
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)**

**Utilização de parâmetros microbiológicos para avaliação do impacto da
contaminação por petróleo e derivados em sedimentos marinhos**

ALINE BARTELOCHI PINTO

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Campus
de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas
(Área: Microbiologia Aplicada).

RIO CLARO – SP
Março - 2011

ALINE BARTELOCHI PINTO

**Utilização de parâmetros microbiológicos para avaliação do impacto da
contaminação por petróleo e derivados em sedimentos marinhos**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área: Microbiologia Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca

Co-Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Júlia Fernandes Cardoso de Oliveira

RIO CLARO
2011

576 Pinto, Aline Bartelochi
P659u Utilização de parâmetros microbiológicos para avaliação
do impacto da contaminação por petróleo e derivados em
sedimentos marinhos / Aline Bartelochi Pinto. - Rio Claro :
[s.n.], 2011
70 f. : il., figs., gráfs., tabs., mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Fernando Carlos Pagnocca
Co-Orientador: Ana Júlia Fernandes Cardoso de Oliveira

1. Microorganismos. 2. Ambientes estuarinos. 3.
Leveduras. 4. Hidrocarbonetos. 5. Manguezais. I. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre acreditaram que meus sonhos eram possíveis.

Na terra em que o mar não bate

Não bate o meu coração

O mar onde o céu flutua

Onde morre o sol e a lua

E acaba o caminho do chão

Nasci numa onda verde

Na espuma me batizei

Vim trazido numa rede

Na areia me enterrarei

Na areia me enterrarei....

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais, José e Luíza, que sempre me incentivaram, sempre me deram todas as condições possíveis e sempre acreditaram que eu poderia me tornar o que sou hoje. Vocês são grandes responsáveis pelo meu sucesso moldaram minha personalidade e meu caráter. Serei eternamente grata por isso. Amo vocês!

Ao meu amor, Renan, por estar ao meu lado em mais uma conquista, por brigar comigo quando necessário, por acreditar e confiar em mim sempre, pelo seu apoio, enfim, por ser especial e estar presente na minha vida.

À minha irmã, Alice, pelas inúmeras risadas e episódios de "The Vampire Diaries" para descontraír!

À minha vó Nair, pessoa pela qual eu tenho imenso respeito e amor.

Aos meus cunhados, Isabella e Rodrigo, que nos acolheram de braços abertos e nos proporcionaram momentos lindos em família. Às suas filhas, Lorena e Laura, sobrinhas que eu amo imensamente e que não saberia viver sem.

Aos meus sogros, Regina e José Pedro, e minha cunhada Isabela, por serem como uma segunda família.

A todos os meus amigos que estiveram do meu lado proporcionando momentos incríveis em especial: Kaline, mais que amiga... uma irmã! Conhecemos-nos há tanto tempo que parece que eu nunca tive uma vida sem ela estar presente... melhor escolha para madrinha não há... Mariany, Mariana, Aline, Felipe, Cristal, Henrique, Thiago, Luis: Não sei descrever minha vida sem esses grandes amigos, foram mais que amigos, sempre ao meu lado mesmo nas situações mais difíceis. Proporcionaram-me momentos incríveis de muito companheirismo e diversão e agora serão tios da minha "filhota" e espero que estejam pra sempre em minha vida.

Tchuca, Carlão, Monte, Ana Lu, Nayara: Foram amizades de pouco tempo, mas que deixaram uma marca enorme e parece que nos conhecemos há muito mais tempo. Nosso laboratório integrado foi pura diversão mesmo nos dias de mais trabalho além de ter o melhor café do campus e as melhores risadas!

Tatiana e Paula: Sem vocês esse trabalho não seria o que foi! Incrível como em pouco tempo criamos uma amizade tão grande! Sem dúvida o laboratório de microbiologia jamais seria o mesmo sem vocês. Companheiras, amigas, sempre dispostas a ajudar em qualquer situação! Pessoas lindas em todos os sentidos! Meus anjos particulares!!!!!!!

Virginia: Apesar de argentina (!) adoro você e já considero parte da minha família! Pessoa doce de fala calma que me conquistou no primeiro olá!

A todos do Laboratório de Microbiologia da UNESP Rio Claro: Dirce, Weilan, Sílvia, Derlene, Fábio, Noemi... Agradeço por todos os momentos ótimos, risadas, cantorias, piadas enfim todos os momentos que tornaram minha estada o mais agradável possível.

A todos do laboratório de São Vicente: Marcia, Beto, Luciana, Waguinho... como sempre, desde minha primeira graduação, vocês foram incríveis comigo, sempre me apoiando, confiando em meu trabalho e me deixando à vontade para trabalhar... Obrigada pelos momentos de conversa, trocas de idéias e por toda ajuda que tive sempre que necessário! Jamais esquecerei vocês!

A todos da UNESP Campus de São Vicente: Conceição, Sr. Paulo, Denise, Cecília, Luís, Allan, Batuta, Paulo, Cláudio, César, Dona Valdete, Alex, enfim, todos que fazem desse campus tão especial e que sempre me ajudaram de uma forma ou de outra. Um agradecimento especial a todas as meninas da limpeza: Alessandra, Vanessinha, Maria, Jaqueline, Janete... obrigada por todos os cafezinhos e conversas nos momentos de pausa do trabalho... Aprendi muito com vocês e sentirei muita saudade...

Aos professores: Áurea, Fernando Zara, Denis, Francisco, Marcos Oliveira que me auxiliaram seja com uma conversa em momentos de crise, seja com materiais e equipamentos ou com uma cervéjinha no bar para descontraír e relaxar de um dia estressante e cansativo de trabalho. Considero todos responsáveis pelo meu sucesso até agora e agradeço de coração! Vocês estarão sempre em meu coração!

Ao professor Fernando Carlos Pagnocca: nem sei por onde começar a agradecer pela oportunidade de realizar esse trabalho sob sua orientação! Agradeço por ter me aceitado mesmo sem ao menos conhecer-me e por confiar na minha capacidade e competência para finalizar esse trabalho pelo qual tenho muito carinho. Serei sempre grata por ter aberto as portas de seu laboratório a mim e por ter me dado a oportunidade de aprender tanto!

Agradeço, também, ao professor Marcelo Pinheiro pela dedicação com que conduz seu trabalho. Obrigada pelas considerações, por toda a ajuda estatística e por ter aceitado ser parte da minha banca. Posso dizer com toda certeza que este trabalho melhorou substancialmente com suas considerações.

Obrigada à professora Hilda pelas correções que também colaboraram para a melhora deste trabalho.

Agradeço também ao melhor presente que alguém poderia receber nesta vida: Rafaella!!! Amo cada vez mais a cada segundo que passa!

Por fim, novamente agradeço à minha querida co-orientadora professora Ana Júlia. Não tenho palavras para descrever o que essa professora significa para mim. Acima de uma relação profissional temos o que considero uma grande amizade e profundo respeito! Obrigada por sempre acreditar em mim, por confiar no meu trabalho e por compartilhar tanto conhecimento fazendo com que eu crescesse cada vez mais como pessoa e como profissional! Obrigada do coração!

Enfim, obrigada a todos que compartilharam essa incrível e desafiante jornada comigo!!!

RESUMO

Os ecossistemas costeiros são considerados de grande importância sócio-econômica, política e cultural, pois possuem alta produtividade que suporta uma ampla gama de atividades econômicas e de lazer. Possuem elevado valor paisagístico, atraindo inúmeros habitantes e, assim, contribuem ao desenvolvimento das cidades litorâneas. Além disso, oferecem suporte às comunidades biológicas com manutenção de muitas espécies residentes ou que utilizam a zona costeira como berçário para reprodução, beneficiando a biodiversidade como um todo. Sendo uma região que sofre grande pressão antrópica, a Zona Costeira está sujeita a inúmeros impactos causados por atividades humanas, tais como as portuárias, industriais e de exploração de petróleo. Essas geram impactos por lançarem diversos poluentes, entre eles os hidrocarbonetos e metais que podem ter efeito deletério na biota local. No ambiente marinho, o compartimento mais afetado em relação a essa contaminação é o sedimento em função dos derivados de petróleo que atingem as águas costeiras possuem maior densidade, nele se depositando. Atualmente existe uma grande preocupação com os impactos gerados por atividades antrópicas em ecossistemas litorâneos e muitos estudos têm sido feitos em busca de alternativas para avaliar e remediar tais impactos. Uma delas consiste no uso de micro-organismos tanto como indicadores da contaminação por poluentes quanto para a diminuição da contaminação, processo popularmente conhecido como biorremediação. Deste modo, o presente estudo teve como objetivos: 1) avaliar o efeito da presença de hidrocarbonetos na abundância de bactérias heterotróficas, cianobactérias e leveduras em sedimentos e águas estuarinas de duas regiões distintas, dos Estuários de Santos e do Rio Itanhaém, tanto no que diz respeito às características ambientais quanto em relação ao grau de contaminação que apresentam; 2) isolar microrganismos, com ênfase em leveduras, para futura avaliação do potencial como bioindicadoras de contaminação por hidrocarbonetos provenientes de petróleo e como biorremediadoras de sedimentos estuarinos; e 3) contribuir para um banco de micro-organismos desse ambiente para estudos posteriores. Amostras de sedimento e água foram coletadas em três pontos distintos nas duas áreas amostrais com análises de parâmetros físico-químicos com pHmetro de campo e refratômetro. A densidade de micro-organismos foi determinada por contagem direta em microscópio de epifluorescência, utilizando DAPI como corante e isolamento feito pela técnica de "spread plate" nos meios de cultura apropriados. A identificação das estirpes de leveduras isoladas utilizou critérios morfológicos, fisiológicos e moleculares (análise da região D1/D2 e utilização da ferramenta Blastn da base de dados NCBI), enquanto as análises de metais e hidrocarbonetos foram realizadas pelo Laboratório de Análises Corplab. Houve grande diferença dos parâmetros físico-químicos entre as duas áreas de coleta, tendo ocorrido eventos de tempestade durante o período amostral, que podem ter influenciado os resultados obtidos. Maiores densidades de cianobactérias foram encontradas nas amostras de água de Itanhaém e nos sedimento de Santos, enquanto que as densidades de

bactérias heterotróficas foram superiores nas amostras de água dos dois estuários. Em relação às leveduras, as maiores densidades foram encontradas nas amostras de água de Itanhaém e no sedimento de Santos, entretanto, o maior número de isolados foi obtido nas amostras de sedimento de Itanhaém que apresentou, também, maior diversidade de espécies. Nas amostras de Santos foi isolada uma espécie patogênica do sistema nervoso central (*Exophiala dermatitidis*), bem como duas espécies que apresentaram baixa identidade em comparação às informações disponíveis nos bancos de dados sendo, possivelmente, espécies ainda não descritas. A maior concentração de poluentes encontrada nas amostras de Santos possivelmente influencia a estrutura das comunidades de micro-organismos, alterando a predominância das espécies presentes.

Palavras chave: Hidrocarbonetos. Leveduras. Manguezais. Micro-organismos.

ABSTRACT

Coastal ecosystems have great socio-economic, political and cultural importance, as well as high productivity which support a wide range of economic activities and leisure. They have high landscape value thus attracting numerous people contributing to the development of coastal cities. Moreover, its high productivity supports biological communities and maintenance of many species living or using the coastal zone as a nursery for breeding, benefiting whole biodiversity. Being a region that suffers high anthropogenic pressure, the Coastal Zone is subject to numerous impacts caused by human activities such as port activities, industrial and oil exploration. These generate impacts on the environment by launching several pollutants, including hydrocarbons and metals that can have deleterious effects on local biota. The most affected marine environment is the sediment due to oil products that reach coastal waters have a higher density and end up being deposited in sediments. Nowadays there is great concern about the impacts generated by human activities on coastal ecosystems and many studies have been done in search of alternatives to evaluate and remedy such impacts. One alternative is the use of micro-organisms both as indicators of contamination by pollutants and for reduction of contamination, a process popularly known as bioremediation. Thus, this study aimed to evaluate the effect of the presence of hydrocarbons in the abundance of heterotrophic bacteria, cyanobacteria and yeast on sediment and estuarine waters of two distinct regions: The Estuaries of Santos and Itanhaém River are located in the metropolitan area of Santos, Sao Paulo State; and to isolate microorganisms with emphasis on yeasts, for further evaluation of its potential both as bioindicators of hydrocarbon contamination and bioremediation of estuarine sediments in order to contribute to a bank of micro-organisms from this environment for further studies. Water and sediment samples were collected at three different points in the two sites and analysis of the physical - chemical parameters were made by a field pHmeter and a refractometer. The density of micro - organisms was determined by direct count with an epifluorescence microscopy using DAPI staining and isolation was done using spread plate technique with the appropriate media culture. The identification of yeast strains isolated were examined using morphological, physiological and molecular criteria (D1/D2 region analysis and use of the Blastn tool of NCBI database) and analysis of metals and hydrocarbons was performed by the Analytical Laboratory Corplab. There was difference in physical and chemical parameters between the two sampling areas that could be caused by the storm events that occurred during the study period. Higher densities of cyanobacteria were found in water samples from Itanhaém and sediment samples from Santos, while densities of heterotrophic bacteria were higher in water samples from both estuaries. Regarding yeasts, higher densities were found in water samples from Itanhaém and sediment samples from Santos, but the largest number of isolates was obtained in sediment samples from Itanhaém which showed also a greater diversity of species. A pathogenic species of the central nervous system was isolated from Santos

samples (*Exophiala dermatitidis*) and two species that showed low identity with those described in the databases, being possibly undescribed species. The highest concentration of pollutants found in samples of Santos possibly influences the community structure of micro-organisms by changing the predominant species present.

Key words: Hydrocarbons. Mangroves. Micro-organisms. Yeasts.

Sumário

Pág.

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Ecossistemas Costeiros	17
2.1.2 Ecossistema de Manguezal	18
2.2 Impactos Antrópicos em Ecossistemas Costeiros	20
2.2.1 Metais e Hidrocarbonetos em Sistemas Estuarinos	21
2.3 Micro-organismos Associados aos Manguezais	24
2.4 Ecologia e Distribuição de Bactérias, Cianobactérias e Leveduras	25
2.4.1 Bactérias Heterotróficas	25
2.4.2 Cianobactérias	26
2.4.3 Leveduras	27
2.5 Micro-organismos Hidrocarbonoclasticos	28
3. OBJETIVOS	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 Áreas de Estudo	32
4.1.1 Santos	33
4.1.2 Itanhaém	33
4.2 Coleta e Processamento de Amostras	34
4.3 Contagens de Micro-organismos	35
4.3.1 Contagem Direta de Bactérias Heterotróficas (BH) e Cianobactérias (Cb)	35
4.3.2 Contagem Direta de Leveduras	35
4.4 Isolamentos de Micro-organismos	36
4.4.1 Leveduras	36
4.4.2 Isolamento de Leveduras Negras	36
4.4.3 Caracterização das leveduras utilizando critérios morfológicos e fisiológicos ...	37
4.4.4 Caracterização por Métodos Moleculares	38
4.5 Identificação de Leveduras por Métodos Moleculares	38
4.5.1 Extração de DNA Bruto	38
4.5.2 Agrupamento das Estirpes por MSP-PCR	38
4.5.3 Amplificação – PCR (região D1/D2 do DNA ribossômico 26S)	39
4.5.4 Reação de Sequenciamento	40
4.5.5 Purificação da Reação de Sequenciamento	40
4.6 Isolamento de Bactérias Heterotróficas	40
4.7 Parâmetros Físico-Químicos	41
4.8 Análise Química do Sedimento	41
4.9 Análises Estatísticas	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Parâmetros Físico-Químicos	43
5.2 Metais Pesados e Hidrocarbonetos	44
5.3 Contagem Direta de Micro-organismos	49
5.4 Isolamento de Micro-organismos	52
5.4.1 Bactérias	52
5.4.2 Isolamento de Leveduras	53
CONCLUSÕES	60
BILIOGRAFIA	61

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Exemplos de ecossistemas costeiros (adaptado de BURKE et al., 2001).	17
Tabela 2 - Principais fontes de poluição industrial na Baixada Santista (adaptado de CETESB, 2001).	20
Tabela 3 - Critérios utilizados para avaliação da qualidade de sedimentos de acordo com a <i>Environmental Canada</i> (fonte: CETESB, 2001).	42
Tabela 4 - Parâmetros físicos dos pontos amostrados em Santos e Itanhaém.....	44
Tabela 5 – Concentrações (mg.kg^{-1}) de solventes aromáticos presentes nas amostras de Santos e Itanhaém.	48
Tabela 6 - Quantidade de estirpes de bactérias isoladas dos pontos amostrados nos estuários de Santos e Itanhaém	53
Tabela 7 - Quantidade de estirpes de leveduras isoladas na água e no sedimento de Santos e Itanhaém	53
Tabela 8 - Estirpes isoladas das amostras de água de Santos.....	55
Tabela 9 - Estirpes isoladas das amostras de sedimento de Santos	56
Tabela 10 - Estirpes isoladas das amostras de água de Itanhaém.....	57
Tabela 11 - Estirpes isoladas das amostras de sedimento de Itanhaém	58

Índice de Figuras

Figura 1 - Pontos de coleta nos estuários de Santos e Itanhaém (Fontes: Google Earth e Coastline Extractor).....	32
Figura 2 - Processamento das amostras de sedimento coletadas em Santos e Itanhaém.	34
Figura 3 - Processamento das amostras de sedimento para o isolamento de leveduras negras.....	37
Figura 4 - Concentração de mercúrio (a), zinco (b), chumbo (c) e tph (d) nas amostras de sedimento de Santos e Itanhaém (as linhas pontilhadas correspondem aos limites de TEL estabelecidos pela legislação Canadense com exceção do TPH, para o qual não existem limites estabelecidos)	45
Figura 5 - Marinas existentes no Rio Santo Amaro	48
Figura 6 - Densidade de cianobactérias na água e no sedimento de Santos e Itanhaém por pontos amostrados (STS= Santos; ITA= Itanhaém)	50
Figura 7 - Densidade de bactérias na água e no sedimento de Santos e Itanhaém	50
Figura 8 - Densidade de leveduras na água e no sedimento de Santos e Itanhaém	51
Figura 9 – Classificação em grandes grupos das estirpes obtidas	54

1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas costeiros detêm grande importância por sua alta produtividade, que suporta uma gama de atividades econômicas. Possuem elevado valor paisagístico, atraindo inúmeros habitantes e, assim, contribuem para o desenvolvimento das cidades litorâneas, além de suportar comunidades biológicas e possibilitar a manutenção de muitas espécies residentes ou que utilizam a zona costeira como berçário para reprodução, beneficiando a biodiversidade como um todo.

Sendo um ambiente de grande especulação imobiliária e de fácil acesso aos portos e marinas, se constitui numa área de grande pressão, já que muitas indústrias ali se instalam para aproveitar as facilidades para o escoamento da produção. Esse atrativo gera um aumento na população local em busca de trabalho e melhores condições de vida; entretanto, esse aumento populacional nem sempre é acompanhado por melhorias no sistema de saneamento básico, o que acarreta ligações clandestinas de esgoto que acabam por introduzir efluentes domésticos nesse ambiente, caracterizando um grave quadro de poluição ambiental.

Além dos efluentes domésticos, também são gerados efluentes industriais que podem conter diversos contaminantes persistentes, que podem causar graves impactos à biota local ou se aderir às partículas de sedimento e sofrer processos de ressuspensão. Entre esses contaminantes podemos citar os metais pesados e os hidrocarbonetos provenientes do petróleo.

Entretanto, atualmente existe uma grande preocupação com os impactos gerados por atividades antrópicas, com muitos estudos tendo sido feitos em busca de alternativas para remediar esses impactos. Uma das alternativas consiste no uso de micro-organismos para a diminuição da contaminação, tanto na água quanto no sedimento de ambientes costeiros, processo popularmente conhecido como biorremediação.

Nesse sentido, o presente estudo buscou avaliar a abundância de alguns componentes da alça microbiana em estuários da Baixada Santista, bem como a influência da contaminação antrópica sobre eles, além de isolar e identificar alguns micro-organismos com potencial para uso em ambientes impactados por petróleo, como é o caso da região do Porto de Santos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ecossistemas Costeiros

A zona costeira, considerada como a interface entre a terra e o oceano aberto, ocupa cerca de 8% da área e 0,5% dos oceanos. Apesar disso, a alta produtividade dos ecossistemas costeiros corresponde a aproximadamente 30% da produção primária e 90% dos recursos pesqueiros do globo (HOOLIGAN & REINERS, 1992). Esta alta produtividade está relacionada à entrada de nutrientes vindos de rios, de lençóis freáticos, de ressurgências, trocas com a plataforma continental e *inputs* atmosféricos (ALONGI, 1998).

Nessa interface, a zona costeira age como um “aprisionador” de matéria orgânica, sedimento, metais e outros poluentes vindos do ambiente terrestre.

Os ambientes costeiros podem ser definidos de acordo com suas características físicas, químicas e biológicas, gerando uma grande variedade de ambientes bênticos, pelagiais, intertidais e próximos à costa. Estes habitats coexistem e, por serem sistemas dinâmicos, torna-se difícil estabelecer sua exata localização e seus limites. Exemplos de tais comunidades estão listados na tabela 1.

Tabela 1 - Exemplos de ecossistemas costeiros (adaptado de BURKE et al., 2001).

Próximo à costa	Dunas, costões rochosos, praias arenosas, restingas, paisagens urbanas, agrícolas e industriais.
Bênticos	Florestas de algas, gramas marinhas, recifes de corais, ambientes de substrato não consolidado acima da plataforma continental, recifes artificiais.
Pelagiais	Oceano aberto acima da plataforma continental, florescimentos de plâncton.
Intertidais (entre-marés)	Estuários, deltas, lagoas, manguezais, áreas costeiras alagáveis, portos e marinas, áreas de aquicultura.

Os estuários se destacam entre os ecossistemas costeiros devido a sua grande importância tanto biológica quanto social. Por definição “estuário é um corpo de água

costeiro semi-fechado que estende seu limite até a influência da maré, dentro do qual a água marinha que entra por uma ou mais conexões com o mar aberto, ou qualquer outro corpo de água salina, é significativamente diluída com a água doce proveniente da drenagem do continente, podendo sustentar espécies biológicas eurohalinas em parte ou em todo seu ciclo de vida” (PERILLO, 1995).

2.1.2 Ecossistema de Manguezal

Os manguezais constituem o ecossistema mais produtivo conhecido até o momento, estando distribuídos ao longo de latitudes tropicais e subtropicais. Caracterizam-se como a interface entre o ambiente terrestre e o ambiente marinho, estando sujeitos à variação diária da maré. Constituem-se de espécies vegetais típicas, bem como de micro e macroalgas adaptadas à variação da salinidade, que colonizam seus sedimentos lodosos com pouco oxigênio (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995). Além disso, o ecossistema de manguezal suporta uma grande diversidade de organismos, compreendendo várias espécies de plantas, animais e micro-organismos.

Segundo Schaeffer-Novelli (1995), para que se desenvolvam, os manguezais necessitam de condições particulares como: (i) temperatura média acima de 20°C; (ii) temperatura mínima não inferior a 15°C; (iii) amplitude térmica anual menor que 5°C; e (iv) precipitação pluvial acima de 1.500mm/ano, sem períodos longos de seca.

O ecossistema de manguezal possui características físico-químicas muito particulares no que diz respeito à salinidade, temperatura, marés e condições anaeróbicas de sedimento. A grande variação das marés colabora para um aumento da área intertidal, contribuindo para o desenvolvimento deste ecossistema.

Já a salinidade possui um importante papel na distribuição das espécies presentes nos manguezais, bem como em sua produtividade e crescimento. Mudanças na salinidade deste ambiente são controladas pelo clima, hidrologia, precipitação, topografia e amplitude de maré, fazendo com que os organismos que nele habitam possuam adaptações morfo-fisiológicas que permitem seu estabelecimento.

Um dos fatores importantes que regem este ambiente é a concentração de nutrientes, cujo fluxo está diretamente relacionado à assimilação pelas plantas e à remineralização por micro-organismos. Cabe aos micro-organismos o papel de fixar o nitrogênio, convertê-lo em amônia e torná-lo disponível às plantas, uma vez que a

concentração de nitrogênio inorgânico dissolvido é muito baixa neste ambiente (ROBERTSON & ALONGI, 1992).

A disponibilidade de nutrientes pode limitar o crescimento e produtividade do mangue, bem como apresentar alterações em manguezais impactados por ações antrópicas. Triwilaida & Intari (1990) observaram diferenças significativas na concentração de nutrientes entre manguezais impactados e não impactados, assim como Kathiresan (2002) encontrou baixo nível de nutrientes disponíveis, alta salinidade e baixa carga microbiana em manguezais degradados.

Diante dessas condições, a vegetação que se desenvolve no manguezal é composta, principalmente, por plantas lenhosas (mangue), que possuem adaptações características para sobreviverem neste ambiente, como os pneumatóforos que auxiliam na oxigenação e diminuição do impacto das ondas, além de adaptações fisiológicas que permitem a filtração/secreção de sais e reprodução por viviparidade (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995). Além disso, essa vegetação caracteriza-se pela expressiva perda de folhas durante um grande período compondo a serrapilheira, que se constitui em rica fonte de matéria orgânica para o ambiente.

Na vegetação predominam três gêneros (*Laguncularia*, *Rhizophora*, *Avicennia*), eventualmente ocorrendo também *Conocarpus*. No Brasil, as espécies mais comuns são *Laguncularia racemosa* (mangue-branco), *Rhizophora mangle* (mangue-vermelho) e *Avicennia schaueriana* (mangue-preto).

Em contrapartida, a fauna de manguezais é composta por uma grande diversidade de peixes, aves, répteis e mamíferos, tendo origem nos ambientes terrestre, marinho e de água doce, podendo ser residentes ou semi-residentes.

O sedimento lamoso ou arenoso, do qual é geralmente constituído, possibilita o estabelecimento de uma variedade de organismos invertebrados de infauna, meiofauna e ebipentônicos. Os canais aquáticos nos ecossistemas de manguezal também oferecem suporte para muitas comunidades fito e zooplanctônicas, além de uma grande diversidade de peixes.

O sedimento tem origens diversas e características variáveis, estando associado a elevados teores de matéria orgânica decorrentes da decomposição de folhas e restos animais do próprio ambiente ou associados a restos de plantas/animais trazidos de outros ambientes por ondas, ventos, correntes litorâneas e fluxos de marés (SCHAEFFER-NOVELLI, 1995).

Além disso, os manguezais também possuem um importante papel como berçário para juvenis de diversas espécies de peixes, além de atrair uma rica comunidade de epifauna, incluindo as bactérias, fungos, macroalgas e invertebrados.

2.2 Impactos Antrópicos em Ecossistemas Costeiros

A Zona Costeira está sujeita a inúmeros impactos e pressões causadas por atividades antrópicas, como as atividades portuárias, industriais e de exploração de petróleo. Essas geram impactos por lançar nos estuários e no ambiente costeiro diversos poluentes, entre eles os hidrocarbonetos e PAHs (hidrocarbonetos poliaromáticos), além de diversos metais que podem ter efeito deletério à biota local.

Inúmeras indústrias se instalam na região costeira pela proximidade com os portos e com as cidades. Na Baixada Santista, por exemplo, existem indústrias que produzem os mais variados tipos de produtos e, conseqüentemente, geram muitos resíduos que podem afetar o ambiente próximo (Oliveira et al., 2008). Um relatório da CETESB de 2001 já apontava a existência, na Baixada Santista, de indústrias que utilizam em seu processo de produção diversos metais pesados, além de solventes, fenóis, cianeto, entre outros, que podem afetar significativamente o ambiente e a biota local (Tab. 2).

Tabela 2 - Principais fontes de poluição industrial na Baixada Santista (adaptado de CETESB, 2001).

Indústria	Produção Principal	Solventes Aromáticos	Arsênio	Metais pesados						
				Cádmio	Chumbo	Cobre	Manganês	Mercurio	Níquel	Zinco
Carbocloro	Cloro, soda, EDC							D		D
CBE	Estireno	A				E		E		D
Cia Santista de papel	Papel			D		D		D	D	D
CIEL	Coque verde (beneficiamento)						*		*	*
Copebrás	Ácidos fosfóricos, fertilizantes (P)							E		E
Cosipa	Aços	B	B	E	E	D	D	E	D	D
Dow Química	Látex, polióis e poliestireno	A	E	D	D	D	D	D	D	D
Liquid Química	Ácido benzóico	A					A	D		
Petrobrás - RPBC	Derivados de petróleo	A		E	A	D		D	D	D
Petrocoque	Coque verde (beneficiamento)		E				D		D	D
Solorríco	Fertilizantes (N, P)			D						
Ultrafertil- CB	Fertilizantes (N)		E		D	E	E		D	D
Union carbide	Polietileno						A			D

*Contaminante presente na matéria prima/produto. Critérios de classificação: **A** – O poluente constitui matéria prima ou insumo do processo produtivo; **B** – O poluente é resíduo (líquido ou sólido) obrigatório do processo produtivo; **D** – O poluente foi verificado em análises químicas dos efluentes entre 1979 e 1999; **E** – O poluente foi verificado em análises químicas dos efluentes cujos resultados apresentaram valores menores.

O compartimento marinho mais afetado em relação a essa contaminação é o sedimento, pois os derivados de petróleo que atingem as águas costeiras, por apresentarem maior densidade do que a água, acabam nele se depositando. Já os metais são retidos nos sedimentos por causa das condições anaeróbicas aliadas a outras condicionantes (granulometria fina, pH ácido, entre outros), além de serem tipicamente redutores, aprisionando metais (TAM & WONG, 1996; CHE, 1999; TAM & WONG, 2000; SAIFULLAH et al., 2002).

Os sedimentos estuarinos contaminados apresentam maior dificuldade para remediação, pois os contaminantes ficam aderidos às partículas do sedimento e uma parte deles pode ser ressuspensa, por processos turbulentos, para a coluna de água (MEDEIROS & BÍCEGO, 2004).

2.2.1 Metais e Hidrocarbonetos em Sistemas Estuarinos

Mercúrio

O mercúrio é encontrado em concentrações reduzidas em rochas magmáticas, apresentando maior concentração em rochas sedimentares e em sedimentos argilosos. A concentração de mercúrio em perfis de solos virgens está relacionada ao material de origem e entrada desse metal por via atmosférica, já que ele é de fácil volatilização e lançado na atmosfera por atividade vulcânica.

As principais fontes de contaminação ambiental por mercúrio são as indústrias de processamento de metais, fabricação de pilhas, lâmpadas fluorescentes, bem como lodo de esgoto e outros resíduos. Segundo um levantamento feito pela CETESB (2001), as principais fontes de contaminação do Sistema Estuarino Santos-São Vicente são as seguintes indústrias: Carbocloro, a RPBC-Petrobrás, a Liquid Química, a Cosipa e a Dow Química. Entretanto, a concentração de mercúrio encontrada nos efluentes dessas indústrias esteve abaixo dos limites legais para lançamento (CETESB, 1986), com cerca de 40% das amostras de sedimento analisadas apresentando valores acima do TEL (*Threshold Effect Level*) e, destas, 8% com valores acima do PEL (*Probable Effect Level*).

Zinco

O zinco é um metal amplamente distribuído na natureza, ocorrendo nos solos e servido como nutriente essencial às plantas em geral. Nos solos, os valores de zinco em áreas não poluídas variam de 10 a 30 $\mu\text{g.g}^{-1}$. O uso do zinco em sua forma metálica ou como sais é comum em diversos ramos industriais. Na Baixada Santista o zinco é encontrado nos efluentes de grande parte das indústrias, dos terminais e em áreas contaminadas da região. Além do uso industrial, o zinco está presente nas habitações (telhas, utensílios), bem como em produtos diversos encontrados no lixo e nos esgotos domésticos.

Chumbo

O chumbo tem sua ocorrência natural em rochas, ocorrendo em concentrações que variam de 0,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (rochas ultramáficas e calcários) a 40 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (rochas magmáticas ácidas e sedimentos argilosos) (KABATA-PENDIAS & PENDIAS *apud* CETESB, 1997). As emissões atmosféricas de chumbo, especialmente no período em que era adicionado à gasolina como antidetonante, contribuíram para um acréscimo significativo do metal nos solos e nas águas superficiais, refletindo-se, inclusive, nos estuários e oceanos (KENNISH, 1997).

O chumbo geralmente está associado à indústria de extração, beneficiamento e fundição do metal, sendo contaminante em efluentes de indústrias de refino de petróleo, petroquímicas e siderúrgicas, entre outras. Em Cubatão, as principais fontes industriais detectadas são a RPBC (Refinaria Presidente Bernardes-Cubatão), da PETROBRÁS, e a Ultrafertil-CB, que lançam seus efluentes no Rio Cubatão, apesar das concentrações de chumbo encontradas nos efluentes da primeira serem até 100 vezes superiores às encontradas na segunda. Já os efluentes da Cosipa e da Dow Química são lançados diretamente no Estuário de Santos. Como outras fontes potenciais, existem o Lixão de Pilões, o canal de fuga da Usina Henry Borden e a DTCS-Cubatão. Esta última possui resíduos de chumbo enterrados de forma irregular em área próxima ao terminal, sendo ainda desconhecidos os riscos para o solo e águas subterrâneas.

TPH total (*Total Petroleum Hydrocarbons – Hidrocarbonetos totais de petróleo*)

Produtos de petróleo são misturas complexas de vários componentes, desde cadeias orgânicas leves e voláteis até cadeias longas; sua composição exata varia de acordo com a fonte de óleo cru e das práticas de refino utilizadas para produzir este óleo.

A quantidade total de hidrocarbonetos de petróleo ou TPH (*Total Petroleum Hydrocarbons*) é um parâmetro frequentemente usado para avaliar a contaminação proveniente de vazamentos de petróleo, fornecendo informações sobre a concentração de hidrocarbonetos de uma determinada amostra (TPH WORKING GROUP, 1998).

Quando o TPH é liberado diretamente na coluna d'água através de derramamentos, uma fração, por ser menos densa que a água, forma uma pequena camada acima desta, enquanto outras frações mais pesadas se acumulam no sedimento, onde podem permanecer por um longo período (ATSDR, 1999).

Solventes Aromáticos (BTEX)

Os solventes aromáticos são hidrocarbonetos voláteis, constituídos de um anel aromático. São compostos presentes no petróleo e seus derivados, destacando-se entre as mais importantes matérias primas para a indústria petroquímica. Os principais solventes aromáticos são o Benzeno, Etil-benzeno, Tolueno e Xileno (BTEX), sendo os mais manipulados pelo setor industrial. O benzeno atua como solvente em processos industriais, além de ser um composto intermediário na síntese do estireno, detergentes, pesticidas, ciclohexano, entre outros. As aplicações industriais diversificadas destes poluentes redundam em numerosas fontes potenciais, com destaque ao setor de refino de petróleo e de petroquímica, além dos terminais de combustíveis e outros derivados. Há, também, uma contribuição difusa destes solventes a partir de pequenas fontes que estocam/consomem combustíveis em geral (p. ex., postos de gasolina, pátios de lavagem de máquinas/caminhões, marinas, entre outras).

Na Baixada Santista, os solventes aromáticos são encontrados nos efluentes de todos os terminais de graneis líquidos, da refinaria da Petrobrás, das indústrias petroquímicas (CBE, Liquid Química) e na Cosipa. Os constantes acidentes ambientais envolvendo derrames de óleo na área industrial e portuária são uma importante fonte de BTEX para os ecossistemas estuarinos e marinhos da região. Benzeno, tolueno, xileno e alguns de seus derivados são moderadamente voláteis e solúveis em água.

Conseqüentemente, não ocorre acumulação em larga escala nos sedimentos, resultando em baixas concentrações na maioria dos rios e áreas costeiras (MOORE & RAMAMOORTHY, 1984).

A contaminação por hidrocarbonetos e metais tem forte influência na biota dos ecossistemas costeiros, inclusive nos organismos de menor tamanho. Em ambientes aquáticos, micro-organismos como as bactérias, cianobactérias unicelulares, leveduras, protozoários e até mesmo vírus, apresentam abundância, biomassa, atividade metabólica e diversidade genética/bioquímica muito superior às dos metazoários. Esses micro-organismos constituem uma cadeia alimentar com diversas interações tróficas (alça microbiana, segundo AZAM, 1983), sendo responsáveis em transferir grande parte da matéria/energia do ecossistema marinho aos níveis tróficos superiores (POMEROY et al., 2007)

Os organismos que compõe a alça microbiana da coluna de água e de sedimentos marinhos apresentam respostas ao estresse causado por atividades humanas, que pode ocorrer tanto em nível populacional quanto celular. As mudanças em nível de população incluem seleção de espécies mais resistentes e na diversidade geral, enquanto aquelas em nível celular implicam numa grande variedade de mecanismos adaptativos (FORD, 2000).

2.3 Micro-organismos Associados aos Manguezais

Os manguezais são ricos em diversidade microbiana, que é fundamental à manutenção da produtividade, conservação e recuperação desse ecossistema. Segundo Alongi (2002), 91% da biomassa microbiana nos manguezais compreendem bactérias e fungos, que estão diretamente envolvidos na transformação dos nutrientes, fotossíntese, fixação do nitrogênio atmosférico, produção de metabólitos como também de enzimas e antibióticos, além de serem reservatórios de produtos de interesse biotecnológico (ANISZEWSKI et al., 2010).

Os micro-organismos contribuem diretamente para a alta produtividade dos manguezais, uma vez que participam de um sistema altamente eficiente de ciclagem de nutrientes onde os essenciais são mantidos e outros são gerados por decomposição da matéria orgânica (HOLGUIN & BASHAN, 2001). Também são responsáveis pela maior parte do fluxo de carbono nos sedimentos, pois toda matéria orgânica não exportada fica

retida no sedimento, onde sofre degradação ou modificação química pelos micro-organismos (KRISTENSEN et al., 2008).

2.4 Ecologia e Distribuição de Bactérias, Cianobactérias e Leveduras

2.4.1 Bactérias Heterotróficas

As bactérias são seres procariotos que carecem de membrana nuclear e outras estruturas intracelulares organizadas, normalmente observadas nos eucariotos (PELCZAR et al., 1981). Existe uma enorme variedade de procariotos dentro do domínio Bacteria, com diversos tipos morfológicos e fisiológicos.

As bactérias estão distribuídas por vários habitats, podendo ocorrer desde o ambiente aquático, terrestre ou mesmo associadas sobre ou no interior de plantas e animais como organismos saprófitos ou patogênicos. Apresentam grande diversidade metabólica, podendo obter energia tanto da luz como de compostos químicos, sendo classificadas como quimiorganotróficas, fototróficas, quimiolitotróficas, heterotróficas, dentre outras.

As bactérias heterotróficas possuem grande importância ecológica, pois atuam como decompositoras, contribuindo para o retorno de energia/matéria orgânica para a teia alimentar e por servirem de alimento para organismos de maior tamanho. Algumas espécies podem fixar nitrogênio atmosférico gerando amônia, que pode ser utilizada pelas plantas ou ser metabolizada por outras bactérias presentes no solo, liberando nitratos (NO_3^-). Além do papel ecológico, as bactérias também possuem um importante papel econômico, pois são utilizadas em diversos setores industriais com os mais diversos propósitos. São utilizadas na indústria de laticínios (na produção de queijos, iogurtes e requeijão), na fabricação de vinagre (onde transformam o etanol do vinho em ácido acético), na produção do ácido glutâmico (substância utilizada em temperos para acentuar o sabor dos alimentos) e na produção de antibióticos e vitaminas.

A tecnologia do DNA recombinante, também denominada "Engenharia Genética", tem permitido alterar geneticamente certas bactérias produzindo substâncias economicamente interessantes, como a insulina humana.

Também são utilizadas para a decomposição de matéria orgânica em estações de tratamento de esgoto, bem como na degradação da matéria orgânica de esgotos e lixo doméstico em biodigestores.

2.4.2 Cianobactérias

As cianobactérias apresentaram um importante papel no desenvolvimento da vida, pois foram os primeiros organismos fototróficos oxigênicos a surgirem na Terra. Correspondem a um grupo filogeneticamente associado às bactérias Gram-positivas, com metabolismo gerador de oxigênio molecular, similar ao que ocorre nas plantas (MADIGAN et al., 2004).

Suas células contêm clorofila *a* e outros pigmentos acessórios (p. ex., a ficocianina, a ficoeritrina e a aloficocianina), que são responsáveis por sua coloração (LORENZI, 2008). Além da capacidade de reduzir o dióxido de carbono pela fotossíntese, algumas espécies podem realizar a fixação do nitrogênio atmosférico, contribuindo, assim, para a fertilidade dos solos e águas, além de servirem de alimento para organismos de níveis tróficos superiores (RAI, 1990).

Sua distribuição ocorre em todos os ambientes onde haja luz (exceto em ambientes com pH mais ácido), inclusive em ambientes extremos como areia e rochas desérticas, e lagos do Ártico e Antártica (CASTENHOLZ, 1973; DOR & DANIN, 1996). Apresentam formas diversas em arranjos e tamanhos, não possuem flagelos e muitas vezes formam densos tapetes que podem ser facilmente observados a olho nu (BROCK, 1973).

As cianobactérias, em conjunto com as algas, formam a maior parte da biomassa mundial (CANEL, 1993), detendo importância ecológico-econômica, seja na produção de alimentos com alto valor nutricional ou na conversão de energia solar. Desta forma são consideradas como um dos grupos de micro-organismos com maior potencial para o isolamento de novos produtos bioquimicamente ativos, com aplicação na biorremediação, biodegradação e desenvolvimento de novos fármacos (SKULBERG, 1995; CHAY et al., 2005).

2.4.3 Leveduras

O termo levedura deriva de *gist* e *gischt*, palavras alemãs, que se referem à fermentação, que constitui uma das características de muitas espécies. Leveduras constituem um grupo polifilético de fungos ascomicetos e basidiomicetos com uma peculiar característica de crescimento unicelular, se reproduzindo, principalmente, por brotamento (RAVEN et al., 2001).

Segundo Kurtzman & Fell (1998), estima-se que existam cerca de 800 espécies de leveduras distribuídas em aproximadamente 100 gêneros o que, segundo estimativas, corresponderia a 1% das espécies existentes na natureza. Entretanto, com o advento das técnicas baseadas em análises moleculares, o número de espécies descritas vem aumentando a cada dia.

Embora algumas espécies de leveduras sejam patogênicas, sua utilização para preparo de vinho e cerveja ocorre desde a antiguidade. O uso de leveduras data de mais de 7.000 A.C., quando o vinho já era produzido na Suméria, enquanto que, nos dias atuais, estão envolvidas na produção de cerca de 60 milhões de toneladas de cerveja e 30 milhões de toneladas de vinho.

De fato, inúmeras espécies possuem grande importância industrial e na agricultura. Vários processos industriais, como produção de bebidas alcoólicas, biomassa e produtos metabólicos utilizam leveduras, sendo que muitos desses produtos podem ser produzidos comercialmente, enquanto outros possuem grande potencial biotecnológico.

As leveduras estão distribuídas por uma grande diversidade de habitat, podendo ser encontradas em ambientes terrestres, aquáticos, bem como em animais e plantas. No ambiente aquático são amplamente distribuídas, ocorrendo em oceano aberto, mares, estuários, lagos e rios (FELL, 2001). Entretanto, é difícil caracterizar as águas como habitat específico para as leveduras, pois este sofre influência do ambiente terrestre, das águas de drenagem, dos efluentes domésticos/industriais, dentre outros.

Sieburth (1979) observou que as leveduras são os fungos dominantes nos oceanos, apesar de estarem em menor número quando comparadas às bactérias. De fato, diversos gêneros já foram observados em ambientes costeiros, como *Debaryomyces* (isolado próximo às praias) e *Kluveromyces* (isolado exclusivamente em ambientes marinhos). Entretanto, Araujo et al. (1995) demonstraram sua elevada ocorrência em caranguejos o que, possivelmente, explica sua abundância neste ambiente.

No entanto, *Leucosporidium* spp., *Rhodosporidium* spp., *Candida austromarina*, *Candida natalensis* e *Sympodiomyces parvus* são provavelmente autóctones, já tendo sido encontrados em altas concentrações em amostras de águas de oceano aberto (FELL, 1976).

A população de leveduras em ambientes costeiros possui uma correlação positiva com indicadores de poluição como: demanda bioquímica de oxigênio, carbono orgânico, bactérias heterotróficas e coliformes fecais (MENDONÇA-HAGLER et al., 1995). Desta forma, uma hipótese plausível seria que as leveduras encontradas no ambiente costeiro se originam do ambiente terrestre, principalmente de efluentes domésticos.

Inúmeros fatores bióticos e abióticos podem afetar a distribuição de espécies de leveduras no ambiente e, como são organismos heterotróficos, a disponibilidade de fontes de carbono orgânico é aspecto relevante. Além disso, compostos como açúcares simples, ácidos orgânicos, alcoóis (incluindo metanol), hidrocarbonetos, fenóis, polissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos e lipídeos, conferem às leveduras uma versatilidade metabólica que permite a ocupação de diversos nichos.

Muitas espécies de leveduras toleram a concentração de sal e o pH dos ambientes costeiros e, principalmente, as flutuações de temperatura que caracterizam esse ambiente.

2.5 Micro-organismos Hidrocarbonoclasticos

Os primeiros estudos da utilização de hidrocarbonetos por microrganismos foram realizados em 1906 por Sohnger e Kaserer. Em 1913, Sohnger relatou que gasolina, querosene, parafina e óleo de parafina poderiam ser oxidados a CO₂, água e traços de ácidos orgânicos por micro-organismos.

Os micro-organismos estudados pertenciam principalmente aos gêneros *Mycobacterium* e *Pseudomonas*, enquanto que Gray & Thornton (1928) isolaram vários organismos pertencentes aos gêneros *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Bacterium*, *Bacillus* e *Spirillum*, capazes de decompor compostos aromáticos como naftaleno, tolueno, cresol e fenol.

A habilidade em degradar hidrocarbonetos não é restrita a apenas alguns gêneros de micro-organismos, pois vários grupos de bactérias, cianobactérias, e leveduras

possuem essa capacidade (ZINJARDE & PANT, 2002; ROLING et al., 2004; TOYODA et al., 2005).

Em uma extensa revisão sobre a ação dos micro-organismos em hidrocarbonetos, ZoBell (1946) descreveu que muitas espécies podem utilizá-los como única fonte de carbono e energia, sendo o motivo de sua ampla distribuição na natureza.

De fato, diversos trabalhos comentam sobre o potencial de leveduras e bactérias heterotróficas como degradadoras de hidrocarbonetos provenientes do petróleo. Ilzuka & Komagata (1964) examinaram cerca de 500 espécies de leveduras quanto à capacidade de utilizar hidrocarbonetos. Destas, 56 espécies possuíam tal capacidade, a maioria delas pertencente ao gênero *Candida*.

Shaerun e colaboradores. (2004), isolaram 39 bactérias com potencial para degradar hidrocarbonetos em estudos feitos na costa do mar do Japão, enquanto Zinjarde & Pant (2002) isolaram bactérias e leveduras capazes de degradar mais de 10% do óleo cru das amostras dos sedimentos coletados em Mumbai, sendo todas as leveduras isoladas pertencentes ao gênero *Candida*.

De acordo com D'Souza (1979) e Kobatake e colaboradores. (1992), as leveduras marinhas são conhecidas por serem versáteis agentes de biodegradação, participando de muitos processos ecológicos no ambiente aquático, principalmente nos estuários e em ambientes costeiros.

Além disso, estudos recentes indicaram que leveduras negras (assim chamadas por apresentarem intensa melanização da parede celular) - família Herpotrichiellaceae (Chaetothyriales, Ascomycetes) - utilizam hidrocarbonetos como substrato e podem ter potencial para biorremediação de áreas contaminadas (PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2006). Tais leveduras negras também possuem a capacidade de assimilar hidrocarbonetos aromáticos (WOERTZL et al., 2001; PRENAFETA-BOLDÚ et al., 2002).

Muitos dos estudos que tratam da identificação de leveduras como degradadoras de hidrocarbonetos também fazem referência às bactérias heterotróficas, que também possuem importante papel na transformação e na remineralização de carbono orgânico, nitrogênio e outros nutrientes (AZAM, 1983). Assim como as leveduras, algumas espécies de bactérias heterotróficas, como também de cianobactérias, são conhecidas por sua habilidade em utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono e energia (ZINJARDE & PANT, 2002; BARTH, 2003).

Oliveira et al. (2007), em estudo feito na Praia do Perequê, Guarujá (SP), demonstraram que as cianobactérias tiveram seu maior crescimento correlacionado à

presença de derivados de petróleo. De fato, diversos autores demonstraram o crescimento de cianobactérias em ambientes contaminados por óleo (AL-HASAN et al., 1994; SORKHOH et al., 1995; BARTH, 2003). De acordo com Sorkhoh et al. (1995), a presença de óleo é tóxica aos predadores das cianobactérias, mas estas não são afetadas.

Tendo em vista a afinidade que alguns grupos de micro-organismos apresentam por hidrocarbonetos, sua presença em grande número em sedimentos estuarinos pode indicar a existência de contaminação por derivados de petróleo. Além disso, possibilita o isolamento de espécies microbianas com potencial utilidade na recuperação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos.

3. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivos:

1. Avaliar o efeito da presença de hidrocarbonetos na abundância de alguns componentes da alça microbiana de sedimentos e águas estuarinas, mais especificamente aqueles grupos reconhecidos por terem afinidade por estas substâncias como: bactérias heterotróficas, cianobactérias e leveduras;
2. Avaliar o efeito da presença de metais pesados na abundância desses micro-organismos;
3. Isolar leveduras para futura avaliação do potencial como bioindicadoras de contaminação por hidrocarbonetos provenientes de petróleo e como biorremediadoras de sedimentos estuarinos;
4. Contribuir para um banco de micro-organismos desse ambiente para estudos posteriores.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Áreas de Estudo

Os municípios de Santos e Itanhaém estão localizados na Baixada Santista, Litoral Central do Estado de São Paulo. A Baixada Santista recebe este nome devido à sua geografia, pois se encontra margeada por toda a Serra do Mar. Trata-se de uma região composta por nove municípios: Bertioga, Cubatão, Guarujá, Santos, São Vicente, Praia Grande, Mongaguá, Itanhaém e Peruíbe, ocupando uma área de 2.373Km² e apresentando 161Km de praias.

Os pontos de coleta no Estuário de Santos encontram-se nas seguintes coordenadas: Ponto 1 (P1): 23,98631° S - 46,28668° W; Ponto 2 (P2): 23,98591° S - 46,28665° W; e Ponto 3 (P3): 23,98579° S - 46,28665° W. As coordenadas dos pontos de coleta no Estuário de Itanhaém foram: P1: 24,14038° S - 46,80316° W; P2: 24,17331° S - 46,80371° W; e P3: 24,18019° S - 46,79680° W (Fig. 1). As coletas foram realizadas em condições de maré vazante de sizígia em 2009 (dezembro) e 2010 (março e junho).

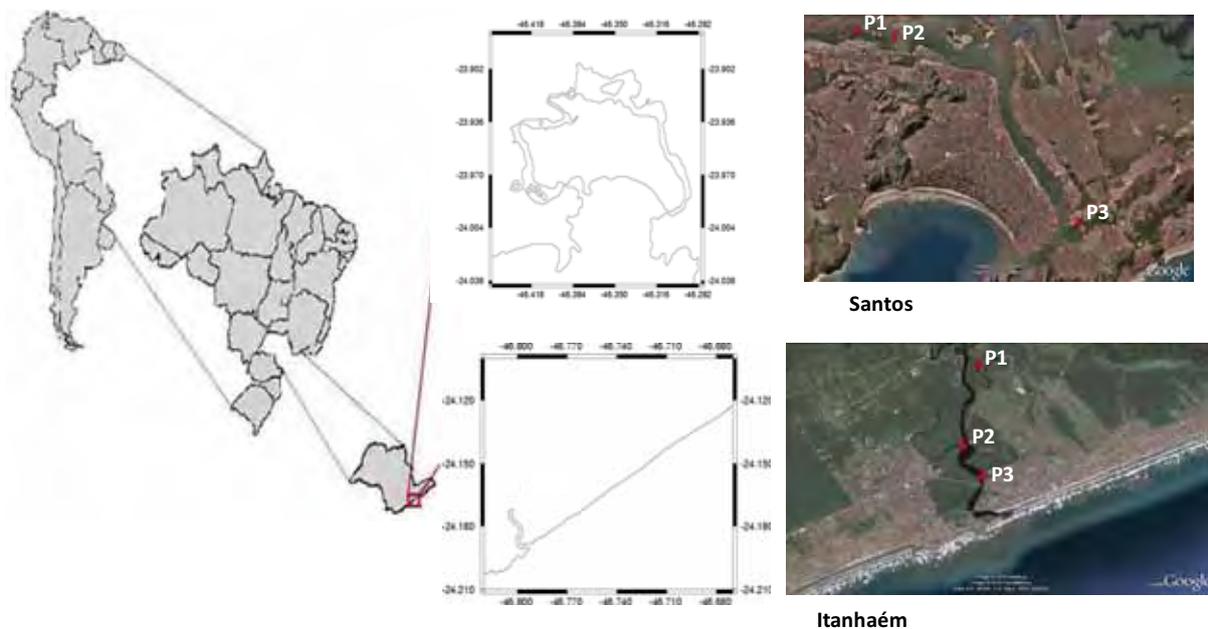


Figura 1 - Pontos de coleta nos estuários de Santos e Itanhaém (Fontes: Google Earth e Coastline Extractor)

4.1.1 Santos

O Sistema Estuarino de Santos–São Vicente (Fig. 1) está localizado no litoral centro do Estado de São Paulo (23°30'5" S - 24°00'00" S; 46°05'00" W - 46°30'00" W), Região Metropolitana da Baixada Santista (RMBS), compreendendo cidades densamente povoadas, como São Vicente, Cubatão, Santos, Guarujá, Bertioga, entre outras (BRAGA et al., 2000).

A RMBS apresenta grande importância para o Estado de São Paulo, tanto pelo aspecto ecológico (devido à presença de unidades de conservação, manguezais e da Serra do Mar), quanto pelo aspecto econômico, com intensa atividade urbana, industrial e portuária. A presença do Porto de Santos, de marinas, de bacias petrolíferas e de gás, de centros metropolitanos, de manguezais, dunas, restingas, praias e costões rochosos são contrastes permanentes no litoral paulista (Oliveira et al, 2008).

O Sistema Estuarino de Santos é considerado uma região crítica no que diz respeito à contaminação dos ecossistemas aquáticos (ABESSA, 2002), sendo que há ocorrência de contaminação elevada por hidrocarbonetos alifáticos no Canal de São Vicente e no interior dos canais de Santos (BONETTI, 2000; ABESSA, 2001).

Segundo Abessa (2005), essa contaminação parece ocorrer a partir dos terminais de óleo, dos lixões, das indústrias e, em menor escala, do emissário. O mesmo autor encontrou altos níveis de PAHs na área interna do Canal de Santos, com pelo menos oito compostos atingindo níveis potencialmente tóxicos. De acordo com Lamparelli et al. (2001), as fontes poluentes são oriundas de indústrias e terminais de óleo.

4.1.2 Itanhaém

A Estância Balneária de Itanhaém é um dos municípios do Litoral Paulista, tendo no Rio Itanhaém o mais expressivo tributário da região, seja em vazão como em extensão drenada. A bacia fluvial é extensa uma vez que o Rio Itanhaém é formado por uma grande quantidade de afluentes sendo os principais, os rios Branco da Conceição, Preto e Aguapeú. Dessa maneira, o presente estudo compreendeu a região estuarina do Rio Itanhaém e, mais especificamente, sua desembocadura e a região oceânica costeira. As águas desta região, tanto ribeirinhas como estuarinas, têm sido consideradas, até o

momento, pouco impactadas em relação à efluentes orgânicos ou químicos, sendo assim utilizada como controle no presente estudo.

4.2 Coleta e Processamento de Amostras

As amostras de sedimento foram coletadas em três pontos da região do entre-marés dos estuários de Santos e Itanhaém, com o auxílio de uma espátula estéril, desde a superfície até 5cm de profundidade. As amostras foram acondicionadas em frascos estéreis e mantidas sob refrigeração (4°C) até seu processamento. As amostras de água foram coletadas nos pontos correspondentes aos pontos de coleta do sedimento, a uma distância mínima de 3m, com o auxílio de frascos estéreis, mantidas sobre refrigeração até o processamento.

Alíquotas de 20g de cada amostra de sedimento foram colocadas em Erlenmeyers contendo 180ml de água do mar estéril e submetidas à agitação em um equipamento do tipo Kline para promover a desagregação dos micro-organismos das partículas do sedimento. O sobrenadante foi utilizado para as contagens e isolamentos dos micro-organismos.

Para as amostras de água, alíquotas de 20µl foram inoculadas em meio Marine Agar 2216E para contagem de bactérias heterotróficas. Para contagem direta de micro-organismos por microscopia de epifluorescência, 20ml de cada amostra foram fixados em formaldeído 5% (concentração final) e estocados a 4°C até a confecção das lâminas (Fig. 2).

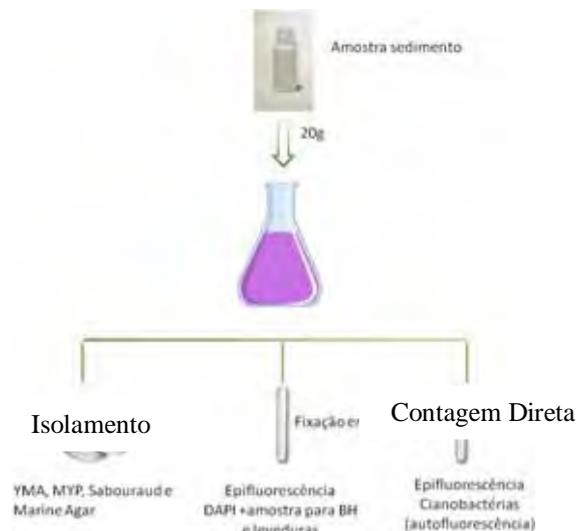


Figura 2 - Processamento das amostras de sedimento coletadas em Santos e Itanhaém.

4.3 Contagens de Micro-organismos

4.3.1 Contagem Direta de Bactérias Heterotróficas (BH) e Cianobactérias (Cb)

Alíquotas de 1,0ml do sobrenadante de cada amostra foram transferidas para tubos de ensaio e coradas com DAPI, 4',6-diamidino-2-fenolindol, (PORTER & FIEG, 1980) e então filtradas em membranas Nucleopore Black com porosidade de 0,2µm, para enumeração de bactérias heterotróficas (HOBBIE, DALEY & JASPER, 1977). As membranas foram dispostas em lâminas, recobertas com lamínula e a contagem realizada em microscópio de epifluorescência (marca Nikon Eclipse 50i), sob luz ultravioleta (330 a 390nm).

Para enumeração de cianobactérias as amostras foram filtradas em membrana Nucleopore Black de 0,2µm e observadas em relação à autofluorescência dos pigmentos fotossintéticos. As membranas foram dispostas em lâminas, recobertas com lamínulas e observadas em microscópio de epifluorescência sob luz azul (450-490 nm).

O mesmo procedimento foi realizado para contagem de micro-organismos provenientes das amostras de água dos estuários, filtrando-se 10ml para contagem de cianobactérias e 250µl para contagem de bactérias heterotróficas.

4.3.2 Contagem Direta de Leveduras

Alíquotas de 1ml do sobrenadante de cada amostra foram transferidas para tubos de ensaio contendo etanol na concentração de 70% (v/v). Após 30 minutos, entre 0,1 a 0,5µl de DAPI, foram adicionados aos tubos os quais permaneceram por 30 minutos no escuro para que o corante reagisse com as células. As amostras foram, então, filtradas em membranas Nucleopore Black de 1,0µm de porosidade, dispostas em lâminas e cobertas com lamínulas. As contagens foram realizadas em microscópio de epifluorescência sob luz azul (450-490nm).

Em relação às amostras de água, o procedimento foi o mesmo, embora o volume filtrado de amostra tenha sido de 10ml.

4.4 Isolamentos de Micro-organismos

4.4.1 Leveduras

Para o crescimento e isolamento de leveduras, foram utilizados os meios YMA (extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, peptona 0,5%, glicose 1,0% e ágar 2,0%) e MYP (extrato de malte 0,7%, extrato de levedura 0,05%, saytone 0,25% e ágar 1,5%), conforme descritos em Yarrow (1998) e Bandoni (1972), ambos com o antibiótico cloranfenicol ($0,1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), preparados com água do mar estéril (filtrada em filtro Millipore $0,22\mu\text{m}$ de porosidade e autoclavada) (Fig. 2). Além destes, foi utilizado o meio Sabouraud (5g de Caseína digerida; 5g de tecido animal digerido; 40g de glicose; e 15g de ágar), também preparado com água do mar esterilizada para crescimento e manutenção das colônias. As placas foram incubadas a 20°C no escuro e monitoradas diariamente para isolamento das colônias. Foram isoladas colônias representantes de todos os morfotipos existentes nas placas, sendo que aquelas com morfologia semelhante foram isoladas em maior número. Após purificação, as colônias foram estocadas em meio Gymp (glicose 2%; extrato de malte 1%; extrato de levedura 0,5%; NaH_2PO_4 0,1%, ágar 2,0%) a -4°C e também em glicerol 15% em Gymp líquido a temperatura de -85°C .

4.4.2 Isolamento de Leveduras Negras

Em relação ao crescimento e isolamento de leveduras negras, foram utilizados Erlenmeyers de 250ml, contendo 100ml de solução salina e antibióticos nas concentrações finais de 200U/ml de penicilina; $200\mu\text{g}/\text{ml}$ de cloranfenicol; $200\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina; e $500\mu\text{g}/\text{ml}$ de actidiona (SATOW et al., 2008), aos quais foram adicionados 20g de amostra. A suspensão foi homogeneizada e incubada por 30 min. à temperatura ambiente. Após esse tempo, 20ml de óleo mineral foram adicionados à suspensão, que foi agitada vigorosamente com auxílio de um vórtex (5 min.) e em seguida mantida em repouso (20 min.). Após o repouso, alíquotas de $150\mu\text{l}$ da interfase óleo-água foram transferidas para placas contendo meio "Mycosel" (digerido enzimático de soja 10g; dextrose 10g; ágar 15,5g; cicloheximida 0,4g; e cloranfenicol 0,05g) (Fig. 3), sendo espalhadas com alça de Drigalsky. Foram inoculadas dez placas por amostra

(incubadas a 30°C) até o surgimento de colônias de coloração escura. As colônias que se assemelharam morfológicamente às leveduras negras foram transferidas para novas placas de “Mycosel” para purificação da cultura. Esta metodologia também permitiu o isolamento de leveduras não-negras.



Figura 3 - Processamento das amostras de sedimento para o isolamento de leveduras negras.

4.4.3 Caracterização das leveduras utilizando critérios morfológicos e fisiológicos

Inicialmente foi realizada uma caracterização da morfologia colonial e celular de cada estirpe e, em seguida, realizados testes fisiológicos utilizando o método descrito em Barnett e colaboradores. (2000) e Yarrow (1998), além da chave disponibilizada na página eletrônica do “Centraalbureau voor Schimmelcultures” (CBS) (www.cbs.knaw.nl), e bibliografia complementar.

Ao finalizar esta etapa, as estirpes foram agrupadas e representantes de cada grupo utilizados para identificação por métodos moleculares. O mesmo procedimento foi realizado com as estirpes únicas ou que não se encaixaram nos agrupamentos

4.4.4 Caracterização por Métodos Moleculares

A caracterização e identificação por métodos moleculares foram efetuadas segundo Sampaio e colaboradores (2001) e Pagnocca e colaboradores (2008).

4.5 Identificação de Leveduras por Métodos Moleculares

4.5.1 Extração de DNA Bruto

Para a extração do DNA bruto dos isolados, três alçadas da cultura de levedura crescida em ágar Sabouraud por 7 dias foram transferidas para eppendorfs e ressuspendidas em 500µl do tampão de lise TNES (50mmol Tris I-1; 250mmol de NaCl I-1; 50mmol EDTA I-1; 0,3%, w/v, SDS; pH 8). Em seguida, foram adicionados 100µl de micro-esferas de vidro (Sigma) esterilizadas. Depois de agitados em vórtex (4min.), os tubos foram incubados (1h a 65°C). Após uma segunda agitação em vórtex, foi realizada centrifugação (15 min. a 13.000 RPM). O sobrenadante (DNA bruto) foi recuperado e transferido para tubos de 1,5ml e então armazenado a -20°C até sua utilização, quando então foi diluído na proporção 1:750 (SAMPAIO et al., 2001).

4.5.2 Agrupamento das Estirpes por MSP-PCR

As estirpes representantes de agrupamentos, realizados de acordo com as características fenotípicas, foram utilizadas para um novo agrupamento pelo método de “fingerprinting” utilizando microsátélites (MSP-PCR), de acordo com Meyer e colaboradores (1993). Para tanto, foram misturados 4ul de dNTPS (1,25 mM), 2,5ul de Buffer 10X, 1µl de MgCl₂, 0,2ul de Taq, 10,3µl de água purificada para PCR, 2µl do primer (GTG)₅ e 5ul de DNA (1:750). O programa utilizado no termociclador (PTC-100TM “Programmable Thermal Controller”) para amplificação foi: 95°C por 3 minutos, seguidos

de 40 ciclos a 93°C por 45 segundos, 50°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, com a extensão final de 72°C por 6 minutos.

Para verificar o padrão de bandas, foi realizada uma corrida em gel de agarose 1,4% em TBE 0.5X a 90V e 50mA por 3 horas. Em seguida, o gel foi corado por 25 minutos em uma solução de Brometo de Etídeo e descorado na sequência por 5 minutos. As fotos dos géis de microsátélites foram analisadas com o software GelCompar II (Applied Maths – www.applied-maths.com) sendo as bandas agrupadas através de uma análise de Cluster utilizando o algoritmo de “Neighbour Joining “ e os agrupamentos confirmados visualmente.

4.5.3 Amplificação – PCR (região D1/D2 do DNA ribossômico 26S)

Para cada amostra de DNA foi preparada uma solução contendo, 2,5µl de tampão de PCR; 8,3µl de água ultra pura estéril; 2µL de “primer” NL1 (10,0µM); 2µl de “primer” NL4 (10µM); 4µl dNTPs (1,25mM); 1µl de MgCl₂; 0,2µl Taq polimerase (5,0U/µl). Dessa solução, 20µl foram distribuídos em tubos plásticos de 0,5mL e, em seguida foram adicionados de 5µl de amostra de DNA devidamente diluído (12 - 20ng). A amplificação dos fragmentos de DNA foi realizada em termociclador utilizando o seguinte programa: 96°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos a 96°C por 30 segundos, 61°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto. Os produtos foram aplicados em gel de agarose 1% (1g de agarose (Promega Corporation, USA) para cada 100ml de tampão TBE 1X (Tris – borato – EDTA), utilizando 2µl de “Loading buffer”, 2µl de cada amostra, 5µl do DNA marcador “ladder” (Promega – G571A) de 1.000pb. Após 40 minutos de corrida do gel a 100V e 50mA, este foi corado em uma solução de Brometo de Etídeo por aproximadamente 20 minutos e descorado, na sequência, por aproximadamente 5 minutos. O gel foi, então, visualizado através do transluminador “Eletronic MultiwaveT Transluminator” e fotografado com auxílio do programa Kodak Digital Science ID[®]. O resultado da amplificação foi purificado com o kit de purificação de bandas de DNA (“GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit”, GE “Healthcare” seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. A qualidade da purificação foi confirmada através de uma corrida em gel de agarose 1% (em TBE 1X), juntamente com o marcador “DNA ladder 1 kb”.

4.5.4 Reação de Seqüenciamento

Para a reação de seqüenciamento foram utilizados os “primers”: NL1 e NL4. Assim, para cada amostra foram preparadas duas soluções compostas de: 1,75µl de “Save Money”, 0,5µl de Big Dye 3.1, 5 – 20ng de DNA 1:750, 0,6µl de um dos “primers” (10µM) e completando com água ultra pura (Mili-Q) estéril até o volume final de 10µl. O programa utilizado para reação de sequenciamento foi: 95°C por 1 minuto seguido de 28 ciclos de 95°C por 15 segundos, 50°C a 45 segundos, 60°C a 4 minutos e 4°C - ∞.

4.5.5 Purificação da Reação de Sequenciamento

Os produtos originados da reação de seqüenciamento foram purificados da seguinte forma: Primeiramente foram adicionados aos tubos 1µl de solução de EDTA 125mM; 1µl de solução de Acetato de Sódio 3M; 25µl de Etanol 100%. Os tubos foram, então, deixados no escuro por 15 minutos e, após este tempo, centrifugados durante 25 minutos. Após o processo de centrifugação, o líquido foi removido dos tubos por capilaridade e, a estes foram adicionados 35µl de Etanol 70%. O material foi então centrifugado por 10 minutos. O líquido foi novamente removido por capilaridade e os tubos colocados no SPEED VAC por 10 minutos sem aquecimento e armazenados no escuro com as tampas abertas por 1 a 2 horas para evaporar todo etanol. Após este período, as amostras foram ressuspensas em 10µl de Hi Di Formamida (“Applied Biosystems”) e aplicadas no seqüenciador ABI 3500.

4.6 Isolamento de Bactérias Heterotróficas

Para isolamento de bactérias heterotróficas, 20g de cada amostra de sedimento foram adicionados a erlenmeyers contendo 180 ml de água do mar estéril e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação inicial, foram adicionados a cada erlenmeyer 20 ml de óleo mineral estéril e estes submetidos à agitação por 5 minutos. A interfase óleo-água foi coletada cuidadosamente e inoculada em placas contendo o meio de cultura Marine Agar 2216E I preparado com água do mar estéril. As placas foram incubadas a 36°C por 24-48 horas ou até que apresentassem um crescimento vigoroso. Colônias de bactérias heterotróficas com aspectos morfológicos distintos foram então

isoladas e armazenadas em Marine Agar 2216E para posterior identificação e armazenadas em glicerol 15% a -85°C.

4.7 Parâmetros Físico-Químicos

Uma alíquota da água intersticial do sedimento foi retirada, de cada ponto amostral, com o auxílio de um extrator de solução (modelo ESS). A salinidade e o pH das amostras da água intersticial e da água do estuário foram determinados com o auxílio de um refratômetro portátil e de um pHmetro (marca Inolab), respectivamente. Para determinação da temperatura do sedimento, foi utilizado um termômetro de solo fixado em cada ponto amostral e para determinação da temperatura da água, foi utilizada a sonda de temperatura do pHmetro portátil.

4.8 Análise Química do Sedimento

As amostras de sedimento foram analisadas pelo Laboratório de Análises Corplab. Os parâmetros analisados foram hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH), metais totais e BTEX (Benzeno, Tolueno, Etil-Benzeno e Xileno) de acordo com as normas de extração e análise recomendadas pela EPA (*Environmental Protection Agency*) Norte-Americana. Os resultados foram analisados com base nos valores orientadores da “Environmental Canadá” (Tab. 3), pois o Brasil não possui legislação específica para esses parâmetros em sedimentos estuarinos.

Tabela 3 - Critérios utilizados para avaliação da qualidade de sedimentos de acordo com a *Environmental Canada* (fonte: CETESB, 2001).

POLUENTE		ENVIRONMENT CANADA (1999)			
		Água Doce		Água Salobra / Salina	
		TEL	PEL	TEL	PEL
Metais Pesados e Arsênio ($\mu\text{g/g}$)	Arsênio	5,9	17	7,24	41,6
	Cádmio	0,6	3,5	0,7	4,21
	Chumbo	35	91,3	30,2	112
	Cobre	35,7	197	18,7	108
	Cromo	37,3	90	52,3	160
	Mercúrio	0,17	0,486	0,13	0,696
	Níquel	18 *	35,9 *	15,9 *	42,8 *
	Zinco	123	315	124	271

* FDEP (1994); TEL (*Threshold Effect Level*) = Nível limiar abaixo do qual não ocorre efeito adverso à comunidade biológica; PEL (*Probable Effect Level*) = Nível provável de efeito adverso à comunidade biológica (frequentemente associados a efeitos biológicos).

4.9 Análises Estatísticas

Os resultados da contagem direta para cada micro-organismo foram submetidos à ANOVA (uma via), com contraste entre as médias avaliado pelo teste de Tukey “a posteriori”, a 5% de significância estatística.

Assim, foi avaliado o efeito dos pontos de amostragem (P1 a P3) de cada estuário sobre a concentração dos micro-organismos, sendo executado o mesmo para o efeito do substrato por estuário, bem como uma comparação entre os estuários, independente dos pontos amostrais.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros Físico-Químicos

Os dados dos parâmetros físicos de cada ponto amostral estão listados na tabela 4. Os valores de salinidade para água de Santos demonstram a condição estuarina do ambiente, enquanto que, Itanhaém permaneceu com salinidades baixas, o que pode tanto caracterizar uma água doce ou o *input* de água doce no estuário durante o período de amostragem. O estuário de Santos apresentou variação de salinidade, tanto para as amostras de água (1 a 30) como de sedimento (0 a 29). Já para as amostras de Itanhaém (água ou sedimento), a variação foi similar (1 a 2).

O pH do estuário de Santos apresentou uma variação de 7,61 a 7,89 e 7,61 a 7,85 para as amostras de água e sedimento, respectivamente. Para as amostras de Itanhaém, a variação foi de 5,85 a 8,68 e 6,01 a 8,22 para água e sedimento, respectivamente.

Por fim, a temperatura dos pontos amostrados em Santos variou de 22 a 26,2 e 25 a 32 para as amostras de água e sedimento e para as amostras de Itanhaém variou de 17,5 a 21 e 22 a 29 para as amostras de água e sedimento, respectivamente.

Grandes variações de temperatura, salinidade e pH podem ser devidas aos eventos de tempestade e ciclones extra-tropicais durante os períodos de coleta. Eventos de tempestade fazem com que ocorram mudanças nas condições meteorológicas e no padrão dos ventos que acabam por atuar nos oceanos provocando mudanças no nível médio do mar (HERZ, 1977; HARARI & CAMARGO, 1998). Reduções drásticas na pressão atmosférica produzem elevação do nível do mar de tal forma que uma redução de 1hPa produz uma elevação do nível médio do mar da ordem de 1,0 cm (NEVES & MUEHE, 2008). Além disso, os ventos acarretam em tensões tangenciais sobre o mar que provocam deslocamentos de massa d'água, conhecido como "transporte de Ekman" (MIRANDA, CASTRO & KJERFVE, 2002). Estes eventos são responsáveis por alguns fenômenos como a ressurgência em Cabo Frio (RJ), o empilhamento de água junto à costa que bloqueia o escoamento dos rios, a inundação de lagoas costeiras prejudicando a drenagem pluvial e fazendo com que haja um empilhamento de água na costa, dificultando as variações nas amplitudes de maré. Tudo isso acaba por "aprisionar" a água na costa e desta forma não há variações muito grandes de salinidade dentro do estuário.

Tabela 4 - Parâmetros físicos dos pontos amostrados em Santos e Itanhaém

Coletas	Substrato	Pontos	Santos			Itanhaém		
			Salinidade	pH	T°C	Salinidade	pH	T°C
1 ^a coleta	Sedimento	1	29	7,64	32	2,0	6,05	25
		2	26	7,62	32	1,0	6,07	27
		3	29	7,67	32	0	6,30	29
	Água	1	30	7,64	22	1,0	5,85	18
		2	30	7,62	22	1,0	6,05	18
		3	30	7,61	22	1,0	6,23	17,5
2 ^a coleta	Sedimento	1	0	7,64	31	2,0	6,04	27
		2	0	7,61	32	0	6,01	24
		3	26	7,62	31	2,0	6,02	29
	Água	1	1,0	7,65	22	2,0	6,05	19
		2	1,0	7,66	22	2,0	6,07	20
		3	25	7,67	22	2,0	6,30	19
3 ^a coleta	Sedimento	1	20	7,81	31	4,0	7,32	23
		2	18	7,85	33	32	8,22	22
		3	25	7,82	25	30	8,08	22
	Água	1	21	7,88	22	4,0	7,86	18,2
		2	16	7,89	22	33	8,59	20,8
		3	22	7,83	26,2	30	8,68	20,9

5.2 Metais Pesados e Hidrocarbonetos

A concentração de Hg nas amostras dos sedimentos do Estuário de Santos apresentou valores acima do TEL (Threshold Effect Level) recomendado pela Environmental Canada ($0,13\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Os pontos 1 e 2 apresentaram valores de $0,19\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ enquanto que, apenas o ponto 3, permaneceu abaixo do valor limite. Já as amostras de Itanhaém apresentaram valores abaixo do TEL para todos os pontos (Fig.4a).

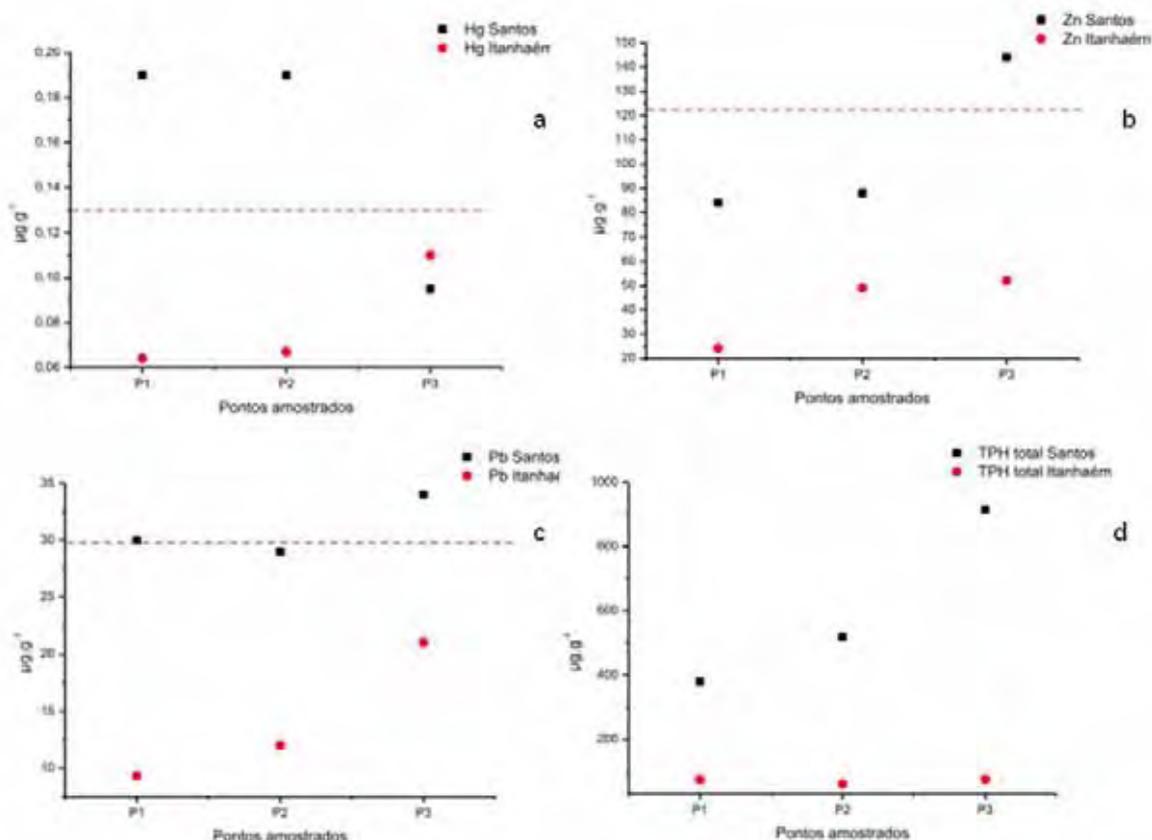


Figura 4 - Concentração de mercúrio (a), zinco (b), chumbo (c) e tph (d) nas amostras de sedimento de Santos e Itanhaém (as linhas pontilhadas correspondem aos limites de TEL estabelecidos pela legislação Canadense com exceção do TPH, para o qual não existem limites estabelecidos)

Segundo um levantamento feito pela CETESB (2001), as principais fontes de contaminação do Sistema Estuarino de Santos-São Vicente são as indústrias Carbocloro, a RPBC (Refinaria Presidente Bernardes-Cubatão)-Petrobrás, a Liquid Química, a Cosipa e a Dow Química. Entretanto, a concentração de mercúrio encontrada nos efluentes dessas indústrias esteve abaixo dos limites legais para lançamento (CETESB, 1986). Ainda, de acordo com este levantamento, cerca de 40% das amostras de sedimento analisadas apresentaram valores acima do TEL (*Threshold Effect Level*) e, destas, 8% apresentaram valores acima do PEL (*Probable Effect Level*).

Segundo Fowler (1990), a concentração de mercúrio nos sedimentos estuarinos e marinhos em áreas não contaminadas são inferiores a $0,1\mu\text{g.g}^{-1}$ e variam de 5 a $32\mu\text{g.g}^{-1}$ em áreas muito contaminadas. Os resultados obtidos no presente trabalho estão abaixo dos valores encontrados em áreas contaminadas, porém, excedem o valor orientador indicando que existe uma provável influência para os organismos presentes na área de estudo.

Em contrapartida, a concentração de zinco nos pontos amostrados ultrapassou o TEL apenas no ponto 3 do estuário de Santos ($144\mu\text{g.g}^{-1}$) enquanto que, as demais amostras os valores estiveram abaixo do limite (Fig. 4b).

Segundo a CETESB (2001), os sedimentos da Região Estuarina de Santos apresentam uma acumulação de zinco, especialmente próximo às fontes industriais. As regiões situadas próximas à COSIPA e à DOW QUÍMICA, no Rio Santo Amaro, apresentam concentrações elevadas de zinco chegando a superar o valor de PEL. Na região do Rio Santo Amaro foram registradas concentrações variando de 183 a $221\mu\text{g.g}^{-1}$, corroborando os dados do presente trabalho, onde a concentração de zinco foi superior ao valor de TEL no ponto 3, que corresponde a região do Rio Santo Amaro.

A concentração de chumbo nos pontos amostrados atingiu o valor de TEL nos pontos 1 e 2 das amostras de Santos (30 e $34\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente) e manteve-se abaixo nas amostras de Itanhaém (Fig. 4c). Os valores obtidos no presente estudo demonstram que as amostras dos pontos 1 e 2 de Santos estão acima do limite de TEL estabelecido (31 e $34\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente), enquanto que todas as amostras de Itanhaém permaneceram abaixo do referido limite. O chumbo geralmente está associado à indústria de extração, beneficiamento e fundição do metal e ocorre como contaminante em efluentes de indústrias de refino de petróleo, petroquímicas e siderúrgicas, entre outras.

As maiores concentrações de chumbo nos sedimentos de Santos foram encontradas próximo à Dow Química, no Rio Santo Amaro. Já em um levantamento feito pela CETESB, o maior valor encontrado para este ponto foi de $66\mu\text{g.g}^{-1}$, mais de duas vezes o valor de TEL estabelecido pela “Environmental Canada”.

Visto que, em ecossistemas naturais, a diversidade e o número de micro-organismos na comunidade apresentam oscilações que resultam das alterações ambientais pode-se considerar que os metais pesados são determinantes do equilíbrio microbiológico pela sua persistência e pelo seu potencial tóxico.

A influência dos metais pode ser aditiva ou depressiva, sendo que, quando presente em altas concentrações, pode levar a uma diminuição na diversidade genética da população microbiana (HIRSCH et al., 1993), assim como inibir a atividade de bactérias, fungos e leveduras, alterando o equilíbrio ecológico do ecossistema (REBBER, 1992; LANDMEYER, BRADLEY & CHAPELLE, 1993).

A presença de metais pesados no ambiente, em especial nos sedimentos, pode reduzir drasticamente a abundância e a diversidade de populações interferindo com os

processos microbiológicos como, por exemplo, as transformações de compostos nitrogenados (HASSEN et al., 1998; MUNN, EVANS & CHALK, 2000) além de reduzir a mineralização da matéria orgânica do sedimento (REBBER, 1992).

É importante ressaltar que os metais são necessários para o crescimento de micro-organismos. Entretanto Pb e Hg não apresentam funções biológicas enquanto que Zn, Cu, Ni, Co, Cd e Cr são essenciais para as plantas, animais e micro-organismos porém em pequenas quantidades (CHAUDRI, McGRATH & GILLER, 1992). Todos esses metais possuem alta toxicidade quando presentes em concentrações elevadas e podem provocar desnaturação de proteínas e bloquear os sítios ativos de ligação de enzimas (SIQUEIRA et al., 1994).

Apesar de alguns pontos amostrados no presente estudo terem apresentado valores abaixo do limite, lançamentos contínuos nos sedimentos, que funcionam como filtros e aprisionadores, levam a uma situação acumulativa de metais e outras substâncias, o que pode vir a se tornar um problema sério, pois existem micro-organismos que transformam metais em compostos ainda mais tóxicos ao ambiente. Alguns micro-organismos podem reduzir ou oxidar as formas inorgânicas ou converter os metais em formas orgânicas e vice-versa. Existem relatos, por exemplo, de bactérias aeróbicas, anaeróbicas, fungos e leveduras que podem realizar a metilação do Hg (HUNGRIA & URQUIAGA, 1992), por exemplo, formando moléculas como o monometilmercúrio (CH_3Hg) ou dimetilmercúrio (CH_3HgCH_3) que são mais tóxicas, mais rapidamente absorvidas e retidas nos tecidos animais do que a forma metálica (PAUL & CLARK, 1989).

Em relação aos solventes aromáticos (BTEX), todos os grupos foram detectados nas amostras de ambos os estuários amostrados; entretanto, não foram encontrados em concentrações elevadas nem em concentrações consideradas de risco para a comunidade biológica (Tab. 5).

Já com relação aos hidrocarbonetos, os maiores valores obtidos no presente trabalho foram encontrados nos pontos amostrados em Santos (380, 517 e 915 $\mu\text{g.g}^{-1}$, nos pontos 1, 2 e 3 respectivamente) sendo uma ordem de grandeza superior aos valores encontrados nos sedimentos de Itanhaém (Fig. 4d).

Tabela 5 – Concentrações (mg.kg^{-1}) de solventes aromáticos presentes nas amostras de Santos e Itanhaém.

Solventes Aromáticos	SANTOS			ITANHAÉM		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3
m+p Xileno	< 0,016	< 0,017	< 0,022	< 0,020	< 0,020	< 0,034
Benzeno	< 0,008	< 0,009	< 0,011	< 0,010	< 0,010	< 0,017
Etilbenzeno	< 0,008	< 0,009	< 0,011	< 0,010	< 0,010	< 0,017
o-Xileno	< 0,008	< 0,009	< 0,011	< 0,010	< 0,010	< 0,017
Tolueno	< 0,008	< 0,009	< 0,011	< 0,010	< 0,010	< 0,017
Xilenos totais	< 0,025	< 0,026	< 0,033	< 0,030	< 0,031	< 0,050
Fluorobenzeno	119	123	111	115	105	*H
1,4- diclorobenzeno-d4	*H	75	70	77	74	92

*H = Resultado fora dos limites de controle de qualidade devido à interferência da matriz.

A presença de TPH em todos os pontos amostrados pode referir-se a uma contaminação crônica do sedimento. Nas amostras do sedimento de Santos, essa contaminação pode ser proveniente das indústrias de refino de petróleo presentes próximas ao rio Cubatão e devido à presença de despejos de óleos e outros combustíveis por marinas ou embarcações existentes no rio Santo Amaro (Fig. 8) enquanto que, nas amostras de Itanhaém, a presença de TPH, ainda que em baixa quantidade, pode ser proveniente de vazamentos das pequenas embarcações que navegam pelo rio.



Figura 5 - Marinas existentes no Rio Santo Amaro

A presença desses contaminantes (mercúrio, chumbo e zinco) acima dos limites de TEL nos sedimentos do estuário de Santos, indica que existe uma probabilidade de efeito deletério para a biota local incluindo os micro-organismos.

Entretanto, é importante ressaltar que os dados aqui apresentados referem-se a duas coletas e ao levantamento feito pela CETESB o qual foi baseado em apenas uma coleta pontual. Ainda assim, esses elementos foram detectados nas amostras analisadas o que indica uma provável contaminação por fontes pontuais ou difusas e um impacto antrópico, o qual necessita de mais investigações tanto quanto à extensão da contaminação quanto aos efeitos deletérios que esta contaminação possa ter na biota e na microbiota destes ambientes.

5.3 Contagem Direta de Micro-organismos

A média de concentração de cianobactérias na água em Itanhaém (1.392 ± 739 células. ml^{-1}) foi cerca de três vezes superior a de Santos ($F=14,94$; $p=0,0014$), enquanto o inverso ocorreu para o sedimento, com a média de concentração em Santos (1.241 ± 897 células. ml^{-1}) superando em 20 vezes a de Itanhaém (60 ± 10 células. ml^{-1}) ($F=15,59$; $p=0,0012$) (Fig. 6)

Oliveira e colaboradores (2007), em estudo feito na Praia do Perequê, no Guarujá (SP), observaram que cianobactérias tiveram suas maiores densidades positivamente correlacionadas com a presença de derivados de petróleo. De fato, diversos autores demonstraram o crescimento de cianobactérias em ambientes contaminados por óleo (SORKHOH et al., 1992; AL-HASAN et al., 1994; BARTH, 2003), visto que estas utilizam esses hidrocarbonetos como fonte de carbono. De acordo com Sorkhoh e colaboradores (1995), a presença de óleo é tóxica para os predadores das cianobactérias, mas estas não são afetadas, o que pode explicar seu alto crescimento em ambientes contaminados. Ainda, Chaillan e colaboradores (2005) observaram uma alta taxa de degradação de hidrocarbonetos por cianobactérias em uma área afetada por um derrame de petróleo na Indonésia.

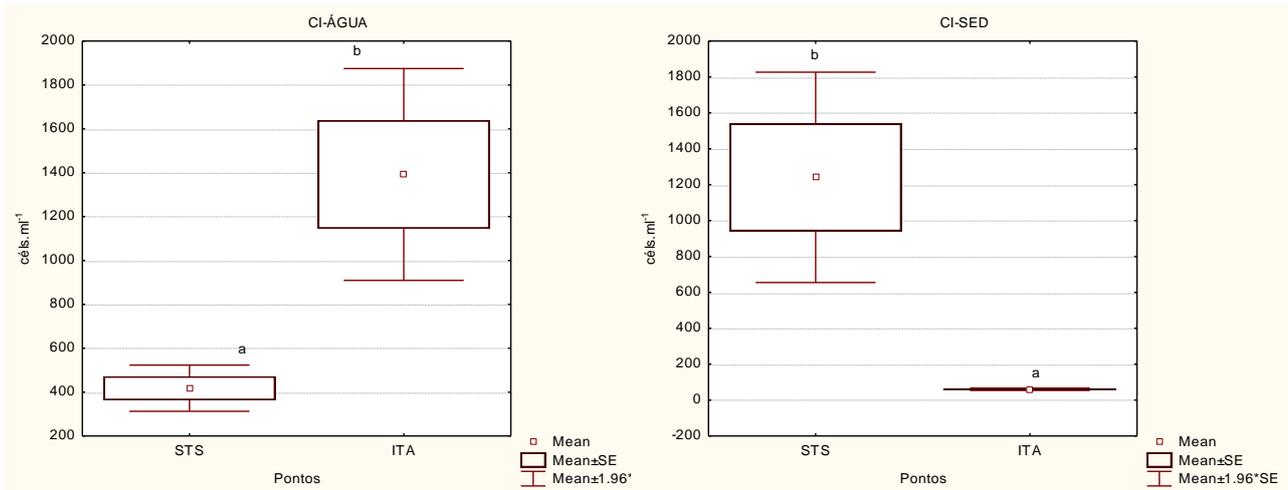


Figura 6 - Densidade de cianobactérias na água e no sedimento de Santos e Itanhaém por pontos amostrados (STS= Santos; ITA= Itanhaém)

Em contrapartida, a média de concentração de bactérias na água em Santos ($1.7 \times 10^7 \pm 8.7 \times 10^5$ células.ml⁻¹) foi cerca de oito vezes superior a de Itanhaém ($2.2 \times 10^7 \pm 1.16 \times 10^5$ células.ml⁻¹) ($p=0,000159$), enquanto que, para o sedimento, a média de concentração em Santos (4.567 ± 1409 células.ml⁻¹) foi semelhante à de Itanhaém (4120 ± 757 células.ml⁻¹) ($F=0.7$; $p=0,4$) (Fig. 7).

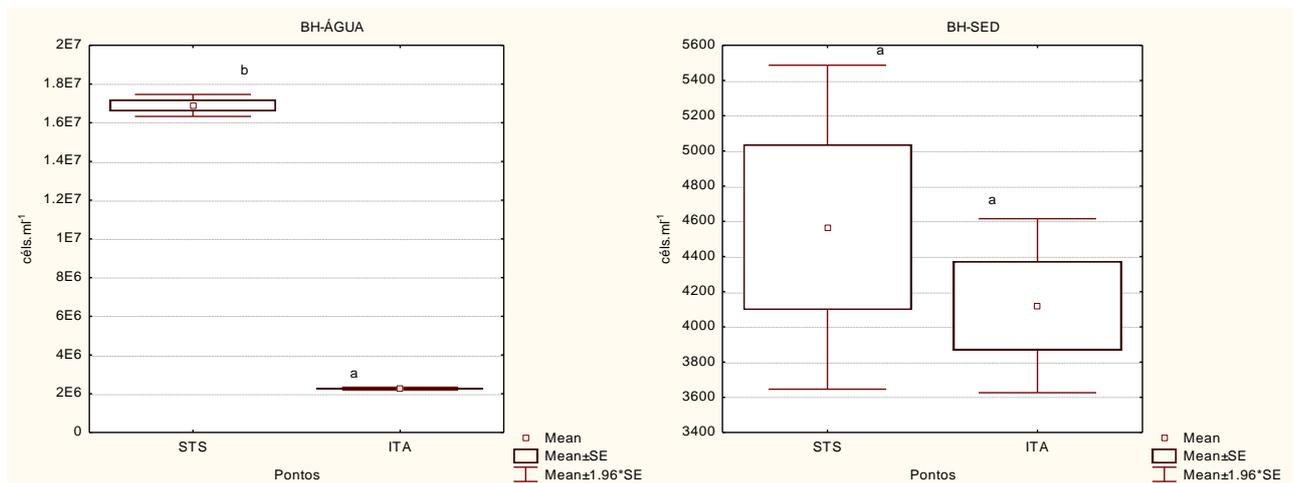


Figura 7 - Densidade de bactérias na água e no sedimento de Santos e Itanhaém

De fato, as águas do sistema estuarino de Santos sofrem influência de inúmeras atividades que são consideradas impactantes ao ambiente e que podem contribuir para o aumento da densidade de micro-organismos presentes. Entre essas atividades podemos citar as atividades portuárias e o lançamento de efluentes domésticos na região estuarina. Estes efluentes, que podem ser tratados, parcialmente tratados ou lançados “in natura”, carregam uma variedade de micro-organismos patogênicos como bactérias, vírus e protozoários, o que explica as altas densidades bacterianas obtidas no presente estudo nas amostras provenientes do Estuário de Santos.

Desde 1979 já era evidenciado um grave quadro de degradação ambiental, com significativos reflexos na área social e de saúde pública, devido aos poluentes industriais e esgotos do Porto de Santos e das cidades da região (CETESB, 1979). Este cenário foi agravado, ainda, pela disposição de resíduos sólidos industriais e domésticos em locais impróprios, além dos freqüentes acidentes com derramamentos de óleo e outras substâncias tóxicas nos cursos d'água (TOMMASI, 1979). Desta forma, não é possível correlacionar a densidade de bactérias encontradas diretamente com a presença de petróleo e derivados.

Por fim, a média de concentração de leveduras na água em Itanhaém (329 ± 91 células. ml^{-1}) foi cerca de duas vezes superior a de Santos ($F=9,1$; $p=0,008$), enquanto que, para o sedimento, a média de concentração em Santos foi semelhante (347 ± 223 células. ml^{-1}) a de Itanhaém (314 ± 86 células. ml^{-1}) ($F=0.18$; $p=0,7$) (Fig. 8)

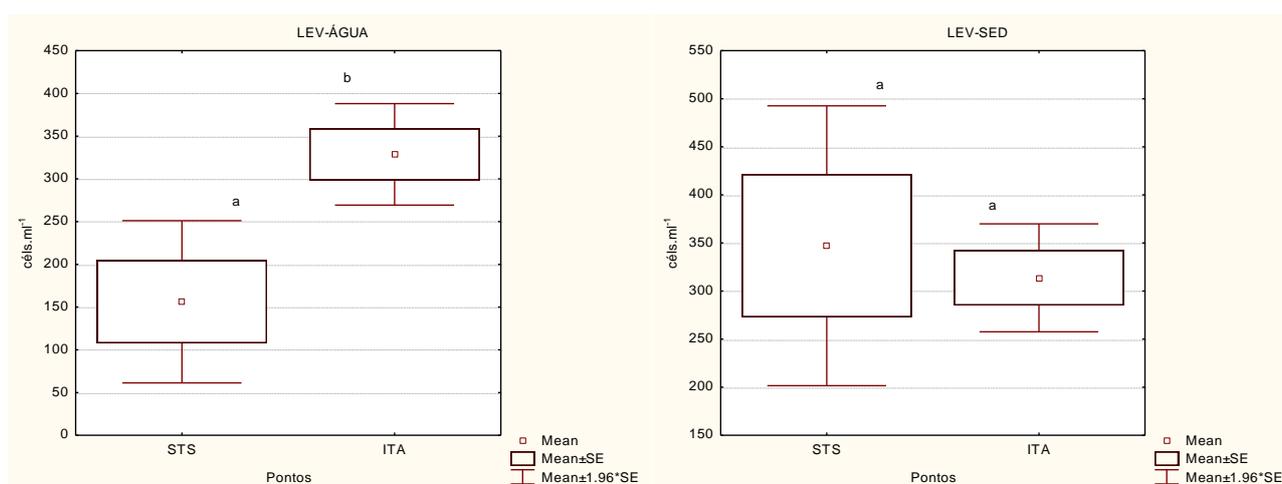


Figura 8 - Densidade de leveduras na água e no sedimento de Santos e Itanhaém

De acordo com De Souza & D'Souza (1979) e Kobatake e colaboradores (1992), as leveduras marinhas são conhecidas por serem versáteis agentes de biodegradação. Elas participam de muitos processos ecológicos no ambiente aquático, principalmente nos estuários e em ambientes costeiros.

Segundo Kutty & Philip (2008), em sedimentos estuarinos as populações de leveduras tendem a aumentar na presença de óleo. Ainda segundo estes autores, leveduras isoladas de regiões poluídas exibem propriedades hidrocarbonoclásticas muito maiores que as mesmas espécies isoladas de áreas não contaminadas. De acordo com Zinjarde (2002), existe uma diminuição significativa nas densidades de leveduras em ambientes não contaminados. Ainda, estuários demonstram uma população mais densa de leveduras que as áreas marinhas adjacentes.

Altas concentrações de micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos foram observadas por Hagler, De Oliveira & Mendonça-Hagler (1982) em um estuário contaminado do Rio de Janeiro, sendo as maiores densidades encontradas a uma profundidade de 2cm.

Entretanto, os resultados encontrados neste trabalho diferem dos dados disponíveis na literatura, pois a maior densidade de leveduras foi encontrada nos ambientes mais limpos (Itanhaém), tanto na água quanto no sedimento. Tal fato pode estar relacionado à situação de contaminação crônica por metais pesados em alguns ambientes marinhos costeiros da Baixada Santista (Santos, por exemplo) e que pode ter uma forte influência na sobrevivência desses micro-organismos, visto que estes podem apresentar respostas ao estresse causado por atividades antrópicas.

5.4 Isolamento de Micro-organismos

5.4.1 Bactérias

Foram isoladas 2.306 estirpes de bactérias, as quais que foram estocadas em ultra-freezer para posterior identificação. Das amostras de Santos foram isoladas 455 estirpes de água e 390 de sedimento. Para as amostras de Itanhaém foram isoladas 1.002 estirpes de água e 459 de sedimento (Tab. 6).

Tabela 6 - Quantidade de estirpes de bactérias isoladas dos pontos amostrados nos estuários de Santos e Itanhaém

	SANTOS			ITANHAÉM		
	ÁGUA	SEDIMENTO	TOTAL	ÁGUA	SEDIMENTO	TOTAL
PONTO 1	96	152	248	240	113	353
PONTO 2	192	125	315	748	177	925
PONTO 3	167	113	280	414	169	580
TOTAL	455	390	390	1002	459	
	(53,8%)	(46,2%)		(68,6%)	(31,4%)	

5.4.2 Isolamento de Leveduras

A quantidade de estirpes isoladas durante a execução deste trabalho encontra-se na tabela abaixo. Foi obtido um total de 80 isolados dos quais a maior parte (46) foi isolada do sedimento de Itanhaém (Tab. 7). Observa-se, também, que a quantidade de isolados de sedimento foi maior que a quantidade de isolados de água, em ambos os estuários. Segundo Brunke & Fischer (1999), partículas de sedimento apresentam condições favoráveis de proteção contra luz solar (DAVIES-COLLEY et al., 1999) e contra predação por outros organismos (DAVIES & BAVOR, 2000) além de poderem apresentar alta concentração de nutrientes, fornecendo condições para a manutenção das populações de leveduras. Além disso, as leveduras provenientes de sedimentos costeiros podem estar envolvidas na decomposição, ciclagem de nutrientes e na biotransformação de petróleo, xenobiontes e outros compostos complexos (AHEARN & MEYERS, 1972; MEYERS & AHEARN, 1974; MACGILLIVRAY & SHIARIS, 1993).

Tabela 7 - Quantidade de estirpes de leveduras isoladas na água e no sedimento de Santos e Itanhaém

	Santos		Itanhaém	
	Sedimento	Água	Sedimento	Água
P1	4	0	10	6
P2	2	0	14	1
P3	9	9	21	4
Total	15	9	45	11

As leveduras isoladas foram agrupadas por aspectos morfológicos e fisiológicos e posteriormente por MSP-PCR o que resultou em sete agrupamentos para posterior sequenciamento. De acordo com os testes fisiológicos, as estirpes foram classificadas em grandes grupos sendo que, das 80 estirpes obtidas, 85% são representantes de ascomicetos, 12,5% representantes de basidiomicetos e 2,5% representantes do grupo de ascomicetos “yeast-like” (Fig. 9).

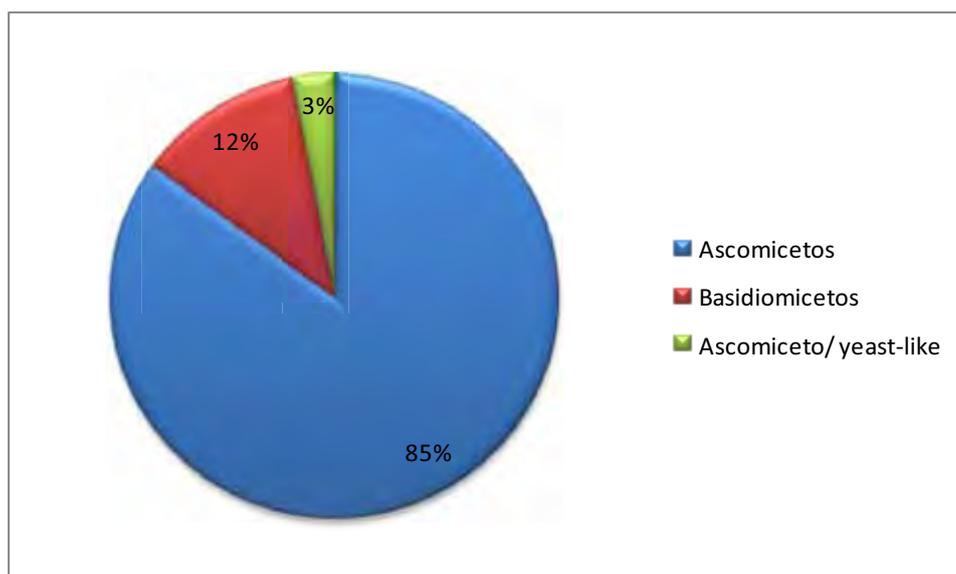


Figura 9 – Classificação em grandes grupos das estirpes obtidas

Através da análise molecular as estirpes isoladas foram identificadas com base nas sequências obtidas e comparadas com àquelas presentes nos bancos de dados (NCBI - www.ncbi.nlm.nih.gov). Das amostras da água de Santos foram isoladas nove estirpes sendo que a predominância foi das espécies do gênero *Candida* (55%) seguida do gênero *Pichia* (33%). Além destes gêneros, foi isolada, também, uma espécie de *Exophiala dermatitidis* uma levedura extremamente patogênica que pode causar graves infecções da derme, podendo até mesmo atingir o sistema nervoso (SUDHADHAM et al., 2008) (Tab. 8).

Tabela 8 - Estirpes isoladas das amostras de água de Santos

Código	D1/D2		
	tamanho	Resultado BLASTn	nº acesso da espécie mais próxima
A 21	*	<i>Pichia occidentalis</i>	*
A 22	492 pb	99% <i>Candida natalensis</i>	AY507152.1
A 26	*	<i>Candida parapsilosis</i>	*
A 29	496 pb	100% <i>Candida glabrata</i>	HM627130.1
A 30	520 pb	100% <i>Pichia kudriavzevii</i>	HM191632.1
A 33	530 pb	100% <i>Candida parapsilosis</i>	GU904181.1
A 34	*	<i>Exophiala dermatitidis</i>	*
A 35	*	<i>Pichia kudriavzevii</i>	*
A 37	*	<i>Candida glabrata</i>	*

*estirpes identificadas através de MSP - PCR

Leveduras do gênero *Candida* habitam, comumente, o trato gastrointestinal de animais de sangue quente (van Uden, Carmo Souza & Farinha, 1958) além de prevalecerem em estuários subtropicais altamente poluídos (HAGLER et al., 1982). Soares e colaboradores (1997) isolaram 47 espécies de leveduras de sedimentos estuarinos sendo que 34 eram provenientes do gênero *Candida*, o que pode evidenciar contaminação por efluentes domésticos. Considerando que, no estuário de Santos, existe uma contaminação por efluentes de origem humana, os resultados obtidos no presente estudo em relação à presença de espécies fermentativas e patogênicas que habitam o trato intestinal de animais de sangue quente mostra-se consistente e evidencia essa contaminação.

Em contrapartida, nas amostras provenientes do sedimento de Santos foram isoladas 15 estirpes de leveduras sendo que houve predominância do gênero *Rhodotorula* (40%) seguida do gênero *Candida* (33%), além de duas estirpes de *Exophiala dermatitidis* e duas estirpes com menos de 97% de identidade e que foram consideradas como espécies novas (estirpes A17 e A38) (Tab. 9).

Tabela 9 - Estirpes isoladas das amostras de sedimento de Santos

Código	D1/D2		
	tamanho	Resultado BLASTn	nº acesso da espécie mais próxima
A 13	541 pb	100% <i>Candida tropicalis</i>	AJ749824.1
A 17**	530 pb	98% <i>Sporopachydermia quercuum</i>	DQ438187.1
A 20	534 pb	98% <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	GU373747.1
A 24	*	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	*
A 25	508 pb	99% <i>Candida palmioleophila</i>	GU373771.1
A 27	*	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	*
A 28	394 pb	100% <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	GU460183.1
A 31	560 pb	100% <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	EU380240.1
A 32	*	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	*
A 36	510 pb	99% <i>Candida butyri</i>	FJ532313.1
A 38	365	96% <i>Yarrowia lipolytica</i>	GU320002.1
A 39	*	<i>Exophiala dermatitidis</i>	*
A 40	*	<i>Candida butyri</i>	*
A 41	*	<i>Candida butyri</i>	*
A 42	530 pb	99% <i>Exophiala dermatitidis</i>	GQ911514.1

*A estirpe A17 obteve 77% de identidade com *Candida tropicalis* no BLAST da região ITS

Segundo Hagler e colaboradores (1995), geralmente as comunidades de leveduras em ambientes aquáticos não poluídos são dominadas por populações esparsas de espécies não fermentativas incluindo muitos gêneros de *Cryptococcus* e *Rhodotorula* enquanto que em ambientes poluídos predominam as espécies fermentativas. Entretanto presente estudo mostrou uma predominância de *Rhodotorula* nas amostras de sedimento de Santos.

A presença da espécie *Exophiala dermatitidis* tanto na água quanto no sedimento de Santos chama atenção por ser uma levedura negra altamente patogênica, sendo um agente etiológico incomum de infecções fatais do sistema nervoso central. De acordo com Sudhadham e colaboradores (2008), esta é uma espécie rara e de baixa ocorrência em amostras ambientais e que ainda não se tem conhecimento exato acerca de seu habitat de preferência. Entretanto, esses autores sugerem que essa espécie tem como possível habitat de origem as florestas tropicais.

Já para as amostras provenientes da água de Itanhaém, das 11 estirpes isoladas, houve predominância de *Candida* (27%), *Pichia* (27%), *Rhodotorula* (11%) além de uma estirpe de *Debaryomyces hansenii*, uma estirpe de *Kwoniella mangroviensis*, uma

levedura recentemente descrita (Statzell-Tallman, Belloch & Fell, 2008) e uma estirpe com menos de 97% de identidade sendo considerada como espécie nova (estirpe A73) (Tab. 10)

Tabela 10 - Estirpes isoladas das amostras de água de Itanhaém

Código	D1/D2		
	tamanho	Resultado BLASTn	nº acesso da espécie mais próxima
A 07	521 pb	99% <i>Candida pseudolambica</i>	GQ324696.1
A 08	450 pb	100% <i>Candida pseudolambica</i>	AB557858.1
A 09	*	<i>Candida pseudolambica</i>	*
A 10	581 pb	100% <i>Kwoniella mangroviensis</i>	EF174035.1
A 11	529 pb	100% <i>Pichia sydwiorium</i>	AB281327.1
A 12	*	<i>Pichia sydwiorium</i>	*
A 45	528 pb	100% <i>Debaryomyces hansenii</i>	AB220035.1
A 72	546 pb	100% <i>Pichia occidentalis</i>	GU373797.1
A 73**	534 pb	96% <i>Candida membranifaciens</i>	EF362752.1
A 86	577 pb	96% <i>Rhodotorula marina</i>	AF189944.1
A 88	*	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	*

** A estirpe A 73 obteve 92% de identidade com *Candida membranifaciens* no BLAST da região ITS.

A predominância de *Candida* nas amostras de água pode estar relacionada a algumas ligações clandestinas de esgoto provenientes das comunidades ribeirinhas ao longo do Rio Itanhaém. Entretanto, esta contaminação é baixa quando comparada à encontrada no ambiente estuarino de Santos.

Por fim, das amostras do sedimento de Itanhaém obteve-se o maior número de isolados (44 estirpes) sendo que a maior predominância foi da espécie *Debaryomyces hansenii* (70,5%) seguida do gênero *Pichia* (9%), *Williopsis* (4,5%), *Kluveryomyces* (4,5%), *Candida* (4,5%) além de uma estirpe de *Cryptococcus cf. podzolicus* e uma estirpe de *Sterigmatomyces halophilus* (Tab. 11).

Debaryomyces hansenii é uma espécie de levedura mais comumente encontrada em ambientes marinhos sendo que sua prevalência foi observada em amostras coletadas próximas a praias (SIEBURTH, 1979). Outra espécie considerada autóctone de ambientes costeiros é a espécie *Kluveryomyces aestuarii* que foi isolada inicialmente apenas de amostras marinhas, porém Araujo e colaboradores (1995) demonstraram sua abundância

em caranguejos sugerindo que a presença desta espécie em amostras de água poderia estar relacionada com a presença nos caranguejos.

Tabela 11 - Estirpes isoladas das amostras de sedimento de Itanhaém

Código	D1/D2		
	tamanho	Resultado BLASTn	nº acesso da espécie mais próxima
A 02	526 pb	99% <i>Williopsis saturns</i>	GQ324696.1
A 03	*	<i>Candida pseudolambica</i>	*
A 04	527 pb	100% <i>Williopsis saturns</i>	EF550318.1
A 05	547 pb	100% <i>Candida thaimueangensis</i>	EF550231.1
A 06	504 pb	100% <i>Pichia guillermondii</i>	FJ455111.1
A 43	514 pb	100% <i>Pichia occidentalis</i>	GU373797.1
A 46	*	<i>Kluveromyces aestuarii</i>	*
A 47	546 pb	100% <i>Pichia occidentalis</i>	GU373797.1
A 51	514 pb	100% <i>Kluveromyces aestuarii</i>	EU543678.1
A 52	510 pb	100% <i>Issatchenkia siamensis</i>	FJ473448.1
A 83	*	<i>Pichia occidentalis</i>	*
A 84	554 pb	Uncultured soil fungus	EU691526.1
A 85	553 pb	100% <i>Cryptococcus cf. podzolicus</i>	FJ743620.1
A 87	555 pb	100% <i>Sterigmatomyces halophilus</i>	AY745716.1
A 56**	567 pb	99% <i>Debaryomyces hansenii</i>	FJ463626.1

** As demais estirpes isoladas das amostras de sedimento de Itanhaém (A 53 a A 82) também foram identificadas como pertencentes à espécie *Debaryomyces hansenii*.

De modo geral, os ambientes aquáticos são difíceis de caracterizar como habitat específico para espécies de leveduras, pois sofrem grande influência de ambientes terrestres, água de drenagem e de efluentes de origem humana.

Além disso, uma variedade de fatores bióticos e abióticos influencia o ciclo de vida das leveduras e exercem condições de estresse das quais as células devem se adaptar e suportar como, por exemplo, temperatura, pH, nutrientes. As diferenças encontradas tanto “entre” quanto “dentre” os estuários podem estar relacionadas às variações dos fatores físico-químicos durante o período de amostragem. Outra possível interpretação relaciona-se ao fato de que alguns organismos produzem compostos com atividades anti-leveduras como, por exemplo, as bactérias e as algas que produzem compostos com atividade inibitória contra *Candida albicans* (BUCK & MEYERS, 1965). A ocorrência de bactérias com atividade contra leveduras em áreas marinhas, principalmente em áreas poluídas, pode servir como um controle biológico natural de espécies patogênicas e não patogênicas que entram em estuários por fontes terrestres.

Em ambos os estuários estudados notou-se que não houve correspondência em relação à predominância de gêneros nas amostras de sedimento e de água. Enquanto que, na água de Santos observa-se predominância de *Candida*, no sedimento observa-se predominância de *Rhodotorula* embora haja presença de estirpes do gênero *Candida*.

Vale ressaltar que algumas das espécies identificadas no presente estudo, como *Candida natalensis*, podem ser autóctones uma vez que foram encontradas em altas concentrações tanto em amostras de oceano aberto como em localidades específicas circumpolares (FELL, 1976).

Em contrapartida, as espécies encontradas na água e no sedimento de Itanhaém evidenciaram as condições diferentes das duas áreas de modo que em ambientes impactados a presença de poluentes interfere na relação das leveduras com o substrato, ocorrendo uma menor diversidade. Essa diferença pode estar relacionada ao fato de que a especificidade da interação entre leveduras e seu substrato pode ser determinada por diversos fatores como status nutricional do substrato, compostos inibitórios e interações com outros organismos. Além disso, a sucessão de diferentes espécies pode mudar por várias ordens de grandeza dentro de poucas horas em resposta às mudanças nas condições ambientais.

Desta forma, a diferença na composição da comunidade de leveduras em Itanhaém em relação ao ambiente santista pode estar relacionada à elevada concentração de metais além da diferença entre os parâmetros físicos.

CONCLUSÕES

Observou-se neste estudo que a microbiota presente no ambiente estuarino tem sua densidade e composição afetada, de maneira geral, pela presença, em altas concentrações, de metais e hidrocarbonetos provenientes de petróleo. Ainda, ambientes de manguezal podem ser fontes para o isolamento de novas espécies microbianas que podem ser utilizadas como bioindicadoras e, provavelmente, em processos de biorremediação. Vale ressaltar que, em ambientes poluídos por efluentes domésticos, podem ocorrer micro-organismos patógenos, o que pode resultar em risco substancial para a saúde pública.

BIBLIOGRAFIA

- ABESSA, D. M. S. **Avaliação da qualidade de sedimentos do sistema estuarino de Santos, SP, Brasil**. 290 f. Universidade de São Paulo, Instituto Oceanográfico, 2002.
- ABESSA, D. M. S. Ecotoxicologia. **Políticas públicas para a Baixada Santista**, v. 04, n. 03, p. 1-3, 2005
- ABESSA, D. M. S. SOUSA, E. RACHID, B. R. F.; MASTROTI, R. R. Sediment toxicity in Santos estuary, SP-Brazil: preliminary results. **Ecotox. Environ. Rest**, v. 4, p. 6–9, 2001.
- AHEARN, D. G.; MEYERS, S. P. The role of fungi in the decomposition of hydrocarbons in the marine environment. **Biodeterioration of materials**, v. 2, p. 12–18, 1972.
- AL-HASAN, R.H. et al. Utilization of hydrocarbons by cyanobacteria from microbial mats on oil coasts of the Gulf. **Appl. Microbiol. Biotech.** v.41, p.615 -619, 1994
- ALONGI, D. M. **Coastal ecosystem processes**. New York, 1998.
- ALONGI, D. M. Present state and future of the world's mangrove forests. **Environmental Conservation**, v. 29, n. 03, p. 331–349, 2002.
- ANISZEWSKI, E. et al. Bioemulsifier production by *Microbacterium* sp. strains isolated from mangrove and their application to remove cadmium and zinc from hazardous industrial residue. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 235–245, 2010.
- ARAUJO, F. V. SOARES, C. A. G. HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. Ascomycetous yeast communities of marine invertebrates in a Southeast Brazilian mangrove ecosystem. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 68, n. 2, p. 91–99, 1995.
- ATSDR (Agency for toxic substances and diseases registry) - **Toxicological Profile: Total Petroleum Hydrocarbons (TPH)**. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/TP.asp?id=424&tid=75>>. Acesso em: 21/05/2010.
- AZAM, F. FENCHEL, T. FIELD, J. G. et al. The ecological role of water-column microbes in the sea. **Marine ecology progress series. Oldendorf**, v. 10, n. 3, p. 257–263, 1983.

- BANDONI, R. J. Terrestrial occurrence of some aquatic hyphomycetes. **Canad. J. Bot.**, v. 50, p. 2283–2288, 1972.
- BARNETT, J. A. PAYNE, R. W.; YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification**. 3. ed. Cambridge University Press, 2000.
- BARTH, H. J. The influence of cyanobacteria on oil polluted intertidal soils at the Saudi Arabian Gulf shores. **Marine pollution bulletin**, v. 46, n. 10, p. 1245–1252, 2003.
- BONETTI, C. **Foraminíferos como bioindicadores do gradiente de estresse ecológico em ambientes costeiros poluídos. Estudo aplicado ao sistema estuarino de Santos-São Vicente (SP, Brasil)**. 229 f. IOUSP, São Paulo, 2000.
- BRAGA, E. S. BONETTI, C. V. D. H. BURONE, L.; BONETTI FILHO, J. Eutrophication and bacterial pollution caused by industrial and domestic wastes at the Baixada Santista Estuarine System-Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 2, p. 165–173, 2000.
- BROCK, T. D. Lower pH limit for the existence of blue-green algae: evolutionary and ecological implications. **Science**, v. 179, n. 4072, p. 480, 1973.
- BRUNKE, M.; FISCHER, H. Hyporheic bacteria: relationships to environmental gradients and invertebrates in a prealpine stream. **Archiv Hydrobiologie**, v. 146, n. 2, p. 189–217, 1999.
- BUCK, J. D.; MEYERS, S. P. Antiyeast Activity in the Marine Environment. 1. Ecological Considerations. **Limnology and Oceanography**, v. 10, n. 3, p. 385–391, 1965.
- BURKE, L. KURA, Y. KASSEM, K. et al. **Coastal ecosystems**. World Resources Institute Washington, DC, 2001.
- BUSHNELL, L. D.; HAAS, H. F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. **Journal of Bacteriology**, v. 41, n. 5, p. 653, 1941.
- CANNELL, R. J. P. Algae as a source of biologically active products. **Pesticide science**, v. 39, n. 2, p. 147–153, 1993.
- CASTENHOLZ, R. W. **Ecology of blue-green algae in hot springs**. 1973.

- CETESB (SÃO PAULO). **Poluição das águas no Estuário e Baía de Santos**. Relatório técnico, CETESB, 1979.
- CETESB (SÃO PAULO). **Avaliação da toxicidade das águas e sedimentos dos rios e efluentes industriais da região de Cubatão**. Relatório técnico, CETESB, 1986.
- CETESB (SÃO PAULO). **Sistema Estuarino Santos-São Vicente**. Relatório técnico, CETESB, 2001.
- CHAERUN, S. K. TAZAKI, K. ASADA, R.; KOGURE, K. Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. **Environment international**, v. 30, n. 7, p. 911–922, 2004.
- CHAILLAN, F. LE FLÈCHE, A. BURY, E. PHANTAVONG, Y.; OTHERS. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Research in microbiology**, v. 155, n. 7, p. 587–595, 2004.
- CHAUDRI, A. M. MCGRATH, S. P.; GILLER, K. E. Metal tolerance of isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* from soil contaminated by past applications of sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, n. 2, p. 83–88, 1992.
- CHAY, T. C. SURIF, S.; HENG, L. Y. A Copper Toxicity Biosensor Using Immobilized Cyanobacteria, *Anabaena Torulosa*. **Sensor Letters**, **3**, v. 1, n. 4, p. 49–54, 2005.
- CHE, O.; et al. Concentration of 7 heavy metals in sediments and mangrove root samples from Mai Po, Hong Kong. **Marine pollution bulletin**, v. 39, n. 1-12, p. 269–279, 1999.
- DAVIES, C. M.; BAVOR, H. J. The fate of stormwater-associated bacteria in constructed wetland and water pollution control pond systems. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 2, p. 349–360, 2000.
- DAVIES-COLLEY, R. J. DONNISON, A. M. SPEED, D. J. ROSS, C. M.; NAGELS, J. W. Inactivation of faecal indicator micro-organisms in waste stabilisation ponds: interactions of environmental factors with sunlight. **Water Research**, v. 33, n. 5, p. 1220–1230, 1999.

- DESOUZA, N. A.; DESOUZA, J. Studies on estuarine yeasts: 4. Pectinolytic yeasts in mangroves. **Mahasagar**, v. 12, n. 3, p. 163–168, 1979.
- DOR, I.; DANIN, A. Cyanobacterial desert crusts in the Dead Sea Valley, Israel. **Arch. Hydrobiol.(Suppl.)(Algol. Stud.)**, v. 117, p. 197–206, 1996.
- ENVIRONMENTAL CANADA. **Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life**. 1999.
- FELL, J. W. Collection and identification of marine yeasts. **Methods in Microbiology**. Academic Press, New York: Paul, J., 2001.. v. 30, p.347–356.
- FELL, J. W. Yeasts in oceanic regions. **Recent advances in aquatic mycology**. Ellk Science, London: Jones, E.B.G, 1976.. p.83-124.
- FORD, E. D. **Scientific method for ecological research**. Cambridge Univ Pr, 2000.
- FOWLER, S. W. Critical review of selected heavy metal and chlorinated hydrocarbon concentrations in the marine environment. **Marine Environmental Research**, v. 29, n. 1, p. 1–64, 1990.
- GRAY, P. H. H.; THORNTON, H. G. Soil bacteria that decompose certain aromatic compounds. **Zentr. Bakt. Parasitenk., Abt. II**, v. 2, p. 74–96, 1928.
- HAGLER, A. N. MENDONÇA-HAGLER, L. C. ROSA, C. A.; MORAIS, P. B. Yeasts as an example of microbial diversity in Brazilian ecosystems. **Oecol. Brasiliensis**, v. 1, p. 225–244, 1995.
- HAGLER, A. N. OLIVEIRA, R. B.; HAGLER, L. C. M. Yeasts in the intertidal sediments of a polluted estuary in Rio de Janeiro, Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 48, n. 1, p. 53–56, 1982.
- HARARI, J.; CAMARGO, R. Modelagem numérica da regi\ ao costeira de Santos (SP): circulação de maré. **Rev. bras, oceanogr**, v. 46, n. 2, p. 135–156, 1998.
- HASAN, R. H. SORKHOH, N. A. BADER, D.; RADWAN, S. S. Utilization of hydrocarbons by cyanobacteria from microbial mats on oily coasts of the Gulf. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 41, n. 5, p. 615–619, 1994.

- HASSEN, A. JEDIDI, N. CHERIF, M. et al. Mineralization of nitrogen in a clayey loamy soil amended with organic wastes enriched with Zn, Cu and Cd. **Bioresource technology**, v. 64, n. 1, p. 39–45, 1998.
- HERZ, R. **Circulação das águas de superfície da Lagoa dos Patos**. 722 f. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1977.
- HIRSCH, P. R. JONES, M. J. MCGRATH, S. P.; GILLER, K. E. Heavy metals from past applications of sewage sludge decrease the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii* populations. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, n. 11, p. 1485–1490, 1993.
- HOBBIE, J. E. DALEY, R. J.; JASPER, S. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1225, 1977.
- HOLGUIN, G. VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and fertility of soils**, v. 33, n. 4, p. 265–278, 2001.
- HOLLIGAN, P.M.; REINERS, W.A. Predicting the responses of the coastal zone to global change. **Adv. Ecol. Res.** v.22, p. 211-255. 1992
- HUNGRIA, M.; URQUIAGA, S. Transformações microbianas de outros elementos (potássio, micronutrientes e metais pesados). **Microbiologia do solo**. Campinas: Cardoso, E.J.B.N, 1992.. p.329–340.
- IIZUKA, H.; KOMAGATA, K. Microbiological studies on petroleum and natural gas. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 207–221, 1964.
- INTARI, S. E. Factors affecting the death of mangrove trees in the Pedada Strait, Indragiri Hilir, Riau, with reference to the site conditions. **Buletin Penelitian Hutan**,v.1 , n. 531, p. 33–48, 1990.
- KATHIRESAN, K. Why are mangroves degrading. **Current Science**, v. 83, n. 10, p. 1246–1249, 2002.
- KENNISH, M. J. **Practical handbook of estuarine and marine pollution**. CRC, 1997.

- KOBATAKE, M. et al. Isolation of proteolytic psychrophilic yeasts from raw seafoods. **Lett Appl Microbiol.** v, 14, n.2, p.37-42.1992
- KRISTENSEN, E. JENSEN, M. H. BANTA, G. T. et al. Transformation and transport of inorganic nitrogen in sediments of a southeast Asian mangrove forest. **Aquatic microbial ecology**, v. 15, n. 2, p. 165–175, 1998.
- KUTTY, S. N.; PHILIP, R. Marine yeasts—a review. **Yeast**, v. 25, n. 7, p. 465–483, 2008.
- LAMPARELLI, M. C. et al. **Sistema Estuarino de Santos e São Vicente**. 2001. Relatório técnico. CETESB (São Paulo). 178f. 2001
- LANDMEYER, J. E. BRADLEY, P. M.; CHAPELLE, F. H. Influence of Pb on microbial activity in Pb-contaminated soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, n. 10, p. 1465–1466, 1993.
- LORENZI, A. S. **Implementação da técnica de PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR) para o monitoramento de *Microcystis* e genótipos potencialmente produtores de microcistinas (2008)**. Implementation of Real Time Quantitative PCR technique (qPCR) for the monitoring of *Microcystis* and potentially microcystin-producing genotypes. 174 f. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.
- MACDONALD, D. D. et al. Development and evaluation of sediment quality guidelines for Florida coastal waters. **Ecotoxicology**, v. 5, n. 4, p. 253–278, 1996.
- MACGILLIVRAY, A. R.; SHIARIS, M. P. Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1613, 1993.
- MADIGAN, M. T. MARTINKO, J. M. PARKER, J.; OTHERS. **Brock biology of microorganisms**. Prentice Hall Upper Saddle River, NJ, 2000.
- MEDEIROS, P. M.; CARUSO BICEGO, M. Investigation of natural and anthropogenic hydrocarbon inputs in sediments using geochemical markers. I. Santos, SP–Brazil. **Marine pollution bulletin**, v. 49, n. 9-10, p. 761–769, 2004.

- MEYER, W. MITCHELL, T. G. FREEDMAN, E. Z.; VILGALYS, R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 9, p. 2274, 1993.
- MEYERS, S. P. AHEARN, D. G. OCEANIC, U. S. N. et al. **Implication of yeasts and yeast-like fungi in marine processes**. National Technical Information Service, 1974.
- MIRANDA, L. B. **Princípios de oceanografia física de estuários**. Edusp, 2002.
- MOORE, J. W.; RAMAMOORTHY, S. **Organic chemicals in natural waters: Applied monitoring and impact assessment**. 1984.
- MUNN, K. J. EVANS, J.; CHALK, P. M. Mineralization of soil and legume nitrogen in soils treated with metal-contaminated sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, n. 14, p. 2031–2043, 2000.
- NEVES, C. F.; MUEHE, D. Vulnerabilidade, impactos e adaptações a mudanças do clima: a zona costeira. **Parcerias Estratégicas**, v. 27, p. 217–295, 2008.
- OLIVEIRA, A. J. F. C. et al. Physical, chemical and microbiological characterization of the intertidal sediments of Pereque Beach, Guarujá (SP), Brazil. **Marine pollution bulletin**, v. 54, n. 7, p. 921–927, 2007.
- PAGNOCCA, F. C. RODRIGUES, A. NAGAMOTO, N. S.; BACCI, M. Yeasts and filamentous fungi carried by the gynes of leaf-cutting ants. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, n. 4, p. 517–526, 2008.
- PAUL, E. A. **Soil microbiology, ecology, and biochemistry**. Academic Press, 2007.
- PELCZAR, M. J. REID, R. D.; CHAN, E. C. S. **Microbiología**. McGraw-Hill, 1981.
- PERILLO, G. M. E. **Geomorphology and sedimentology of estuaries**. Elsevier Science, 1995.
- POMEROY, L. R.; DARWIN, C. The microbial loop. **Oceanography**, v. 20, n. 2, p. 28, 2007.

- PORTER, K. G.; FEIG, Y. S. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. **Limnology and oceanography**, v. 25, n. 5, p. 943–948, 1980.
- PRENAFETA-BOLDÚ, F. X. et al. Isolation and characterization of fungi growing on volatile aromatic hydrocarbons as their sole carbon and energy source. **Mycological Research**, v. 105, p. 477–48. 2002
- PRENAFETA-BOLDÚ, F.X.; SUMMERBELL, R.; DE HOOG, G.S. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard. **FEMS Microbiol Rev.** v. 30, p. 109-130. 2006
- RAI, A. N. **CRC handbook of symbiotic cyanobacteria**. CRC Press, Boca Raton, Fla., 1990.
- RAVEN, P. H. E. EVERT, R. F. E.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- REBER, H. H. Simultaneous estimates of the diversity and the degradative capability of heavy-metal-affected soil bacterial communities. **Biology and Fertility of soils**, v. 13, n. 3, p. 181–186, 1992.
- ROBERTSON, A. I. **Tropical mangrove ecosystems**. Amer Geophysical Union, 1992.
- ROLING, W. F. M. MILNER, M. G. JONES, D. M. et al. Bacterial community dynamics and hydrocarbon degradation during a field-scale evaluation of bioremediation on a mudflat beach contaminated with buried oil. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2603, 2004.
- SAIFULLAH, S. M. KHAN, S. H.; ISMAIL, S. Distribution of nickel in a polluted mangrove habitat of the indus delta. **Marine pollution bulletin**, v. 44, n. 6, p. 551–576, 2002.
- SAMPAIO, J. P. GADANHO, M. SANTOS, S. et al. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporidium*: *Rhodosporidium kratochvilovae* and related anamorphic species. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 2, p. 687, 2001.

- SATOW, M. M. ATTILI-ANGELIS, D. DE HOOG, G. S. ANGELIS, D. F.; VICENTE, V. A. Selective factors involved in oil flotation isolation of black yeasts from the environment. **Studies in Mycology**, v. 61, n. 1, p. 157, 2008.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Manguezal: ecossistema entre a terra eo mar. **Caribbean Ecological Research**, p. 49–52, 1995.
- SCHAEFFER-NOVELLI, Y. CINTRÓN-MOLERO, G. SOARES, M. L. G.; DE-ROSA, T. Brazilian mangroves. **Aquatic Ecosystem Health & Management**, v. 3, n. 4, p. 561–570, 2000.
- SIEBURTH, J. M. N. **Sea microbes**. Oxford University Press, USA, 1979.
- SIQUEIRA, J. O. MOREIRA, F. GRISI, B. M. HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. **Microrganismos e processos biológicos do solo**. Perspectiva Ambiental. Brasília, DF. Embrapa, 1994.
- SKULBERG, O. M. Biophotolysis, hydrogen production and algal culture technology. **Hydrogen energy system: production and utilization of hydrogen and future aspects**. Dordrecht: Kluwer Academy Publishers, 1995.. p.95-110.
- SOARES, C. A. MAURY, M. PAGNOCCA, F. C. et al. Ascomycetous yeasts from tropical intertidal dark mud of southeast Brazilian estuaries. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 43, n. 5, p. 265, 1997.
- SORKHOH, N. A. AL-HASAN, R. H. KHANAFER, M.; RADWAN, S. S. Establishment of oil-degrading bacteria associated with cyanobacteria in oil-polluted soil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 78, n. 2, p. 194–199, 1995.
- STATZELL-TALLMAN, A. BELLOCH, C.; FELL, J. W. *Kwoniella mangroviensis* gen. nov., sp. nov.(Tremellales, Basidiomycota), a teleomorphic yeast from mangrove habitats in the Florida Everglades and Bahamas. **FEMS yeast research**, v. 8, n. 1, p. 103–113, 2008.
- SUDHADHAM, M. PRAKITSIN, S. SIVICHAJ, S. et al. The neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* has a possible origin in the tropical rain forest. **Studies in Mycology**, v. 61, n. 1, p. 145, 2008.

- TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. Retention and distribution of heavy metals in mangrove soils receiving wastewater. **Environmental Pollution**, v. 94, n. 3, p. 283–291, 1996.
- TAM, N. F. Y.; WONG, Y. S. Spatial variation of heavy metals in surface sediments of Hong Kong mangrove swamps. **Environmental Pollution**, v.110, p.195-205, 2000.
- TOMMASI, L. R.; DE SANEAMENTO AMBIENTAL, C. T. **Considerações ecológicas sobre o sistema estuarino de Santos, Sao Paulo**. 489 f. Universidade de São Paulo, 1979.
- TOYODA, K. SHIBATA, A. WADA, M. et al. Trophic interactions among marine microbes in oil-contaminated seawater on a mesocosmic scale. **Microbes and environments**, v. 20, n. 2, p. 104–109, 2005.
- VAN UDEN, N. Intestinal yeasts of man and domestic animals. **Proc. 6th Int. Congr. Trop. Med. Malar**, v. 4, p. 612–616, 1959.
- WEISMAN, W. **Analysis of petroleum hydrocarbons in environmental media**. Amherst Scientific Publishers, 1998.
- WOERTZ, J. R. KINNEY, K. A. MCINTOSH, N. D. P.; SZANISZLO, P. J. Removal of toluene in a vapor-phase bioreactor containing a strain of the dimorphic black yeast *Exophiala lecanii-corni*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 75, n. 5, p. 550–558, 2001.
- YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. **The yeasts, a taxonomic study**. 1998. v. 4, p.77–100.
- ZINJARDE, S. S.; PANT, A. A. Hydrocarbon degraders from tropical marine environments. **Marine pollution bulletin**, v. 44, n. 2, p. 118–121, 2002.
- ZOBELL, C. E. Marine microbiology. **Chronica Botanica Co., Waltham, Mass**, v. 240, 1946.