,50	24,24	79,05
Coleta realizada sob chuva moderada.	Set P1	7,04	37,42	24,00	22,89	118,6
período de menor vazão afluyente durante as coletas(dados prolagos)	Set P2	6,83	38,82	84,00	25,21	112,1
Coleta realizada sob chuva moderada.	Set P3	6,56	11,68	0,00	24,66	111
período de menor vazão afluyente durante as coletas(dados prolagos)	Set P4	6,92	14,1	36,00	24,54	122
Coleta realizada sob chuva moderada.	Set P5	7,35	11,86	37,50	25,74	139,1
período de menor vazão afluyente durante as coletas(dados prolagos)	Set P6	7,22	13,56	38,50	25,19	134,1
verão - dia de sol	Fev P1	6,56	4,00	22,00	32,49	53,4
verão - dia de sol	Fev P2	6,93	48,95	57,00	30,04	73
verão - dia de sol	Fev P3	6,28	17,15	0,00	30,33	104,1
verão - dia de sol	Fev P4	7,07	4,46	32,00	29	61,1
verão - dia de sol	Fev P5	7,4	23,88	32,50	31,37	74
verão - dia de sol	Fev P6	na	14,19	30,00	29,31	68,2
verão - dia de sol	Fev P7	6,64	12,23	105,50	32,48	24,1
verão - resuspensão de sedimento durate a coleta	Fev P8	6,66	5,74	39,00	32,17	45,8

Anexo 03. Tabela 07: Relação qualitativa das bactérias isoladas por amostra. *TBPP= soma das diferentes bactérias (*taxa*) potencialmente patogênicas encontradas por amostra.

Amostra Mês/ponto	BGN	BGP	CBGN	CGN	CGP	<i>Cromobacterium violaceum</i>	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. agglomerans</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Serratia Spp.</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Stenotrophomonas-ltophilia</i>	* TBPP
Ago P1	0	2	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	8
Ago P2	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	9
Ago P3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	3
Ago P4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2
Ago P5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	3
Ago P6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
Set P1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	5
Set P2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	4
Set P3	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	4
Set P4	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	4
Set P5	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	5
Set P6	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3
Fev P1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	6
Fev P2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3
Fev P3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	3
Fev P4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
Fev P5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2
Fev P6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Fev P7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	5
Fev P8	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	5
Abri P1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3
Abri P2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3
Abri P3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Abri P4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Abri P5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2
Abri P7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Abri P8	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	5

Anexo 03. Tabela 07: Relação qualitativa das bactérias isoladas por amostra. *TBPP= soma das diferentes bactérias (*taxa*) potencialmente patogênicas encontradas por amostra.

Amostra Mês/ponto	BGN	BGP	CBGN	CGN	CGP	<i>Cromobacterium violaceum</i>	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter gergoviae</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. agglomerans</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>	<i>Serratia Spp.</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	* TBPP		
Jun P1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
Jun P2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Jun P3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Jun P4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Jun P5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Jun P6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Jun P7	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
Jun P8	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2

Anexo 04. Tabela 08: Resultados das análises de Regressão Múltipla (RM)

<p>Multiple Regression Results (Step 4)</p> <p>Dependent: BILglici enr Multiple R = ,99907801 F = 406,1651 R²= ,99815686 df = 4,3 No. of cases: 8 adjusted R²= ,99569935 p = ,000198 Standard error of estimate:22,697554641 Intercept: 251,03452884 Std.Error: 102,2951 t(3) = 2,4540 p = ,0914</p> <p>O (% sat) beta=-,09 Coli totais beta=1,78 E coli beta=-1,0 Conductividade beta=-,08 (significant betas are highlighted)</p>
<p>Multiple Regression Results (Step 3)</p> <p>Dependent: BILgalci enr Multiple R = ,99799122 F = 330,8767 R²= ,99598647 df = 3,4 No. of cases: 8 adjusted R²= ,99297633 p = ,000030 Standard error of estimate: 1,749564229 Intercept: 306,32618592 Std.Error: 17,96901 t(4) = 17,047 p = ,0001 O D (mgO/L) beta=,061 Temp (°C) beta= -,40 O (% sat) beta=-1,2 (significant betas are highlighted)</p>
<p>Multiple Regression Results (Step 7)</p> <p>Dependent: BILetanol enr Multiple R = 1,00000000 F = -- R²= 1,00000000 df = 7,0 No. of cases: 8 adjusted R²= 1,00000000 p = -- Standard error of estimate: -- Intercept: 781,94630897 Std.Error: 0,000000 t(0) = 0,0000 p = 1,0000</p> <p>O D (mgO/L) beta=,361 DBO5 (mgO/L) beta=-,45 pH beta=-1,1 E coli beta=-2,9 Coli totais beta=3,75 O (% sat) beta=,874 Temp (°C) beta=-,04 (significant betas are highlighted)</p>

Anexo 04. Tabela 08 (continuação): Resultados das análises de Regressão Múltipla

<p>Multiple Regression Results (Step 4)</p> <p>Dependent: BILglici MF Multiple R = ,99644043 F = 104,7877 R²= ,99289353 df = 4,3</p> <p>No. of cases: 8 adjusted R²= ,98341824 p = ,001491 Standard error of estimate:249,78285599</p> <p>Intercept: -1195,417066 Std.Error: 514,2015 t(3) = -2,325 p = ,1026</p> <p>Coli totais beta=1,31 E coli beta=-,36 Pseudomonas beta=,398 Conductividade beta=,268 (significant betas are highlighted)</p> <hr/> <p>Multiple Regression Results (Step 5)</p> <p>Dependent: BILgalci Multiple R = ,99902307 F = 204,4240 R²= ,99804710 df = 5,2</p> <p>No. of cases: 8 adjusted R²= ,99316486 p = ,004875 Standard error of estimate:173,91520242</p> <p>Intercept: 9673,8320598 Std.Error: 745,1022 t(2) = 12,983 p = ,0059</p> <p>O D (mgO/L) beta=-,88 Pseudomonas beta=,287 DBO5 (mgO/L) beta=,383 E coli beta=,219 TDS (mg/L) beta=-,18</p>
<p>Multiple Regression Results (Step 7)</p> <p>Dependent: BILVBC MF Multiple R = 1,00000000 F = -- R²= 1,00000000 df = 7,0</p> <p>No. of cases: 8 adjusted R²= 1,00000000 p = -- Standard error of estimate: --</p> <p>Intercept: -11265,91824 Std.Error: 0,000000 t(0) = 0,0000 p = 1,0000</p> <p>O (% sat) beta=-2,3 DBO5 (mgO/L) beta=,369 Pseudomonas beta=,525 pH beta=,519 E coli beta=,334 O D (mgO/L) beta=1,14 Coli totais beta=-,07 (significant betas are highlighted)</p>

Anexo 05. Tabela 09: Resultados das análises de Correlação linear de Pearson

Variable	Correlations (tabela III.sta) Marked correlations are significant at p < ,05000 N=8 (Casewise deletion of missing data)									
	Coli totais NMP/100	C. term. NMP/100mL	Pseudomonas sp. NMP/100mL	DBO5 (mgO/L)	Conduct. (mS/cm)	TDS (mg/L)	O D (mgO/L)	Sat O2 (%)	pH	Temp (°C)
BILglici/enr	0,89	0,59	-0,37	0,33	0,60	0,60	-0,91	-0,91	-0,47	0,23
BILgalci/enr	0,81	0,53	-0,15	0,36	0,41	0,42	-0,94	-0,94	-0,68	0,17
BILetanol/enr	0,58	0,25	0,03	0,48	0,42	0,43	-0,87	-0,86	-0,75	0,22
Bilglici/mf	0,89	0,63	-0,26	0,35	0,60	0,60	-0,86	-0,88	-0,47	0,20
Bilgalci/mf	0,67	0,40	0,11	0,39	0,29	0,29	-0,89	-0,89	-0,76	0,14
BilVBC/mf	0,71	0,40	0,05	0,38	0,46	0,47	-0,87	-0,88	-0,54	0,21
Biletanol/mf	0,85	0,57	-0,20	0,31	0,41	0,42	-0,94	-0,93	-0,61	0,19

Anexo 06. Tabela 10: Morfologia da colônia dos isolados de Juturnaíba.

cultura	espécies	Pigmento vermelho solubilizado	Margem inteira	Margem erodida	Margem filamentososa	Superfície lisa	Superfície rugosa	Textura cremosa	Textura mucoide	Brilhosa	Textura filamentososa	Achatada	Convexa	Ponto central elevado	“Radiating ridges”	“Geotrichum like worms”	Pigmento preto	Pigmento creme	Pigmento Rosa	Branca
1,01	<i>Candida guilliermondii</i> ?	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1		1	0	1	0	1
1,02	<i>Candida krusei</i> fermentation -	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
1,06	<i>Trichosporon dermatis</i> Sugita, Takashima, Nakase et Shinoda	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0		0	0	0	0	1
1,07	<i>Candida intermedia</i> -like	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0		0	0	0	0	1
1,08	<i>Trichosporon dermatis</i> Sugita, Takashima, Nakase et Shinoda	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1		1	0	0	0	1
1,09	C parap	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0		0	0	0	0	1
1,10	<i>Candida intermedia</i> -like	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0		0	0	0	0	1
1,13	<i>Trichosporon dermatis</i> Sugita, Takashima, Nakase et Shinoda	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0		0	0	0	0	1
1,14	<i>Trichosporon dermatis</i> Sugita, Takashima, Nakase et Shinoda	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1		1	0	0	0	1
1,16	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0		0	0	0	0	1
1,17	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0		0	0	0	0	1
1,18	<i>Candida dajiaensis</i> galactose+	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0		0	0	0	0	1
1,20	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0		0	0	0	0	1
1,21	<i>Candida sorbosa</i> - like N2 positive fermentation -	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0		0	0	0	0	1

0 = Característica ausente / 1 = Característica presente / 0,5= Dúvida quanto a presença da característica / ND = dado não disponível

Anexo 06(Continuação). Tabela 10: Morfologia da colônia dos isolados de Juturnaíba.

cultura	espécies	Pigmento vermelho solubilizado	Margem inteira	Margem erodida	Margem filamentosa	Superfície lisa	Superfície rugosa	Textura cremosa	Textura mucoide	Brilhosa	Textura filamentosa	Achatada	Convexa	Ponto central elevado	“Radiating ridges”	“Geotrichum like worms”	Pigmento preto	Pigmento creme	Pigmento Rosa	Branca
		0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
1,22	<i>Candida rhagii?</i> C19 C39	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0		0	0	0	0	1
1,23	<i>Saturnispora hagleri</i> -like C.A. Rosa et al. trehalose	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0		0	0	0	0	1
1,24	<i>Kloeckera apis</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0		0	0	0	0	1
1,25	<i>Trichosporon dermatis</i> Sugita, Takashima, Nakase et Shinoda	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1		1	0	0	0	1
1,26	<i>Saturnispora hagleri</i> -like C.A. Rosa et al. trehalose	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0		0	0	0	0	1
1,27	<i>Candida boidinii</i> ?	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0		0	0	0	0	1
1,28	<i>Candida boidinii</i> ?	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1
1,30	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
1,30	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
1,32	<i>Torulaspota delbruckii</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
1,32	<i>Torulaspota delbruckii</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
1,32	<i>Torulaspota delbruckii</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
1,33	<i>Pichia anomala</i>																			
1,34	<i>Candida pseudolambica</i> ? M .T. Smith & Poot																			
2,01	<i>Rhodospiridium sphaerocarpum</i>				0	0	0		1		0						0	0	1	0
2,02a	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (A. Jörgensen) F.C. Harrison var. <i>mucilaginosa</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,02b	<i>Candida pseudolambica</i> ? M .T. Smith & Poot	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1

0 = Característica ausente / 1 = Característica presente / 0,5= Dúvida quanto a presença da característica / ND = dado não disponível

Anexo 06(Continuação)Figura 11:Tabela da Morfologia da colônia dos isolados de Juturnaíba.

cultura	espécies	Pigmento vermelho solubilizado																		
		Margem inteira	Margem erodida	Margem filamentososa	Superfície lisa	Superfície rugosa	Textura cremosa	Testura mucoide	Brilhosa	Textura filamentososa	Achatada	Convexa	Ponto central elevado	“Radiating ridges”	“Geotrichum like worms”	Pigmento preto	Pigmento creme	Pigmento Rosa	Branca	
2,03a	<i>Trichosporon dermatis</i> Sugita, Takashima, Nakase et Shinoda	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
2,03b	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,06	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,08	<i>Rhodospordium sphaerocarpum</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
2,09	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,10	<i>Trichosporon dermatis</i> Sugita, Takashima, Nakase et Shinoda	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1
2,11	<i>Trichosporon dermatis</i> Sugita, Takashima, Nakase et Shinoda	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,12	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,13a	<i>Trichosporon dermatis</i> Sugita, Takashima, Nakase et Shinoda	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1
2,14	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,15	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,16	<i>Trichosporon dermatis</i> Sugita, Takashima, Nakase et Shinoda	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1
2,17	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,18	<i>Trichosporon dermatis</i> Sugita, Takashima, Nakase et Shinoda	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1

0 = Característica ausente / 1 = Característica presente / 0,5= Dúvida quanto a presença da característica / ND = dado não disponível

Anexo 06(Continuação)Figura 11:Tabela da Morfologia da colônia dos isolados de Juturnaíba.

cultura	espécies																			
		solubilizado	Margem inteira	Margem erodida	Margem filamentosa	Superfície lisa	Superfície rugosa	Textura cremosa	Testura mucóide	Brilhosa	Textura filamentosa	Achatada	Convexa	Ponto central elevado	“Radiating ridges”	“Geotrichum like worms”	Pigmento preto	Pigmento creme	Pigmento Rosa	Branca
2,19	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,20	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,21	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,22	<i>Cryptococcus</i> sp	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1
2,23	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,24	<i>Trichosporon dermatis</i> Sugita, Takashima, Nakase et Shinoda	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,25	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,26	<i>Trichosporon dermatis</i> Sugita, Takashima, Nakase et Shinoda	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,27	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,28	<i>Trichosporon dermatis</i> Sugita, Takashima, Nakase et Shinoda	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1
2,29	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,30	<i>Trichosporon dermatis</i> Sugita, Takashima, Nakase et Shinoda	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1		1	0	1	0	1
2,31	<i>Candida famata</i>	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
2,32	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,33	<i>Trichosporon dermatis</i> Sugita, Takashima, Nakase et Shinoda	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1		1	0	1	0	1
2,34	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,35	<i>Pichia kluyveri</i> Bedford var. kluyveri	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,36	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1

0 = Característica ausente / 1 = Característica presente / 0,5= Dúvida quanto a presença da característica / ND = dado não disponível

Anexo 06(Continuação)Figura 11:Tabela da Morfologia da colônia dos isolados de Juturnaíba.

cultura	espécies																			
		Pigmento vermelho solubilizado	Margem inteira	Margem erodida	Margem filamentosa	Superfície lisa	Superfície rugosa	Textura cremosa	Testura mucoide	Brilhosa	Textura filamentosa	Achatada	Convexa	Ponto central elevado	“Radiating ridges”	“Geotrichum like worms”	Pigmento preto	Pigmento creme	Pigmento Rosa	Branca
2,37	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,39	<i>Candida colliculosa</i> -like fermentation -	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,40	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,42	<i>Candida guilliermondii</i>	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
2,43	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
2,44	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,45	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,46	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,47	<i>Candida famata</i>	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
2,48	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,49	<i>Candida guilliermondii</i> ?	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,50	<i>Candida guilliermondii</i> ?	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
2,51	<i>Yarrowia lipolytica</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
3,01	<i>Candida boidinii</i> ?	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
3,03	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,04	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,05	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,02a	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,02b	<i>Rhodospodium sphaerocarpum</i> ; <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
3,06	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1

0 = Característica ausente / 1 = Característica presente / 0,5= Dúvida quanto a presença da característica / ND = dado não disponível

Anexo 06(Continuação). Tabela 10: Morfologia da colônia dos isolados de Juturnaiba.

cultura	espécies																			
		Pigmento solubilizado	Margem inteira	Margem erodida	Margem filamentosa	Superfície lisa	Superfície rugosa	Textura cremosa	Testura mucoide	Brilhosa	Textura filamentosa	Achatada	Convexa	Ponto central elevado	“Radiating ridges”	“Geotrichum like worms”	Pigmento preto	Pigmento creme	Pigmento Rosa	Branca
3,07a	<i>Debaryomyces vanrijae</i> -like C8, C18, C26, C31	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,07b	<i>Trichosporon dermatis</i> Sugita, Takashima, Nakase et Shinoda	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1		1	0	1	0	1
3,07bb	<i>Candida guilliermondii</i> ?				1	0	1		0		0									
3,07bc	<i>Trichosporon dermatis</i> Sugita, Takashima, Nakase et Shinoda				1	0	1		0		0									
3,07d	(3-7BC) <i>Trichosporon dermatis</i> Sugita, Takashima, Nakase et Shinoda	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1		1	0	1	0	1
3,10	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,11	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,13	<i>Wickerhamomyces onychis</i> ? C12 A1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,14	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,15	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,16	<i>Candida famata</i>																			
3,17	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,18a	<i>Kloeckera apis</i> ?	0			0	1	0		0		0					0	0	0	1	
3,18b	<i>Candida krusei</i>	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1		0	0	0	0	1	
3,19	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,20	<i>Candida catenulata</i>	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
3,21	<i>Candida guilliermondii</i> - like N!	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,22	<i>Candida sorbosa</i> - like N1 N2 positive	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
3,23	<i>Saturnispora hagleri</i> -like C.A. Rosa et al	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1

Anexo 06(Continuação). Tabela 10: Morfologia da colônia dos isolados de Juturnaíba.

cultura	espécies	Pigmento vermelho solubilizado	Margem inteira	Margem erodida	Margem filamentososa	Superfície lisa	Superfície rugosa	Textura cremosa	Textura mucoide	Brilhosa	Textura filamentososa	Achatada	Convexa	Ponto central elevado	“Radiating ridges”	“Geotrichum like worms”	Pigmento preto	Pigmento creme	Pigmento Rosa	Branca
3,24	<i>Candida famata</i>																			
3,25	<i>Candida guilliermondii</i> ?	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,26	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,27	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1
3,28	<i>Trichosporon dermatis</i> Sugita, Takashima, Nakase et Shinoda										N D									
3,29	<i>Trichosporon dermatis</i> Sugita, Takashima, Nakase et Shinoda	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1
3,30	<i>Saturnispora hagleri</i> -like C.A. Rosa et al. trehalose	0															0	0	0	1
3,31	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,32	<i>Saturnispora hagleri</i> -like C.A. Rosa et al. trehalose																			
3,34	<i>Trichosporon dermatis</i> Sugita, Takashima, Nakase et Shinoda										N D									
3,35	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,36	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,49	<i>Candida guilliermondii</i> ?	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,51	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,52	<i>Saturnispora hagleri</i> -like C.A. Rosa et al. trehalose	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,54	<i>Candida guilliermondii</i> ?	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,55	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,56	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
3,57	<i>Candida guilliermondii</i> ?	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1

0 = Característica ausente / 1 = Característica presente / 0,5= Dúvida quanto a presença da característica / ND = dado não disponível

Anexo 06(Continuação). Tabela 10: Morfologia da colônia dos isolados de Juturnaíba.

cultura	espécies	Pigmento vermelho solubilizado	Margem inteira	Margem erodida	Margem filamentosa	Superfície lisa	Superfície rugosa	Textura cremosa	Textura mucóide	Brilhosa	Textura filamentosa	Achatada	Convexa	Ponto central elevado	“Radiating ridges”	“Geotrichum like worms”	Pigmento preto	Pigmento creme	Pigmento Rosa	Branca
3,58	<i>Candida famata</i>																			
3,59	<i>Candida guilliermondii</i> ?	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,60	<i>Candida</i> sp																			
3,61	<i>Candida guilliermondii</i> ?	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,62	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,66	<i>Candida guilliermondii</i> ?	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
3,67	<i>Candida famata</i>																			
3,69	<i>Candida famata</i>																			
3,69	<i>Candida famata</i>																			
3,70	<i>Candida famata</i>																			
3,71	<i>Candida famata</i>																			
3,71	<i>Candida famata</i>																			
3,73	<i>Candida famata</i>																			
3,74	<i>Candida famata</i>																			
4,01	<i>Candida krusei</i>	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0		0	1	0	0	0	0	0	1
4,01	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	1	0	0	0	0	0	1
4,02	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1		1	1	0	0	0	0	0	1
4,02	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	0	0	0	0	0	0	1
4,03	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	1	0	0	0	0	0	1
4,03	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	0	0	0	0	1	1	0

0 = Característica ausente / 1 = Característica presente / 0,5= Dúvida quanto a presença da característica / ND = dado não disponível

Anexo 06(Continuação). Tabela 10: Morfologia da colônia dos isolados de Juturnaíba.

cultura	espécies																			
		Pigmento vermelho solubilizado	Margem inteira	Margem erodida	Margem filamentososa	Superfície lisa	Superfície rugosa	Textura cremosa	Textura mucoide	Brilhosa	Textura filamentososa	Achatada	Convexa	Ponto central elevado	“Radiating ridges”	“Geotrichum like worms”	Pigmento preto	Pigmento creme	Pigmento Rosa	Branca
4,04	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	1	0	0	0	0	0	1
4,04	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	0	0	0	0	0	0	1
4,05	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	1	0	0	0	0	0	1
4,06	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	1	0	0	0	0	0	1
40,7	<i>Candida krusei</i>	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0		1	0	0	0	0	0	0	1
4,08a	<i>Rhodotorula ?</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	1	0	0	0	0	1	0
4,08b	<i>Pseudozyma?</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	0	0	0	0	0	1	0
4,09a	<i>Candida humilis</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	1	0	0	0	1	0	0
4,09b	<i>Kloeckera apis</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		0	1	0	0	0	0	0	1
4,11	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
4,12	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	1	0	0	0	0	0	1
4,13	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	1	0	0	0	0	0	1
4,14	<i>Candida guilliermondii</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
4,15	<i>Yarrowia lipolytica</i>	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0		1	1	0	0	0	0	0	1
4,16	<i>Candida krusei</i>	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0		1	0	0	0	0	0	0	1
4,17	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	1	0	0	0	0	0	1
4,18	<i>Candida sp.</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	1	0	0	0	0	0	1

0 = Característica ausente / 1 = Característica presente / 0,5= Dúvida quanto a presença da característica / ND = dado não disponível

Anexo 06(Continuação). Tabela 10: Morfologia da colônia dos isolados de Juturnaíba.

cultura	espécies	Pigmento vermelho solubilizado	Margem inteira	Margem erodida	Margem filamentososa	Superfície lisa	Superfície rugosa	Textura cremosa	Textura mucoide	Brilhosa	Textura filamentososa	Achatada	Convexa	Ponto central elevado	“Radiating ridges”	“Geotrichum like worms”	Pigmento preto	Pigmento creme	Pigmento Rosa	Branca
4,19	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	1	0	0	0	0	0	1
4,21	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	0	0	0	0	0	0	1
4,22	<i>Candida krusei</i>	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0		1	1	0	0	0	0	0	1
4,23	<i>Candida norvegica</i> (Reiersál) S.A. Meyer & Yarrow	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0		1	1	0	0	0	0	0	1
4,25	<i>Kloeckera</i> sp. ?	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	0	0	0	0	0	0	1
4,27	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	0	0	0	0	0	0	1
4,28	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	0	0	0	0	0	0	1
4,29	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	0	0	0	0	0	0	1
4,32	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	1	0	0	0	1	0	0
4,33	<i>Rhodotorula</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	0	0	0	0	0	1	0
4,34	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	0	0	0	0	0	0	1
4,35	<i>Cryptococcus</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	1	0	0	0	0	0	1
4,36	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0		1	0	0	0	0	0	0	1
4,37a	<i>Trichosporon</i> ?																0	0	0	1
4,37b	<i>Cryptococcus</i>																			
4,38	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	0	0	0	0	0	0	1
4,41	<i>Pseudozyma</i> ?	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0		0	0	0	0	0	1	0	0
4,42	<i>Candida guilliermondii</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0		1	1	0	0	0	0	0	1
4,43	<i>Rhodotorula</i>		1	0	0	0	1	1	0	0	0		1	0	0	0	0	0	1	0
4,44	<i>Rhodotorula</i>		1	0	0	1	0	1	0	0	0		1	0	0	0	0	0	1	0

0 = Característica ausente / 1 = Característica presente / 0,5= Dúvida quanto a presença da característica / ND = dado não disponível

Anexo 06(Continuação). Tabela 10: Morfologia da colônia dos isolados de Juturnaíba.

cultura	espécies	Pigmento vermelho solubilizado	Margem inteira	Margem erodida	Margem filamentosa	Superfície lisa	Superfície rugosa	Textura cremosa	Textura mucoide	Brilhosa	Textura filamentosa	Achatada	Convexa	Ponto central elevado	“Radiating ridges”	“Geotrichum like worms”	Pigmento preto	Pigmento creme	Pigmento Rosa	Branca
4,45	<i>Candida albicans</i> ?	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1		1	0	0	0	0	0	0	1
4,46	<i>Candida guilliermondii</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
4,47	<i>Candida krusei</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0		1	0	0	0	0	0	0	1
4,48	<i>Candida norvegica</i> (Reiersál) S.A. Meyer & Yarrow	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
4,49	<i>Candida boidinii</i> C. Ramírez	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	0	0	0	0	0	0	1
5,01	<i>Candida valida</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0		1	1	0	0	0	0	0	1
5,03	<i>Cryptococcus</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	w	0		1	1	0	0	0	1	0	0
5,04	<i>Kluyveromyces lactis</i> var. <i>drosophilarum</i> ?	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0		1	0	0	0	0	0	0	1
5,06	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5,07	<i>Trichosporon</i>	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5,09	<i>Candida albicans</i> ?	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5,10	<i>Candida parapsilosis</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5,11	<i>Rhodotorula</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
5,12	<i>mold?</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0		0	0	0	1
5,13	<i>Trichosporon</i>	0	1	0	1	0	w	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
5,14	<i>Candida parapsilosis</i>	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5,15	<i>Candida guilliermondii</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5,16a	<i>Candida krusei</i>	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5,16b	<i>Trichosporon</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5,17a	<i>Candida krusei</i>	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1

0 = Característica ausente / 1 = Característica presente / 0,5= Dúvida quanto a presença da característica / ND = dado não disponível

Anexo 06(Continuação). Tabela 10: Morfologia da colônia dos isolados de Juturnaíba.

cultura	espécies	Pigmento vermelho solubilizado	Margem inteira	Margem erodida	Margem filamentososa	Superfície lisa	Superfície rugosa	Textura cremosa	Testura mucoide	Brilhosa	Textura filamentososa	Achatada	Convexa	Ponto central elevado	“Radiating ridges”	“Geotrichum like worms”	Pigmento preto	Pigmento creme	Pigmento Rosa	Branca
5,17b	<i>Kloeckera apis</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5,18	<i>Kloeckera apis</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5,19	<i>Candida tropicalis</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5,2	<i>Candida sp.</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		0	1	0	0	0	0	0	1
5,20	<i>Trichosporon</i>	0	1	0	0,5	1	0	1	0	0	0,5	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5,21	<i>Pseudozyma?</i>	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
5,22	<i>Candida guilliermondii</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
5,23	<i>Rhodotorula</i>	0	1	0	0	1	0	1	0,5	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
5,24	<i>Candida valida</i>	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1
5,25	<i>Candida albicans ?</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5,26	<i>Candida humilis</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0
5,27	<i>Candida valida</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5,28	<i>Candida famata</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5,29	<i>Candida guilliermondii</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5,30	<i>Candida guilliermondii</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	0,5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5,31	<i>Candida famata</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	0,5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5,32	<i>Candida guilliermondii</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	0,5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5,33	<i>Kloeckera apis</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	0,5	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
5,34	<i>Rhodotorula</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
5,35	<i>Candida guilliermondii</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5,36	<i>Candida guilliermondii</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
5,37	<i>Candida guilliermondii</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	0	0	0	0	0	0	1

0 = Característica ausente / 1 = Característica presente / 0,5= Dúvida quanto a presença da característica / ND = dado não disponível

Anexo 06(Continuação). Tabela 10: Morfologia da colônia dos isolados de Juturnaíba.

cultura	espécies	Pigmento vermelho solubilizado	Margem inteira	Margem erodida	Margem filamentosa	Superfície lisa	Superfície rugosa	Textura cremosa	Testura mucoide	Brilhosa	Textura filamentosa	Achatada	Convexa	Ponto central elevado	“Radiating ridges”	“Geotrichum like worms”	Pigmento preto	Pigmento creme	Pigmento Rosa	Branca
		5,38	<i>Kloeckera apis</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	1	0	0	0	0
5,39	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	0	0	0	0	0	0	1
5,40	<i>Candida guilliermondii</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	0	0	0	0	0	0	1
5,41	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	0	0	0	0	0	0	1
5,42	<i>Candida guilliermondii</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	0	0	0	0	0	0	1
5,43	<i>Candida guilliermondii</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	0	0	0	0	0	0	1
5,44	<i>Candida peltata</i> (Yarrow) S.A. Meyer & Ahearn	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0		1	1	0	0	0	0	0	1
5,45	<i>Candida parapsilosis</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	0	0	0	0	0	0	1
5,47	<i>Rhodotorula</i>	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
5,48	Cryptococcus	0	1	0	0,5	0	1	1	0	0	0,5	0	1	1	0	1	0	0	0	1
5,49	<i>Pichia heedii</i> Phaff et al.	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0	1
5,5	<i>Candida famata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0		1	0	0	0	0	0	0	1
5,50	<i>Kloeckera apiculata</i>	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	0	0	0	0	0	0	1
5,51	<i>Kloeckera apis</i>	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0		1	1	0	0	0	0	0	1
5,52	<i>Candida norvegica</i> (Reiersál) S.A. Meyer & Yarrow	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0		1	0	0	0	0	0	0	1
5,53	<i>Candida boidinii</i> C. Ramírez		1	0	0	1	0	0	1	1	0		1	0	0	0	0	0	0	1

0 = Característica ausente / 1 = Característica presente / 0,5= Dúvida quanto a presença da característica / ND = dado não disponível

Anexo 07: Tabela 11: Resultados dos testes de assimilação, tolerância e crescimento

colecção cultura	meio de cultura	espécies	DBB 4+wk GYP	ferment elicos3wk	galactose ferment until 2 wk	sucrose fermentation until 2	maltose fermentation until 2	0 YNB	glicose	galactose	sorbose	glucosamina	ribose	xilose	L-arabinose	D-arabinose	ramnose	sacarose	lmaltose	trealose	D-glucoside	celobiose	salicina	Arbutina	melibiose	lactose	rafinose	melezitose	Inulina	glicerol	eritritol	ribitol	xilitol	D-lucitol	D-anitol	0 galactitol	lmlto-sitol	lactato	succinato	citrato	Metanol	Etanol	nitrite	N1 Nitrate	10%NaCl	15%NaCl	0.01 Ciclohex	0.1 Ciclohex Ciclohexamida	haxadecano	Formação de amido	28C	37C	38C	40C	
1 10	BILglici	<i>Candida aff. Intermedia</i>	0				w	3	3	3	2	1	3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	w	3	2	3	w	1	w	3	2	3	3	2	w	w	1	1	0	3	w	w	0	0	w	0		0	1	w	0	0		
3 21	BILvbc	<i>Candida aff. guillemontii - like NO3 -</i>	0	0			w	3	3	3	3	w	3	3	3	1	3	3	3	3	3	3	1		3	w	3	3	3	3	w	3	3	3	3	w	w	1	1	0	3	w	3	3	3	w	w		0	1	3	1	w		
1 7	BILglici	<i>Candida aff. Intermedia</i>	0	n	n	1	w	3	3	3	2	1	3	1	3	3	3	3	3	2	3	3	3		w	3	2	3	w	1	w	3	2	3	3	2	w	w	1	1	0	3	w	w	0	0	w	0		0	1	w	0	0	
5 14	BILgalci	<i>Candida aff. intermedia</i>	0	2	3	1	w	0	3	3	3	1	1	3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	2	0	2	1	3	0	2	1	3	3	3	2	0	1	1	2	0	3	0	0	3	0	0	0	0	3	0		0		0	n
4 30	BILvbc	<i>Candida aff. parapsilosis</i>	0	3	2	w	0	0	3	3	2	1	1	3	3	1	0	3	3	3	3	0	0	0	0	0	3	3	1	3	0	3	2	3	3	0	0	1	1	1	0	1	0	0	3	2	1	0		0	2	0			
4 34	BILglici	<i>Candida aff. parapsilosis</i>	0	3	w	w	0	0	2	2	3	2	2	3	3	1	2	3	2	3	3	1	0	0	2	0	1	3	0	3	0	3	3	3	3	3	0	2	1	0	0	1	0	0	3	3	1	0	n	0	2	0			
1 27	BILgalci	<i>Candida aff. rugopelliculosa</i>	0				w	3	w	w	w	1	3	w	w	w	w	w	w	w	3	w	w		w	w	w	w	w	2	3	3	3	3	3	w	w	1	w	w	3	3	2	3	0	0	1	1		0	1	0	?	0	
1 28	BILetanol	<i>Candida aff. rugopelliculosa</i>	0				w	3	w	0	3	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w		w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	w	0	3	N	w	w	0	0	0	0		0	1	3	?	0			
3 1	BILglici	<i>Candida aff. rugopelliculosa</i>	0				w	3	w	w	w	3	3	w	w	w	1	w	w	3	w	w		w	w	w	w	w	2	3	3	3	3	3	w	w	1	w	w	3	3	3	3	0	0	w	1		0	1	0	0	0		
4 49	BILetanol	<i>Candida aff. rugopelliculosa</i>	0	3			0	3	0	1	0	3	1	3	0	1	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	1	0	2	2	2	3	3	3	3	1	0	3	3	n	0	0	0			
5 53	BILetanol	<i>Candida aff. rugopelliculosa</i>	0	3			0	3	0	0	3	3	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	0	2	1	1	3	3	3	3	1	0	3	2	2	0	0	0				
2 39	BILgalci	<i>Candida aff. sorbophila</i>	0				w	3	3	3	w	w	w	w	w	w	3	1	w	w	w	1	1		w	w	w	1	1	w	1	1	2	3	w	w	w	w	w	0	3	w	w	3	0	w	w		0	1	2	0	0		
5 2	BILetanol	<i>Candida aff. valida</i>	0	3			0	3	0	0	3	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	n	0	2	0				

Foram considerados positivos os crescimentos 2 e 3, fracos 1 e 1,5 e negativos valores w(fraco) ou 0(zero).

Anexo 07: Tabela 11(continuação): Resultados dos testes de assimilação, tolerância e crescimento

colecção	cultura	meio de cultura	espécies	DBB 4+wk	ferment	galactose	sucrose	maltose	0 YNB	glicose	galactose	sorbose	glucosamina	ribose	xilose	L-arabinose	D-arabinose	ramnose	sacarose	l maltose	trealose	D-glucoside	celobiose	salicina	Arbutina	melibiose	lactose	rafinose	melezitose	Inulina	glicerol	eritritol	ribitol	xilitol	D-lucitol	D-amitol	0 galactitol	l mio-sitol	lactato	succinato	citrato	Metanol	Etanol	nitrite	NI Nitrate	10%NaCl	15%NaCl	0,01 Ciclohex	0,1 Ciclohex	hexadecano	Formação de	28C	37C	38C	40C
3	20	BILglici	<i>Candida catenulata</i>	0	0			w	3	3	w	1	1	1	w	w	w	1	3	3	w	w	w	w	w	w	2	w	w	3	w	1	w	1	3	w	2	1	1	0	3	w	w	3	1	w	w	0	1	3	w	0			
5	9	BILglici	<i>Candida catenulata</i>	0	0	0	n	0	0	3	3	1	0	3	3	2	1	1	2	3	2	1	0	1	2	0	0	1	1	0	3	0	1	1	3	3	1	0	2	0	2	0	2	0	0	3	3	2	3	2	0	3	n		
1	18	BILglici	<i>Candida dajiaensis ?</i>	0				w	3	3	1	w	w	3	3	2	3	3	3	3	w	1	1	2	w	w	w	2	w	3	w	3	w	3	w	2	1	w	0	N	w	w	0	w	1	1	0	1	1	0	0				
5	49	BILetanol	<i>Candida ethanolica</i>	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	3	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1	0	3	3	0	0	0	0	0	1	0	3	3					
5	28	BILglici	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0	2	w	3	0	0	3	3	3	2	1	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	0	3	3	3	3	2	3	2	3	3	3	0	1	2	2	0	3	0	0	3	3	3	2	0	3	0			
2	3,0 2	BILgalci	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>		0			0	w	3	3	w	1	w	2	w	2	w	w	3	3	3	3	3	2	2	w	3	3	3	3	w	2	3	3	3	3	1	w	w	2	0	3	w	w	3	0	1	w	0	1	3	w	0	
2	27	BILvbc	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0				0	w	3	3	1	1	w	3	2	2	1	w	3	3	3	3	2	2	2	w	3	3	3	3	1	3	3	3	3	2	1	w	w	2	0	3	w	w	3	1	1	1	0	1	3	w	0	
2	29	BILglici	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>					0	w	3	3	1	2	w	3	3	2	3	3	3	3	3	3	1	1	2	w	3	3	3	3	w	3	3	2	3	2	w	w	1	1	0	3	w	w	3	2	1	1	0	1	2	w	0	
3	69	BILglici	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>					w	3	3	w	1	w	3	3	2	2	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	w	3	3	3	3	w	3	3	3	3	3	1	w	w	1	0	3	w	w	3	0	1	w	0	1	0	0	
4	29	BILvbc	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0	3	w	2	0	0	3	3	2	3	1	3	3	3	2	3	3	3	3	3	2	2	3	0	3	3	3	3	2	3	3	3	3	0	0	1	1	1	0	3	0	0	3	2	2	3	2	0	2	0		
5	31	BILgalci	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0	2	w	3	0	1	3	3	3	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	0	1	2	2	0	3	0	0	3	3	3	3	0	3	0			
5	41	BILglici	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0	2	1	2	0	1	3	3	3	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	0	3	3	3	3	1	3	3	3	3	0	2	2	2	0	3	0	0	3	3	3	3	0	3	0				
5	29	BILglici	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0	1	w	2	0	1	3	3	1	3	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	3	3	3	3	3	3	3	3	1	0	2	2	2	0	3	0	0	3	3	3	3	0	3	2				

Foram considerados positivos os crescimentos 2 e 3, fracos 1 e 1,5 e negativos valores w(fraco) ou 0(zero).

Anexo 07: Tabela 11(continuação): Resultados dos testes de assimilação, tolerância e crescimento

colecção	cultura	meio de cultura	espécies	DBB	4+vk	ferment	galactose	sucrose	maltose	0 YNB	glicose	galactose	sorbose	glucosamina	ribose	xilose	L-arabinose	D-arabinose	ramnose	sacarose	l maltose	trealose	D-glucoside	celobiose	salicina	Arbutina	melbiose	lactose	rafinose	melezitose	Inulina	glicerol	eritritol	ribitol	xilitol	D-lucitol	D-anitol	0 galactitol	l mio-sitol	lactato	succinato	citrato	Metanol	Etanol	nitrite	N1 Nitrate	10% NaCl	15% NaCl	0.01 Ciclohex	0.1 Ciclohex	hexadecano	Formação de	28C	37C	38C	40C	
5	30	BILglici	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0	3	3	3	0	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	3	3	3	3	3	3	3	0	3	3	3	3	3	1	3	3	3	3	0	2	1	2	0	1	0	0	3	3	3	3	3	0	3	2				
5	32	BILetanol	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0	3	1	2	0	1	3	3	3	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	3	3	3	3	3	3	3	3	0	2	2	2	2	0	3	0	0	3	3	3	3	3	0	3	2					
5	35	BILglici	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0	3	w	1	w	1	3	3	2	3	0	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	3	3	3	3	3	3	3	1	0	2	2	2	2	0	3	0	0	3	3	3	3	3	0	3	2					
5	36	BILgalci	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0	2	w	1	0	1	3	3	2	3	0	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	0	3	3	3	3	3	2	3	3	3	1	0	2	2	2	0	3	0	0	3	3	3	3	0	3	2				
5	37	BILetanol	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0	3	1	3	0	1	3	3	2	3	0	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	1	3	2	3	0	3	3	3	3	2	3	3	3	1	0	2	2	2	0	2	0	0	3	3	3	3	0	3	2				
5	40	BILetanol	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0	3	w	3	0	1	3	3	2	3	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	0	3	3	3	3	3	1	0	2	2	2	2	0	3	0	0	3	3	3	3	3	0	3	2						
5	42	BILgalci	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0	3	3	2	0	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	0	3	3	3	3	3	1	3	3	3	3	0	2	2	2	0	3	0	0	3	3	3	3	0	3	2				
5	43	BILetanol	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0	1	w	w	0	1	3	3	2	3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	0	3	3	3	3	3	3	3	2	0	2	2	2	0	3	0	0	3	3	3	3	3	0	3	2					
2	6	BILglici	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0				w	3	3	3	2	w	3	3	3	2	1	3	2	3	3	3	3	3	3	3	w	3	3	3	3	1	3	1	3	2	1	w	w	1	0	3	w	w	3	0	1	w	0	1	3	1	w			
2	9	BILgalci	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0				w	3	3	2	1	w	3	3	3	2	w	w	3	3	3	3	3	3	3	3	w	3	3	3	3	1	3	1	2	3	2	1	w	w	1	0	3	w	w	3	1	1	w	0	1	3	1	w		
2	12	BILvbc	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0				w	3	3	3	1	w	3	3	3	w	w	3	3	3	3	3	3	3	3	3	w	3	3	3	3	1	2	3	2	3	3	1	w	w	1	1	0	3	w	w	3	w	1	1	w	0	1	3	2	w
2	14	BILvbc	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0				w	3	3	2	1	w	3	3	3	2	1	w	3	3	3	3	3	3	3	3	w	3	3	3	3	1	3	1	2	3	2	1	w	w	1	0	3	w	w	3	1	1	w	0	1	3	1	w		
2	15	BILgalci	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0				w	3	3	2	1	w	3	3	3	2	w	w	3	3	3	3	3	3	3	3	w	3	3	3	3	1	3	1	2	3	2	w	w	w	1	0	3	w	?	3	1	1	w	0	1	3	1	w		
2	19	BILgalci	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0				w	3	3	2	2	w	3	3	3	3	3	w	3	2	3	3	3	2	2	2	w	3	3	3	3	1	3	1	3	3	3	w	w	w	1	0	w	w	w	3	0	1	w	0	1	3	1	w		

Foram considerados positivos os crescimentos 2 e 3, fracos 1 e 1,5 e negativos valores w(fraco) ou 0(zero).

Anexo 07: Tabela 11(continuação): Resultados dos testes de assimilação, tolerância e crescimento

colecção	cultura	meio de cultura	espécies	DBB 4-wk	ferment	galactose	sucrose	maltose	0 YNB	glicose	galactose	sorbose	glucosamina	ribose	xilose	L-arabinose	D-arabinose	ramnose	sacarose	l-maltose	trealose	D-eltucoside	celobiose	salicina	Arbutina	melibiose	lactose	rafinose	melezitose	Inulina	glicerol	eritritol	ribitol	xilitol	D-lucitol	D-anitol	0 galactitol	Imio-sitol	lactato	succinato	citrate	Metanol	Etanol	nitrite	N1 Nitrate	10%NaCl	15%NaCl	0.01 Ciclohex	0.1 Ciclohex	hexadecano	Formação de	28C	37C	38C	40C
2	21	BILvbc	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0				w	3	3	2	1	5	w	3	3	3	w	w	3	3	3	3	2	2	w	3	3	3	3	3	1	3	1	2	3	2	w	w	w	1	0	w	w	w	3	3	1	w		0	1	3	2	w
5	22	BILglici	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0	3	2	3	0	0	3	3	3	2	1	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	2	3	0	3	3	1	3	1	3	3	3	3	3	0	0	1	2	0	3	0	0	3	1	3	3	1	0	3	n		
2	25	BILgalci	<i>Candida famata/Candida guilliermondii ?</i>	0				w	3	3	1	1	5	w	3	3	3	w	3	3	3	3	3	2	1	w	3	3	3	3	3	1	3	3	3	3	1	w	w	w	1	0	3	w	w	3	2	1	w		0	1	3	2	w
4	32	BILglici	<i>Candida famata?</i>	0	3	1	3	0	2	0	0	2	0	2	0	3	3	3	1	3	3	3	3	2	3	3	0	3	3	0	3	1	3	3	3	3	3	0	2	2	2	0	2	0	0	3	3	2	2	n	0	2	0		
4	6	BILglici	<i>Candida famata?</i>	0	3	w	w	0	0	3	3	1	2	1	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	2	3	0	3	3	1	3	1	3	3	3	2	0	1	1	1	0	3	0	0	3	2	2	3	1	0	2	0		
4	3	BILglici	<i>Candida famata?</i>	0	3	w	3	0	0	2	1	0	2	1	2	2	3	1	3	3	2	3	3	2	0	2	0	2	3	2	1	1	2	3	3	3	0	0	1	1	0	0	3	0	0	3	3	1	3	1	0	?	0		
4	19	BILetanol	<i>Candida famata?</i>	0	3	w	3	0	0	3	3	1	2	1	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	1	3	0	3	3	2	3	1	3	3	3	3	0	1	1	1	0	3	0	0	3	3	2	3	1	0	2	0			
4	21	BILetanol	<i>Candida famata?</i>	0	3	w	2	0	0	3	3	2	2	1	3	3	2	2	3	3	2	3	3	3	2	3	0	3	3	2	3	2	3	3	3	0	0	2	1	1	0	3	0	0	3	3	3	3	1	0	3	0			
4	40	BILgalci	<i>Candida famata?</i>	0	3	2	3	w	0	3	3	3	3	1	3	3	3	2	3	3	3	3	3	2	3	3	0	3	3	2	3	1	3	3	3	3	0	2	3	3	0	3	0	0	3	3	2	3	n	0	3	0			
5	5	BILgalci	<i>Candida famata?</i>	0	3	1	3	0	0	2	3	1	2	0	3	3	2	0	3	3	3	3	3	2	2	3	0	3	3	2	3	0	3	3	3	3	0	3	2	2	0	3	0	0	3	3	3	3	n	0	2	0			
5	6	BILetanol	<i>Candida famata?</i>	0		w	3	0	0	2	3	2	2	0	3	3	2	2	3	3	3	3	3	2	2	2	0	3	3	2	3	0	3	3	3	3	0	3	2	2	0	3	0	0	3	3	3	3	n	0	2	0			
4	4	BILglici	<i>Candida famata?</i>	0	3	w	3	0	0	3	2	1	2	1	3	2	3	3	3	3	2	3	3	2	2	3	0	3	2	3	3	1	3	3	3	3	0	1	1	0	0	3	0	0	3	2	2	2	1	0	2	0			
4	17	BILetanol	<i>Candida famata?</i>	0	3	w	3	0	0	3	3	2	2	2	3	3	3	2	3	3	2	3	3	3	2	3	0	3	3	3	3	1	3	3	3	3	0	2	1	1	0	3	0	0	3	2	2	3	1	0	2	0			
4	36	BILglici	<i>Candida famata?</i>	0	3	3	3	0	3	2	3	0	0	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	2	3	1	3	2	3	0	3	1	3	3	3	2	1	2	3	1	0	2	0	0	3	0	1	0	n	0	0	0			
1	16	BILglici	<i>Candida famata?</i>	0				w	w	3	3	3	2	1	3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	5	w	3	3	3	w	1	w	3	1	3	3	1	w	w	1	1	0	3	w	w	3	w	w	0	0	1	3	0	0	

Anexo 07: Tabela 11(continuação): Resultados dos testes de assimilação, tolerância e crescimento

colecção	cultura	meio de cultura	espécies	DBB 4+wk	ferment	galactose	sucrose	maltose	0 YNB	glicose	galactose	sorbose	glucosamina	ribose	xilose	L-arabinose	D-arabinose	ramnose	sacarose	l maltose	trealose	D-elucoside	celobiose	salicina	Arbutina	melibiose	lactose	rafinose	melezitose	Inulina	glicerol	eritritol	ribitol	xilitol	D-lucitol	D-amitol	0 galactitol	l mio-sitol	lactato	succinato	citrato	Metanol	Etanol	nitrite	NI Nitrate	10%NaCl	15%NaCl	0,01 Ciclohex	0,1 Ciclohex	hexadecano	Formacão de	28C	37C	38C	40C
1	17	BILgalci	<i>Candida famata?</i>	0	0			1	3	3	3	3	w	3	2	w	2	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	3	3	1	3	3	3	3	3	w	w	w	1	0	N	w	w	3	w	1	2		0	1	w	0	0		
2	36	BILgalci	<i>Candida famata?</i>	0	0			w	3	3	3	1	1	3	3	3	1	n	3	3	3	3	3	3	3	3	1	3	3	1	2	3	3	3	3	3	w	2	w	1	0	3	3	w	3	3	w	5	0		0	1	3	0	0
2	43	BILgalci	<i>Candida famata?</i>	0				w	3	3	3	1	w	2	w	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	w	3	3	3	w	2	w	3	w	3	2	w	w	2	1	0	3	w	w	3	0	w	0		0	1	3	0	0	
3	7,0 1	BILgalci	<i>Candida famata?</i>	0			n	w	3	3	1	1	n	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	1	3	3	w	1	1	2	2	w	w	0	3	w	w	w	0	w	0		3	1	3	w	0		
3	27	BILglici	<i>Candida famata?</i>	0				w	3	3	3	2	w	3	w	3	w	3	3	3	3	3	3	2	w	3	2	2	w	2	w	3	2	3	3	2	w	w	1	1	0	3	w	w	2	0	0	0		0	1	0	0	0	
2	17	BILglici	<i>Candida famata?</i>		0		0	w	3	3	1	1	w	3	3	2	1	w	3	3	3	3	3	3	1	w	3	3	3	3	1	2	3	2	3	2	1	2	1	1	0	3	w	w	3	w	w	w		0	1	3	w	0	
2	20	BILvbc	<i>Candida famata?</i>	0	0			w	3	3	2	2	w	3	2	3	w	3	2	3	3	3	3	2	1	w	3	3	3	3	1	3	3	2	3	2	w	w	w	2	0	w	w	w	3	2	w	w		0	1	3	w	0	
2	31	BILgalci	<i>Candida famata?</i>					w	3	3	1	2	w	3	3	2	1	3	3	3	3	3	3	2	2	w	3	3	3	3	w	3	3	3	3	3	w	w	1	1	0	3	w	w	3	3	w	w		0	1	0	1	0	
2	32	BILgalci	<i>Candida famata?</i>	0	0			w	3	3	3	2	1	3	3	2	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	w	3	3	2	2	3	3	3	3	3	w	w	2	1	2	0	3	3	w	3	3	w	w		0	1	3	0	0
2	44	BILgalci	<i>Candida famata?</i>					w	3	3	2	1	w	3	3	3	1	n	3	3	3	3	3	3	3	3	w	3	3	3	3	w	3	2	3	3	3	w	w	1	1	0	3	w	w	3	3	w	0		0	1	3	1	0
2	48	BILgalci	<i>Candida famata?</i>					w	3	3	2	2	w	3	3	3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	w	3	3	3	3	w	3	3	3	3	w	w	1	1	0	3	w	w	3	2	w	w		0	1	3	0	0	
3	10	BILgalci	<i>Candida famata?</i>					w	3	3	3	2	w	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	w	3	3	3	3	w	3	3	3	3	3	w	w	1	1	0	3	w	w	3	3	w	w		0	1	3	w	0	
3	11	BILvbc	<i>Candida famata?</i>					w	3	3	3	2	w	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	2	3	w	3	3	3	3	w	3	3	3	3	3	w	w	1	1	0	3	w	w	3	3	w	w		0	1	3	w	0	
3	14	BILgalci	<i>Candida famata?</i>		0			w	3	3	3	2	w	3	2	3	w	3	3	3	3	3	3	2	3	w	3	3	3	3	w	3	1	3	3	3	w	w	1	1	0	3	w	w	3	3	w	w		0	1	3	1	0	
3	31	BILgalci	<i>Candida famata?</i>				0	w	3	3	3	3	w	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	w	3	3	3	3	w	2	3	3	3	w	w	1	1	0	3	w	w	3	3	w	w		0	1	3	1	0	
3	35	BILglici	<i>Candida famata?</i>				0	w	3	3	3	3	w	3	2	3	1	3	3	3	3	3	3	2	2	w	3	3	3	3	w	3	3	3	3	3	w	w	1	w	0	3	w	w	3	3	w	1		0	1	3	1	0	
3	36	BILgalci	<i>Candida famata?</i>					w	3	3	3	3	w	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	w	3	3	3	3	w	3	3	3	3	3	w	w	1	1	0	3	w	w	3	3	w	1		0	1	3	w	0	

Anexo 07: Tabela 11(continuação): Resultados dos testes de assimilação, tolerância e crescimento

colecção	cultura	meio de cultura	espécies	DBB	4+vk	ferment	galactose	sucrose	maltose	0 YNB	glicose	galactose	sorbose	glucosamina	ribose	xilose	L-arabinose	D-arabinose	ramnose	sacarose	l-maltose	trealose	D-eltucoside	celobiose	salicina	Arbutina	melibiose	lactose	rafinose	melezitose	Inulina	glicerol	eritritol	ribitol	xilitol	D-lucitol	D-anitol	0 galactitol	l-mio-sitol	lactato	succinato	citrate	Metanol	Etanol	nitrite	N1 Nitrate	10% NaCl	15% NaCl	0.01 Ciclohex	0.1 Ciclohex	hexadecano	Formação de	28C	37C	38C	40C
3	54	BILgalci	<i>Candida famata?</i>	0					w	3	3	2	3	2	3	3	2	w	3	3	3	3	3	3	2	3	w	3	3	1	3	w	3	3	3	3	w	w	1	1	0	3	w	n	3	w	w	w		0	1	3	2	0		
4	5	BILglici	<i>Candida famata?</i>	0	3	w	2	w	0	3	2	3	1	1	0	0	0	0	3	3	2	3	3	3	2	0	0	2	0	0	3	0	3	0	0	1	1	0	0	3	0	0	3	3	0	0	3	0			2		0			
4	10	BILgalci	<i>Candida famata?</i>	0	2	w	3	0	0	3	3	1	2	1	3	3	3	1	3	3	3	3	3	3	3	2	3	1	3	2	3	3	2	0	1	1	1	1	0	3	0	0	3	2	2	3	1	0		2		0				
4	11	BILgalci	<i>Candida famata?</i>	0	3	1	3	0	0	2	2	1	2	0	3	3	3	1	3	3	3	3	3	3	2	3	3	0	3	3	0	3	1	3	3	3	3	0	2	2	1	1	0	3	0	0	3	3	2	2	n	0		2		0
4	12	BILgalci	<i>Candida famata?</i>	0	3	2	3	0	0	3	3	1	2	1	3	3	3	1	3	3	3	3	3	3	3	2	3	0	3	3	2	3	1	3	2	3	3	2	0	1	1	1	0	3	0	0	3	2	2	3	1	0		3		0
4	13	BILgalci	<i>Candida famata?</i>	0	3	1	3	0	0	3	3	1	2	1	3	3	3	1	3	3	3	3	3	3	3	1	3	0	3	3	2	3	1	3	3	3	3	2	0	1	1	1	0	3	0	0	3	2	2	3	1	0		1		0
4	20	BILetanol	<i>Candida famata?</i>	0	3	w	2	0	0	3	2	3	1	1	1	0	1	0	3	3	3	3	3	3	3	2	0	0	2	0	0	3	0	2	0	3	0	1	0	1	0	1	0	3	0	0	3	3	0	0	2	0		3		0
1	20	BILglici	<i>Candida famata?</i>					w	3	3	1	3	w	3	3	3	3	w	3	3	3	3	3	1	3	3	w	3	3	1	3	w	3	3	3	3	1	w	w	1	w	0	3	w	w	3	3	1	1		0	1	3	2	1	
1	30	BILglici	<i>Candida famata?</i>	0				0	w	3	3	2	w	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	2	3	2	3	w	3	3	2	3	1	3	3	3	3	3	w	1	1	2	0	3	w	n	3	3	w	w		0	1	3	2	1
3	51	BILetanol	<i>Candida famata?</i>	0				0	w	3	3	2	2	w	3	3	2	3	3	2	3	3	3	2	3	2	3	w	3	3	2	3	2	3	3	2	3	w	w	1	1	0	3	w	n	3	3	w	w		0	1	3	2	1	
3	56	BILetanol	<i>Candida famata?</i>					w	3	3	1	1	w	3	2	2	3	3	3	3	3	2	3	3	2	3	3	w	3	3	3	3	w	3	3	3	3	w	1	1	0	3	w	n	3	3	w	w		0	1	3	1	1		
3	49	BILgalci	<i>Candida famata?</i>	0				w	3	3	1	2	w	3	3	2	3	3	3	3	2	3	3	2	3	2	3	w	3	3	2	3	1	3	3	3	3	3	w	1	1	1	0	3	w	n	3	3	1	w		0	1	3	2	2
3	70	BILgalci	<i>Candida famata?</i>					w	3	3	3	1	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	w	3	3	w	3	1	3	3	3	3	3	w	1	1	0	3	w	n	3	0	1	1		0	1	2	2		
1	1	BILgalci	<i>Candida famata?</i>	1		n	1	w	w	3	3	1	2	1	3	3	2	w	3	3	3	3	3	3	3	3	3	w	3	3	1	3	w	3	3	3	1	w	w	1	1	0	3	w	w	3	0	w	1		0	1	3	2	2	
3	25	BILglici	<i>Candida famata?</i>	0				w	w	3	3	3	3	1	3	1	w	w	3	3	3	3	3	3	1	w	w	2	3	2	1	w	3	2	3	3	w	w	1	1	0	3	w	w	3	1	w	w		0	1	3	3	2		
3	55	BILgalci	<i>Candida famata?</i>					w	3	3	2	3	2	3	3	2	w	3	3	3	3	3	3	2	2	2	w	3	3	1	3	w	3	2	3	3	w	w	1	0	3	w	n	3	3	w	w		0	1	3	2	2			

Foram considerados positivos os crescimentos 2 e 3, fracos 1 e 1,5 e negativos valores w(fraco) ou 0(zero).

Anexo 07: Tabela 11(continuação): Resultados dos testes de assimilação, tolerância e crescimento

colecção	cultura	meio de cultura	espécies	DBB 4-wk	ferment	galactose	sucrose	maltose	0 YNB	elicose	galactose	sorbose	elucosamina	ribose	xilose	L-arabinose	D-arabinose	ramnose	sacarose	l maltose	trealose	D-glucoside	celobiose	salicina	Arbutina	melitiose	lactose	rafinose	melezitose	Inulina	glicerol	eritritol	ribitol	xilitol	D-lucitol	D-anitol	0 galactitol	Imio-sitol	lactato	succinato	citrato	Metanol	Etanol	nitrite	NI Nitrate	10% NaCl	15% NaCl	0.01 Ciclohex	0.1 Ciclohex	hexadecano	Formação de	28C	37C	38C	40C
3	58	BILetanol	<i>Candida famata?</i>			3		w	3	3	w	w	3	2	2	3	w	3	2	2	3	3	2		2	w	3	3	w	3	3	3	3	3	w	w	w	1	0	3	w	n	3	3	w	w	0	1		2	2				
3	59	BILetanol	<i>Candida famata?</i>	0				w	3	3	w	2	w	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2		3	w	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	w	w	1	1	0	3	w	n	3	3	w	w	0	1	3	2	2		
3	71	BILglici	<i>Candida famata?</i>				0	w	3	3	2	2	w	2	3	3	2	3	3	2	3	3	2		3	w	3	3	2	3	1	3	3	3	3	w	w	w	1	1	0	3	w	n	3	3	w	0	1		2	2			
3	73	BILglici	<i>Candida famata?</i>					w	3	3	2	2	w	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		3	w	3	3	2	3	2	3	3	3	3	w	w	w	1	1	0	3	w	n	3	3	w	w	0	1		1	2		
3	74	BILgalci	<i>Candida famata?</i>					w	3	3	2	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		2	w	3	3	w	3	w	3	3	3	3	3	w	w	w	1	0	3	w	n	2	0	w	w	0	1		2	2		
3	61	BILglici	<i>Candida famata?</i>	0				w	3	3	1	2	w	3	3	3	2	3	3	3	3	3	2		3	w	3	3	2	3	1	3	w	3	3	3	w	w	1	1	0	3	w	n	3	3	w	w	0	1	3	2	3		
3	62	BILetanol	<i>Candida famata?</i>	0				w	3	3	2	2	w	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3		3	w	3	3	2	3	2	3	3	3	3	w	w	w	1	1	0	3	w	n	3	3	w	w	0	1	3	2	3		
3	66	BILglici	<i>Candida famata?</i>	0				w	3	3	2	2	w	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3		3	w	3	3	2	3	2	3	1	3	3	3	w	w	1	1	0	3	w	n	3	3	w	w	0	1	3	2	3		
3	67	BILgalci	<i>Candida famata?</i>					w	3	3	2	2	w	3	3	2	3	3	2	2	3	3	3		3	w	3	3	2	3	1	3	3	3	3	w	w	w	1	1	0	3	w	n	3	3	w	w	0	1		2	3		
4	46	BILetanol	<i>Candida famata?</i>	0	3	w	3	0	0	2	3	2	3	1	3	3	3	2	3	2	3	3	3	3	3	3	0	3	3	0	3	2	3	3	3	3	1	0	2	3	2	0	3	0	0	3	3	2	3	n	0		2		?
3	15	BILgalci	<i>Candida famata?</i>	0			0	w	3	3	3	2	w	3	3	3	2s	3	3	3	3	3	2		3	2	3	3	3	3	w	3	3	3	3	3	3	1	w	1	1	0	3	w	w	3	3	w	w	0	1	3	1	w	
2	23	BILglici	<i>Candida famata?</i>	0				w	3	3	2	1	w	3	2	3	w	w	3	3	3	3	2		1	w	3	3	3	3	1	3	3	2	3	w	2	w	w	1	0	w	w	w	3	1	w	w	0	1	3	2	w		
2	34	BILgalci	<i>Candida famata?</i>					w	3	3	2	1	1	3	3	2	w	n	3	3	3	3	2		3	w	3	3	2	3	w	3	3	3	3	w	w	w	1	1	0	3	w	w	3	1	w	1	0	1	3	1	w		
2	37	BILgalci	<i>Candida famata?</i>					w	3	3	1	2	w	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3		2	w	3	3	3	3	w	3	3	3	3	w	w	w	1	1	0	3	w	w	3	3	w	w	0	1	2	1	w		
2	40	BILetanol	<i>Candida famata?</i>					w	3	3	2	2	w	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3		1	w	3	3	3	3	w	3	3	3	3	w	w	w	1	1	0	3	w	w	3	3	w	w	0	1	3	1	w		
2	42	BILetanol	<i>Candida famata?</i>	0			0	w	3	3	2	3	2	3	3	3	1,5	3	3	3	3	3	2		1	w	3	3	3	3	w	3	3	3	3	2	w	w	w	1	0	3	w	w	3	2	w	w	0	1	3	1	w		
2	45	BILetanol	<i>Candida famata?</i>					w	3	3	2	2	w	3	3	3	1,5	3	3	3	3	3	3		3	w	3	3	1	3	w	3	2	2	3	2	w	w	w	1	0	3	1	w	3	2	w	w	0	1	3	1	w		

Anexo 07: Tabela 11(continuação): Resultados dos testes de assimilação, tolerância e crescimento

colecção	cultura	meio de cultura	espécies	DBB 4+wk	ferment	galactose	sucrose	maltose	0 YNB	glicose	galactose	sorbose	glucosamina	ribose	xilose	L-arabinose	D-arabinose	ramnose	sacarose	l maltose	trealose	D-glucoside	celobiose	salicina	Arbutina	melibiose	lactose	rafinose	melezitose	Inulina	glicerol	eritriol	ribitol	xilitol	D-lucitol	D-anitol	D galactitol	Inio-sitol	lactato	succinato	citrato	Metanol	Etanol	nitrite	NI Nitrate	10%NaCl	15%NaCl	0.01 Ciclohex	0.1 Ciclohex	haxadecano	Formação de	28C	37C	38C	40C
5	45	BILglici	<i>Candida parapsilosis</i>	0	3	1	w	0	1	3	3	3	2	3	3	3	3	2	3	3	3	3	1	1	3	2	1	1	3	1	3	3	3	3	3	1	0	2	2	2	0	2	0	2	0	3	3	3	s	0	2	0	3	0	
5	44	BILglici	<i>Candida pelata</i>	0	3	3	3	3	1	3	3	3	2	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	1	1	1	3	1	3	1	3	3	3	3	1	0	2	2	2	0	3	0	0	3	s	3	3	2	3	0	3	3	
1	1,34	BILetanol	<i>Candida pseudolambica ?</i>					w	3	w	w	3	w	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	2	2	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	0	0	1	0	0			
2	2,02	BILvbc	<i>Candida pseudolambica ?</i>	0				w	3	w	w	1	w	2	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0		
1	22	BILetanol	<i>Candida rhagii?</i>	0				w	2	3	w	2	2	3	3	w	w	3	3	3	3	3	2		w	w	w	3	w	3	w	3	3	3	3	w	w	w	w	w	0	3	w	w	3	3	w	w	0	1	0	0	0		
3	22	BILvbc	<i>Candida sorbosa</i> - like N1 N2 positive	0				w	3	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	1	w	w	1	w		w	w	w	w	w	3	w	w	w	w	w	w	2	w	w	0	3	3	3	w	0	w	w	0	1	3	2	w		
1	9	BILetanol	<i>Candida sp</i>	0		2		w	3	3	w	w	1	3	1	1	3	3	3	3	3	3	3	3		w	w	w	3	w	3	3	2	1	2	3	w	w	2	1	1	0	3	3	3	3	w	0	0	0	1	w	0	0	
3	60	BILgalci	<i>Candida sp</i>					w	3	3	3	w	w	3	w	3	w	3	3	3	3	3	1	2		w	w	w	3	w	2	w	1	w	3	3	w	w	w	w	1	0	3	w	n	1	0	w	w	0	1	0	3		
4	45	BILetanol	<i>Candida sp</i>	0	3	2	w	n	0	2	3	2	3	1	2	3	0	1	3	2	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	0	3	3	3	1	0	2	2	2	0	1	0	0	0	3	3	1	0	n	0	2	?
5	25	BILglici	<i>Candida sp</i>	0	2	3	0	0	0	3	3	3	0	0	3	3	2	2	3	3	3	3	1	0	1	1	0	0	1	1	0	3	0	3	0	3	0	3	0	1	2	3	0	3	0	0	3	0	3	3	1	0	3	n	
5	4	BILvbc	<i>Candida sp</i>	0	3	0	0	0	2	3	3	0	0	0	0	0	0	0	3	2	2	3	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3	3	3	3	3	0	0	3	0	1	0	3	0	0	3	0	3	3	n	0	2	0		
5	19	BILetanol	<i>Candida tropicalis</i>	0	3	3	1	3	0	3	3	3	1	0	3	3	0	0	3	3	2	3	3	3	3	0	1	1	3	0	2	1	3	3	3	3	1	0	2	2	2	0	3	0	0	3	0	3	3	3	3	0	c	?	2
5	15	BILgalci	<i>Candida tropicalis</i>	0	3	3	2	3	0	3	3	3	1	1	3	1	2	1	3	3	3	3	3	2	3	0	0	2	3	0	3	1	3	2	3	3	1	0	2	1	2	0	3	0	0	3	0	3	3	3	0	3	n		
5	1	BILvbc	<i>Candida valida</i>	0	w			0	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	n	0	2	0			
5	24	BILetanol	<i>Candida valida</i>	0	3	0		0	3	1	0	0	0	0	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	3	0	0	3	0	0	0	0	0	0	3	n	

Foram considerados positivos os crescimentos 2 e 3, fracos 1 e 1,5 e negativos valores w(fraco) ou 0(zero).

Anexo 07: Tabela 11(continuação): Resultados dos testes de assimilação, tolerância e crescimento

colecção	cultura	meio de cultura	espécies	DBB 4+vk	ferment	galactose	sucrose	maltose	0 YNB	glicose	galactose	sorbose	glucosamina	ribose	xilose	L-arabinose	D-arabinose	ramnose	sacarose	l maltose	trealose	D-glucoside	celobiose	salicina	Arbutina	melbiose	lactose	rafinose	melezitose	Inulina	glicerol	eritritol	ribitol	xilitol	D-lucitol	D-anitol	0 galactitol	l mio-sitol	lactato	succinato	citrato	Metanol	Etanol	nitrite	N1 Nitrate	10% NaCl	15% NaCl	0.01 Ciclohex	0.1 Ciclohex	hexadecano	Formação.de	28C	37C	38C	40C	
5	12	BILglici	mold?	0	0		0	0	1	3	3	3	2	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	2	3	3	1	3	2	1	3	1	3	3	3	3	3	1	0	3	1	2	0	3	0	0	3	0		2		n				
1	33	BILetanol	<i>Wickerhamomyces anomala</i>			1		0	3	2	w	w	w	1	1	1	w	3	3	2	3	3	3		w	w	w	3	1	3	3	3	1	w	2	1	1	0	3	2	3	3	0	0	0		0	1		?	0					
2	35	BILgalci	<i>Pichia kluyveri</i>	0				w	3	w	w	3	w	w	w	w	w	2	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	2	w	w	w	w	w	1	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0		0	1	3	0	0				
4	41	BILgalci	<i>Pseudozyma ?</i>	1	0			0	2	2	3	3	1	2	3	3	3	3	3	2	2	2	2	3	3	3	3	3	2	0	3	1	2	3	3	3	3	3	2	0	0	3	2	3	0	0	0	n	0		0	0				
4	8,2	BILglici	<i>Pseudozyma?</i>	1	0			0	3	0	3	0	1	3	2	2	2	3	1	3	0	3	2	2	0	0	0	1	0	0	0	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	3	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0			
5	21	BILglici	<i>Pseudozyma?</i>	1	0			0	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1	3	3	3	1	2	2	1	3	3	1	2	2	2	1	3	0	1	1	0	2	3	3	3	0	0	0	2	0		s	0		
2	1	BILgalci	<i>Rhodotorula glutinis-like</i>	1	0			w	3	3	2	w	3	3	3	3	w	3	3	3	3	3	3	3	w	w	3	3	1	3	w	3	3	3	3	3	w	w	1	0	3	3	3	1	0	0	0		0	1	0	0	0			
2	8	BILgalci	<i>Rhodotorula glutinis-like</i>	1	0			w	3	2	1	w	3	3	3	3	w	3	2	3	3	3	3	3	w	w	3	3	1	3	w	3	3	2	3	2	w	w	1	0	3	2	3	w	0	0	0		0	1	0	0	0			
3	2,0 2	BILglici	<i>Rhodotorula glutinis-like</i>	1	0			w	3	2	3	1	2	1	1	3	1	3	3	3	3	3	3	3	w	w	3	3	w	3	w	3	2	2	2	w	w	w	w	0	3	1	3	0	0	0	0		w	?	1	0	0	0		
5	11	BILglici	<i>Rhodotorula glutinis-like</i>	1	0			0	3	2	1	0	2	3	3	3	0	2	3	3	1	0	2	3	0	0	3	1	0	2	0	3	3	2	2	1	0	0	0	0	0	0	1	3	3	3	0	2	1	0	0		2		n	
5	34	BILglici	<i>Rhodotorula glutinis-like</i>	1	0			1	3	3	2	0	3	3	3	3	0	3	3	3	2	1	3	3	1	0	3	3	2	3	0	3	3	0	2	1	0	1	0	0	0	2	3	3	3	0	s	0	1	0		1	0	0		
4	33	BILglici	<i>Rhodotorula glutinis-like</i>	1	0			0	2	1	1	0	1	3	3	3	0	3	3	3	0	1	3	3	1	0	2	3	0	3	0	3	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	3	3	3	3	0	1	0	n	0		2	0	0	
4	8,1	BILglici	<i>Rhodotorula-like inositol +</i>	1	0			1	2	2	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	1	2	3	3	3	2	1	3	3	3	1	2	3	3	2	1	1	0	1	2	2	2	0	0	0	2	3		2	0	0		
4	43	BILgalci	<i>Rhodotorula minuta?</i>	1	0			0	2	2	2	1	2	3	2	3	2	3	3	3	3	2	2	1	3	3	2	3	3	0	3	1	3	3	3	3	1	0	0	2	2	0	0	0	0	0	2	0	0	0	n	0		0	0	0
5	47	BILgalci	<i>Rhodotorula mucilaginosa ?</i>	1	0			1	3	3	3	1	3	3	3	3	2	3	3	3	3	0	2	1	3	1	0	3	3	1	2	0	3	2	2	3	2	0	1	2	1	0	0	0	0	3	0	s	0	1	0		0	0	0	

Foram considerados positivos os crescimentos 2 e 3, fracos 1 e 1,5 e negativos valores w(fraco) ou 0(zero).

Anexo 07: Tabela 11(continuação): Resultados dos testes de assimilação, tolerância e crescimento

colecção	cultura	meio de cultura	espécies	DBB 4+wk	ferment	galactose	sucrose	maltose	0 YNB	glicose	galactose	sorbose	glucosamina	ribose	xilose	L-arabinose	D-arabinose	ramnose	sacarose	l maltose	trealose	D-glucoside	celobiose	salicina	Arbutina	melibiose	lactose	rafinose	melezitose	Inulina	glicerol	eritritol	ribitol	xilitol	D-lucitol	D-anitol	0 galactitol	l mio-sitol	lactato	succinato	citrato	Metanol	Etanol	nitrite	NI Nitrate	10%NaCl	15%NaCl	0,01 Ciclohex	0,1 Ciclohex	hexadecano	Formacão de	28C	37C	38C	40C
5	23a	BILgalci	<i>Rhodotorula mucilaginosa ?</i>	0	0			0	3	3	3	0	3	3	3	3	2	3	3	3	3	0	2	1	3	0	0	3	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0	1	0		c	?		n	
2	2,01	BILvbc	<i>Rhodotorula mucilaginosa ?</i>	0			0	w	3	3	2	w	3	3	3	3	3	3	3	3	3	w	3	3	w	w	3	3	1	3	w	3	3	3	3	w	w	w	w	0	3	w	w	2	0	0	0		0	1	3	0	0		
4	44	BILglici	<i>Rhodotorula sp NO3 +</i>	1	0			0	2	2	1	0	0	2	2	2	1	2	1	2	0	2	3	3	0	0	1	0	0	3	0	2	1	3	3	3	0	2	0	0	0	3	3	3	3	1	1	0	n	d	0	0	0	0	
1	23	BILetanol	<i>Candida valida - like</i>	0				w	3	w	0	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	2	w	1	w	2	3	w	w	w	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0		0	1	3	0	0	
1	26	BILetanol	<i>Candida valida - like</i>	0				w	3	w	3	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	3	w	2	w	w	w	w	w	1	w	w	w	0	3	1	w	2	0	0	0		0	1	3	0	0	
3	23	BILvbc	<i>Candida valida - like</i>	0				w	3	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	3	w	1	w	2	3	w	w	w	w	w	0	3	w	w	w	0	0	0		0	1	3	0	0	
3	30	BILvbc	<i>Candida valida - like</i>	0				w	3	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	3	w	1	w	1	3	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	2	0	0	0		0	1	3	0	0	
3	32	BILvbc	<i>Candida valida - like</i>	0				w	3	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	3	w	1	w	1	3	w	w	w	w	w	w	0	3	w	w	0	0	0	0		0	1	3	0	0	
3	52	BILetanol	<i>Candida valida - like</i>	0				w	3	1	0	w	w	1	w	w	w	w	3	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	w	1	w	w	w	w	1	w	w	0	3	w	n	1	0	0	0		0	1	3	0	0	
1	32	BILgalci	<i>Torulaspora delbruckii</i>	0		0		w	3	2	3	w	w	1	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	w	1	w	w	2	3	3	w	w	w	w	0	3	w	w	1	0	1	1		0	1	3	0	0		
4	37a	BILgalci	<i>Trichosporon ?</i>	1	0			0	3	2	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	2	3	3	3	3	2	0	1	3	3	3	3	3	3	1	3	3	0	3	3	0	3	0	2	1	n	d	3	2		0	
5	20	BILglici	<i>Trichosporon aff. insectorum</i>	1	0			0	3	3	3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	0	3	2	2	0	2	3	1	2	2	2	1	3	1	1	2	0	3	3	3	3	2	3	0	2	3		3	0	0
3	7	BILvbc	<i>T.dermatis</i>	1	0			w	3	3	2	1	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	2	3	3	1	2	2	3	3	1	1	w	w	0	3	w	w	0	0	w	0		3	1	3	w	0	
1	6	BILgalci	<i>T.dermatis</i>	0	0			w	3	3	3	1	3	3	3	3	w	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	1	3	3	3	3	1	1	1	0	3	2	w	1	0	w	w		3	1	3	0	0	
1	8	BILgalci	<i>T.dermatis</i>	1	0			w	3	3	3	1	3	3	3	3	w	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	1	2	3	3	3	3	1	1	1	0	3	2	w	1	0	w	w		3	1	3	0	0	

Anexo 07: Tabela 11(continuação): Resultados dos testes de assimilação, tolerância e crescimento

colecção	cultura	meio de cultura	espécies	DBB 4+wk	ferment	galactose	sucrose	maltose	0 YNB	glicose	galactose	sorbose	glucosamina	ribose	xilose	L-arabinose	D-arabinose	rannose	sacarose	Maltose	trealose	D-glucoside	celobiose	salicina	Arbutina	melbiose	lactose	rafinose	melezitose	Inulina	glicerol	eritritol	ribitol	xilitol	D-lucitol	D-anitol	0 galactitol	Imio-sitol	lactato	succinato	citrato	Metanol	Etanol	nitrite	NI Nitrate	10%NaCl	15%NaCl	0.01 Ciclohex	0.1 Ciclohex	haxadecano	Formação de	28C	37C	38C	40C
1	13	BILgalci	<i>Trichosporon dermatis</i>	0	0			w	3	3	3	1,5	3	3	3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	w	3	3	1	2	3	3	3	3	1,5	1,5	1,5	0	N	3	w	1,5	0	w	w		3	1	0	?	0	
1	14	BILgalci	<i>Trichosporon dermatis</i>	1	0			w	3	3	1,5	1,5	3	3	3	w	3	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	w	1	3	2	2	3	3	3	3	3	1,5	1,5	1,5	0	3	3	w	3	w	1	w		3	1	3	0	0
1	25	BILglici	<i>Trichosporon dermatis</i>	1	0			w	3	3	3	1,5	3	3	3	1	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	w	3	w	2	3	3	3	3	3	1,5	1,5	2	0	3	3	w	2	0	1	w		3	1	3	1	w		
2	10	BILgalci	<i>Trichosporon dermatis</i>	1	0			w	3	3	3	1,5	3	3	3	1	3	w	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	1	1	3	3	2	1,5	1,5	2	0	3	3	w	1	0	1	w		3	1	3	w	0	
2	11	BILvbc	<i>Trichosporon dermatis</i>	1	0			w	3	2	3	1,5	3	2	3	1	3	w	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	1	1	3	3	2	1,5	1,5	2	0	3	3	1	1,5	0	1	w		3	1	3	w	0		
2	13	BILvbc	<i>Trichosporon dermatis</i>	1	0			w	3	3	3	1,5	3	3	3	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	1,5	1,5	2	0	3	3	1	1,5	2	1	w		3	1	3	w	0		
2	16	BILgalci	<i>Trichosporon dermatis</i>	1	0			w	3	3	3	1,5	3	3	3	1	3	w	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	1	1	3	3	3	1,5	1,5	2	0	3	3	w	2	0	1	w		3	1	3	w	0		
2	18	BILglici	<i>Trichosporon dermatis</i>	1	0			w	3	2	3	1,5	3	3	3	2	3	w	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	1	3	3	3	3	1,5	1,5	2	0	3	3	w	2	0	1	w		3	1	3	w	0		
2	24	BILglici	<i>Trichosporon dermatis</i>	?	0			w	3	2	2	1,5	3	3	2	1	3	w	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	1	3	3	3	2	1,5	1,5	1,5	0	w	3	2	1,5	0	w	w		3	1	3	1	0		
2	26	BILgalci	<i>Trichosporon dermatis</i>	?				w	3	3	2	1,5	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	1,5	1,5	2	0	3	3	1	2	0	1	w		3	1	3	w	0		
2	28	BILvbc	<i>Trichosporon dermatis</i>	1	0			w	3	1,5	2	1,5	3	3	2	1	3	w	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	1	3	3	3	2	2	1,5	2	0	3	3	w	1,5	0	1	0		3	1	3	w	0		
2	30	BILglici	<i>Trichosporon dermatis</i>	1	0			w	3	3	3	1,5	3	3	2	2	3	n	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	2	1	3	3	3	3	2	1	1	0	3	3	w	1	0	w	w		3	1	3	0	0		
2	33	BILvbc	<i>Trichosporon dermatis</i>	1				w	3	2	2	1,5	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	2	3	3	3	3	2	1	2	0	3	3	w	1,5	0	w	w		3	1	3	w	0		
3	7,0	BILvbc	<i>Trichosporon dermatis</i>	0	0			w	3	3	3	1,5	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	w	2	2	3	3	3	1,5	1	1	0	3	3	w	1	0	w	0		3	1	3	w	0		

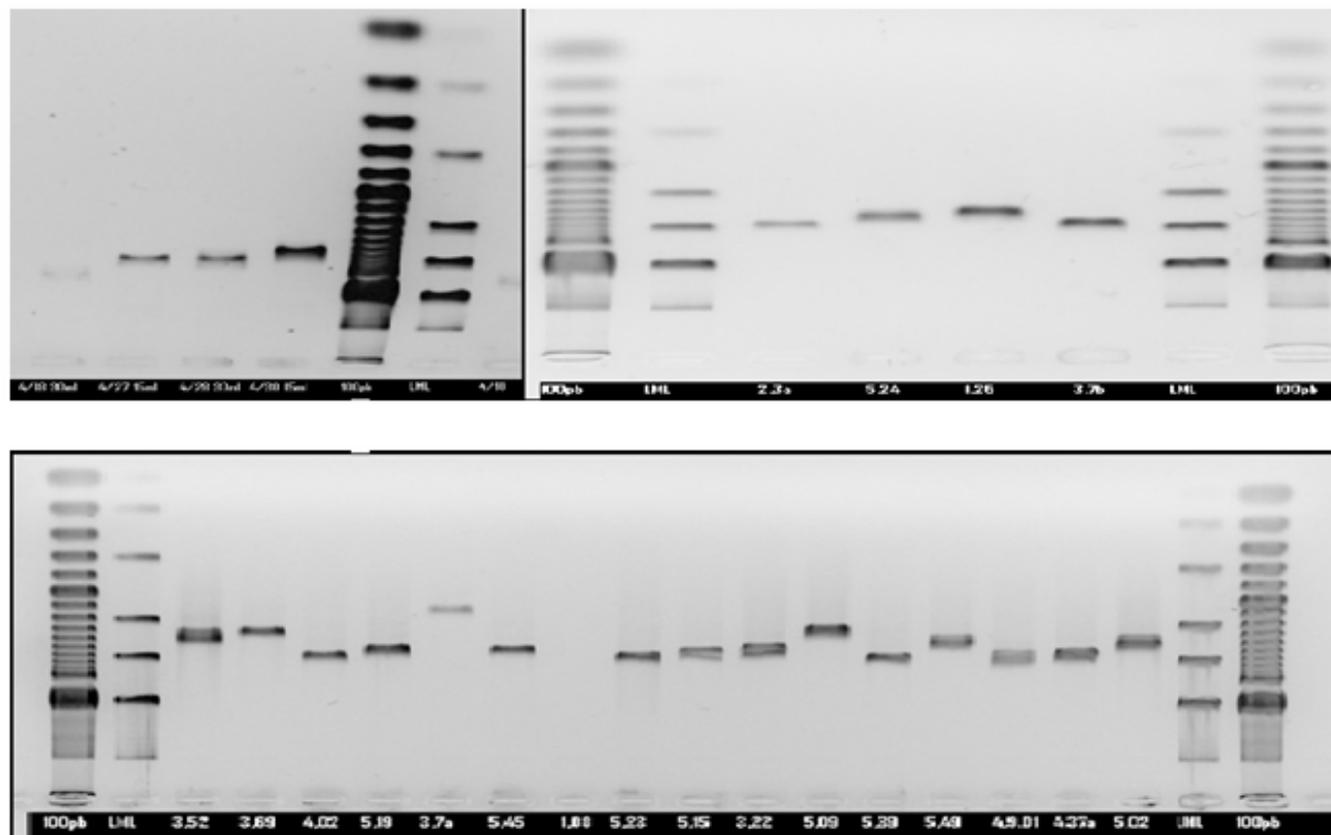
Foram considerados positivos os crescimentos 2 e 3, fracos 1 e 1,5 e negativos valores w(fraco) ou 0(zero).

Anexo 07: Tabela 11(continuação): Resultados dos testes de assimilação, tolerância e crescimento

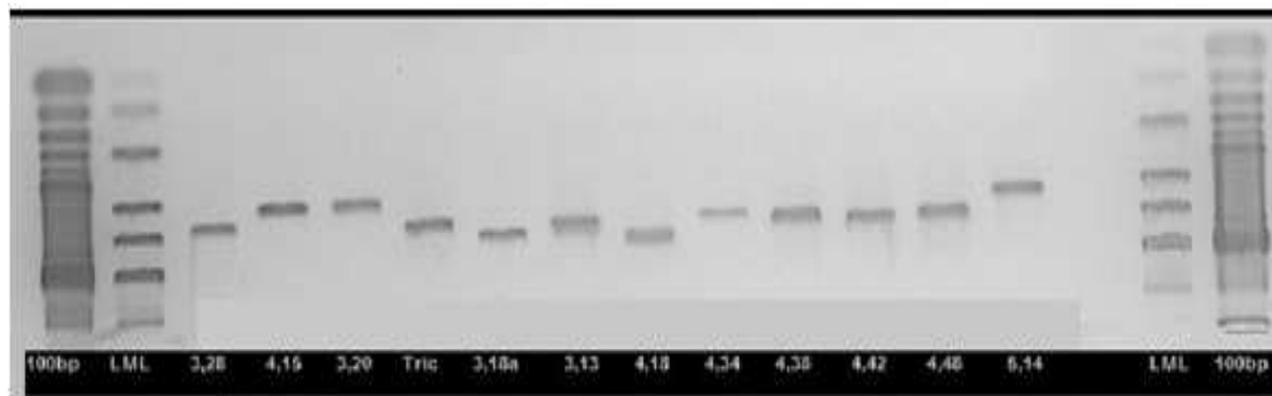
colecção	cultura	meio de cultura	espécies	DBB 4+wk GYP	ferment glicose	galactose ferment	sucrose	maltose	0 YNB	glicose	galactose	sorbose	glucosamina	ribose	xilose	L-arabinose	D-arabinose	ramnose	sacarose	Inaltese	trealose	D-glucoside	celobiose	salicina	Arbutina	melbiose	lactose	rafinose	melezitose	Inulina	glicerol	eritritol	ribitol	xilitol	D-lucitol	D-anitol	0.galactitol	Imio-sitol	lactato	succinato	cittrato	Metanol	Etanol	nitrite	N1 Nitrate	10% NaCl	15% NaCl	0,01 Ciclohex	0.1 Ciclohex	haxadecano	Formação de amido	28C	37C	38C	40C
3	7,23	BILvbc	<i>Trichosporon dermatis</i>	1	0			w	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2		3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	1	1	2	0	3	3	w	w	0	w	0		3	1	3	w	0			
3	28	BILglici	<i>Trichosporon dermatis</i>	1	0			w	3	3	3	2	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	2		3	3	3	3	w	3	3	2	3	3	3	3	3	1	1	2	0	3	2	w	2	0	w	w		3	1	3	0	0	
3	29	BILglici	<i>Trichosporon dermatis</i>	1	0			w	3	3	3	2	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	2		3	3	3	3	w	3	3	2	3	3	3	3	3	1	1	2	0	3	3	w	2	0	w	w		3	1	3	0	0	
3	34	BILglici	<i>Trichosporon dermatis</i>	1	0			w	3	3	2	2	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3		3	3	3	3	w	3	3	3	3	3	3	3	1	w	2	0	3	3	w	2	0	w	0		2	1	3	0	0	
5	13	BILgalci	<i>Trichosporon sp</i>	1	0			0	3	3	3	1	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	0	3	3	3	3	2	0	3	3	0	3	3	3	3	1	0	0	0	2	0	0	3	0	3	0	3	0	1	3	2	n		
5	7	BILvbc	<i>Trichosporon sp</i>	1	0			0	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	2	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	0	2	3	0	3	0	3	1	n	3	2	0			
5	16.2	BILvbc	<i>Trichosporon sp</i>	1	0			0	3	0	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	0	3	3	0	2	3	3	3	3	2	1	1	1	0	2	0	0	3	0	3	0	3	0	2	3	0	n
3	13	BILvbc	<i>Wickerhamomyces onychis ?</i>	0				w	3	w	w	w	w	3	3	w	w	3	3	3	1	3	2		w	w	3	3	1	3	w	w	1	1	1	1	1	1	0	3	w	w	0	0	w	0		0	1	3	w	0			
4	15	BILgalci	<i>Yarrowia lipolytica</i>	0	0	0		0	3	1	2	0	3	3	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	1	1	2	0	0	3	2	3	0	3	0	0	3	0	2	3	3	0	0	0	0
2	51	BILglici	<i>Yarrowia lipolytica</i>	0				w	3	1	w	w	2	w	w	w	w	1	5	1	w	w	w	w		w	w	w	w	w	3	3	w	w	1	2	w	w	2	1	2	0	3	w	w	3	0	w	w		0	1	1	0	0

Foram considerados positivos os crescimentos 2 e 3, fracos 1 e 1,5 e negativos valores w(fraco) ou 0(zero).

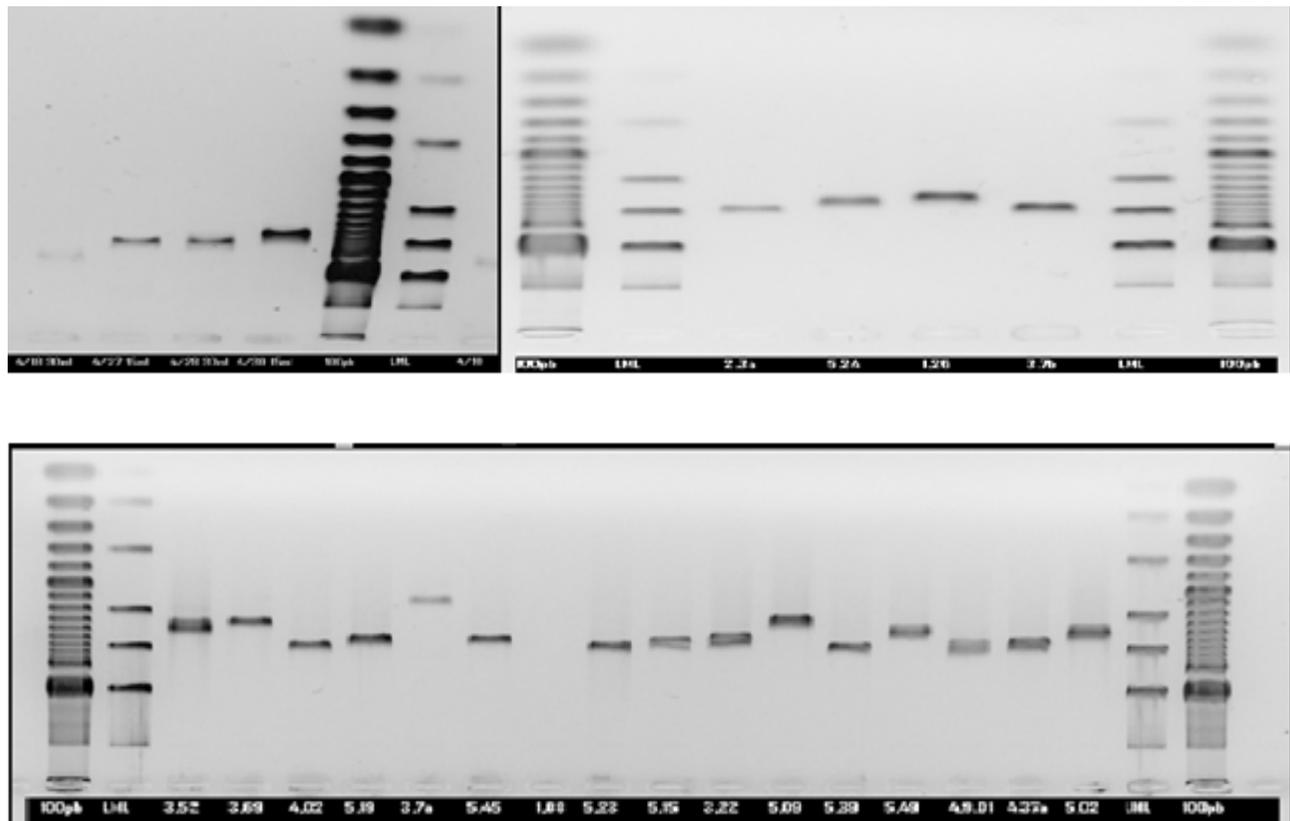
Anexo 08: Figura 03: Eletroforese em gel agarose 1,75%, da região D1/D2 e ITS do rDNA.



Anexo 08: Figura 03(continuação): Eletroforese em gel agarose 1,75%, da região D1/D2 e ITS do rDNA



Anexo 08: Figura 03(continuação): Eletroforese em gel agarose 1,75%, da região D1/D2 e ITS do rDNA



Anexo 9. Tabela 12: identificação polifásica dos isolados.

Espécies (identificação morfofisiológica)	Número da coleta	Ponto de coleta	Cultura	Meio de cultura	Identificação pelas sequência D1/D2 rDNA
<i>Candida aff. intermedia</i>	5	7	14	BILgalci	<i>Candida aff. intermedia</i> 93,4%
<i>Candida aff. parapsilosis</i>	4	5	30	BILvbc	<i>Candida aff. parapsilosis</i> 98,9%
<i>Candida aff. parapsilosis</i>	4	6	34	BILglici	<i>Candida aff. parapsilosis</i> 99,1%
<i>Candida aff. rugopelliculosa</i>	1	6	28	BILetanol	<i>Candida rugopelliculosa</i> 99,3%
<i>Candida aff. sorbophila</i>	2	1	39	BILgalci	<i>Candida aff. sorbophila</i> 97,5%
<i>Candida aff. valida</i>	5	1	2	BILetanol	<i>Pichia aff. membranifaciens</i> 90,4%
<i>Candida catenulata</i>	3	3	20	BILglici	<i>Candida catenulata</i> 100%
<i>Candida catenulata</i>	5	7	9	BILglici	<i>Candida catenulata</i> 99,8%
<i>Candida ethanolica</i>	5	7	49	BILetanol	<i>Candida ethanolica</i> 100%
<i>Candida glabrata</i>	4	3	18	BILetanol	<i>Candida glabrata</i> 99,7%
<i>Candida guilliermondii</i>	4	2	2	BILglici	<i>Meyermcyces guilliermondii</i> 100%
<i>Candida guilliermondii</i>	4	4	27	BILvbc	<i>Candida guilliermondii</i> 100%
<i>Candida guilliermondii</i>	4	4	28	BILvbc	<i>Candida guilliermondii</i> 100%
<i>Candida guilliermondii</i>	4	3	38	BILgalci	<i>Candida guilliermondii</i> 100%
<i>Candida guilliermondii</i>	5	1	23b	BILgalci	<i>Candida guilliermondii</i> 100%
<i>Candida guilliermondii</i>	5	5	39	BILgalci	<i>Meyermcyces guilliermondii</i> 100%
<i>Candida humilis</i>	4	1	9a	BILgalci	<i>Candida humilis</i> 100%
<i>Candida intermedia</i>	3	4	69	BILglici	<i>Candida intermedia</i> 100%
<i>Candida norvegica</i>	4	8	23	BILetanol	<i>Lindnera subsufficiens</i> 99,8

Anexo 9(continuação). Tabela 12:identificação polifásica dos isolados.

Espécies (identificação morfofisiológica)	Número da coleta	Ponto de coleta	Cultura	Meio de cultura	Identificação pelas sequências D1/D2 rDNA
<i>Candida parapsilosis</i>	5	7	45	BILglici	<i>Candida parapsilosis</i> 99,6%
<i>Candida tropicalis</i>	5	7	19	BILetanol	<i>Candida tropicalis</i> 100%
<i>Candida tropicalis</i>	5	7	15	BILgalci	<i>Candida tropicalis</i> 100%
<i>Candida valida</i>	5	1	24	BILetanol	<i>Candida krusei</i> 99.2%
<i>Cryptococcus aff. rajasthanensis</i>	2	1	3a	BILgalci	<i>Cryptococcus aff. rajasthanensis</i> 98,9%
<i>Debaryomyces polymorphus</i>	4	7	42	BILgalci	<i>Debaryomyces polymorphus</i> 100%
<i>Kloeckera apiculata</i>	3	1	18a	BILvbc	<i>Hanseniaspora uvarum</i> 99.8%
<i>Trichosporon insectorum</i>	5	1	20	BILglici	<i>Trichosporon insectorum</i> strain ATCC 20506 95,7%
<i>Trichosporon dermatis</i>	3	4	7b	BILvbc	<i>Trichosporon dermatis</i> 100%
<i>Wickerhamomyces onychis</i> ?	3	6	13	BILvbc	<i>Wickerhamomyces onychis</i> ? 99.6%
<i>Yarrowia lipolytica</i>	4	7	15	BILgalci	<i>Yarrowia lipolytica</i> 100%
<i>Yarrowia lipolytica</i>	2	4	51	BILglici	<i>Yarrowia lipolytica</i> 100%

No total, foram identificados 236 isolados de 47 espécies, tendo *Candida famata/Candida guilliermondii*, *Candida famata*? e *Trichosporon dermatis* as espécies mais isoladas. Coletas: 1 (Julho/09) 2 (agosto/09) 3 (setembro/09) 4(Fevereiro/10) e 5 (Abril/10). Pontos de coleta 01 e 07 localizados em locais de alta poluição por esgotos domésticos, e 08 em local de vegetação bem conservada, sem esgotos. Pontos números 02 a 06 localizados dentro do lago. 01 a 03 fozes de rios.

Anexo 10: Base para isolamento de leveduras – BIL

Base para isolamento de leveduras – BIL: meio de enriquecimento baseado no meio MLA (Aquatic Yeast Medium; Hagler et al. 1986, Carvalho 2007, Garcia 2007).

Estoque de BILglicose base para adição de inibidores.

	BIL 1x	BIL2x
extrato de levedura	0,5 %	1,0 %
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 %	0,2 %
NaH ₂ PO ₄	0,2 %	0,4 %
MgSO ₄	0,01 %	0,02 %
KCl	0,04 %	0,08 %
cloranfenicol	0,04 %	0,08 %
amoxicilina	0,05 %	0,1 %

Ajuste o pH para 5,5

Stock of BILgalactose base para adição de inibidores

	BIL 1x	BIL2x
extrato de levedura	0,1 %	0,2 %
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 %	0,2 %
NaH ₂ PO ₄	0,2 %	0,4 %
MgSO ₄	0,01 %	0,02 %
KCl	0,04 %	0,08 %
cloranfenicol	0,04 %	0,08 %
amoxicilina	0,05 %	0,1 %

Ajuste o pH para 5,5

- Antibióticos: Fazer solução mãe 100x em metanol. (0,4 g chloramphenicol + 0,5g amoxicilina em 10 mL metanol.) Não filtre, homogenise antes de pipetar, ou adicione o atibiótico em pó antes de aquecer.
em

- Faça solução mãe de cicloeximida 1% metanol. Para 10ppm em 100 mL adicione 0.1mL (100uL) ou para 1ppm adicione 0.01 mL (10uL).

- Verde Bromocresol (0.01%) é ser usado para BILVBC, o pH deverá ser ajustado para 4, em meios diferenciais, e diferencia as colônias pelo seu pH.

- Ácidos orgânicos como propionico ou málico podem ser usados como tampão em 0.05% ou como inibidor a 0.2%

- Uma fonte de carbono pode ser adicionada a 0,5%. O extrato de levedura já incluído no meio básico pode servir como fonte de carbono, e consistindo de diversos aminoácidos. Para glicose use 0,5% com 0,5% de extrato de leveduras(YE). Para outra fonte de carbono reduza YE para 0,1%.

- No BILetanol 4%, o etanol é adicionado no BILetanol no momento antes da inoculação, servindo para selecionar species fermentadoras resistentes a etanol, com *Candida krusei* e outras do clado *Pichia membranifaciens*, além de ser um forte inibidor de fungos filamentosos e bactérias.

Anexo 11: Protocolo para extração de ácidos nucleicos

Protocolo para extração de ácidos nucleicos com MasterPure Yeast DNA Purification (Epicentre) .

- Pegar uma colônia (de um meio sólido) e passar para 100 μL de água esterilizada;
- Adicionar 200 μL da solução de extração e Agitar em vortex (10 segundos);
- Incubar a 65 $^{\circ}\text{C}$ por 15 min (após, manter em gelo por 5 min);
- Adicionar 150 μL da solução de precipitação de proteínas e agitar em vortex (10 segundos);
- Centrifugar por 10 min (10000 rpm);
- Retirar o sobrenadante e juntar 500 μL de isopropanol (mini-tubos de 1,5 ml);
- Agitar por inversão do tubo e centrifugar por 10 min (10000 rpm);
- Descartar o sobrenadante e lavar o precipitado (pipetando) com 500 μL de etanol 70%;
- Ressuspender o DNA extraído com 35 μL de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7,5), -20 $^{\circ}\text{C}$;
- Visualizar 5 μL do extraído em gel agarose 0,8% (TAE 0,5X : 2 mM tampão Tris-acetato, 0,5 mM EDTA, pH 8,0);
- Na eletroforese será usado 5 μL do marcador de peso molecular 1kB (Invitrogen);
- Os géis serão corados com brometo de etídeo e visualizados com iluminação ultravioleta;
- A presença de contaminantes será checada correndo-se o mix de extração sem a colônia (controle).

Anexo 12: Amplificação de fragmentos da região estudada

Amplificação de fragmentos da região estudada

- Etapa inicial de 94 °C/ 5 min;

- 30 ciclos de:

- Desnaturação a 94 °C/ 30 s;

- Anelamento / 30 s:

- 57 °C para NL1-NL4 ;

- 55° C para ITS1f-NL4 e ITS1f-ITS4;

- Extensão:

- 73 °C /1 min p/ D1-D2 e ITS1f-ITS4 e 1,5 min p/ todo o fragmento.

* Os resultado das amplificações serão checados em gel de agarose 1 %.