

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**(ÁREA: MICROBIOLOGIA APLICADA)**

---

**SONIA ASSAMI DOI**

**QUALIDADE SANITÁRIA DA BAÍA DO ARAÇÁ,  
SÃO SEBASTIÃO (SP)**

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

Rio Claro - SP  
2018

**SONIA ASSAMI DOI**

**QUALIDADE SANITÁRIA DA BAÍA DO ARAÇÁ,  
SÃO SEBASTIÃO (SP)**

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

**Orientadora: Profa. Dra. Ana Júlia Fernandes Cardoso de Oliveira**

**Rio Claro - SP  
2018**

D657q Doi, Sonia Assami  
Qualidade Sanitária da Baía do Araçá, São Sebastião  
(SP). / Sonia Assami Doi. -- Rio Claro, 2018  
146 f. : il., tabs., fotos, mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista  
(Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro  
Orientadora: Ana Julia Fernandes Cardoso de Oliveira

1. Escherichia coli. 2. Enterococcus sp.. 3. Candida sp..  
4. Qualidade sanitária. 5. Diversidade fúngica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do  
Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: CONTAMINAÇÃO FECAL DA ÁGUA E DO SEDIMENTO DA BAÍA DO ARAÇÁ, SÃO SEBASTIÃO (SP), SUA RELAÇÃO COM PARÂMETROS BIÓTICOS/ABIÓTICOS E ANÁLISE DA DENSIDADE DE FUNGOS FILAMENTOSOS

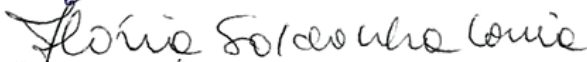
**AUTORA: SONIA ASSAMI DOI**

**ORIENTADORA: ANA JULIA FERNANDES**


Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. ANA JULIA FERNANDES  
Campus do Litoral Paulista / UNESP



Profa. Dra. FLÁVIA MARISA PRADO SALDANHA  
Instituto Oceanográfico / Universidade de São Paulo



Prof. Dr. JOSE JUAN BARRERA ALBA  
Campus Baixada Santista / Universidade Federal de São Paulo



Profa. Dra. CRISTIANE ANGÉLICA OTTONI  
Câmpus do Litoral Paulista / UNESP



Profa. Dra. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS  
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 27 de abril de 2018

**Título alterado para: "QUALIDADE SANITÁRIA DA BAÍA DO ARAÇÁ, SÃO SEBASTIÃO (SP)"**

Dedico este trabalho aos meus pais  
pelo apoio para conquistar meus  
objetivos.

## AGRADECIMENTOS

O meu agradecimento a todas as pessoas que participaram e contribuíram na elaboração, realização e conclusão deste trabalho, compartilhando conhecimentos, experiências e pela companhia na alegria e no trabalho do dia a dia.

Agradeço de todo coração à minha orientadora prof. Dra. Ana Julia Fernandes pela orientação, oportunidades, estímulo e ensinamentos transmitidos ao longo deste trabalho. Agradeço a paciência e confiança que permitiram um crescimento profissional e pessoal nestes anos de convívio para que este trabalho fosse realizado com sucesso.

Agradecimento à UNESP do Campus de Rio Claro e a UNESP do Campus do Litoral Paulista pelo apoio, auxílio e oportunidade concedida para o aprimoramento da minha formação acadêmica. Agradeço pelo exemplo profissional, mas também pela amizade e carinho de cada um.

Aos professores, funcionários e todos os envolvidos do Programa de pós-graduação da UNESP de Rio Claro e de São Vicente, pelos conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade, pelas informações prestadas, permitindo a realização desta pesquisa. Foi parte fundamental na realização deste trabalho.

Ao prof. Dr Pagnocca e ao Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudo de Insetos da UNESP – Rio Claro, pela execução das análises moleculares e pelo treinamento oferecido. Agradecimento às pós-graduandas Daiane Polezel e Maria Carolina Canali pelas sugestões e experiência compartilhada.

Aos meus amigos e colegas do melhor lab de micro, o MICROMAR, pelo carinho, apoio e companheirismo em todas as horas. Nossos encontros e saídas foram inesquecíveis, sendo possível superar os desafios e dificuldades com muita alegria e aventura. Agradeço a Roberta, Erik e Maitan por me apoiar, me ajudar e sempre estando ao meu lado nas execuções dos trabalhos. À Thaís pelas informações importantes em relação ao trabalho dentro do laboratório. À Aline pelas preciosas dicas, observações e informações para melhoria deste trabalho. À Roberta e Vanessa pelas preciosas e importantes informações e correções para realização deste trabalho.

À minha família e minhas amigas Li, Mila, Dany e Sá que me incentivou, apoiou e me confortaram esses anos. E aos amigos que mesmo distantes, se fizeram presentes em todos os momentos.

Agradeço a CNPq pelo apoio financeiro.

Agradeço a Profa Cecília Amaral, coordenadora do projeto Biota Araçá, projeto qual este doutorado é vinculado.

Às pessoas que não foram citados, mas participaram e auxiliaram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho, muito obrigada!

*“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.”*  
(Isaac Newton)



## RESUMO

A Baía do Araçá apresenta grande complexidade morfofisiológica e ambiental e uma grande diversidade de organismos aquáticos e terrestres. Ela está exposta a diferentes tipos de ações antrópicas que influenciam sua qualidade ambiental, ocasionado pelo aumento da poluição orgânica, incluindo efluentes domésticos. A avaliação das densidades de microrganismos indicadores de contaminação fecal é fundamental para determinar a qualidade microbiológica, tanto da água, como do sedimento. O presente trabalho teve por objetivo avaliar a qualidade microbiológica da água e do sedimento, determinando a densidade de *E. coli*, *Enterococcus* spp. e da levedura do gênero *Candida*. Os resultados foram correlacionados com as variáveis abióticas e comparados com a legislação vigente. Também foi analisado a densidade e diversidade de fungos filamentosos isolados da água e do sedimento. Para avaliar a qualidade microbiológica, amostras de água e de sedimento foram coletados na região entremarés da Baía do Araçá (São Sebastião/SP), em campanhas no verão e no inverno durante dois anos. As variáveis abióticas foram mensurados *in situ*, com auxílio de uma sonda multiparâmetro. Foi utilizado a Técnica de Membrana Filtrante para determinar a densidade das bactérias *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. e da levedura *Candida* spp. e a Técnica *Spread Plate* para determinar a densidade dos fungos filamentosos. A análise estatística foi utilizada testes não paramétricos, Análise de Correspondência Canônica e o Índice de Shannon e Chao1 para determinar a diversidade de fungos. Os resultados obtidos mostraram que as densidades microbianas foram maiores nos sedimentos em relação à amostra da água. As maiores densidades de *Enterococcus* spp., *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* foram obtidas no inverno, em oposição ao *E. coli* que foi obtida no verão. Comparando os dados coletados com a Resolução CONAMA nº 274/00, as amostras indicaram condições ambientais impróprias para uso recreativo. Não foram observadas correlações significativas das variáveis abióticas com as densidades das bactérias e leveduras. Foram detectadas elevadas densidades de *Enterococcus* sp. e de *Candida tropicalis* tanto na amostra da água como no sedimento, indicando que este resultado é preocupante quanto à qualidade sanitária do ambiente. Dentre os gêneros de *Enterococcus* sp. foi detectado uma elevada presença de *E. faecium* na água e no sedimento. A densidade dos fungos filamentosos foram muito mais elevadas em relação às bactérias, sendo identificados ao total 15 gêneros: *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizophus*, *Sporothrix*, *Talaromyces*, *Trichophyton* e *Trichoderma*. As espécies *Aspergillus fumigatus* e *Penicillium citrinum* foram isoladas e identificadas neste trabalho e por serem conhecidas pela sua patogenicidade e indica um fator preocupante para a saúde dos frequentadores da praia. A análise constante da densidade de bactérias e de leveduras patogênicas é importante para determinar a qualidade ambiental e os possíveis riscos que esta contaminação pode acarretar na saúde dos homens e animais. Apesar da contaminação e do impacto que caracteriza a qualidade da Baía, ela deve ser preservada por possuir microrganismos que podem servir de fonte para bioprospecção de novos produtos com potencial aplicação biotecnológica.

**Palavras-chave:** *Escherichia coli*. *Enterococcus* sp. *Candida* sp. Qualidade sanitária. Diversidade fúngica.

## ABSTRACT

Araçá Bay presents great morphophysiological and environmental complexity and a great diversity of aquatic and terrestrial organisms. It is exposed to different types of anthropogenic actions that influence its environmental quality, caused by the increase of organic pollution, including domestic effluents. The evaluation of the microorganisms densities of fecal contamination indicators is essential to determine the microbiological quality of both water and sediment. This work aimed to evaluate the microbiological quality of water and sediment, determining the density of *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. and *Candida* yeast. The results were correlated with the abiotic variables and compared with the current legislation. The density and diversity of filamentous fungi isolated from water and sediment were also analyzed. To evaluate the microbiological quality, water and sediment samples were collected in the intertidal region of Araçá Bay (São Sebastião / SP), in summer and winter campaigns for two years. Abiotic variables were measured in situ with the aid of a multiparameter probe. The Filter Membrane Technique was used to determine the density of the bacteria *E. coli*, *Enterococcus* spp. and yeast *Candida* spp. and the Spread Plate Technique to determine the density of the filamentous fungi. Statistical analysis was performed using non-parametric tests, Canonical Correspondence Analysis and the Shannon and Chao1 Index to determine fungal diversity. The results showed that the microbial densities were higher in the sediments in relation to the water sample. The highest densities of *Enterococcus* spp., *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* and *C. glabrata* were obtained in winter, as opposed to *E. coli* that was obtained in the summer. Comparing the data collected with CONAMA Resolution No. 274/00, the samples indicated environmental conditions unfit for recreational use. No significant correlation of abiotic variables with bacterial and yeast densities was observed. High densities of *Enterococcus* sp. and *Candida tropicalis*, both in the water sample and in the sediment, indicating that this result is of concern regarding the sanitary quality of the environment. Among the genera of *Enterococcus* sp. a high presence of *E. faecium* was detected in the water and in the sediment. The density of the filamentous fungi was much higher in relation to the bacteria, being identified to the total 15 genera: *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizophus*, *Sporothrix*, *Talaromyces*, *Trichophyton* and *Trichoderma*. The species *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium citrinum* were isolated and identified in this work and because they are known for their pathogenicity and indicates a worrying factor for the health of beach goers. The constant analysis of the density of bacteria and pathogenic yeasts is important to determine the environmental quality and the possible risks that this contamination can have on the health of men and animals. Despite the contamination and the impact that characterizes the Bay quality, it must be preserved because it has microorganisms that can serve as a source for bioprospecting new products with potential biotechnological application.

**Keywords:** *Escherichia coli*. *Enterococcus* sp.. *Candida* sp.. Sanitary quality. Fungal diversity.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Algumas estruturas dos fungos filamentosos observados microscopicamente..... 30
- Figura 2: Mapa da localização da Baía do Araçá, indicando o Porto de São Sebastião, o Terminal Petrolífero Almirante Barroso (TEBAR), o emissário submarino e o Córrego Mãe Isabel (adaptado de AMARAL; MORGADO, 1994; AMARAL et al., 2015). ..... 37
- Figura 3: Mapa da região da Baía do Araçá mostrando a localização do Emissário Submarino (adaptado de CETESB, 2007), do Córrego Mãe Isabel, destaque da mancha verde para os bosques de manguezal (adaptado de AMARAL et al., 2015), e dos pontos de coleta destacados com pontos vermelhos na região entremarés..... 39
- Figura 4: Praias que fazem parte da Baía do Araçá (Praia do Germano, Praia Pernambuco, Praia Deodato e Praia do Topo). A) Vista panorâmica do TEBAR. B) Vista da beleza e águas calmas da Baía do Araçá. C) ao G) Vista geral da região entremarés na maré baixa, expondo o sedimento e os materiais submersos. H) ao L) descarga de efluente não tratado e resíduos sólidos (lixo) encontrados ao longo da Baía..... 41
- Figura 5: A) Placas de mTec com crescimento de colônias após 22 horas de incubação em banho maria. B) Colônias ao teste confirmativo com o substrato de Uréia..... 44
- Figura 6: Morfologia e resultado da reação de Gram de cepas isoladas. Bactérias em forma de bacilo, gram-negativas, visualizadas ao microscópio ótico em objetiva de 100x..... 44
- Figura 7: A) Crescimento das colônias em meio mEnterococos após 48 horas de incubação a 37°C. B) Tubos considerados positivos no teste confirmativo. .... 45
- Figura 8: Morfologia e resultado da reação de Gram de cepas de *Enterococcus* spp. isoladas. Bactérias em forma de cocos, gram-positivas, visualizadas ao microscópio ótico em objetiva de 100x..... 45
- Figura 9: A) Tubos de ensaio do Entero Kit contendo substratos para os testes bioquímicos, realizados com as colônias isoladas B) Tubos mostrando os resultados dos testes bioquímicos..... 46
- Figura 10: Crescimento das colônias de *Candida* spp., nas placas com meio de culutra Agar HiChrome. .... 47
- Figura 11: Colônias de fungos filamentosos em placas com meio PDA acrescido de cloranfenicol após 10 dias de incubação à temperatura ambiente. .... 48
- Figura 12: Variáveis abióticas obtidas da região entremarés da Baía do Araçá analisados por ano e período de coleta, sendo: (A) Temperatura (°C), (B) salinidade, (C) pluviosidade (mm), (D) oxigênio dissolvido (mg L<sup>-1</sup>) e (E) pH. .... 53

- Figura 13: Variação das médias das densidades de *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Enterococcus* sp.. Média geral, média do verão e do inverno e seus respectivos erros padrões representado pelas barras. Expresso em  $\times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ . Quadro em destaque representa resultado do teste estatístico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p), diferença entre as densidades da espécie *E. coli* e *Enterococcus* sp. em relação ao período (verão-inverno). ❖: representa diferença significativa..... 55
- Figura 14: Valores médios das densidades de *E. coli* e *Enterococcus* sp. analisados por ano de coleta, com unidade expressos em  $\times 10^2$  UFC  $100\text{ mL}^{-1}$ . Quadro em destaque representa resultado do teste estatístico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p) entre as densidades da espécie *E. coli* e *Enterococcus* sp. em relação por ano de coleta (2015 e 2016). ❖: representa diferença significativa. .... 57
- Figura 15: Variação das médias das densidades de *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Enterococcus* sp., nas estações de verão e inverno de 2015 e 2016 na água e seus respectivos erros padrões representado pelas barras. Valor expresso em  $\times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ ..... 58
- Figura 16: A) Teste utilizando Kit bioquímico para identificar as colônias isoladas de *Enterococcus spp.* para determinar a espécie. Sequência de tubos da esquerda para direita: Manitol, Arginina, Arabinose, Sorbitol, Motilidade, controle e branco. Teste de mobilidade da cepa isolada. B) negativo, C) positivo. .... 62
- Figura 17: Valores médios da densidade dos microrganismos analisados na água coletados na Baía do Araçá ( $\times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ ) e seu erro padrão representado pelas barras. Microrganismos: *C. albicans*: *Candida albicans*; *C. krusei*: *Candida krusei*; *C. glabrata*: *Candida glabrata*; *C. tropicalis*: *Candida tropicalis*. .... 65
- Figura 18: Valores médios da densidade das espécies de *Candida* sp. no verão e no inverno analisados na água ( $\times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ ) e seu erro padrão representado pelas barras. Quadro vermelho em destaque representa resultado do teste estatístico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p), diferença entre as densidades das espécies de *Candida* sp. em relação ao período (verão-inverno). ❖: representa diferença significativa. Microrganismos: *C. albicans*: *Candida albicans*; *C. krusei*: *Candida krusei*; *C. glabrata*: *Candida glabrata*; *C. tropicalis*: *Candida tropicalis*. .... 67
- Figura 19: Valores médios da densidade das espécies de *Candida* sp. nos anos de 2015 e 2016 analisados na água ( $\times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ ) e seu erro padrão representado pelas barras. Quadro vermelho em destaque representa resultado do teste estatístico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p), diferença entre as densidades das espécies de *Candida* sp. em relação aos anos 2015-2016. ❖: representa diferença significativa. Microrganismos: *C. albicans*: *Candida albicans*; *C. krusei*: *Candida krusei*; *C. glabrata*: *Candida glabrata*; *C. tropicalis*: *Candida tropicalis*. .... 68
- Figura 20: Valores médios da densidade das espécies de *Candida* sp. nos anos de 2015 e 2016 nos períodos do verão e inverno, analisados na água ( $\times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ ) e seu erro padrão representado pelas barras. Microrganismos: *C. albicans*: *Candida albicans*; *C.*

*krusei*: *Candida krusei*; *C. glabrata*: *Candida glabrata*; *C. tropicalis*: *Candida tropicalis*. ..... 69

Figura 21: Média das densidades de colônias dos fungos filamentosos coletados na água, separado em inverno e verão (barras indicam os erros padrões). Unidade expressa em  $\times 10^3$  UFC 100mL<sup>-1</sup>. ..... 75

Figura 22: Valores médios das densidades das bactérias e fungos filamentosos e seus erros padrões (representado pelas barras), encontrados na água ( $\times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup>). Quadro em destaque representa resultado do teste estatístico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p), diferença entre as densidades da espécie *E. coli* e *Enterococcus* sp. em relação ao período (verão-inverno). ♦: representa diferença significativa. .... 76

Figura 23: Variação das médias das densidades de *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Enterococcus* sp. nas amostras de areia. Média geral, média do verão e do inverno e seus respectivos erros padrões representado pelas barras. Expresso em  $\times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup>. Quadro em destaque representa resultado do teste estatístico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p), diferença entre as densidades da espécie *E. coli* e *Enterococcus* sp. em relação ao período (verão-inverno). ♦: representa diferença significativa. .... 78

Figura 24: Valores médios das densidades de *E. coli* e *Enterococcus* sp. analisados por ano de coleta, com unidade expressos em  $\times 10^3$  UFC 100g<sup>-1</sup>. Quadro em destaque representa resultado do teste estatístico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p) entre as densidades da espécie *E. coli* e *Enterococcus* sp. em relação por ano de coleta (2015 e 2016). ♦: representa diferença significativa. .... 79

Figura 25: Variação das médias das densidades de *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Enterococcus* spp. nas estações de verão e inverno de 2015 e 2016 nas amostras de areia e seus respectivos erros padrões. Unidade expressos em  $\times 10^3$  UFC 100g<sup>-1</sup>. ..... 80

Figura 26: Valores médios dos microrganismos analisados no sedimento ( $\times 10^3$  UFC 100g<sup>-1</sup>) e seu erro padrão representado pelas barras. Microrganismos: *C. albicans*: *Candida albicans*; *C. krusei*: *Candida krusei*; *C. glabrata*: *Candida glabrata*; *C. tropicalis*: *Candida tropicalis*. ..... 83

Figura 27: Valores médios dos microrganismos analisados na areia ( $\times 10^3$  UFC 100g<sup>-1</sup>) no verão e no inverno, e seus respectivos erros padrões representado pelas barras. Microrganismos: *C. albicans*: *Candida albicans*; *C. krusei*: *Candida krusei*; *C. glabrata*: *Candida glabrata*; *C. tropicalis*: *Candida tropicalis*. Quadro vermelho em destaque representa resultado do teste estatístico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p), diferença entre as densidades das espécies de *Candida* sp. em relação ao período (verão-inverno). ♦: representa diferença significativa. .... 85

Figura 28: Comparação da média das densidade das leveduras na areia, separado por ano e seus respectivos erros padrões representado pelas barras. Microrganismos: *C. albicans*: *Candida albicans*; *C. krusei*: *Candida krusei*; *C. glabrata*: *Candida glabrata*; *C.*

*tropicalis: Candida tropicalis*. Quadro vermelho em destaque representa resultado do teste estatístico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p), diferença entre as densidades das espécies de *Candida* sp. em relação ao período (verão-inverno). ♦: representa diferença significativa. .... 86

Figura 29: Valores médios das densidades do gênero *Candida* entre os verões e invernos de 2015 e 2016 na areia, sendo expressas em  $\times 10^3$  UFC  $100g^{-1}$  e seus respectivos erros padrões representado pelas barras. Destaque no quadro para os microrganismos que apresentaram valores médios baixos. Microrganismos: *C. albicans: Candida albicans*; *C. krusei: Candida krusei*; *C. glabrata: Candida glabrata*; *C. tropicalis: Candida tropicalis*. .... 87

Figura 30: Média das densidades dos fungos filamentosos com seus devidos erros padrões, comparados pela estação do ano (verão e inverno). Expresso em  $\times 10^4$  UFC  $100g^{-1}$ . .. 89

Figura 31: Comparação das médias das densidades entre as bactérias *E. coli*, *Enterococcus* spp. e dos fungos filamentosos, expressos em  $\times 10^3$  UFC  $100g^{-1}$ . Quadro em destaque representa o resultados do testes estatístico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p) entre as densidades da espécie *E. coli* e *Enterococcus* spp. em relação à densidade de fungos filamentosos nas amostras de areia. .... 90

Figura 32: Análise de Correspondência Canônica entre variáveis ambientais mensurados e a densidade de microrganismos na água. Obs.: Temp. - Temperatura ( $^{\circ}C$ ); pH – potencial hidrogenionico; salin - salinidade, OD - oxigênio dissolvido ( $mg L^{-1}$ ) e pluvios. - pluviosidade (mm). Enter. - *Enterococcus* spp; *C. alb.* – *C. albicans*; *C. trop.* – *Candida tropicalis*; *C. alb.* – *Candida albicans*; *C. glabr.* – *Candida glabrata*. Pontos vermelhos – verão; pontos azuis – inverno. .... 95

Figura 33: Fungos filamentosos da espécie *Aspergillus* sp. observadas em microscópico ótico, com aumento de 400x. .... 103

Figura 34: Fungos filamentosos da espécie *Penicillium* sp. observadas em microscópico ótico, com aumento de 1000x. .... 104

Figura 35: Fungos filamentosos da espécie *Curvularia* sp. observadas em microscópico ótico, com aumento de 400x. .... 104

Figura 36: Abundancia relativa dos gêneros dos fungos filamentosos isolados da água e da areia, identificadas morfológicamente. .... 107

Figura 37: Abundância relativa dos fungos filamentosos identificados morfológicamente das amostras isoladas, separados em água e areia. .... 108

Figura 38: Densidade de fungos filamentosos apresentados em porcentagem (%) na água (A) e na areia (B) em relação a estação do ano verão e inverno. .... 109

## LISTA DE TABELA

Tabela 1: Descrição das classificações da qualidade da água salobra em relação à presença de <i>E. coli</i> na legislação brasileira CONAMA 375/2005. Valores expressos em UFC 100 mL <sup>-1</sup> (BRASIL, 2005).....	32
Tabela 2: Descrição das classificações da qualidade da água em relação a presença de <i>E. coli</i> e <i>Enterococcus</i> sp. na legislação brasileira segundo CONAMA 274. Valores expressos em UFC 100 mL <sup>-1</sup> (BRASIL, 2000).....	33
Tabela 3: Limites das densidades de indicadores de contaminação fecal em águas marinhas recreacionais, estabelecidos por outros países ou organizações. Valores expressos em UFC 100 mL <sup>-1</sup> . ....	34
Tabela 4: Proposta de padrões para avaliação da qualidade microbiológica das areias.....	36
Tabela 5: Valores das variáveis abióticas obtidas da Baía do Araçá: Geral, verão e inverno.....	51
Tabela 6: Valores referente a classificação da Correlação de Spearman (modificado) segundo Cabral et al. (2006).....	60
Tabela 7: Resultado da análise estatística de Correlação de Spearman (r) em relação à densidade de microrganismos na água em comparação aos parâmetros ambientais coletados no verão e no inverno. (p): Nível de significância p<0,05.....	61
Tabela 8: Resultado dos testes bioquímicos das cepas isoladas de <i>Enterococcus</i> spp. (+ positivo, - negativo, +/- variado).....	63
Tabela 9: Porcentagem de <i>Enterococcus</i> spp. identificados pela técnica bioquímica. (n): número de cepas testadas. ....	63
Tabela 10: Valores resultantes do teste de Kruskal-Wallis a 95% de significância (p) entre as densidades das espécies de <i>Candida</i> sp. ( <i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida tropicalis</i> ).....	66
Tabela 11: Resultado da análise estatística de Correlação de Spearman (r) em relação à densidade de microrganismos na água em comparação às variáveis ambientais coletados no verão e no inverno. Nível de significância: p<0,05.....	71
Tabela 12: Parâmetros ambientais obtidos das amostras de água da região entremarés da Baía do Araçá. ....	73
Tabela 13: Valores resultantes da análise estatística da correlação de Spearman (r) dos fungos em relação aos parâmetros abióticos, e com nível de significância p<0,05.....	74
Tabela 14: Resultado da correlação de Spearman (r) relacionando as densidades de bactéria <i>E. coli</i> e <i>Enterococcus</i> spp. com a densidade de fungos filamentosos.....	76
Tabela 15: Porcentagem das espécies de <i>Enterococcus</i> spp. identificados pela técnica bioquímica. (n) quantidades de cepas analisadas .....	81

Tabela 16: Resultado da correlação de Spearman relacionando a densidade das bactérias <i>E. coli</i> e <i>Enterococcus</i> spp. e dos fungos filamentosos. ....	91
Tabela 17: Resultados do teste estatístico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p) entre as densidades da espécie <i>E. coli</i> e <i>Enterococcus</i> spp. em comparando os compartimentos água e areia na visão geral, no verão, no inverno e por ano 2015 e 2016. ....	92
Tabela 18: Valores resultantes da análise estatística Kruskal-Wallis (KW) comparando as densidades das <i>Candidas albicans</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>C. glabrata</i> encontrados na água e na areia, no geral, no verão, inverno, e por ano 2015 e 2016. Nível de significância de $p < 0,05$ . ....	93
Tabela 19: Densidade em média geométrica de <i>E. coli</i> e <i>Enterococcus</i> spp. da água (expressos em $\times 10^2$ UFC $100\text{mL}^{-1}$ ) nos anos de 2015 e 2016. Referências dos valores limites das legislações citados nas colunas da direita de bactérias estabelecidos pela legislação. ....	96
Tabela 20: Densidade em média geométrica de <i>E. coli</i> e <i>Enterococcus</i> spp. na água (expressos em $\times 10^2$ UFC $100\text{mL}^{-1}$ ) durante o período do verão e inverno, e separados por ano (2015-2016). Quantidade de amostras acima do valor estabelecido descrito em % entre parênteses. ....	98
Tabela 21: Densidade de <i>Candida</i> na água (expressos em $\times 10^2$ UFC $100\text{mL}^{-1}$ ) durante o verão e inverno no geral e nos anos estudados (2015 e 2016). ....	100
Tabela 22: Densidade em média geométrica de <i>E. coli</i> e <i>Enterococcus</i> spp. na areia (expressos em $\times 10^3$ UFC $100\text{g}^{-1}$ ) nos anos 2015 e 2016, e por período verão e inverno. ....	101
Tabela 23: Densidade em média geométrica do gênero <i>Candida</i> na areia (expressos em $\times 10^3$ UFC $100\text{g}^{-1}$ ), nos anos de 2015 e 2016 e por período do verão e inverno. ....	102
Tabela 24: Identificação molecular das cepas de fungos filamentosos isolados nas amostras coletadas na Baía do Araçá (identificação acima de 97%). ....	106
Tabela 25: Valores obtidos do Índice de Diversidade de Shannon-Wiener ( $H'$ ) e Riqueza do ambiente por Chao 1 das espécies de fungos filamentosos isolados da água e da areia, nos períodos do verão e do inverno. ....	112



## LISTA DE ABREVIATURAS

AC – Água Continental

ACAS – Água Central do Atlântico Sul

APHA - American Public Health Association

CCA – Análise de Correspondência Canônica

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

*E. coli* – *Escherichia coli*

Enteroc. – *Enterococcus* spp.

EU –European Union

GPS – Global System Position

ITS – Internal Transcribed Spacer

KW– Kruskal-Wallis

LSU – Large Subunit

NHMRC - National Health and Medical Research Council of Australia

OD - Oxigênio dissolvido

PCR – Polymerase Chain Reaction

Pfc – Propósito de formação de colônias

pH – Potencial Hidrogeniônico

pluvios. - pluviosidade

PDA – Potato Dextrose Agar

salin – Salinidade

SMA – Secretaria do Meio Ambiente

SMAC - Secretaria Municipal de Meio Ambiente

TEBAR – Terminal Petrolífero Almirante Barroso

Temp. - Temperatura

UFC (CFU) – Unidade Formadora de Colônia (Colony Forming Unit)

USEPA - United States Environmental Protection Agency

VMA - Valores Máximos Admissíveis

WHO - World Health Organization

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	17
2.	OBJETIVOS .....	19
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	20
3.1.	Ecossistema de praia .....	20
3.2.	Microrganismos na água e nas areias de praias .....	21
3.3.	Microrganismos indicadores de contaminação fecal .....	22
3.4.	<i>Escherichia coli</i> .....	23
3.5.	<i>Enterococcus spp.</i> .....	25
3.6.	Levedura do gênero <i>Candida sp.</i> .....	27
3.7.	Fungos filamentosos .....	28
3.8.	Legislação brasileira para corpos d'água .....	31
3.9.	Legislações internacionais estabelecidas para corpos hídricos .....	33
3.10.	Resolução para areias de praias .....	35
4.	ÁREA DE ESTUDO: A BAÍA DO ARAÇÁ .....	37
5.	MATERIAL E MÉTODOS .....	42
5.1.	Coletas e determinações dos parâmetros físico-químicos .....	42
5.2.	Processamento de Amostras .....	43
5.3.	Determinação das densidades de <i>Escherichia coli</i> .....	43
5.4.	Determinação da densidade de bactérias do grupo <i>Enterococcus sp.</i> .....	44
5.5.	Testes bioquímicos para diferenciação das espécies de <i>Enterococcus spp.</i> .....	46
5.6.	Determinação das densidades da leveduras e das espécies de <i>Candida sp.</i> .....	47
5.7.	Determinação de fungos filamentosos .....	47
5.8.	Identificação de fungos filamentosos .....	48
5.9.	Tratamento de dados e Análise Estatística .....	49
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	50
6.1.	Parâmetros Físico-Químicos .....	50
6.2.	Microbiota .....	54
6.2.1.	Água .....	54
6.2.1.1.	Bactérias indicadoras de contaminação fecal .....	54
6.2.1.2.	<i>Candida spp.</i> .....	65

<b>6.2.1.3. Fungos filamentosos .....</b>	<b>72</b>
<b>6.2.2. Sedimento .....</b>	<b>77</b>
<b>6.2.2.1. Bactérias indicadoras de contaminação fecal .....</b>	<b>77</b>
<b>6.2.2.2. <i>Candida</i> spp. ....</b>	<b>82</b>
<b>6.2.2.3. Fungos filamentosos .....</b>	<b>88</b>
<b>6.2.3. Comparação Água e Sedimento .....</b>	<b>91</b>
<b>6.3. Resultados Microbiológicos e a Legislação nos corpos d'água .....</b>	<b>95</b>
<b>6.4. Resultados Microbiológicos e a Legislação para areias de praias .....</b>	<b>100</b>
<b>6.5. Diversidade de fungos .....</b>	<b>102</b>
<b>7. CONCLUSÕES FINAIS .....</b>	<b>114</b>
<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>115</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Baía do Araçá localizado no litoral norte de São Paulo, por conter remanescentes de manguezal e abrigar alta diversidade biológica, é uma região de grande importância ambiental sujeita as diversas formas de intervenção antrópica, como ocupação populacional, dragagem, aterros, agricultura, poluição industrial e urbana (GUBITOSO et al., 2008; PLDS/Araçá, 2016). As comunidades desta região dependem, direta e indiretamente dos ecossistemas da Baía e dos ciclos biológicos que ali ocorrem, os quais, devido à proximidade da cidade de São Sebastião e do Porto de São Sebastião, acabam sendo impactados pelos efluentes gerados e lançados no ambiente, incluindo o despejo de esgotos domésticos (AMARAL et al., 2010).

O lançamento de efluentes domésticos parcialmente tratados ou sem tratamento, na Baía do Araçá, implica em risco à saúde da comunidade que utiliza essa água contaminada para recreação de contato primário ou para obtenção de alimentos (CERUTTI; BARBOSA, 1996).

Deste modo, é de fundamental importância para manutenção da saúde humana e ambiental, monitorar os efeitos das ações antrópicas a fim de manter a qualidade deste ambiente (GUBITOSO et al., 2008; AMARAL et al., 2010; PLDS/Araçá, 2016).

A determinação da densidade de microrganismos indicadores de contaminação de origem fecal tais como da bactéria *Escherichia coli* e as do grupo *Enterococcus* spp. nos diversos compartimentos da Baía, é fundamental para monitorar a qualidade do ambiente e da saúde da população tendo em vista que sua presença indica o risco da presença de outras bactérias e microrganismos patogênicos (BRASIL, 2005).

Atualmente as bactérias do gênero *Enterococcus* spp. são consideradas como melhor indicador de qualidade microbiológica para água e sedimentos provenientes de ambientes salinos e salobros devido à sua alta sua capacidade de sobrevivência em ambientes com presença de sal (CABELLI et al., 1983; BRASIL, 2000; WHO, 2003; BOEHM; SASSOUBRE, 2014).

Adicionalmente, os fungos presentes nos sedimentos marinhos e estuarinos, além de ter um importante papel na dinâmica da cadeia alimentar, na ciclagem de materiais e, também, na decomposição da matéria orgânica produzida pelos produtores primários ali presentes (HILL et al., 2000; ANDREOTE et al., 2012), podem, no caso de algumas

espécies de leveduras (*e.g. Candida spp.*), ser importantes indicadores da qualidade do ambiente. Existe uma grande diversidade de leveduras em ambientes aquáticos e, segundo HAGLER et al. (1995), boa parte destas tem origem a partir de ambientes terrestres incluindo os esgotos domésticos. De fato, as espécies de *Candida* têm sido observadas em ambientes que recebem grande quantidade de esgoto doméstico, tendo sido muitas vezes utilizadas como indicadoras de contaminação fecal, principalmente para sedimentos (MEDEIROS, 2002; PINHATA, 2007; PEREIRA et al., 2011; PINTO; OLIVEIRA, 2011).

Vários estudos demonstraram a correlação entre a ocorrência de leveduras em ambientes aquáticos e a presença de bactérias indicadoras de poluição fecal (ARVANITIDOU; KANELLOU; VAGIONA, 2005; HAGLER, 2006; PINHATA, 2007; PINTO; OLIVEIRA, 2011; OLIVEIRA, 2016) e, devido a isto, as leveduras tem sido utilizadas também como indicadoras de contaminação fecal para avaliação da qualidade das águas recreacionais (HAGLER, 2006), como um complemento às contagens de *E. coli* e *Enterococcus spp.*

Esta pesquisa está vinculada ao Projeto Biota Temático da FAPESP: Biodiversidade e Funcionamento de um Ecossistema Costeiro Subtropical que tem como objetivo entender o funcionamento da região costeira, sua dinâmica, sustentabilidade e diversidade, resultando em uma análise e descrição integrada da região.

## 2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo geral avaliar a qualidade microbiológica das águas e sedimentos da Baía do Araçá por meio da determinação das densidades das bactérias *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. e da presença de espécies de *Candida* spp. e sua relação com os parâmetros ambientais. Neste sentido, os objetivos específicos foram:

- Determinar as variações das densidades de bactérias indicadoras de contaminação fecal em águas e sedimentos da Baía do Araçá (São Sebastião/SP) e avaliar a qualidade microbiológica de acordo com as Legislações vigentes;
- Identificar as espécies de *Enterococcus* isoladas da água e do sedimento coletados da Baía do Araçá.
- Avaliar as densidades e diversidade de fungos filamentosos na água e no sedimento através de métodos morfofisiológicos e moleculares;
- Avaliar a relação entre as densidades de bactérias e de fungos;
- Estabelecer uma relação existente entre as variáveis físico-químicas (*e.g.* oxigênio dissolvido (OD), pH, temperatura e salinidade) e as densidades de *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. e *Candida* spp..

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Ecossistema de praia**

A costa brasileira abrange a porção tropical e subtropical do Atlântico Sul, e têm sido reconhecida como uma importante área de elevada diversidade de organismos aquáticos, representando uma das áreas prioritárias para conservação da biodiversidade do Oceano Atlântico (MMA, 2010; LONGO; AMADO FILHO, 2014). Dentre os ecossistemas que ocorrem na zona costeira estão os manguezais, recifes, dunas, restingas, praias, costões rochosos, lagoas, marismas e estuários (MMA, 2010).

Neste ambiente costeiro entremarés estão situadas as praias que são contíguas aos mares, oceanos, estuários e outros corpos hídricos (MMA, 2010). Diversos fatores interagem e determinam a dinâmica específica de cada praia, dentre eles a granulometria do sedimento, padrão de circulação, correntes e marés, inclinação da praia dentre outros (VELOSO; CARDOSO; FONSECA, 1997). O ambiente sofre influência das variações físico-químicas e biológicas, podendo ser classificado conforme a sua característica ambiental e abrigando vários ecossistemas dinâmicos e complexos, sendo muitas vezes difícil localizar e definir seus limites com precisão (MMA, 2010).

As praias são ambientes importantes ecologicamente pela riqueza biológica, intimamente ligado às características geomórficas no qual processos físico, químico e biológico afetam no depósito sedimentar, alterando a sua estrutura e textura (BOGGS, 1995), juntamente com a circulação hidrodinâmica (FURTADO, 1995).

A sedimentação do canal de São Sebastião está ligada à hidrodinâmica, sendo que na face continental ocorrem o depósito de materiais mais finos, enquanto no eixo do canal encontram sedimentos mal selecionados (FURTADO, 1995). Estes sedimentos constituem depósitos de areias acumuladas pelos agentes de transporte fluvial ou marinho, apresentando uma largura variável em função da maré (PRATES; GONÇALVES; ROSA, 2012).

Outro aspecto importante do ambiente de praias é a existência de um gradiente de estresse por temperatura e dessecação, no sentido perpendicular à linha d'água, isto é, quanto mais perto da água, mais rica e densa é a comunidade e quanto mais longe da água, mais variável é a temperatura e mais seco o ambiente (CETESB, 2007).

O litoral norte de São Paulo apresenta planície litorânea estreita, com inúmeras praias intercaladas por costões rochosos (LAMPARELLI et al., 1999), possuindo um total de 184 praias, a maioria com extensão inferior a 1 km (CETESB, 2017).

Encontra-se neste ambiente uma extensa atividade antrópica como turismo, esportes náuticos, navegação, pesca a maricultura entre outras atividades, que provocam sua deterioração causando impactos ao meio marinho (LAMPARELLI, 2006). Portanto, a qualidade das águas costeiras, principalmente das praias, são bastante influenciadas pelas condições de saneamento básico existentes nas cidades litorâneas, tornando-se bastante comum encontrar o aporte de esgotos domésticos em muitos locais (SATO et al., 2005).

A balneabilidade das águas das praias vêm sendo analisada e monitorada seguindo critérios estabelecidos, baseado nas densidades de indicadores microbiológicos para que possam identificar as suas condições de qualidade ambiental (BRASIL, 2000). A preocupação com a contaminação não só da água, mas das areias vêm aumentando ao longo dos anos devido à disposição inadequada de lixo, descarte de efluentes sem tratamento que são carregadas pela água da chuva para as praias (VALDEZ; GROSELLI, 2012; OLIVEIRA, 2016).

### **3.2. Microrganismos na água e nas areias de praias**

As bactérias podem ser encontradas nos mais variados tipos de ambientes terrestres e aquáticos, podendo ser em locais aparentemente inóspitos, como sob temperaturas elevadas ou em frio extremo (ZHANG et al., 2007).

As bactérias sendo de menor tamanho que os fungos, algas e protozoários, ocupam uma maior variedade de nichos e são fundamentais para o funcionamento destes ambientes, participando dos ciclos do carbono, ciclo do nitrogênio (ABRAHAM et al., 2004), servindo de alimento para organismos de maior tamanho participando de teias alimentares (THOMAZ, 1999; FENCHEL, 2008; ANDRADE, 2015) e como decompositores primários de matéria orgânica (LOKA-BHARATHI; OAK; CHANDRAMOHAN, 1991).

Estes ambientes aquáticos são utilizados para várias atividades e distintas finalidades, dentre elas o abastecimento de água, irrigação, recreação, navegação,



aquicultura entre outros (LÓPEZ-PILA; SZEWZYK, 2000; LEBARON et al., 2005). A contaminação desses ambientes ocorre principalmente pelo descarte de resíduos e efluentes liberados indiscriminadamente, favorecendo o aumento de microrganismos patogênicos na água, nas areias e nos animais aquáticos utilizados como alimento, o que pode acarretar doenças e prejudicar a saúde dos usuários e do ambiente (ALM; BURKE; SPAIN, 2003; ALERJ, 2006; ANDRAUS, 2006; OLIVEIRA; PINHATA, 2008; PINTO; OLIVEIRA, 2011; MELO, 2015; ZAMPIERI et al., 2017).

O sedimento marinho foi reconhecido como importante local para a atividade microbiana nas zonas costeiras (DANOVARO et al., 2000; MORENO et al., 2006), podendo apresentar uma rica diversidade microbiana, sendo 91% da biomassa compreendida por bactérias e fungos (ALONGI, 2002).

Maiores densidades e diversidades bacterianas ocorrem nos primeiros 3 a 5cm do sedimento pois, à medida que a profundidade do sedimento aumenta, diminui a concentração de oxigênio presente principalmente por causa da textura fina e da matéria orgânica presente (SHERMAN; FAHEY; HOWARTH, 1998). Apesar da granulometria influenciar na densidade microbiana, os sedimentos mais finos e arredondados dificultam a adesão dos microrganismos (OLIVEIRA et al., 2007). Zampieri (2015) relatou que nos sedimentos de granulometria fina e muito fina da Baía do Araçá houve grande quantidade de matéria orgânica e que este fator pode ter acarretado na elevada densidade microbiana encontrada.

Em relação à presença de fungos filamentosos no ambiente, estudos descrevem que estes microrganismos são importantes tanto nos sedimentos, incluindo aqueles de praias, quanto na água, pelo seu papel na decomposição da matéria orgânica detrítica de plantas e animais (CARLILE; WATKINSON; GOODAY, 2001; JONES et al., 2009)

### **3.3. Microrganismos indicadores de contaminação fecal**

A água é essencial para todo ser vivo e a necessidade por boa qualidade tem se acentuado devido ao aumento da poluição hídrica (CABRAL, 2010). Muitas cidades localizadas em zonas costeiras não dispõem de infraestrutura de saneamento básico adequada para acompanhar o crescimento da população e o conseqüente aumento da carga de efluentes orgânicos, que acabam sendo lançados *in natura* no ambiente

(MENDONÇA-HAGLER; VIEIRA; HAGLER, 2001; SATO et al., 2005; ROHDEN et al., 2009).

A água que recebe esgotos domésticos pode servir como veículo de diversos microrganismos, incluindo patógenos. A presença de tais microrganismos podem ocasionar tanto através da ingestão, quanto pelo contato direto durante atividades recreacionais, podendo ocasionar diversos tipos de doenças, desde as do trato gastrointestinal, até dermatites, otites (GERMANO; GERMANO, 2001; COSTA et al., 2003; ANA, 2014). Nas praias com alta incidência de contaminação fecal pode ser um risco para saúde somente o contato ou exposição com este ambiente, provocando diarreia, náusea e vômito (LAMPARELLI; SATO; BRUNI, 2003).

Deste modo, é evidente a necessidade de monitorar a qualidade microbiológica das águas e de outros compartimentos, tais como os sedimentos e os alimentos de origem marinha, de maneira a garantir a qualidade ambiental e a saúde dos que utilizam estes ambientes e/ou seus recursos (OLIVEIRA et al., 2007; PINHATA, 2007; REGO, 2010; PINTO; OLIVEIRA, 2011; MELO, 2015; OLIVEIRA, 2016; ZAMPIERI et al., 2017).

Tendo em vista a grande diversidade de patógenos que podem estar presentes em águas e sedimentos contaminados, a análise da presença de todos os microrganismos é inviável devido ao tempo e ao custo de tais análises. Sendo assim a qualidade microbiológica é determinada pela análise de bactérias indicadoras de contaminação fecal. Os indicadores mais comumente usados para avaliação da qualidade microbiológica de águas são as bactérias do gênero *Enterococcus* spp. e *E. coli*.

### **3.4. *Escherichia coli***

Bactéria bacilo Gram negativo, pertencente à família *Enterobacteriaceae* caracterizada pela atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase e  $\beta$ -glicuronidase, não esporulada, aeróbia facultativa, fermenta lactose e manitol com produção de ácido e gás. Em sua maioria movimenta-se por flagelos peritríquios, cresce em meio complexo a 44-45°C, e produz indol a partir do aminoácido triptofano (BRASIL, 2000; BRASIL, 2001; BRASIL, 2005).

As colônias de *E. coli* apresentam cerca de 1 a 3mm de diâmetro quando cultivadas em meios sólidos, podendo apresentar aspecto rugoso, grosseiro e com contornos

irregulares, ou aspecto liso com colônias lisas, convexas, brilhantes e com bordas regulares (MURATORI et al., 2000).

O gênero *Escherichia* compreende as espécies *E. coli*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris*, no entanto, a principal espécie de importância patogênica é a *E. coli* (CAMPOS; TRABULSI, 2002; BARNES et al., 2003; QUINN et al., 2005).

De acordo com Kaper e colaboradores (2004) esta espécie compreende grande número de grupos e tipos de sorotipos, sendo que a maioria faz parte da microbiota comensal do intestino dos seres humanos e outros animais homeotérmicos. No entanto certos sorotipos são patogênicos para o homem e para outros animais, não sendo considerados como integrantes da microbiota intestinal (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; KONEMAN et al., 2008; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Sua incidência tem sido relacionada com doenças do trato digestivo e infecções em casos de eventual desequilíbrio do seu habitat natural, que podem variar, desde formas benignas até formas que podem ser mortais, dependendo de fatores como o tipo de cepa patogênica, a susceptibilidade do paciente e o grau de exposição (BRASIL, 2004; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; KONEMAN et al., 2008).

Considerada a representante do grupo dos coliformes termotolerantes (bactérias com capacidade de crescer a temperatura de 44-45°C), a contagem de *E. coli* vem sendo extensivamente utilizada nos monitoramentos de qualidade microbiológica das águas. A resolução CONAMA nº 357 (BRASIL, 2005) afirma que a *E. coli* pode substituir o parâmetro de coliformes termotolerantes, por serem restritas ao trato intestinal de animais homeotérmicos. Diversos autores consideram este microrganismo como mais significativo que os coliformes totais para expressar poluição ambiental de origem fecal (LÓPEZ-PILA; SZEWZYK, 2000; ALM; BURKE; SPAIN, 2003; MELO, 2015).

As técnicas de detecção de *E. coli* são práticas e relativamente rápidas, com vários métodos disponíveis, dentre eles: tubos múltiplos, contagem em membranas filtrantes e utilização de substratos cromogênicos (EDBERG; ALLEN; SMITH, 1988; FRANCO; LANDGRAF, 2003; SOUZA; DANIEL, 2008).

No ambiente marinho, existem condições bem diferentes daquelas encontradas no trato gastrointestinal, que são estressantes à *E. coli*, sendo o principal deles a salinidade. Esta característica motiva a busca por novos indicadores de contaminação fecal para ambientes salinos e salobros (PINHATA, 2007; OLIVEIRA, 2016).

### 3.5. *Enterococcus* spp.

Este gênero compreende bactérias cocos Gram-positivos que ocorrem isolados, aos pares ou em pequenas cadeias. São anaeróbios facultativos, alguns são móveis e a temperatura ótima de crescimento é de  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  (FATTAL et al., 1987; BRASIL, 2000).

Os *Enterococcus* spp. são comensais e estão presentes no trato gastrointestinal (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012), constituindo uma pequena proporção da microbiota intestinal, cerca de menos de 1% (FINEGOLD; SUTTER; MATHISEN, 1983; SGHIR et al., 2000).

Dentre as 36 espécies descritas pertencentes ao gênero *Enterococcus* sp., *E. faecalis* é citada como a espécie dominante, seguida por *E. faecium*, *E. hirae*, *E. avium* e *E. durans* (RUOFF et al., 1990). Dentre essas espécies, *E. faecalis* e *E. faecium* estão presentes em fezes humanas (ANDRE et al., 2005).

Nas fezes de adultos saudáveis há elevadas concentrações de *E. faecalis*, enquanto que *E. faecium* é encontrado em menores concentrações (HAYDEN et al., 1993). Layton et al. (2010) cita em seu trabalho que apesar da concentração de *E. faecium* ser menor nas fezes humanas, sua presença foi detectada em 100% das amostras que analisou, enquanto *E. faecalis* esteve presente em somente 78%. Estas podem ser patogênicas quando encontrados fora do seu habitat natural, causando infecções urinárias e infecções em feridas (SCOTT et al., 2002; HENRIQUE, 2007), sendo *E. faecalis* responsável por aproximadamente quase 90% das infecções humanas, enquanto que *E. faecium* é responsável por apenas 5% das infecções enterocócicas (RUOFF, 1995; TAVARES, 2000).

Na década de 90, eram conhecidas aproximadamente 36 espécies de *Enterococcus* spp., sendo que 26 são associadas a infecções humanas (FACKLAM; COLLINS, 1989; RUOFF et al., 1990; GORDON et al., 1992). Atualmente são 54 espécies descritas (EUZÉBI, 2017), sendo a espécie *E. faecalis* considerada a patógena humana mais comum (MURRAY, 1990; NASER et al, 2005; CATTOIR; LECLERCQ, 2013), uma das mais isoladas em ambientes marinhos (BOEHM et al., 2002; KORAJKIC; BROWNELL; HARWOOD, 2011).

Até meados da década de 1990, *E. faecalis* representava 90-95% dos isolados clínicos e a infecção por *E. faecium* era rara (HUYCKE; SAHM; GILMORE, 1998).

Desde então, a proporção de isolados de *E. faecium* aumentou, em grande parte devido à disseminação de resistência a antibióticos, particularmente vancomicina e ampicilina (ARIAS; MURRAY, 2012; GILMORE; LEBRETON; VAN SCHAİK, 2013).

Dentre outras espécies associadas a infecções humanas podem ser citados *Enterococcus gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. avium*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. pseudoavium* e *E. raffinosus* (FACKLAM; COLLINS, 1989; GORDON et al., 1992; MELLMAN; SPISAK; BURAKOFF, 1992; VAN GOETHEM et al., 1994; DE BAERE et al., 2000).

Caracterizam-se pela alta tolerância às condições adversas ao seu crescimento, como a capacidade de sobreviverem na presença de 6,5% de cloreto de sódio (halotolerantes), em pH 9,6 e crescem em ampla faixa de temperatura (de 10° a 45°C) (BARTRAM; REES, 2000; BRASIL, 2000; FORSYTHE, 2002). Têm sido utilizadas como as indicadoras de contaminação fecal mais adequada para os ambientes marinhos e salobros (ANDREA et al., 2002; NOBLE et al., 2003; OLIVEIRA; PINHATA, 2008; OLIVEIRA, 2011; PINTO; ZAMPIERI et al., 2017).

Sendo assim, altas densidades de *Enterococcus* spp. em águas marinhas e salobras indicam a ocorrência de contaminação fecal, o que pode colocar em risco a saúde dos banhistas e de usuários de praias (CABELLI, 1983; OLIVEIRA; PINHATA, 2008; PINTO; OLIVEIRA, 2011; PINTO; PEREIRA; OLIVEIRA, 2012; ANDRADE, 2015; ZAMPIERI et al., 2017).

A Resolução CONAMA nº 274/2000 que dispõe sobre a qualidade das águas recreacionais, quando utilizado mais de um indicador microbiológico, as águas serão avaliadas de acordo com o critério mais restritivo. Os padrões referentes aos *Enterococcus* aplicam-se somente para as águas marinhas conforme legislação brasileira (BRASIL, 2000). Choi et al. (2003) verificaram que além de terem sobrevivido por mais tempo, *Enterococcus* spp. se apresentaram mais resistentes aos processos de tratamento de efluentes quando comparados a *E. coli*, havendo boa correlação destes microrganismos com a presença de outros microrganismos patogênicos.

### 3.6. Levedura do gênero *Candida* sp.

As leveduras *Candida* spp. pertencem à família *Cryptococcaceae*, apresentam formato oval com brotamento único, alguns podem aparecer como brotamentos alongados, formando pseudo-hifas (KURTZMAN; FELL, 1998; LEVINSON; JAWETZ, 2005; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). São predominantemente unicelulares, imóveis, na sua maioria saprófitos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Crescem na faixa de temperatura preferencialmente entre 18°C e 45°C (KURTZMAN; FELL, 1998). As leveduras são microrganismos encontrados tanto em ambientes aquáticos como terrestres, sendo em sua maioria saprófitas e algumas parasitas oportunistas (BRANDÃO et al., 2010).

Por serem facilmente cultivadas, estes microrganismos estão entre os eucariotas mais bem estudados em seus aspectos genéticos, fisio, morfo e tecnológicos. Estas leveduras vêm sendo amplamente estudadas em ambientes aquáticos, sendo a *Candida* sp. a mais comum (HAGLER et al., 1995; MORAIS et al., 1996; PEÇANHA et al., 1996; MEDEIROS, 2002; PINHATA, 2007; PINTO; OLIVEIRA, 2011).

Hagler e Ahearn (1987) descreveram que a contagem das leveduras em lagos poluídos foram maiores em relação aos não poluídos, destacando uma correlação entre os níveis de poluição orgânica e a população de leveduras. Foi observada uma grande diversidade de leveduras em todos os estágios de tratamento de esgoto (COOKE; MATSUURA, 1963; COOKE, 1965).

As leveduras do gênero *Candida* podem ser encontradas em vários ambientes, como a água e solo, alimentos e na microbiota natural do trato gastrointestinal de homens e animais (YANONG, 2003; KUTTY; PHILIP, 2008; BRILHANTE et al., 2011;), e podem comportar-se como um patógeno oportunista (HAGLER; AHEARN, 1987). A contaminação microbiológica por bactérias e *Candida albicans* nos ambientes é provocada por efluentes domésticos lançados sem tratamento (BRANDÃO et al., 2010).

Existem pelo menos 20 espécies de *Candida* spp. capazes de provocar doença em humanos (CDC, 2017). Leveduras como *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. glabrata*, muitas vezes isoladas de ambientes aquáticos, têm sido frequentemente relatadas como agentes etiológicos da candidíase (BRANDÃO et al.,

2010). Odds (1988) relata como isolada do trato gastrointestinal humano as espécies: *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*.

A espécie *Candida albicans* se destaca dentre as outras leveduras (CALDERONE, 2002; SAMARANAYAKE et al., 2002; SILVA et al., 2012; BONDARYK; KURZATKOWSKI; STANISZEWSKA, 2013), sendo frequentemente isolada em infecções (LIM et al., 2012; SILVA et al., 2012; BONDARYK; KURZATKOWSKI; STANISZEWSKA, 2013; SARANYA et al., 2014). Este gênero também foi identificado como causador de fungemia nosocomial entre os hospedeiros imunocomprometidos e imunodeprimidos (MAGANTI, 2011).

Devido a incidência de micoses e infecções bacterianas contraídas por pessoas frequentadores das praias e que utilizam suas areias como local de recreação, as autoridades públicas e pesquisadores tem se preocupado com a contaminação destas areias (CABELLI et al., 1983; MENDES; NASCIMENTO; OLIVEIRA, 1993; PEREIRA et al., 2011; PINHATA, 2007). Existe um consenso mundial a respeito das areias das praias serem indicados como uma fonte de potencial de contaminação por patógenos (MENDES; NASCIMENTO; OLIVEIRA, 1993; PAPADAKIS et al., 1997).

### **3.7. Fungos filamentosos**

Os fungos filamentosos constituem um grupo de organismos eucarióticos, heterotróficos, imóveis, multicelular que se reproduzem sexualmente e assexuadamente via esporos (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; BLACKWELL; SPATOFORA, 2004; MARGULIS; CHAPMAN, 2009; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012), sendo a maioria terrestre, mas encontrados também em ambiente aquático (MARGULIS; CHAPMAN, 2009).

Estes organismos desempenham um papel importante nas vias de decomposição da matéria orgânica presente no ecossistema (JONES et al., 2009). A diversidade de espécies fúngicas no mundo varia de acordo com a localidade (latitude, longitude e altitude) e com a profundidade (no caso de ecossistemas aquáticos) e ressalta-se a tendência de encontrar maior diversidade nos trópicos (SHEARER et al., 2007). Gutiérrez et al. (2010) descreveram a distribuição vertical da biomassa fúngica no ecossistema

marinho, resultando alta diversidade biológica nas camadas superficiais do sedimento marinho.

Os fungos filamentosos formam massas visíveis chamadas de micélios (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012), que se estabelece e torna-se capaz de crescimento e persistência ilimitados (ZAK; WILLIG, 2004). Os micélios são constituídos por longos filamentos (hifas), septados ou não, que se ramificam e permanecem interconectados, tornando possível a comunicação intercelular e o sustento dos esporos reprodutivos (CARLILE; WATKINSON; GOODAY, 2001; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012) (Figura 1A).

A sobrevivência da micobiota, sua diversidade e sua composição no ambiente aquático podem ser influenciadas por fatores abióticos como a temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido (OD), disponibilidade e diversidade de substratos (JAITLY; RAI, 1982; JAITLY, 1987; TUCCI; MENDES, 2006; RAGHUKUMAR, 2008) além da granulometria do sedimento (ROITMAN; TRAVASSOS; AZEVEDO, 1991). A comunidade fúngica é influenciada pelas variáveis abióticas, tais como pH, oxigênio dissolvido (OD), fosfatos totais dissolvidos (HAGLER et al., 1986; FUJITA; KOMEMUSHI; YAMAGATA, 1987; ROSA et al., 1995; MORAIS et al., 1996), elevada temperatura e umidade (SHEARER et al., 2007). A maioria dos fungos é aeróbia ou microaerófilas, embora algumas espécies mostrem um metabolismo anaeróbio limitado e poucos são capazes de crescimento totalmente sem oxigênio (TABAK; COOKE, 1968; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Os fungos mais frequentemente isolados nas praias são do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* (LARRONDO; CALVO, 1989; PAPADAKIS et al., 1997; OLIVEIRA et al. 2011; GOMES et al., 2008). As espécies de fungos do gênero *Aspergillus* apresentam características microscópicas como as hifas septadas, conidióforos não ramificados e célula podal de base. Conidióforo alargado e arredondado no topo, formando uma vesícula volumosa coberta de fiálides e destas fiálides, cadeias de conídios de formação basipétala (RAPER; FENNELL, 1977; KLICH, 2002; HOUBRAKEN; DEVRIES; SAMSON, 2014) (Figura 1B). Os fungos do gênero *Penicillium* apresenta hifas septadas com conidióforos que podem ser ramificados ou não, possuindo métula (estrutura secundária do conidióforo), que suporta a fiálide e esta apoia cadeias ramificadas de



conídios arredondados de formação basipétala (PITT, 1985; HOUBRAKEN; DEVRIES; SAMSON, 2014) (Figura 1C).

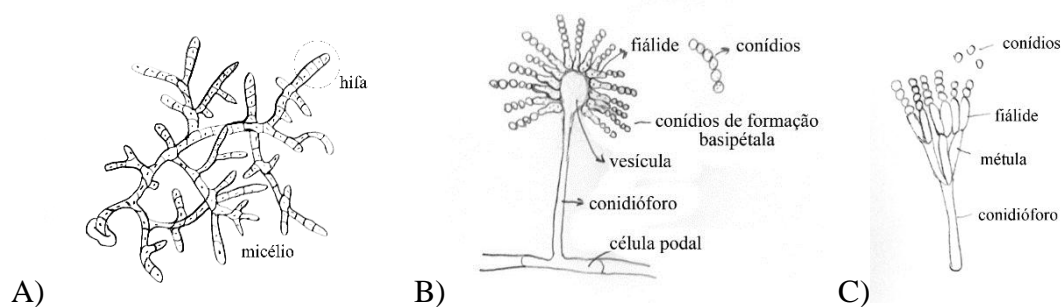


Figura 1: Algumas estruturas dos fungos filamentosos observados microscopicamente.

Estes microrganismos geralmente são adaptados a condições adversas, portanto, possuem capacidade de sobreviver em diversos ambientes e em diversos substratos, como água, solo, vegetal e em materiais orgânicos em decomposição (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Mendes et al. (1998) pesquisaram presença de fungos em areias úmidas e secas de 12 praias de Lisboa e Vale do Tejo (Portugal) e descrevem que a presença e os níveis de fungos podem ter relação direta e indireta de resíduos/detritos trazidos pela maré ou deixados por banhistas. A presença de fungos nas águas e areias das praias foram citados por Ghinsberg et al., (1994) e Maier et al., (2003), em que citam a importância do monitoramento da qualidade da água e da areia, por ser uma possível fonte de contágio destes microrganismos.

Segundo Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003), têm sido encontrados frequentemente no ambiente como saprófitas e podem atuar como patógenos oportunistas, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Espécies patogênicas foram detectadas vindas principalmente de áreas poluídas (WALSH et al., 2004).

Os fungos são encontrados em todos os ambientes, produzindo diversos tipos de enzimas, crescendo sobre os mais diversos substratos e até em condições ambientais extremas (RICKLEFS, 2003). Alguns fungos são produtores de enzimas com potencial para degradação de vários substratos, sendo isolados de diversos ambientes e os gêneros mais frequentes são *Penicillium* e *Verticillium*, além de *Aspergillus* que é responsável pela assimilação de hidrocarbonetos (ATLAS, 1981), degradando poluentes da água e do

solo para formas menos prejudiciais ao ambiente (VIDALI, 2001; NOVOTNY et al., 2004; PASSOS et al., 2009).

### **3.8. Legislação brasileira para corpos d'água**

No Brasil existem leis específicas para avaliação e monitoramento da qualidade dos mais diversos tipos de água. Diretamente relacionadas a este trabalho estão a Resolução CONAMA 357 de março de 2005 que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e a Resolução CONAMA 274 de novembro de 2000 que define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras.

A CONAMA nº357 de 2005 considera que a classificação das águas em doces, salobras e salinas é essencial à defesa dos níveis de qualidade das mesmas, os quais devem ser avaliados por variáveis físico-químicas e microbiológicas sendo que alguns destes podem ser específicos para cada tipo de água e também variam de acordo com uso a que se destinam. Nesta resolução estão definidos os variáveis e os índices de qualidade para os diversos tipos de águas e seus usos, de forma a assegurar as condições necessárias ao uso seguro dos corpos de água pelos seres vivos (BRASIL, 2005).

De acordo com a resolução foram adotadas as definições de água doce para água com salinidade abaixo a 0,5; água salobra para águas com salinidade superior a 0,5 e inferior a 30 e águas salinas para salinidade acima de 30. As águas salobras, são classificadas em classes de 1 a 3 e especial, sendo a classe especial destinada à preservação dos ambientes aquáticos em unidades de conservação de proteção integral (BRASIL, 2005).

A Classe 1 abrange as águas destinadas à recreação de contato primário, proteção de comunidades aquáticas, a aquicultura e atividade de pesca, ao abastecimento para o consumo humano após o tratamento convencional ou avançado e à irrigação. Os limites e parâmetros estabelecidos para a qualidade da água desta classe são: carbono orgânico total até 3 mg/L; oxigênio dissolvido não inferior a 5 mg/L O<sub>2</sub>; pH entre 6,5 a 8,5; óleos e graxas, materiais flutuantes, substâncias que produzem cor, odor e turbidez, resíduos sólidos objetáveis, todos virtualmente ausentes.

Os limites para as densidades de bactérias indicadoras de contaminação fecal, *E. coli* e *Enterococcus* sp, variam conforme a destinação da água e estas são calculadas através da média geométrica. No caso do seu uso para recreação de contato primário, a Legislação pertinente deixa de ser a CONAMA 357/2005 e passa a ser a CONAMA 274/2000, que define os padrões para avaliação da balneabilidade das águas. Para os demais usos, os limites e parâmetros são os estabelecidos pela Resolução CONAMA 357 como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1: Descrição das classificações da qualidade da água salobra em relação à presença de *E. coli* na legislação brasileira CONAMA 375/2005. Valores expressos em UFC 100 mL<sup>-1</sup> (BRASIL, 2005).

	PRÓPRIA	classificação	<i>E. coli</i>
Água salobra	classe 1 para uso recreativo (CONAMA 274/2000)	excelente	máximo de 200
		muito boa	máximo de 400
		satisfatória	máximo de 800
	classe 1 para uso geral		máximo de 1.000
	classe 2		máximo de 2.500
	classe 3		máximo de 4.000

Para Classe 2, destinada à pesca amadora e recreação de contato secundário, os parâmetros e limites (que diferem da Classe 1) são OD não inferior a 4 mg/L de O<sub>2</sub> e a média geométrica de *E. coli* até 2.500 UFC (Unidade Formadora de Colônia) por 100mL (Tabela 1) em 80% ou mais de pelo menos 6 amostras coletadas durante o período de um ano, com frequência bimestral.

Para as águas destinadas à navegação e harmonia paisagística (Classe 3), o pH deve ser entre 5 a 9; OD não inferior a 3 mg/L O<sub>2</sub>; e a densidade de *E. coli* não deverá exceder um limite de 4.000 UFC por 100 mL (Tabela 1) em 80% ou mais de pelo menos 6 amostras coletadas.

A Resolução 274/2000 considera as densidades das médias geométricas não somente de *E. coli* como também a densidade de *Enterococcus* sp., como parâmetros para avaliação da qualidade das águas. A Tabela 2 mostra os limites dos valores de referência que classificam a água analisada como imprópria ou própria para uso em atividades de

lazer de contato primário (BRASIL, 2000). Para classificação das águas como impróprias para atividades de contato primário, pode ser adotado também o critério em que se a última amostragem resultar em valor superior a 2.000 de *E. coli* ou 400 de *Enterococcus* sp. por 100 mL da amostra (BRASIL, 2000).

Tabela 2: Descrição das classificações da qualidade da água em relação a presença de *E. coli* e *Enterococcus* sp. na legislação brasileira segundo CONAMA 274. Valores expressos em UFC 100 mL<sup>-1</sup> (BRASIL, 2000).

		<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i> sp
PRÓPRIA	Excelente	máximo de 200 em 80% ou mais amostras	máximo de 25 em 80% ou mais amostras
	Muito boa	máximo de 400 em 80% ou mais amostras	máximo de 50 em 80% ou mais amostras
	Satisfatória	máximo de 800 em 80% ou mais amostras	máximo de 100 em 80% ou mais amostras
IMPRÓPRIA		superior a 800 em mais de 20% do amostras maior que 2000 na última amostra	superior a 100 em mais de 20% do amostras maior que 400 na última amostra

Cabe ressaltar que a Resolução CONAMA 357/2005 classifica os corpos d'águas analisando parâmetros físico-químicos e microbiológicos, como a presença de cianobactérias e *E. coli*, mas não menciona o uso de leveduras e de bactérias do gênero *Enterococcus* sp. como indicadores. Em relação às leveduras, o mesmo ocorre na Resolução CONAMA 274, a qual não menciona estes microrganismos como possível indicador de qualidade. Quando for utilizado mais de um indicador microbiológico, as águas terão as suas condições avaliadas, de acordo com o critério mais restritivo.

### 3.9. Legislações internacionais estabelecidas para corpos hídricos

Cada país possui políticas e diretrizes com valores estabelecidos de organismos indicadores fecais em águas marinhas costeiras e de transição. A Tabela 3 apresenta alguns parâmetros utilizados por outros países em relação às densidades de *E. coli* e *Enterococcus spp.* para uso recreacional, calculadas através da média geométrica.

No caso da União Europeia, o Decreto-lei n.º 135 de 3 de junho de 2009 estabelece o regime jurídico de identificação, gestão, monitorização e classificação da qualidade das águas balneares e da prestação de informação ao público sobre as mesmas. Este decreto se aplica às águas balneares superficiais, que podem ser interiores, costeiras ou de transição (EU, 2006). O limite estabelecido para *E. coli* em águas costeiras e de transição é de 500 UFC 100 mL<sup>-1</sup> (com base de avaliação em que 90% das amostras sejam inferior ao limite estabelecido) para águas serem de qualidade satisfatória, enquanto que para a bactéria *Enterococcus spp.* o valor máximo é de 185 UFC 100 mL<sup>-1</sup> (EU, 2006) (Tabela 3).

Tabela 3: Limites das densidades de indicadores de contaminação fecal em águas marinhas recreacionais, estabelecidos por outros países ou organizações. Valores expressos em UFC 100 mL<sup>-1</sup>.

Legislação/ País	Decreto-Lei n.º 135/09. UE (águas costeiras e transição)	Decreto-Lei n.º 135/09. UE (águas costeiras e transição)	WHO*	Australia	Health Canada	Health Canada
<b>CATEGORIA/ organismo</b>	<i>E. coli</i>	<i>Enteroc.**</i>	<i>Enteroc.</i> Intestinal	<i>Enteroc.</i> Intestinal	<i>E. coli</i>	<i>Enteroc.**</i>
<b>PRÓPRIA</b>	Excelente (base de avaliação de 95%)	250	100	≤40	≤40	
	Muito Boa (base de avaliação de 95%)	500	200	200	200	
	Satisfatória (base de avaliação de 90%)	500	185	500	500	200 175
<b>IMPRÓPRIA</b> (base de avaliação de 95%)			>500	>500		
<b>Referência</b>	EU (2006)	EU (2006)	WHO (2003)	NHMRC (2008)	Health Canada (2012)	Health Canada (2012)

\*WHO - World Health Organization, \*\*Enteroc. – *Enterococcus spp.*

As novas diretrizes da Organização Mundial da Saúde (“World Health Organization” - WHO) para ambientes de águas destinadas ao uso recreacional, manifestam preocupação com o estado atual da contaminação dos ambientes costeiros e de água doce utilizados para recreação de contato primário e seus efeitos na saúde dos frequentadores (WHO, 2003). Esta diretriz aborda a contaminação fecal, estabelece valores da densidade de *Enterococcus sp.* superiores a 500 UFC 100mL<sup>-1</sup> como restritivos

devido à possibilidade de haver um risco significativo de altos níveis de transmissão de doença (WHO, 2003) (Tabela 3).

O “National Health and Medical Research Council of Australia” (NHMRC) adota os mesmos valores de referência para águas recreacionais marinhas, recomendados e descritos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003; NHMRC, 2008) (Tabela 3).

Em relação aos microrganismos indicadores de contaminação fecal, as bactérias do grupo *Enterococcus* sp. são utilizadas como indicador padrão para avaliação da qualidade das águas recreacionais marinhas em diversos países, incluindo o Brasil (BRASIL, 2000; NHMRC, 2008; USEPA, 2012; WHO, 2003).

A legislação canadense e a européia adotaram os *Enterococcus* sp. e a *E. coli* para avaliação da qualidade de águas recreacionais, estabelecendo para a *E. coli* média geométrica com valores máximos de 200 UFC 100mL<sup>-1</sup> e de 900 UFC 100mL<sup>-1</sup> de um percentil de 90% de pelo menos 8 amostras coletadas durante o período de maior frequência de banhistas (HEALTH CANADA, 2012) (Tabela 3).

Além das legislações citadas anteriormente, nos Estados Unidos é utilizado o regulamento de United States Environmental Protection Agency (USEPA), que recomenda o uso do grupo *Enterococcus* sp. como indicador de contaminação fecal para águas marinhas e enfatiza que a sua presença em determinadas densidades está associada ao aumento do risco de contrair doenças gastrointestinais e respiratórias. A taxa estimada da ocorrência de doença gastrointestinal foi de 36 doentes por 1000 banhistas, sendo 130 UFC 100 mL<sup>-1</sup> o valor limiar estatístico (USEPA, 2012).

### **3.10. Resolução para areias de praias**

Fato a ser destacado é que, até o momento, não existem parâmetros ou normas brasileiras adotadas para a avaliação e a determinação da qualidade microbiológica dos sedimentos de ambiente marinho, incluindo as areias de praias. Alguns países e localidades têm estabelecido padronizações para qualidade microbiológica das areias de praias, para determinar a balneabilidade tanto da água como da areia, conforme apresentado na Tabela 4.

No caso do Brasil, a Resolução CONAMA nº 274/2000 embora expresse preocupação em relação à qualidade dessas areias, recomendando em seu artigo 8º, a

avaliação das condições parasitológicas e microbiológicas das areias das praias, não foram determinados parâmetros e limites para tal avaliação.

Existe a resolução nacional utilizada no Rio de Janeiro utilizando outro método de contagem das bactérias, não sendo plausível utilizar em trabalhos com resultados expressos em UFC (Unidade Formadora de Colônia). A prefeitura do Rio de Janeiro estabeleceu na Resolução SMAC (Secretaria Municipal de Meio Ambiente) n° 468 de 2010, limites máximos utilizando somente a unidade de expressão NMP (números mais prováveis) para determinar a densidade de *E. coli*, sendo assim, classificar as areias para recreações de contato primário, não recomendando o contato com areias nas quais tenham sido detectadas concentrações superiores a 3.800 NMP de *E. coli* por 100g de areia (SMAC, 2010).

Mendes e colaboradores (1993) descreveram a preocupação com a qualidade microbiológica da água e também da areia das praias e propôs um critério para controle microbiológico das areias, analisando *E. coli* e *Candida* sp (Tabela 4). Associação Bandeira Azul (ABAE, 2011) de Portugal também propôs monitorização da qualidade das areias das zonas balneares utilizando como parâmetro bacteriológico indicadores os enterococos intestinais e *E. coli*. Foram adotados os Valores Máximos Admissíveis (VMA) em que classifica a qualidade da areia como boa ou imprópria, utilizando a unidade propósito de formação de colônias por grama (pfc g<sup>-1</sup>), descritos na Tabela 4.

Tabela 4: Proposta de padrões para avaliação da qualidade microbiológica das areias.

País	Referência	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Candida</i> spp.
Portugal (UFC 100g <sup>-1</sup> )*	Mendes, Nascimento, Oliveira, 1993	1.000		10 <sup>3</sup>
Portugal (PFC g <sup>-1</sup> )**	Associação Bandeira Azul (ABAE), 2011	20	20	

\*UFC: unidades formadoras de colônias; \*\* PFC: propósito de formação de colônias (Portugal).

#### 4. ÁREA DE ESTUDO: A BAÍA DO ARAÇÁ

A Baía do Araçá localiza-se na porção central do município de São Sebastião (entre as latitudes 23°48'S e 23°49'S e longitude 45°24'W aproximadamente), no litoral norte do estado de São Paulo (Figura 2), próxima aos bairros Varadouro, Topolandia e Centro. Faz parte da Área de Proteção Ambiental Municipal de Alcatrazes (Lei Municipal nº 848/1992), da Área de Proteção Ambiental Marinha do Litoral Norte (Decreto Estadual nº 53.525/2008) (PLDS/Araçá, 2016). Mantém um dos últimos remanescentes de manguezal do litoral de São Sebastião abrigando alta diversidade biológica além de serreduto de pescadores artesanais (AMARAL et al., 2010; PLDS/Araçá, 2016).

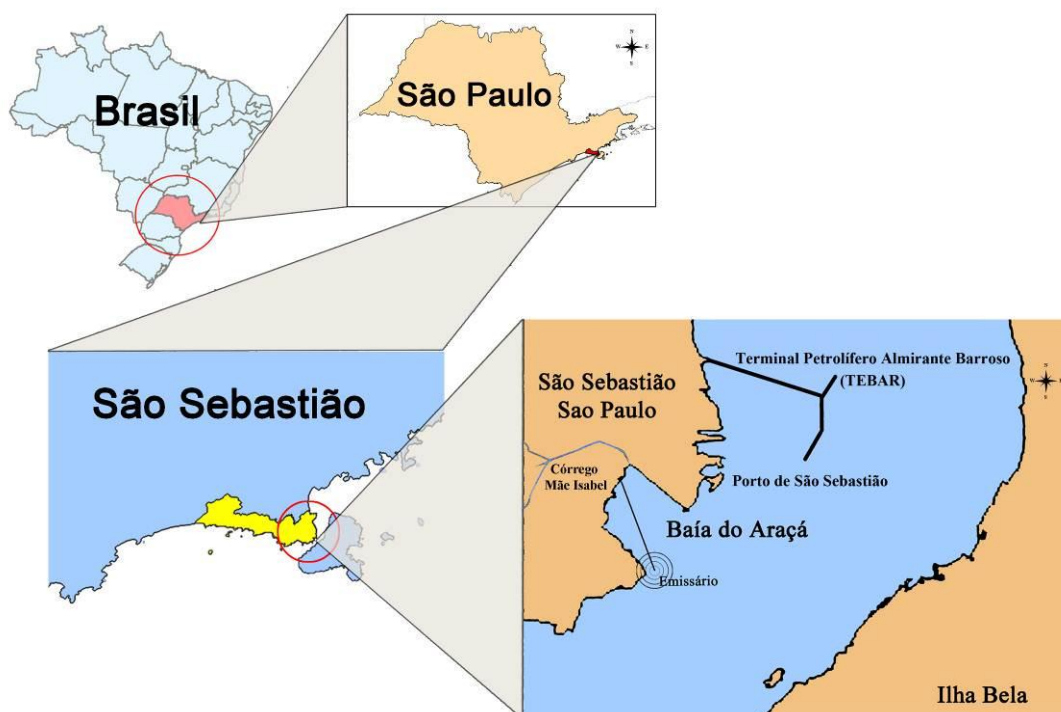


Figura 2: Mapa da localização da Baía do Araçá, indicando o Porto de São Sebastião, o Terminal Petrolífero Almirante Barroso (TEBAR), o emissário submarino e o Córrego Mãe Isabel (adaptado de AMARAL; MORGADO, 1994; AMARAL et al., 2015).

Esta é uma região considerada protegida devido a sua configuração fisiográfica, apresentando uma enseada limitada por flancos rochosos, manguezais e por uma extensa planície de fundo mole (sedimento areno-lamoso), com sua hidrodinâmica baixa sendo dominada pelas marés, pela ação de ondas de baixa amplitude e protegida contra a ação



direta de correntes e fluxos de água que ocorrem no Canal de São Sebastião (AMARAL et al., 2010; LITTO et al., 2016).

A Baía do Araçá contém o último testemunho existente preservado das áreas de manguezal entre Bertioga e Ubatuba (AMARAL et al., 2010), sendo composta por quatro praias: Deodato, Pernambuco, Germano e Topo (Figura 4), duas ilhotas (Pernambuco e Pedroso) e três núcleos principais de bosques de mangue (AMARAL et al., 2010; ANDRADE, 2015; ZAMPIERI, 2015) (Figura 3). Próximos às praias Pernambuco e Deodato estão localizados os bancos arenosos com bosque de mangue e uma faixa entremarés mais larga e plana do que o encontrado perto do Porto, incluindo duas ilhas, a Ilha de Pernambuco e a Ilha Pedroso, apresentando maior heterogeneidade ambiental (AMARAL et al., 2010 apud Denadai, 2001). Entre a praia do Deodato e do Germano também contém uma parte do núcleo do manguezal. Na praia do Topo é uma região mais estreita e inclinada em relação às outras praias (AMARAL et al., 2010 apud Denadai, 2001).

A Baía compreende um espaço relativamente pequeno quando comparado com outras baías brasileiras, com área interna de cerca de 550.000m<sup>2</sup> (AMARAL et al., 2010). Considerado hábitat de peixes e crustáceos, os quais são capturados por pescadores artesanais que utilizam pequenas canoas caiçaras (AMARAL et al., 2010; VAZ-DOS-SANTOS; GRIS, 2016). Além de possuir uma beleza cênica, com águas calmas (Figura 4B) e que favorecem a prática de atividades de lazer e recreação (XAVIER; STORI; TURRA, 2016). Na maré baixa, a Baía expõe o sedimento areno-lamoso, vegetação e materiais antes submersos na maré alta (Figura 4C ao G).

Em 2007 a estimativa populacional de São Sebastião foi de 67.348 habitantes, apresentando um aumento de 25% em 2016, com 84.294 habitantes no município, sendo que somente 36% da população urbana tem acesso à rede de esgotos e destes, apenas 55% do esgoto é tratado (CETESB, 2017). É importante salientar que esta região vem sofrendo constantes alterações influenciadas pela ação antrópica, principalmente relacionadas ao desenvolvimento urbano de grandes obras e empreendimentos, ocasionando intenso crescimento populacional e ocupações irregulares (PLDS/Araçá, 2016).

Dentre estas obras estão a ampliação do Porto de São Sebastião, nas décadas de 70 e 80, que levou ao aterro de parte da Baía do Araçá (AMARAL et al., 2010; PLDS/Araçá, 2016), a instalação de uma dragagem para o Emissário Submarino, na

década de 1990 (GUBITOSO et al., 2008; TEODORO; DULEBA; GUBITOSO, 2011; PLDS/Araçá, 2016) e a construção do Terminal Petrolífero Almirante Barroso da Petrobras (TEBAR) (Figura 4A), que já foi considerado um dos maiores terminais petrolíferos do Brasil, operado pela Companhia Petróleo Brasileiro S.A. (PETROBRAS) (AMARAL et al., 2010). O TEBAR possui tanques para armazenamento de petróleo e derivados, um píer de atracação de navios (GUBITOSO, 2010) e um emissário submarino de efluentes industriais (CETESB, 2007) (Figura 2).

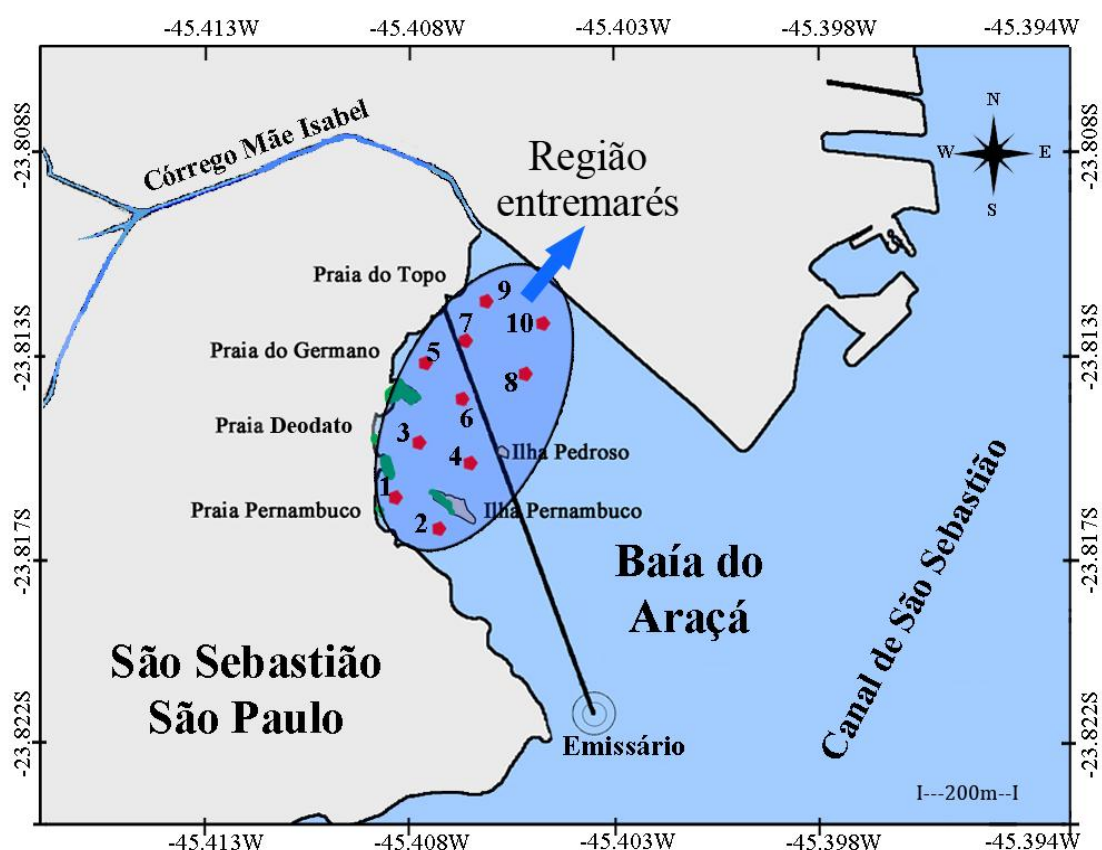


Figura 3: Mapa da região da Baía do Araçá mostrando a localização do Emissário Submarino (adaptado de CETESB, 2007), do Córrego Mãe Isabel, destaque da mancha verde para os bosques de manguezal (adaptado de AMARAL et al., 2015), e dos pontos de coleta destacados com pontos vermelhos na região entremarés.

Próximo à Baía do Araçá, existe uma estação de pré-condicionamento de esgotos (EPC), o EPC Itatinga, juntamente onde o esgoto passa por tratamento antes de ser liberado pelo emissário do Araçá (CETESB, 2007 e 2017). Esta EPC tem sua eficiência comprometida em períodos chuvosos devido à falta de rede de drenagem adequada que

atenda à região. Devido a isto, em período chuvosos, os resíduos da drenagem são lançados na rede de estotos e também carreados para a EPC o que acaba comprometendo o tratamento (CETESB, 2007).

O emissário submarino implantado e operado pela SABESP desde 1991, na profundidade de 8 m e comprimento aproximado de 100 m (CETESB, 2007), transporta e lança no canal de São Sebastião quase todo esgoto doméstico da cidade (GUBITOSO, 2010). Estes efluentes são previamente levados para estações de pré-condicionamento, onde passam por: gradeamento para remoção de sólidos grossos, peneiramento para remoção de sólidos finos e por deareanadores (MARCELINO, 2000), e posteriormente são desinfectados por cloração, antes de serem lançados nas águas costeiras. Como apenas parte do esgoto é tratado, esta região ainda apresenta áreas contaminadas por esgotos domésticos, o que aumenta a concentração de carbono orgânico e de matéria orgânica em decomposição podendo levar à formação de zonas anóxicas (GUBITOSO et al., 2008).

A principal fonte de água doce à Baía do Araçá vem do Córrego Mãe Isabel, que nasce a aproximadamente 300m de altitude, desaguando na Baía, próximo ao aterro atual do Porto de São Sebastião (Figura 3). Este córrego sofre influência do aporte de esgotos domésticos por ter seu caminho incorporado na drenagem urbana dos bairros de Olaria e Topolândia, o que ocasiona seu transbordo em épocas de chuvas fortes. Devido a alguns fatores, como o assoreamento, os esgotos sanitários domésticos carreados pelo córrego e a elevação da concentração de matéria orgânica, agravou-se o problema de eutrofização das águas na Baía (IBAMA, 2009).

O crescimento populacional desordenado está associado à falta de saneamento adequado (Figura 4H), ocasionando uma aceleração da descaracterização do ambiente com lixo e entulho depositado nas margens da Baía (Figura 4L) (AMARAL et al., 2010; AMARAL et al., 2015; PLDS/Araçá, 2016), desmatamento e descargas ilegais de esgoto (Figura 4I ao K) provocando impactos ambientais nesta Baía e levando riscos à saúde da população.

A Baía do Araçá apresenta uma diversidade de ecossistemas, incluindo costões rochosos, praias e manguezais, e também uma grande diversidade de organismos, que utilizam o local para reprodução, alimentação e desenvolvimento, como os mariscos, camarões, caranguejos, peixes entre outros organismos (AMARAL et al., 2010 e 2015; PLDS/Araçá, 2016; XAVIER; STORI; TURRA, 2016).

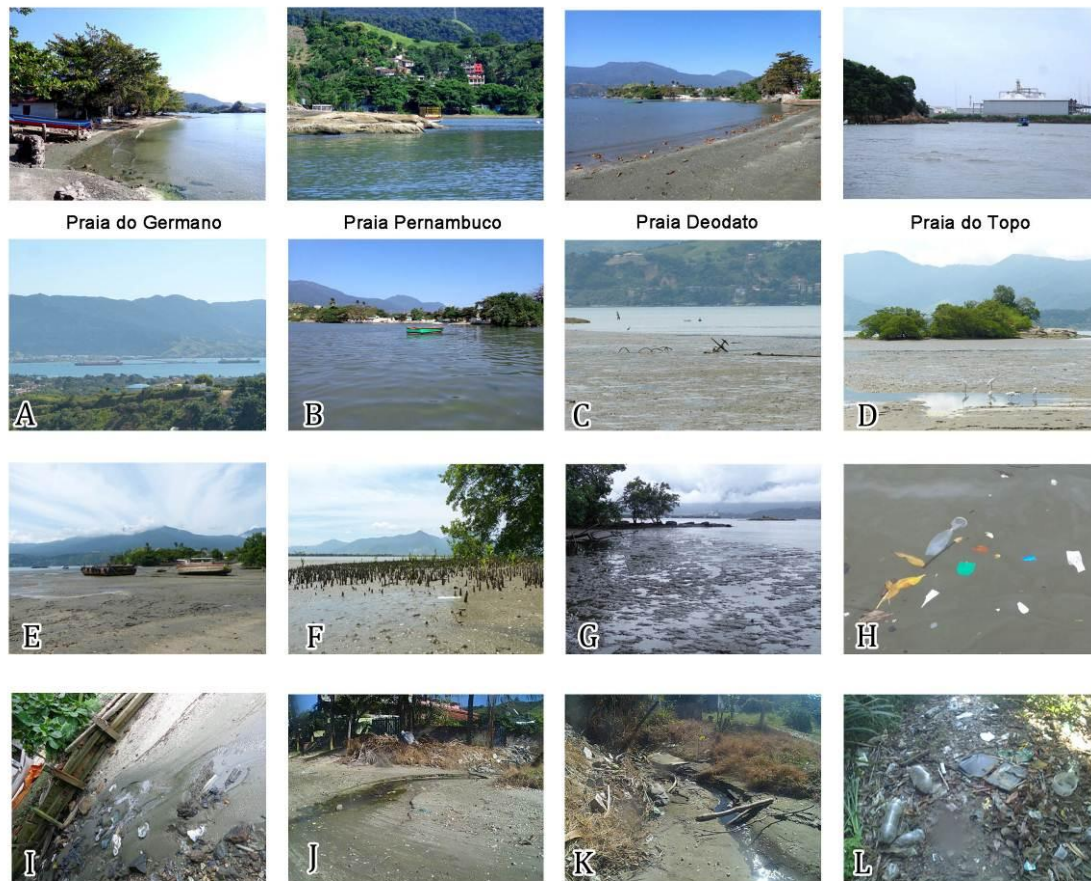


Figura 4: Praias que fazem parte da Baía do Araçá (Praia do Germano, Praia Pernambuco, Praia Deodato e Praia do Topo). A) Vista panorâmica do TEBAR. B) Vista da beleza e águas calmas da Baía do Araçá. C) ao G) Vista geral da região entremarés na maré baixa, expondo o sedimento e os materiais submersos. H) ao L) descarga de efluente não tratado e resíduos sólidos (lixo) encontrados ao longo da Baía.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Coletas e determinações dos parâmetros físico-químicos

Foram realizadas 8 coletas durante os anos de 2015 e 2016, em 10 pontos de monitoramento na região de entremarés, a fim de obter-se uma homogeneidade amostral da Baía do Araçá (Figura 3). Em cada ano foram realizadas duas coletas na estação de verão (janeiro e fevereiro) e duas na de inverno (junho e julho). Os pontos de coleta foram definidos por um estudo prévio realizado pelo Projeto Temático Biota Fapesp-Araçá e as coordenadas verificadas com aparelho GPS (Marca: Garmim, modelo: MONTANA 650).

Os parâmetros físico-químicos temperatura (°C), salinidade, pH e oxigênio dissolvido (OD) foram mensurados no local de coleta, com o uso de uma Sonda Multiparâmetro (Horiba U-50). Para a realização das medidas *in situ*, a sonda foi submersa e posicionada próxima ao sedimento de fundo.

Os dados pluviométricos foram obtidos através dos dados meteorológicos coletados pelo Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo em São Sebastião (CEBIMAR, 2017) sendo adotado como parâmetro o volume de chuva acumulado em milímetros nos cinco dias antecedentes a data da coleta.

As amostras de água foram coletadas no estofa da maré alta, na isóbata de 1 (um) metro, conforme normas descritas na Legislação brasileira, a Resolução CONAMA 357 (BRASIL, 2005), utilizando frascos estéreis com capacidade aproximada de 300mL, contendo 0,2 µL de EDTA para neutralizar a presença de elementos traço e 0,2 µL de tiosulfato de sódio (3%) para neutralizar o cloro (BRASIL, 2005). As amostras foram mantidas sob refrigeração até o processamento no Laboratório de Microbiologia Marinha (Micromar) localizado na UNESP – São Vicente, SP.

Os sedimentos de fundo foram coletados manualmente, sem o uso de equipamentos específicos, utilizando sacos de plástico inertes e estéreis como luvas, nos mesmos pontos correspondentes as coletas de água, sendo coletada apenas a camada superficial dos mesmos (máximo 1cm de profundidade). Após coletado o sedimento foi acondicionado nos próprios sacos que serviram de luvas, os quais foram fechados, numerados e armazenados sob-refrigeração em caixa térmica, até o seu processamento no no Laboratório de Microbiologia Marinha (Micromar) (UNESP/CLP).

## 5.2. Processamento de Amostras

Para a determinação da densidade dos microrganismos nas amostras de água e de areia, foi utilizada a Técnica de Membrana Filtrante (APHA, 2017), usando membranas Milipore de 0,45 µm de porosidade e meios de cultura específicos conforme descrito abaixo. Foram filtrados volumes de 25 mL, 10 mL e 1 mL de amostra de água.

Para as amostras de sedimento, foram pesadas alíquotas de 20g de sedimento, as quais foram acondicionadas em Erlenmeyers estéreis e acrescidas de água deionizada estéril. As amostras foram submetidas ao processo de agitação (agitador tipo vórtex), por dez minutos, para a remoção dos microrganismos aderidos aos grãos de areia. Depois deixadas em repouso para assentar o sedimento antes do processamento e utilizados somente o sobrenadante para as análises (OLIVEIRA; PINHATA, 2008; ANDRADE, 2015; ZAMPIERI, 2015). Para determinar a densidade dos microrganismos nas amostras de sedimento, através da Técnica de Membrana Filtrante (APHA, 2017), realizou-se a filtração de volumes de 10 mL, 5 mL e 1 mL do sobrenadante.

Os resultados das densidades bacterianas foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias por 100ml (UFC 100mL<sup>1</sup>) para a água e em Unidades Formadoras de Colônias por 100g (UFC 100g<sup>-1</sup>) para o sedimento.

## 5.3. Determinação das densidades de *Escherichia coli*

Para determinação das densidades de *E. coli*, foi utilizado como meio de cultura o Ágar mTec (Marca: Acumedia), os quais após receberem as membranas com o filtrado, foram incubados na estufa a 35±2°C por 2 horas e posteriormente incubados em banho-maria por 22h a 44,5°C. Após o período de incubação, as colônias amarelas, crescidas sobre a membrana (Figura 5A), foram submetidas ao teste confirmativo para *E. coli* com uso do substrato de Ureia. Foram consideradas *E. coli* as colônias que mantiveram a coloração amarela por não terem a capacidade de hidrolisar a ureia (Figura 5B).



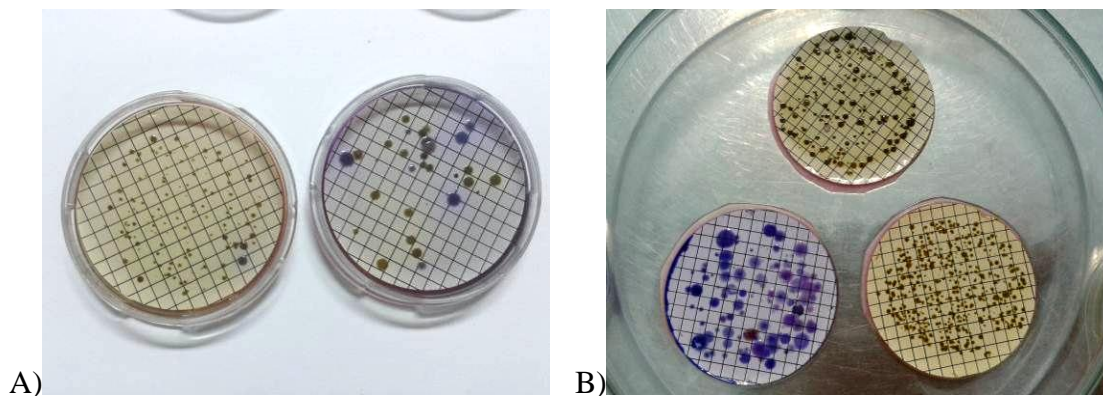


Figura 5: A) Placas de mTec com crescimento de colônias após 22 horas de incubação em banho maria. B) Colônias ao teste confirmativo com o substrato de Uréia.

Também foi realizada a coloração de Gram com cepas isoladas e purificadas para observação das características morfológicas da bactéria, confirmando sua forma (bacilo flagelados), arranjo e reação a Coloração de Gram (gram-negativa) (Figura 6).

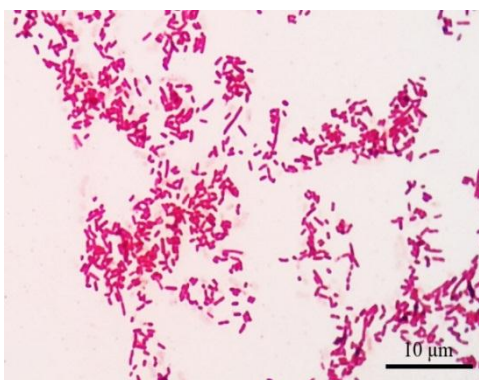


Figura 6: Morfologia e resultado da reação de Gram de cepas isoladas. Bactérias em forma de bacilo, gram-negativas, visualizadas ao microscópio ótico em objetiva de 100x.

#### 5.4. Determinação da densidade de bactérias do grupo *Enterococcus* sp.

Para a determinação das densidades de *Enterococcus* sp. foi utilizado o meio de cultura Ágar mEnterococcus (Marca: BD). As amostras foram incubadas a 37°C por 24/48 horas. Após o período de incubação, foram contadas como *Enterococcus* spp. as colônias de coloração vermelho-marrom (Figura 7A). Colônias aleatórias foram selecionadas, isoladas e purificadas para realização de testes posteriores. Para a confirmação do gênero *Enterococcus* sp., foi realizado o teste com caldo Enterococcosel (BBL Enterococcosel caldo, Marca: BD). As colônias selecionadas foram transferidas

para os tubos com meio de cultura e incubadas a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 2 a 24h. As bactérias do grupo *Enterococcus* sp. hidrolisam a esculina para produzir esculetina, a qual reage com citrato de amônio férrico para formar uma coloração marrom escuro a preto. Foram considerados positivos os tubos que apresentaram enegrecimento do meio (Figura 7B).

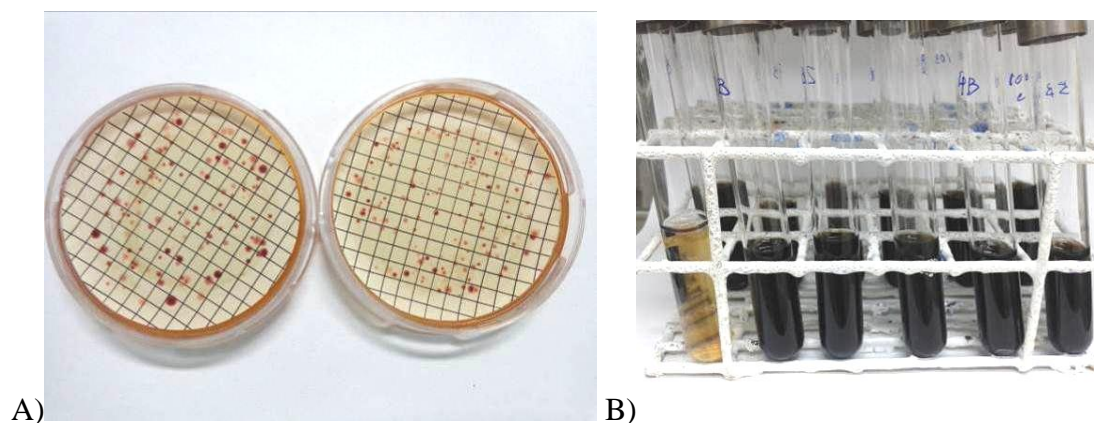


Figura 7: A) Crescimento das colônias em meio mEnterococos após 48 horas de incubação a  $37^{\circ}\text{C}$ . B) Tubos considerados positivos no teste confirmativo.

Também foi realizada a coloração de Gram para algumas cepas selecionadas, afim de observar-se características morfológicas da bactéria, confirmando sua forma (cocos) e reação positiva a coloração (Gram-positivas) (Figura 8).

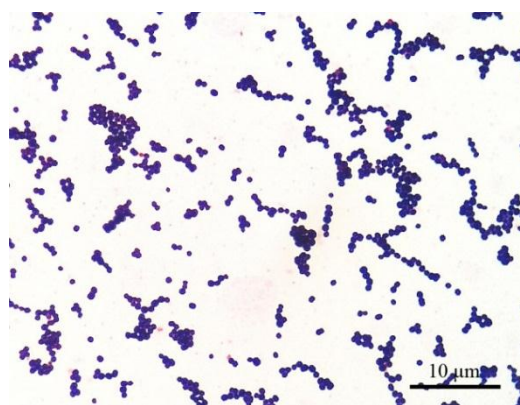


Figura 8: Morfologia e resultado da reação de Gram de cepas de *Enterococcus* spp. isoladas. Bactérias em forma de cocos, gram-positivas, visualizadas ao microscópio ótico em objetiva de 100x.



### 5.5. Testes bioquímicos para diferenciação das espécies de *Enterococcus* spp.

As colônias isoladas que foram confirmadas como pertencentes ao grupo dos *Enterococcus* sp, foram testadas com uso do kit de identificação Enterokit (Marca: Probac) para diferenciar as espécies presentes através das suas características bioquímicas (descritos por FACKLAM; COLLINS, 1989) (Figura 9A). O kit abrange o teste de fermentação de carboidratos (Arabinose, Manitol, Sorbitol), motilidade, produção de pigmentação amarela, descarboxilação da arginina e produção de catalase (MURRAY et al., 2007) (Figura 9B).

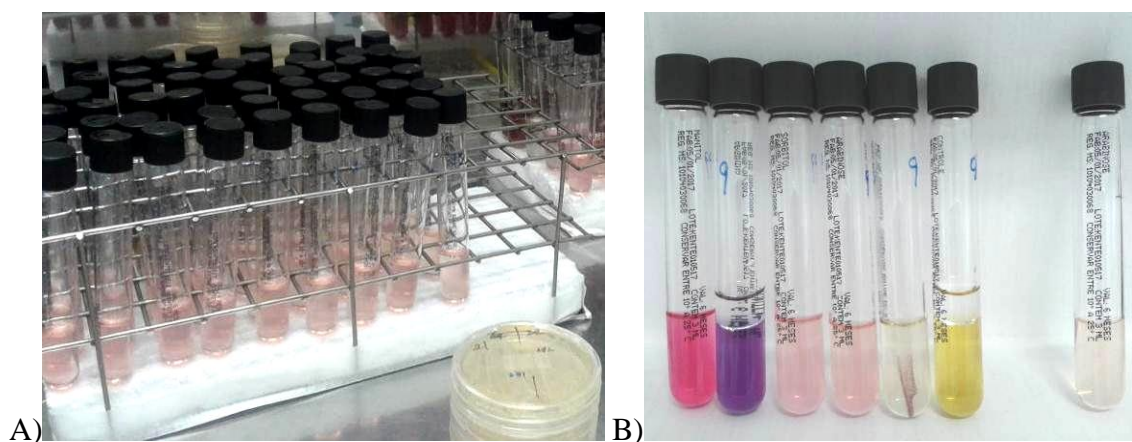


Figura 9: A) Tubos de ensaio do Entero Kit contendo substratos para os testes bioquímicos, realizados com as colônias isoladas B) Tubos mostrando os resultados dos testes bioquímicos.

Segundo Facklam e colaboradores (2002), as espécies podem ser divididas em 5 grupos com base na formação de ácido em manitol, sorbo de sorbose e hidrólise da Arginina (FACKLAM; CARVALHO; TEIXEIRA, 2002).

Grupo I consiste de espécies que inclui *E. avium* e *E. canis*; Grupo II inclui as espécies *E. faecalis* e *E. faecium*; Grupo III inclui espécies *E. durans*, *E. hirae* e *E. rotai*; Grupo IV inclui *E. aquamarinus* e *E. plantarum*; O Grupo V inclui *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* (FACKLAM; CARVALHO; TEIXEIRA, 2002). Outras provas bioquímicas são adicionadas para diferenciação das espécies do mesmo grupo, como *E. faecalis* com *E. faecium*, como o teste da Arabinose e motilidade.

### 5.6. Determinação das densidades da leveduras e das espécies de *Candida* sp.

Em relação a levedura do gênero *Candida*, a determinação de suas densidades também foi feita pela Técnica de Membrana Filtrante utilizando como meio de cultura o cromogênico HiChrome (marca HiMedia), incubado a  $35\pm 2^\circ\text{C}$  a 40-48h. Além da determinação das densidades, o uso de um meio seletivo e diferencial como este permitiu a diferenciação de algumas espécies do gênero através da coloração e da morfologia das colônias (*Candida albicans* – colônias circulares, lisas de cor verde/azul clara), *Candida tropicalis* (colônias circulares arroxeadas), *Candida glabrata* (colônias circulares de coloração branca) e *Candida krusei* (colônias circulares com estrias, rosado, com centro mais escuro) (Figura 10).

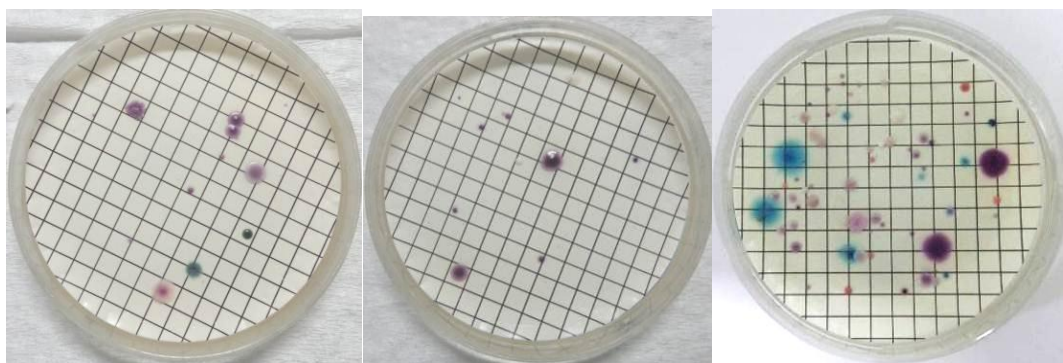


Figura 10: Crescimento das colônias de *Candida* spp., nas placas com meio de cultura Agar HiChrome.

### 5.7. Determinação de fungos filamentosos

Para determinação quantitativa e qualitativa da presença de fungos filamentosos na água e no sedimento da Baía do Araçá, foram utilizadas apenas 4 campanhas amostrais (duas no inverno de 2015 e duas no verão de 2016). A análise das densidades dos fungos foram relacionadas com os parâmetros ambientais do período da coleta. As amostras de sedimento foram processadas da mesma maneira que para determinação das densidades das bactérias citada anteriormente.

Amostras de água e sedimento foram inoculadas (500 $\mu\text{L}$ ) através da Técnica de *Spread Plate* em placas com meio Potato Dextrose Agar (PDA) acrescido do antibiótico Cloranfenicol (200  $\mu\text{g}$ ). As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 7 a 14 dias. Após o período de incubação as placas foram analisadas quanto ao crescimento de

colônias de fungos filamentosos (Figura 11). Também foram realizadas as contagens totais das colônias dos fungos filamentosos (APHA, 2017) e calculadas suas densidades expressas Unidades Formadoras de Colônias por 100mL para água (UFC 100mL<sup>-1</sup>) e UFC por 100g (UFC 100g<sup>-1</sup>) para sedimento.

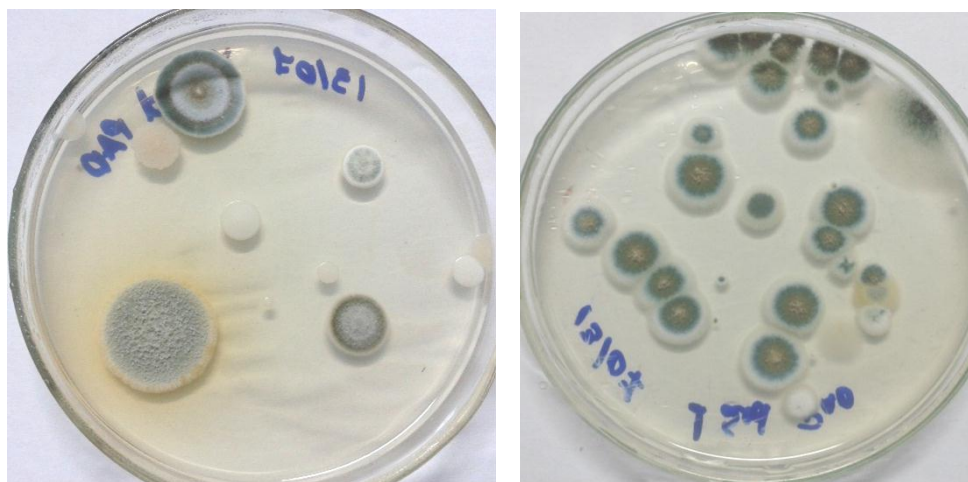


Figura 11: Colônias de fungos filamentosos em placas com meio PDA acrescido de cloranfenicol após 10 dias de incubação à temperatura ambiente.

### 5.8. Identificação de fungos filamentosos

A partir das placas com crescimento dos fungos filamentosos foram isoladas colônias que apresentaram diferentes características macromorfológicas (cor, diâmetro e aspecto da colônia) e micromorfológicas (microestruturas), para determinação dos gêneros dos fungos seguiu-se as descrições em Alexopoulos, Mims e Blackwell (1996), Houbraken, deVries e Samson (2014) e Talaiekhosani e Ponraj (2015). As lâminas para observação foram preparadas utilizando o corante Azul de Metileno e especial atenção foi dada à observação das estruturas, formato, disposição e formação dos esporos.

De acordo com as características microscópicas observadas, foram realizados 3 agrupamentos das estruturas fisiológicas, sendo estes determinados pela presença de vesícula no conidióforo, ausência de vesícula e formato diferencial do conídio. A partir destes agrupamentos, foram selecionadas as 20 cepas com variações morfofisiológicas mais marcantes e estas foram submetidas à identificação molecular no Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS) do Instituto de Biociências da UNESP/Rio Claro.

As cepas selecionadas foram reinoculadas em meio PDA acrescido de 0,2 µg de cloranfenicol e incubadas a 25°C por 5 a 7 dias, para posterior identificação molecular.

O DNA genômico foi extraído a partir do micélio cultivado em meio PDA, seguindo a versão modificada do Método da Técnica de Extração com o uso de Brometo de Cetil-Trimetil Amônio - CTAB (Cationic hexadecyl trimethyl ammonium bromide) (GERARDO et al., 2004).

O DNA extraído foi amplificado utilizando dois primers diferentes para análise filogenética (LSU e ITS) (MÖLLER et al., 1992). O primer LSU seguiu a sequência: 2 min de denaturação a 95°C, 40 ciclos de 95°C/30s; 62°C/60s; 72°C/90s e 5min de extensão à 72°C (AUGUSTIN et al., 2013). O primer ITS seguiu a sequência: 96°C por 3 min e 35 ciclos de 94°C/1min, 55°C/1min, 72°C/2min e passo de extensão final 72°C/10min (WHITE et al., 1990).

Os produtos da PCR foram limpos com Kit Wizard SV Gel e PCR Clean-up System (Promega), as reações do ciclo de sequenciamento foram realizadas usando *BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies), e as sequências foram geradas usando ABI3500 (Life Technologies). Os contigs foram montados em Bioedit v.7.1.3 (HALL et al., 1999) e consultados no GenBank do NCBI para comparação.

## 5.9. Tratamento de dados e Análise Estatística

Para a análise estatística dos resultados obtidos foi utilizado o programa Past (Paleontological STatistics) versão 2.16c (HAMMER et al., 2001).

Primeiramente foi realizado o teste estatístico Shapiro-Wilk que mostrou que a distribuição dos dados não se ajustou à normalidade ( $p < 0,05$ ). Foi aplicado então o teste de normalidade não paramétrico de Kruskal-Wallis (KW,  $p < 0,05$ ) para comparar entre as médias de contaminação medidas pelas densidades dos diferentes microrganismos indicadores avaliados, dos parâmetros ambientais e da sazonalidade.

A existência de correlação entre os parâmetros ambientais e densidades de bactérias e leveduras foram avaliadas pela Correlação Linear de Spearman, seguindo classificação (modificado) conforme Cabral et al. (2006).

A Análise de Correspondência Canônica foi aplicada para relacionar o conjunto dos parâmetros ambientais com as densidades de microrganismos. Este é um método de

ordenação que ordena os pontos de acordo com os eixos, e prevê possíveis gradientes ambientais (HAMMER et al., 2001).

Para determinar a diversidade fúngica foi utilizado o índice baseado na abundancia relativa das espécies, o Índice de Shannon (MAGURRAN, 1988) e utilizado o estimador de riquezas Chao1 (COLWELL; CODDINGTON, 1994).

## **6. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **6.1. Parâmetros Físico-Químicos**

A região entremarés da Baía do Araçá é utilizada como área de recreação, lazer e navegação. Segundo Resolução CONAMA nº 357 de 2005, a qualidade da água ambiental é classificada pelo seu uso, no qual para as águas salobras a salinidade mantém-se inferior a 30,0 e acima de 0,5, com condições de OD não inferior a 5,0 mg L<sup>-1</sup>, pH entre 6,5 a 8,5 para recreação para classificar como sendo da categoria “própria”.

Os valores do oxigênio dissolvido (OD) apresentaram uma variação de 4,2 a 6,9 (Tabela 5) com uma média geral de 5,7 e maior no inverno de 2016, com 6,0 (Tabela 5). Apesar de alguns pontos das coletas apresentarem OD com valores menores que 5,0 mg L<sup>-1</sup>, observou-se que a média de cada coleta se mostraram ideais para águas recreacionais, segundo CONAMA 357 (BRASIL, 2005).

O OD é um dos principais parâmetros ambientais para controlar o nível de poluição das águas, sendo fundamental manter e verificar as condições aeróbias na água que recebe aporte de material poluidor (BAUMGARTEM; POZZA, 2001) e poderá ter consequências negativas para o ecossistema, afetando os organismos aquáticos e a cadeia trófica (MACÊDO et al., 2000). Sant’Anna e Whately (1981) cita grande flutuação de OD, assim sendo possível encontrar grandes variações deste parâmetro, como encontrado em trabalhos de Boehs et al. (2008) e Grisi e Gorlach-Lira (2010). De acordo com Vanucci (1999) as marés são responsáveis pela manutenção de nutrientes e matéria orgânica nos sedimentos além de promover a aeração do substrato.

A biota marinha encontrada na Baía do Araçá sofreu impactos pela ação antrópica como a construção de aterros e a descarga de efluentes domésticos através do emissário, córrego e fontes difusas, provocando assoreamento natural e eutrofização das águas da Baía (IBAMA, 2009). Apesar de a Baía apresentar problemas de eutrofização decorrente

da decomposição da matéria orgânica, diminuindo os teores de oxigênio, neste estudo o teor de oxigênio dissolvido na água mensurada foi superior a 4,0 mg L<sup>-1</sup> em toda amostragem, indicando valores adequados de OD na água para uso recreacionais em todos os períodos estudados, conforme a legislação vigente.

Tabela 5: Valores das **variáveis abióticas** obtidas da Baía do Araçá: Geral, verão e inverno.

variáveis abióticas	Geral		Verão		Inverno	
	min - max	x ± s	min - max	x ± s	min - max	x ± s
*Temp. (°C)	19,8 - 33,6	25,7 ± 0,4	24,3 - 33,6	29,3 ± 0,4	19,8 - 25,7	22,9 ± 0,2
pH	7,2 - 8,5	7,9 ± 0,02	7,3 - 8,5	7,9 ± 0,04	7,2 - 8,2	7,9 ± 0,02
salinidade	20,6 - 28,8	26,0 ± 0,2	20,6 - 28,8	25,4 ± 0,3	23,7 - 28,4	26,6 ± 0,2
**OD (mg L <sup>-1</sup> )	4,2 - 6,9	5,7 ± 0,1	4,2 - 6,6	5,5 ± 0,1	4,8 - 6,9	5,9 ± 0,1
pluviosidade (mm)	0 - 42		21 - 42		0 - 2	

\*Temp. - Temperatura (°C), \*\*OD - oxigênio dissolvido (mg L<sup>-1</sup>). Onde: min – valor mínimo, max – valor máximo, x – média, s – erro padrão.

Segundo Secretaria do Meio Ambiente (SMA, 1997), o litoral norte apresenta um clima local quente e úmido, devido à proximidade com o oceano, influenciado pelas dinâmicas atmosféricas locais e à geomorfologia, registra temperatura média do ar entre 17°C em julho a 25,9°C em fevereiro, com precipitação pluviométrica anual variando de 1.300 a 4.700mm. Matsuura (1986) cita que a distribuição e variação sazonal das massas de águas presentes na região de São Sebastião e Ubatuba são possivelmente típicas da plataforma continental sudeste, fato que pode ser atribuído à pequena variabilidade espacial na distribuição da salinidade e temperatura entre Cabo Frio (RJ) e cabo de Santa Marta Grande (SC).

Conforme Belúcio (1995) o clima da região de São Sebastião é quente e úmido, com precipitação pluvial máxima registrado em dezembro (2.000mm) que corresponderia ao mês de verão, e o mínimo registrado em agosto (79mm), correspondente ao inverno. Para este trabalho observou-se valores baixos de pluviosidade nas coletas realizadas no verão de 2015, registrando valores de 21mm, no verão de 2016, com acúmulo de 42mm (dos cinco dias que antecederam a coleta). No inverno de 2015 quase não foi registrada a pluviosidade, com somente 2mm de chuva acumulada.

Na figura 12 estão representados as variáveis abióticas coletadas no verão e no inverno nos anos de 2015 e 2016. OD (Figura 12D) e pH (Figura 12E) mantiveram estáveis ao longo do período, observa-se uma pequena queda de OD no verão de 2016 com aumento da pluviosidade e temperatura. A temperatura apresentou uma queda gradativa no período da coleta enquanto na salinidade observou-se o inverso com um leve aumento.

Analisando a temperatura da água neste trabalho, verificou-se que os dados obtidos no verão de 2015 apresentaram a média mais elevada em relação aos outros períodos (31,0°C), seguido de menores temperaturas nas coletas seguintes (Figura 12A). A temperatura manteve-se acima de 19°C em todos os períodos das coletas (no verão e no inverno), sendo que a maior temperatura mensurada foi de 33,6 °C no verão de 2015 e a mínima de 19,8 °C no inverno de 2016 (Figura 12A).

As águas do Canal de São Sebastião são formadas principalmente pela Água Costeira (AC), com temperatura média acima de 24°C e salinidade menor que 34,5, com eventos de intrusão durante a primavera e verão da Água Central do Atlântico Sul (ACAS), apresentando temperaturas menores de 20°C e salinidade acima de 35,4 (CASTRO et al., 2008; DOTTORI et al., 2015). As misturas das águas entre o canal e o interior da Baía decorrem das correntes geradas pelas marés e pela ação do vento (DOTTORI et al., 2015).

Pucci (2016) descreve em seu trabalho que registrou maiores médias de salinidade (34,1) e temperatura (27,7°C) no verão em comparação ao inverno (33,1 e 22,2°C, respectivamente), provavelmente pelas amostras serem da proximidade do Canal de São Sebastião. Neste trabalho, a salinidade foi mais baixa no verão, não ultrapassando de 30 e a temperatura foi maior, com média de 29,3°C, indicando águas mais quentes e menos salinas, provavelmente influenciadas pela descarga de água doce do córrego e proximidade com a praia (declive suave e rasa na região entremaré).

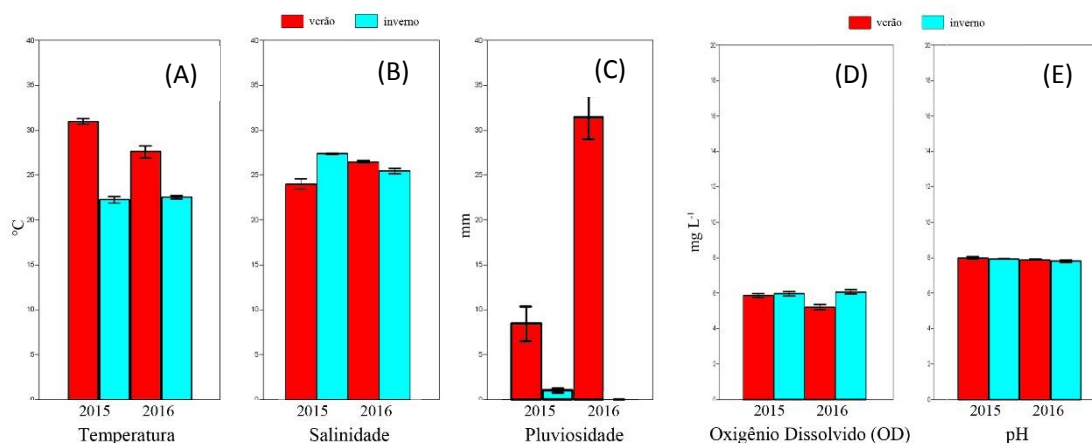


Figura 12: Variáveis abióticas obtidas da região entremarés da Baía do Araçá analisados por ano e período de coleta, sendo: (A) Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), (B) salinidade, (C) pluviosidade (mm), (D) oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ ) e (E) pH.

O valor do pH quase não apresentou variação ao longo do período de estudo mantendo-se na média de 7,9 no geral e nas duas estações do ano (Figura 12E). A água manteve-se levemente alcalina, com valores acima de 7,8 ao longo de todas as coletas (Figura 12E). O pH da água é um índice importante por influenciar nos processos químicos e biológicos, podendo indicar espécies químicas, e ou toxicidade de metais (DALLAS; DAY, 2004). Gubitoso (2010) analisou a variável pH nas proximidades do emissário do Araçá e descreve que os valores apresentaram-se homogêneos e semelhantes aos de ambientes marinhos não poluídos, que foram entre 6,5 e 8,5, mas considerados ácidos. A acidificação provocada pela ação antrópica é resultado de diferentes tipos de poluição, como efluentes de produtos químicos, drenagem de minas e poluição do ar que resulta em precipitação ácida (VAN WYK, 2012).

A salinidade média foi de 26,0, sendo a mais elevada no período de inverno de 2015, com média de 27,6, mantendo-se acima de 20,0 em todas as coletas, com mínima de 20,6 e máxima de 28,8 no verão de 2015 (Figura 12B). As águas podem portanto ser classificadas como água salobra, segundo CONAMA 357 (BRASIL, 2005).

Observou-se que o acúmulo da pluviosidade foi maior no verão em relação ao inverno (Figura 12C), e apesar da quantidade de chuva registrados na estação do verão e descarga de água doce pelo Córrego Mãe Isabel, não foram observadas diminuições ou grande variação da salinidade nos períodos da coleta.



## 6.2. Microbiota

### 6.2.1. Água

#### 6.2.1.1. Bactérias indicadoras de contaminação fecal

Diversos estudos foram realizados com relação à qualidade sanitária de praias e ecossistemas aquáticos litorâneos com o objetivo de avaliar a qualidade microbiológica, analisando a água em relação à contaminação por bactérias fecais e outros microrganismos potencialmente patogênicos que podem oferecer riscos à saúde humana e organismos aquáticos.

O tipo mais comum de poluição encontrado no litoral de todo estado de São Paulo é pela contaminação da água por efluentes domésticos (PINHATA, 2007; PINTO; OLIVEIRA, 2011; MELO, 2015; OLIVEIRA, 2016; ZAMPIERI et al., 2017), seguido por derramamento de petróleo, que ocorrem em regiões com portos petroleiros, como é o caso da região de São Sebastião (LAMPARELLI, 2006; GUBITOSO, 2010).

O *Enterococcus* spp. apresentou maior densidade média, com  $3,0 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ , em relação ao *E. coli* com  $2,4 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$  (Figura 13). A máxima densidade encontrada na água para o gênero *Enterococcus* sp. foi de  $25,7 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ , enquanto a densidade máxima para *E. coli* foi inferior a  $13,4 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ . Verificou-se que as bactérias do gênero *Enterococcus* sp. foram detectadas em todas as amostragens (Figura 13). Resultados similares foram observados em Zampieri et al. (2017), que obteve densidades maiores de *Enterococcus* spp. do que *E. coli* em amostras de água, coletadas nos municípios de Santos (SP) e Itanhaém (SP).

Sanchez et al. (1986) avaliou a densidade de bactérias de origem fecal em 8 praias da Baixada Santista e uma de Ubatuba, obtendo resultados de aproximadamente  $10^3$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$  de *Enterococcus* spp. Oliveira e Pinhata (2008) analisaram *Enterococcus* spp. nas águas das praias de Gonzaguinha e Ilha Porchat, no município de São Vicente (SP). Comparando a densidade de *Enterococcus* sp. com trabalhos de Sanchez et al. (1986) e Oliveira e Pinhata (2008), a água da Baía do Araçá apresentou densidades inferiores indicando menor contaminação microbiológica em relação às outras localidades.

Em relação às estações do ano, *E. coli* foi mais abundante no verão enquanto *Enterococcus* spp. apresentou densidades maiores no inverno (Figura 13). A bactéria *E. coli* apresentou valores aproximadamente duas vezes maiores no verão do que no inverno

( $3,6 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$  e  $1,6 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ , respectivamente) (Figura 13). Segundo Lamparelli (2006), o Estado de São Paulo possui uma população de aproximadamente 2 milhões de habitantes na zona costeira, podendo duplicar durante o verão. Este aumento populacional aliado à insuficiência dos sistemas de saneamento provoca um aumento nos volumes de esgotos lançados aos recursos hídricos litorâneos influenciando na qualidade sanitária do ambiente. Este fluxo da população para a costa litorânea pode ter influenciado no aumento da densidade da *E.coli* no verão.

Neste trabalho, analisando a densidade de *Enterococcus* sp. verificou que no inverno a densidade foram mais elevadas do que os obtidos no verão, divergindo de trabalhos de Passos et al. (2011) e Pereira (2014) em que obtiveram elevada densidade de bactérias *E. coli* e *Enterococcus* sp. no período do verão em relação ao inverno nas análises de areia e água de praias.

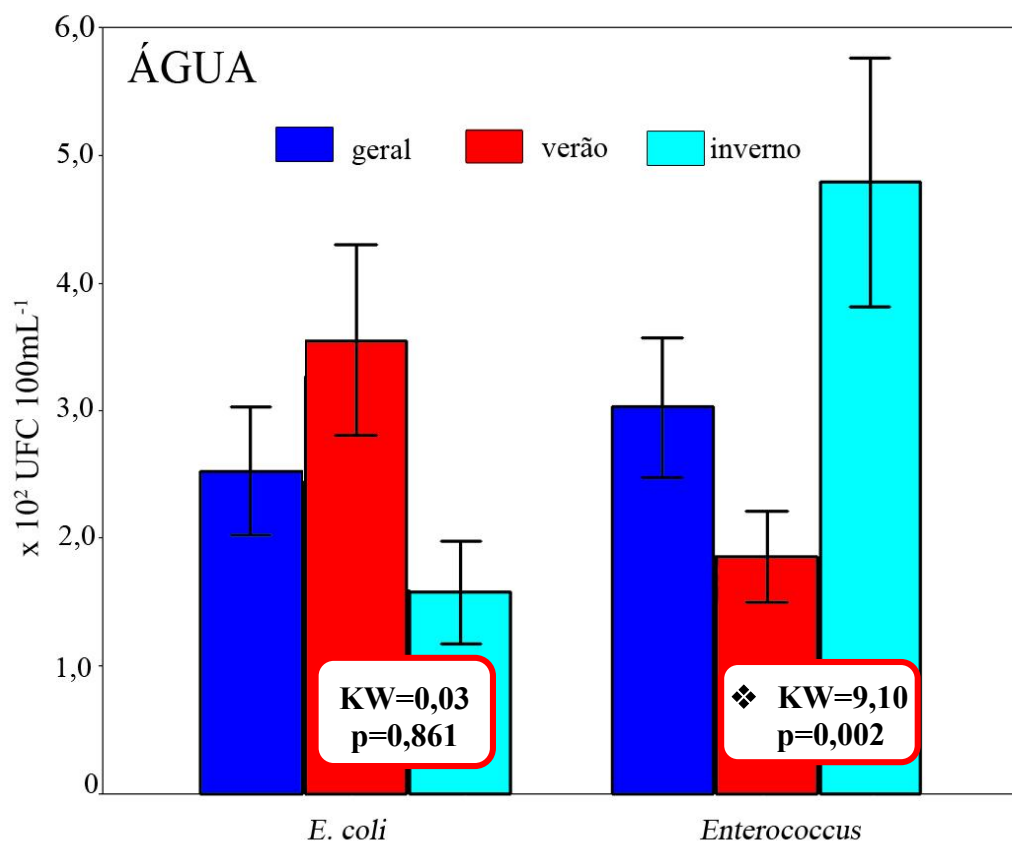


Figura 13: Variação das médias das densidades de *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Enterococcus* sp.. Média geral, média do verão e do inverno e seus respectivos erros padrões representado pelas barras. Expresso em  $\times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ . Quadro em destaque representa resultado do teste estatístico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p), diferença entre as densidades da espécie *E. coli* e *Enterococcus* sp. em relação ao período (verão-inverno). ❖: representa diferença significativa.

Em um estudo realizado com amostras de água no estuário de Cananéia, litoral sul do Estado de São Paulo, constatou-se que no verão a densidade de bactérias indicadoras de contaminação fecal foi muito maior comparando com as amostras coletadas no inverno provavelmente em decorrência ao elevado nível de contaminação por efluentes e grandes volumes pluviométricos (DOI; BARBIERI; MARQUES, 2014). Ristori et al. (2007) analisaram a água estuarina da costa sul do Brasil e detectaram um elevado nível de contaminação de origem fecal relacionado às variações sazonais, sendo que no verão foi a densidade mais alta, com possível influência da pluviosidade e aumento da população turística.

A capacidade dos *Enterococcus* spp. de sobreviverem em águas marinhas por um período mais prolongado que a *E. coli* pode ter acarretado no aumento da densidade. Neste presente trabalho, a densidade média no inverno de *Enterococcus* sp. foi de  $4,8 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$  e no verão foi densidade bem inferior, com  $1,8 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ , detectando diferença significativa entre as densidades no período do verão e inverno (KW=9,10,  $p < 0,002$ ), mas não foi observada diferença significativa entre as densidades de *E. coli* (Figura 13).

Analisando os dados por ano de trabalho, observou-se que no ano de 2015 as densidades médias de *E. coli* ( $0,9 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ ) e *Enterococcus* spp. ( $1,8 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ ) foram inferiores quando comparado com o ano de 2016 (Figura 14), constatando diferenças significativas entre as densidades dos anos 2015 e 2016 para *E. coli* ( $p = 0,0009$ ) e também para *Enterococcus* spp. ( $p = 0,0003$ ). A densidade média de 2016 indicou uma elevada contaminação de bactérias de origem fecal, provavelmente por receber uma descarga maior de efluentes e esgotos domésticos.

CETESB (2017) avaliou a qualidade microbiológica de outras praias de São Sebastião, constatando que na maioria destas praias, as médias de *Enterococcus* sp. em 2016 foram menores do que as obtidas em 2015. Entretanto os dados encontrados neste trabalho apresentou dados inversos, no qual no ano de 2016 a densidade média de *Enterococcus* sp. foi de  $4,8 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ , muito mais elevada que em 2015 ( $1,8 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ ) (Figura 14), possivelmente diferindo pelo período de coleta e influência da dinâmica de dispersão do local (ação da maré e correnteza). O mesmo pode ser observado nas densidades de *E. coli* em que apresentou valor muito mais elevado em 2016, detectado diferença significativa entre os anos de 2015 e 2016 para a densidade de

*E. coli* (KW=21,47, p=0,0009) e para os *Enterococcus* spp. (KW=12,95, p=0,0003), sendo que as maiores densidades encontradas na água foi em 2016 para ambas bactérias (Figura 14).

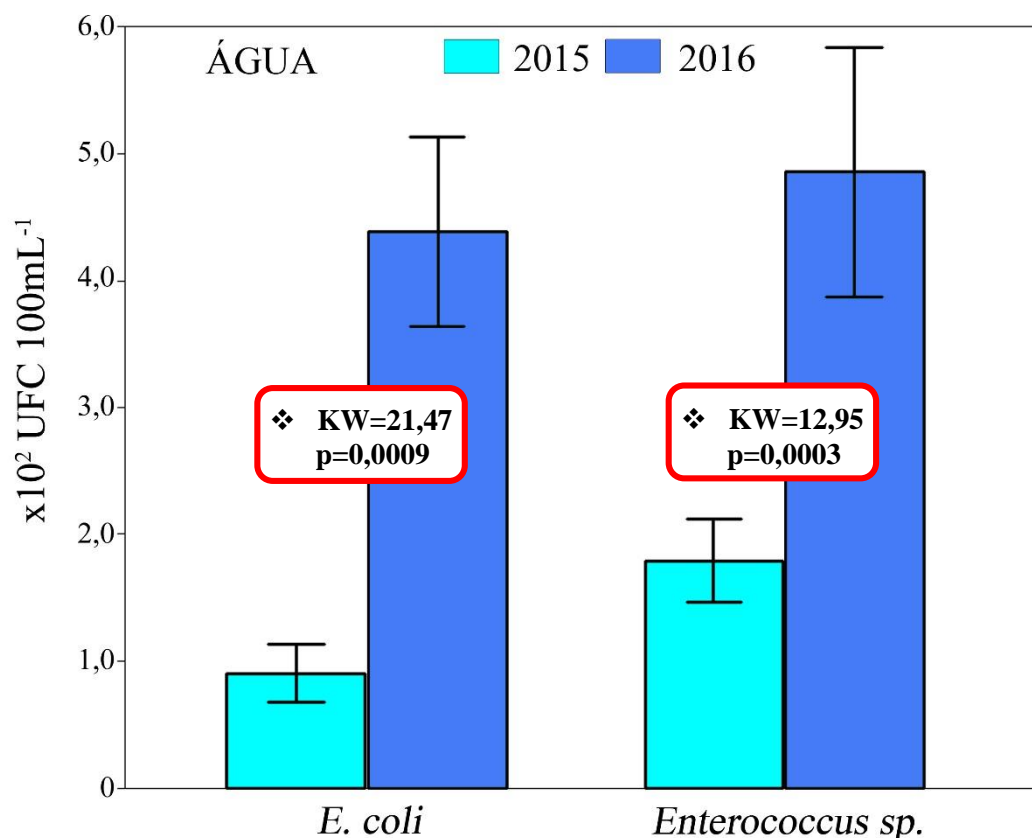


Figura 14: Valores médios das densidades de *E. coli* e *Enterococcus* sp. analisados por ano de coleta, com unidade expressos em  $\times 10^2$  UFC 100 mL<sup>-1</sup>. Quadro em destaque representa resultado do teste estatístico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p) entre as densidades da espécie *E. coli* e *Enterococcus* sp. em relação por ano de coleta (2015 e 2016). ❖: representa diferença significativa.

Analisando os dados separadamente por estação (verão e inverno) e por ano (2015 e 2016), observou-se que a maior densidade obtida de *E. coli* foi no verão de 2016 (Figura 15). No verão de 2015 a amostra de água apresentou pequena densidade ( $0,6 \times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup>) deste microrganismo e um leve aumento no inverno de 2015 ( $1,1 \times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup>). No verão de 2016 foi o período que apresentou uma elevada densidade ( $6,6 \times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup>), decaindo novamente no inverno de 2016 ( $2,1 \times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup>) (Figura 15). As concentrações e distribuição de bactérias marinhas estão diretamente relacionadas com as atividades antropogênicas que, conseqüentemente, aumentam o

índice de contaminação do local analisado, mostrando que estas bactérias podem ser utilizadas como indicadoras de poluição (ALMEIDA, 2009).

Os *Enterococcus* spp. apresentaram as menores densidades no verão de 2015 ( $0,5 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ ), aumentando no inverno de 2015 ( $3,0 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ ) e no verão de 2016 ( $3,1 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ ), e elevando mais no inverno de 2016 ( $6,5 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ ). A densidade máxima analisada entre os microrganismos na água foi do *Enterococcus* sp., detectado no inverno de 2016 ( $25,7 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ ) (Figura 15).

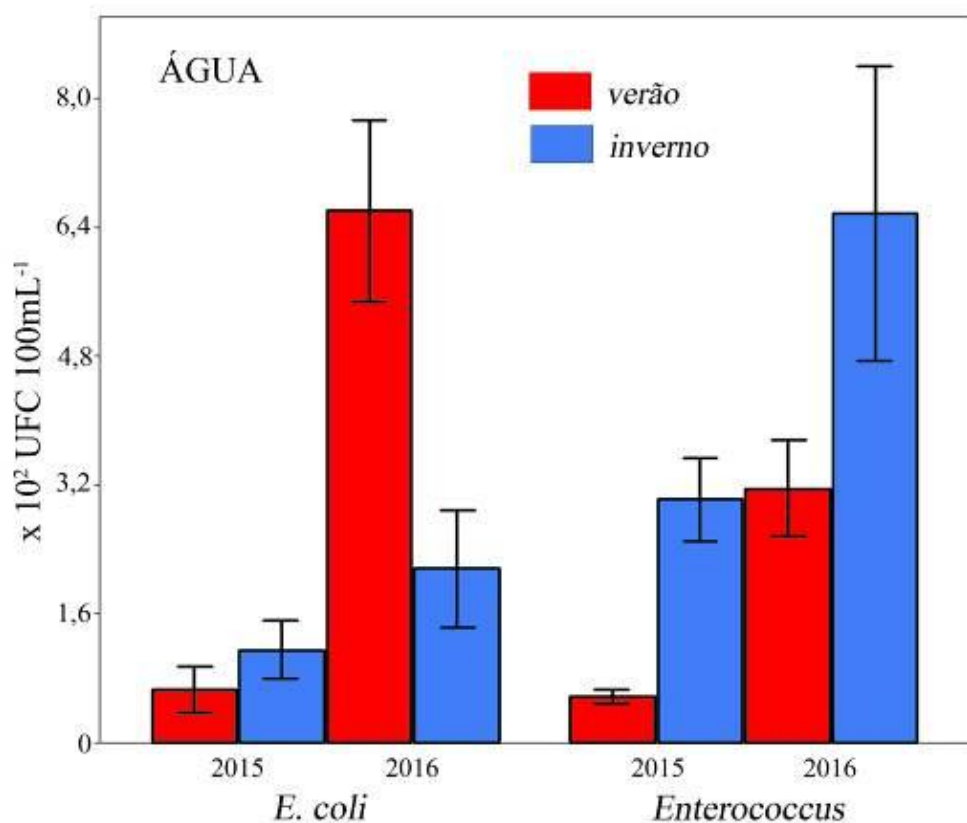


Figura 15: Variação das médias das densidades de *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Enterococcus* sp., nas estações de verão e inverno de 2015 e 2016 na água e seus respectivos erros padrões representado pelas barras. Valor expresso em  $\times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ .

Conforme Gubitoso (2008), o sistema de bombeamento do emissário submarino é periodicamente ativado e desativado para realização da manutenção periódica, e este funcionamento não é informado pela SABESP, ocasionando a variação dos valores dos microrganismos nas amostras coletadas por refletir a atividade ou inatividade do emissário, e este efluente carreado para o litoral.

Estudos epidemiológicos relacionaram contato com a água contaminada com microrganismos patogênicos e incidências de doenças gastrointestinais e dermatológicas variaram em cada caso (LAMPARELLI et al., 2003; YAMAHARA; WALTERS; BOEHM, 2009). As águas de praias contaminadas por esgotos e efluentes de origem urbana que apresentaram densidades elevadas de bactérias de origem fecal foram relacionadas a doenças em banhistas, nadadores e frequentadores (LAMPARELLI; SATO; BRUNI, 2003; YAMAHARA; WALTERS; BOEHM, 2009).

Diversos estudos relataram o risco crescente da contração de doenças pelo contato direto com os ambientes apresentando índices elevados de contaminação fecal, como McBride et al. (1998) em praias de Nova Zelândia, Cheung et al. (1990) em praias costeiras de Hong Kong, Fleisher et al. (1996) em praias costeiras no Reino Unido, Heaney et al. (2009) em praias dos EUA, Oliveira et al. (2007), Pinhata (2007), Andrade (2015), Melo (2015), Zampieri et al. (2017) nas praias do Estado de São Paulo, entre outros. Para pessoas com maior tempo de contato com esta água, como nadadores, o risco de contrair doenças são maiores, especialmente em épocas com aumento da população flutuante (turistas), que eleva a descarga de esgotos em locais com falta de saneamento, fato que pode ser agravado pela ocorrência de chuvas (SATO et al., 2005).

Os fatores ambientais aquáticos sofrem com a variação em função dos ciclos da maré, sazonal e temporal, efeitos da dispersão por correntes, ação dos ventos, alterando parâmetros físico-químicos e estes podem influenciar na densidade dos microrganismos pela capacidade de sobrevivência nestas condições adversas.

As variáveis abióticas mensuradas neste trabalho apresentaram-se adequadas para a sobrevivência, adaptabilidade e estabelecimento dos microrganismos. A temperatura média foi de 25,7°C, o nível de pH manteve-se com pouca variação entre neutro a levemente básico (7,9), a salinidade manteve inferior a 30 e os valores do OD variaram de 4,01 a 6,9 mg L<sup>-1</sup>, e a pluviosidade concentrou-se no período do verão.

Considerou-se a classificação (modificado) segundo Cabral et al. (2006) conforme descrito na Tabela 6:

Tabela 6: Valores referente a classificação da Correlação de Spearman (modificado) segundo Cabral et al. (2006).

Classificação	Valores
muito fraca correlação (MFC)	< 0,50
fraca correlação (FRC)	entre 0,50 e 0,70
forte correlação (FC)	entre 0,70 e 0,89
correlação muito forte (CMF)	entre 0,90 e 1

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos com a Correlação de Spearman (seguindo classificação descrito na Tabela 6), onde o verão apresentou correlações negativas fracas (FRC) entre *E. coli* e temperatura ( $r = -0,5258$ ,  $p < 0,0001$ ) e entre *Enterococcus* spp. e temperatura ( $r = -0,6610$ ,  $p = 0,001$ ), indicando que conforme este parâmetro aumentasse, menor a densidade de bactérias indicadoras de contaminação fecal. Estes mesmos microrganismos apresentaram correlação positiva fraca (FRC) em relação à pluviosidade, portanto indicando que o aumento da chuva elevaria a densidade de *E. coli* ( $r = 0,5164$ ,  $p = 0,011$ ) e *Enterococcus* spp. ( $r = 0,6587$ ,  $p = 0,012$ ).

Trabalhos anteriores citam que o aumento da densidade de *E. coli* durante os meses de verão podem ser ocasionado pelas temperaturas mais elevadas (WHITMAN; NEVERS, 2003; EDGE; HILL, 2007; ZEHMS et al., 2008) sugerindo que este microrganismo possa persistir mais neste período. Divergentes resultados foram obtidos neste trabalho em que a temperatura influenciou negativamente na densidade das bactérias, indicando que em temperatura mais elevadas foram obtidas menores densidades de bactérias no verão (Tabela 7).

Esta relação não foi observada nos dados coletados no inverno. Não foram observadas relações entre os parâmetros abióticos mensurados no inverno com a densidade das bactérias *E. coli* e *Enterococcus* spp., indicando que os valores das variáveis não influenciaram diretamente na contagem das bactérias.

Tabela 7: Resultado da análise estatística de Correlação de Spearman (r) em relação à densidade de microrganismos na água em comparação aos parâmetros ambientais coletados no verão e no inverno. (p): Nível de significância  $p < 0,05$ .

	<i>E. coli</i>				<i>Enterococcus</i> spp.			
	VERÃO		INVERNO		VERÃO		INVERNO	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Temperatura (°C)	<b>-0,5258</b>	<0,0001	-0,3256	0,266	<b>-0,6610</b>	0,001	0,1769	0,997
pH	-0,1943	0,389	-0,0940	0,750	-0,2761	0,656	0,1394	0,371
salinidade	0,2061	0,104	-0,1836	0,326	0,4349	0,052	-0,0808	0,704
OD	-0,2672	0,057	0,1533	0,197	-0,3875	0,235	0,2474	0,107
pluviosidade	<b>0,5164</b>	0,011	0,0200	0,870	<b>0,6587</b>	0,012	-0,0850	0,190

Obs.: Os valores acima de correlação fraca (FRC) estão destacados em negrito na Tabela.

Segundo Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003) e Niencheski et al. (2006), a contaminação microbiológica pode agravar com chuvas fortes, que carregam a poluição elevando o índice de contaminação fecal do ambiente. A sobrevivência das bactérias fecais no ambiente aquático é determinada por diversos fatores como temperatura, salinidade, oxigênio, predação e pH (MCFETERS; SINGH, 1991; DAVIES et al., 1995; ROZEN; BELKIN, 2001; HUGHES, 2003; CRAIG; FALLOWFIELD; CROMAR, 2004; MOUNA; AHMED; OMAR, 2014).

No trabalho de Mouna e colaboradores (2014) avaliaram o impacto dos fatores abióticos, como a temperatura, salinidade, pH e turvação da área costeira marroquina e a relação da sobrevivência da bactéria *E. coli* com estes parâmetros, concluindo que a salinidade e o pH correlacionam negativamente na densidade da bactéria e positivamente com maior turvação.

Diversos trabalhos vêm mostrando que as variações nas condições ambientais, como as mudanças climáticas, são parcialmente responsáveis pelas variações espaciais da diversidade de microrganismos, assim sendo, a composição das comunidades microbianas nos ecossistemas pode ser afetada por inúmeros fatores bióticos como abióticos (HUNTER-CEVERA; KARL; BUCKLEY, 2005; MARTINY et al., 2006).

Entretanto neste trabalho não foram observadas correlações significativas entre as densidades das bactérias analisadas com as variáveis pH, OD e salinidade obtidas no verão, indicando que estas não influenciaram nos valores da densidade bacteriana, entretanto a temperatura e a presença de chuva influenciaram nos valores das densidades das bactérias.



Com relação a identificação das colônias isoladas de *Enterococcus* spp., 31 cepas isoladas das amostras de água foram selecionadas aleatoriamente e submetidas aos testes bioquímicos, utilizando Entero Kit, para determinar as espécies (Figura 16A). Exemplo do resultado de um dos testes pode ser visualizado nas Figuras 16B (resultado negativo) e 16C (resultado positivo). A realização do teste e os resultados seguiram as orientações do fabricante (Probac).

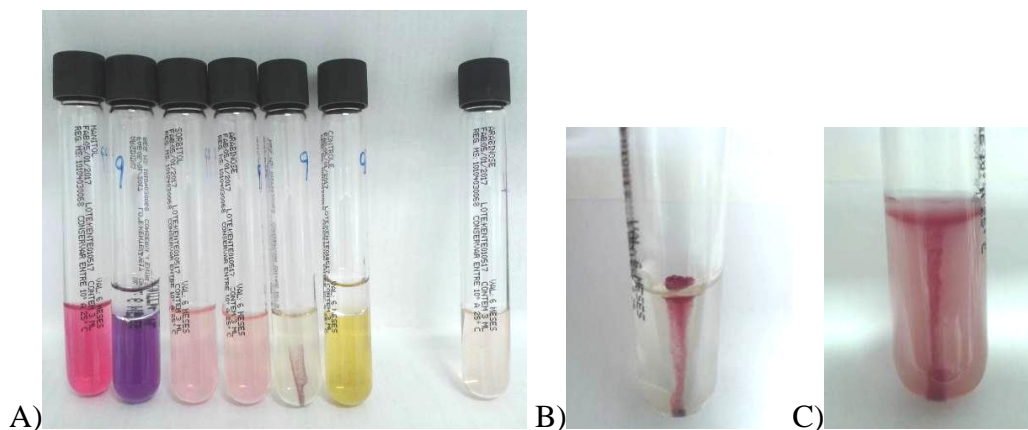


Figura 16: A) Teste utilizando Kit bioquímico para identificar as colônias isoladas de *Enterococcus* spp. para determinar a espécie. Sequência de tubos da esquerda para direita: Manitol, Arginina, Arabinose, Sorbitol, Motilidade, controle e branco. Teste de mobilidade da cepa isolada. B) negativo, C) positivo.

Sendo assim, as espécies de *Enterococcus* isolados neste trabalho foram definidas pelos resultados dos testes bioquímicos descritos na Tabela 8.

As cepas isoladas foram testadas bioquimicamente para determinar a espécie. Uma cepa isolada não foi possível determinar a espécie por dificuldade de leitura. Das 30 cepas isoladas da água foram numeradas e listadas a seguir:

- Grupo 1: 31Ae, 32Ae, 311Ab, 312Ab, 43Ae, 45Ab, 46Ae, 47Ae, 48Ae, 49Ae, 410Ae, 52Ae, 55Ae, 71A, 75A, 86A, 811A, 812A.
- Grupo 2: 311Ae, 510Ab, 511Ae, 33Ae, 74A, 58Ae, 76A.
- Grupo 3: 81A, 82A, 83A.
- Grupo 4: 63Ae, 69Ae.
- Indeterminado: 66Ab.

As cepas foram agrupadas em grupos, conforme trabalho de Facklam e colaboradores (2002), determinando a espécie do *Enterococcus* sp. conforme os resultados dos testes apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Resultado dos testes bioquímicos das cepas isoladas de *Enterococcus* spp. (+ positivo, - negativo, +/- variado).

Número do grupo	1	2	3	4	5
Motilidade	-	-	+	-	-
Arabinose	+	-	+	-	+
Manitol	+	+	+	-	+
Sorbitol	+/-	+	+	-	+
Arginina	+	+	+	+	-
Pigment./controle	-	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-	-
Espécie	<i>E. faecium</i> *(II)	<i>E. faecalis</i> *(II)	<i>E. gallinarum</i> *(V)	<i>E. duram</i> *(III)	<i>E. avium</i> *(I)

\*Número romano indica classificação conforme Facklam et al. (2002). (pigment.: pigmentação)

Observou-se que a *E. faecium* foi a espécie dominante com 60,0% das cepas identificadas, seguido do *E. faecalis* com 23,3% (Tabela 9).

Tabela 9: Porcentagem de *Enterococcus* spp. identificados pela técnica bioquímica. (n): número de cepas testadas.

Espécie	% das cepas (n=30)
<i>E. faecium</i>	60,0% (18)
<i>E. faecalis</i>	23,3% (7)
<i>E. gallinarum</i>	10,0% (3)
<i>E. duram</i>	6,6% (2)
<i>E. avium</i>	0,0%

Todas as espécies identificadas bioquimicamente neste trabalho são consideradas patogênicas associadas a infecções cutâneas, sendo que houve uma predominância da espécie *E. faecium*, que é encontrado nas fezes humanas em menor proporção do que *E. faecalis*, sugerindo que o ambiente apresenta uma elevada contaminação por efluentes domésticos. Enquanto *E. faecalis* representava quase 95% dos isolados clínicos, isolados de *E. faecium* eram raras até a década de 1990 (HUYCKE; SAHM; GILMORE, 1998),

mas com a disseminação de resistência a antibióticos, a proporção de isolados em infecções por *E. faecium* aumentou tornando-se casos problemáticos para tratamento (GILMORE; LEBRETON; VAN SCHAİK, 2013).

A espécie *E. faecium* não é uma bactéria enterocócica exclusiva de origem humana, apesar de ser encontrado em 100% das fezes analisadas, também foi isolada do trato gastrointestinal de bovinos, suínos, cães e de aves como a galinha e em menor densidade (DEVRIESE et al., 1992).

Oliveira e Pinhata (2008) analisaram a água de praias de São Vicente (SP) e constataram uma elevada densidade de *Enterococcus* sp. nas amostras e a espécie dominante foi *E. faecalis* na água, concluindo que o local analisado apresenta um alto índice de contaminação fecal, provavelmente de origem humana. Ferguson et al. (2005) descreve em seu trabalho realizado nos sedimentos marinhos e águas intertidais da costa sul da Califórnia, a elevada presença das espécies *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. durans* nas suas amostras.

Bartram e Rees (2000) descreve que as bactérias *E. faecalis* e *E. faecium* ocorrem em quantidades significativas em fezes humanas e animais e, juntamente com a espécie *E. durans*, foram relatados como sendo as espécies mais frequentemente encontrada em ambientes aquáticos poluídos. As espécies *E. gallinarum* e *E. avium*, inicialmente isolados de aves, ocorrem em altas concentrações em fezes de animais, mas não estão exclusivamente associados a estas fontes.

Um estudo mais recente descreve que em águas de praias recreacionais da Malásia foram detectados maior número de *E. faecium* do que *E. faecalis* (DADA et al., 2012). Outros trabalhos também apresentaram resultados positivos ao analisar a sobrevivência de *Enterococcus* spp. nas águas doce (ANDERSON; WHITLOCK; HARWOOD, 2005; HALLER et al., 2009), água marinha (LITOPOULO-TZANETAKI; TZANETAKIS, 1992; BOEHM, et al., 2002; KORAJKIC; BROWNELL; HARWOOD, 2011) e em estuários (JENG; ENGLAND; BRADFORD, 2005).

Sinclair et al. (2012) citou em seu trabalho a correlação entre a elevada concentração das bactérias *Enterococcus* spp. relacionadas com riscos de doenças gastrointestinais, respiratória e de infecção de pele em humanos durante o contato com água de uso recreacional (KAY et al., 1994; PRUSS, 1998).

A grande quantidade destas bactérias no ambiente indica elevada contaminação por esgoto e efluentes não tratados, por serem consideradas bactérias fecais de origem humana (BOEHM; SASSOUBRE, 2014). Estas espécies são as principais causadoras de infecções e de doenças gastrointestinais (MALANI; KAUFFMAN; ZERVOS, 2002; WERNER, et al., 2008; PRABAKER; WEINSTEIN, 2011). Assim, elevadas densidades podem provocar aumento de doenças enterocócicas nos organismos que mantenham contato com a água contaminada, e a identificação correta pode auxiliar no tratamento e na caracterização do meio ambiente (BOEHM; SASSOUBRE, 2014; LEBRETON; WILLEMS; GILMORE, 2014).

### 6.2.1.2. *Candida* spp.

A Figura 17 apresenta os resultados das densidades das espécies de *Candida* sp. na água. A espécie *C. tropicalis* foi a mais abundante especialmente no inverno. *C. glabrata* foi a levedura menos abundante, apresentando uma média geral de  $0,10 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$  (Figura 17). As variações da densidade e as diversidades encontradas na água dependem dos fatores bióticos e abióticos do ambiente que influenciam na sobrevivência dos microrganismos (HAGLER, 2006).

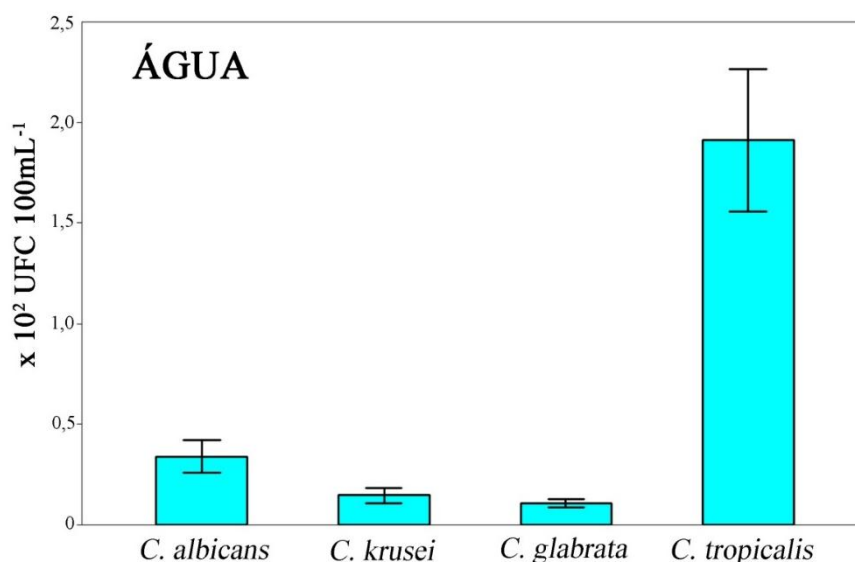


Figura 17: Valores médios da densidade dos microrganismos analisados na água coletados na Baía do Araçá ( $\times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ ) e seu erro padrão representado pelas barras. Microrganismos: *C. albicans*: *Candida albicans*; *C. krusei*: *Candida krusei*; *C. glabrata*: *Candida glabrata*; *C. tropicalis*: *Candida tropicalis*.

No trabalho de Van Wyk (2012) foram isolados diferentes espécies de leveduras, sendo o gênero *Candida* sp. o que apresentou o maior número representativo, como *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*, citando serem comuns em ambientes aquáticos e provavelmente de origem terrestre e por serem espécies patogênicas oportunistas, quando encontradas no ambiente podem indicar um potencial risco para a saúde dos usuários de água e frequentadores do local. Neste presente trabalho foram detectadas a presença de quatro espécies de *Candida*: *Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*, sendo que esta última se destacou em relação às outras na densidade encontrada da água.

Chen e colaboradores (2009), cita a *Candida tropicalis* como a espécie mais encontrada no litoral das águas do nordeste de Taiwan e descreve como a levedura que é amplamente distribuída no ambiente marinho, corroborando com os achados deste trabalho.

As densidades das *Candida* analisadas neste trabalho, variou conforme a espécie identificada. Analisando estatisticamente as densidades das espécies de *Candida* foram detectados diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as todas as espécies estudadas, com os valores de Kruskal-Wallis descritos na Tabela 10.

Tabela 10: Valores resultantes do teste de Kruskal-Wallis a 95% de significância (p) entre as densidades das espécies de *Candida* sp. (*Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*).

	<i>C. albicans</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. glabrata</i>
<i>C. krusei</i>	49,33 (p<0,0001)		
<i>C. glabrata</i>	45,45 (p<0,0001)	4,02 (p=0,031)	
<i>C. tropicalis</i>	12,05 (p=0,0005)	64,84 (p<0,0001)	60,58 (p<0,0001)

A densidade de todas as espécies de *Candida* sp. analisadas foram maiores no inverno do que no verão (Figura 18). Obteve-se uma densidade alta de *C. tropicalis* no inverno, quando comparado às outras espécies de *Candida* sp. indicando uma possível capacidade de sobrevivência em ambientes diversos, com presença de contaminação por dejetos ou efluentes, visto que esta levedura faz parte da microbiota humana normal e de outros animais (OKSUZ et al., 2007; NEGRI et al., 2010). Somente as leveduras *C. krusei* (p=0,009) e *C. tropicalis* (p=0,019) apresentaram diferença significativa entre os dados do verão e inverno (Figura 18).

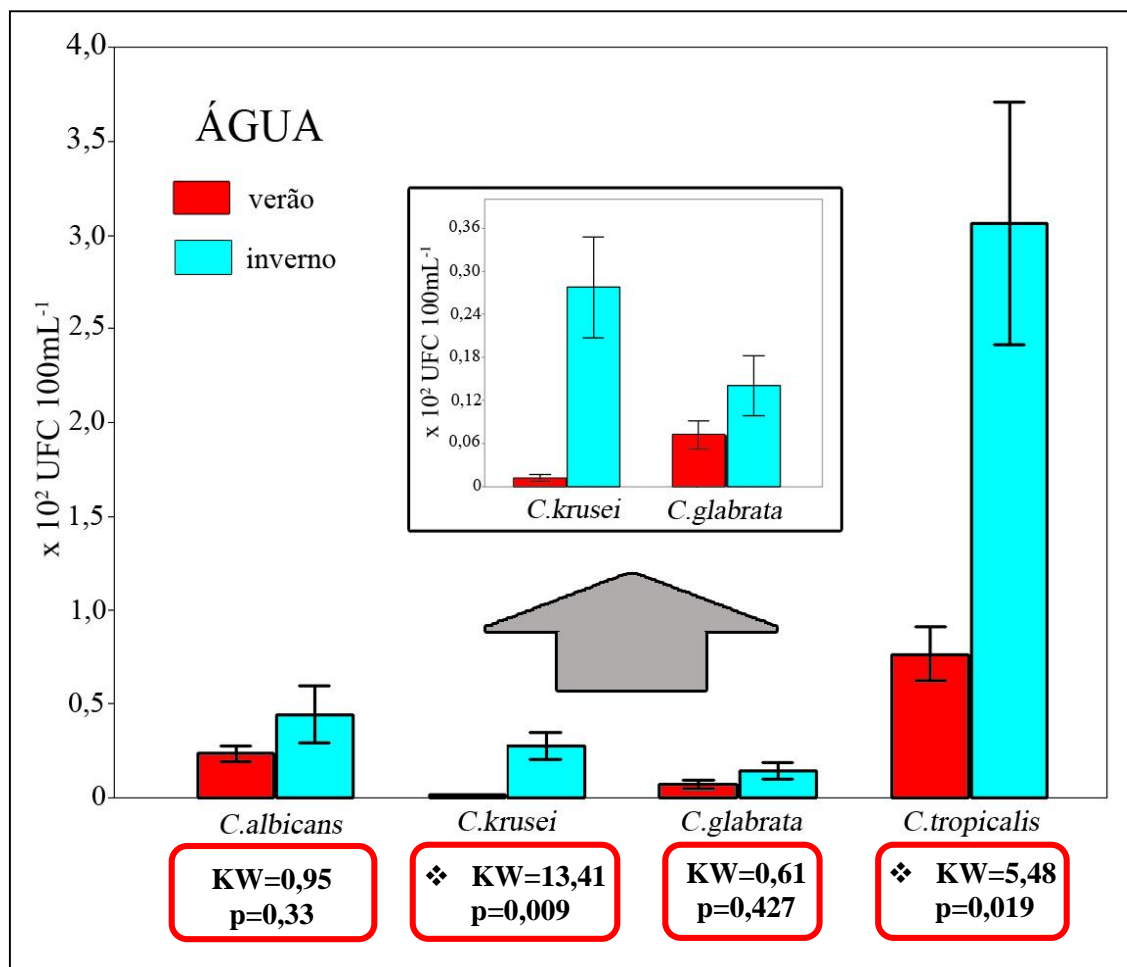


Figura 18: Valores médios da densidade das espécies de *Candida* sp. no verão e no inverno analisados na água ( $\times 10^2 \text{ UFC } 100\text{mL}^{-1}$ ) e seu erro padrão representado pelas barras. Quadro vermelho em destaque representa resultado do teste estatístico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p), diferença entre as densidades das espécies de *Candida* sp. em relação ao período (verão-inverno). ❖: representa diferença significativa. Microrganismos: *C. albicans*: *Candida albicans*; *C. krusei*: *Candida krusei*; *C. glabrata*: *Candida glabrata*; *C. tropicalis*: *Candida tropicalis*.

No ano de 2015 a densidade média de quase todas as espécies de *Candida* spp. analisadas foram menores em relação ao encontrado em 2016, com exceção da *C. tropicalis* que apresentou uma queda em 2016 (Figura 19). *C. krusei* e *C. glabrata* quase não foram observados no ano de 2015, entretanto em 2016 foi verificado um aumento da densidade, indicando que a presença destas leveduras aumentaram na água da Baía.

Apesar da densidade de *Candida albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* serem baixas em relação aos outros microrganismos, observou-se um aumento na densidade em comparação ao ano anterior (Figura 19). Neste trabalho verificou-se que somente *C.*

*albicans* não apresentou diferença significativa entre os anos de 2015 e 2016 (KW=1,65, p=0,20) (Figura 19).

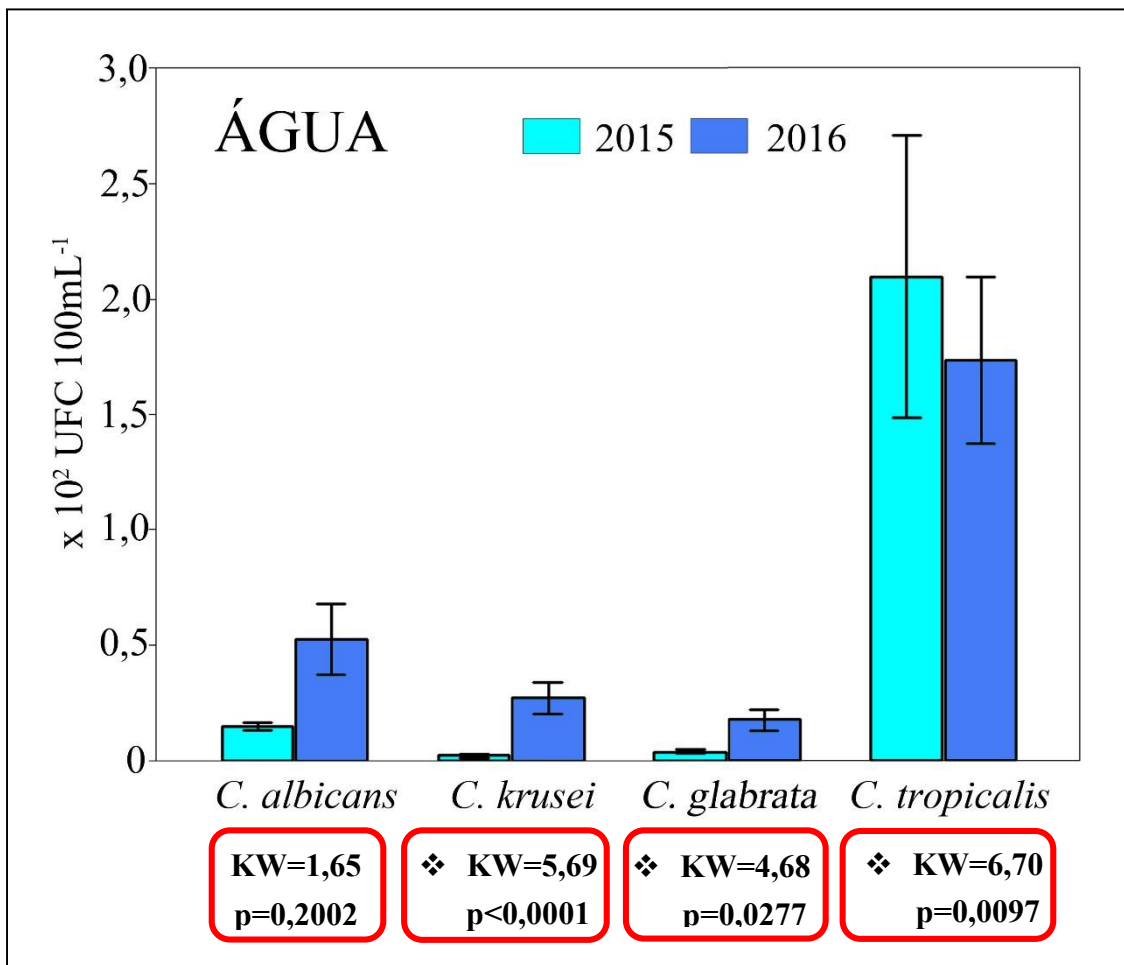


Figura 19: Valores médios da densidade das espécies de *Candida* sp. nos anos de 2015 e 2016 analisados na água ( $\times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup>) e seu erro padrão representado pelas barras. Quadro vermelho em destaque representa resultado do teste estatístico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p), diferença entre as densidades das espécies de *Candida* sp. em relação aos anos 2015-2016. ❖: representa diferença significativa. Microrganismos: *C. albicans*: *Candida albicans*; *C. krusei*: *Candida krusei*; *C. glabrata*: *Candida glabrata*; *C. tropicalis*: *Candida tropicalis*.

Analisando os dados separadamente em verão e inverno nos dois anos coletados, as densidades das *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* apresentaram valores relativamente baixos comparados com *C. tropicalis*, mantendo-se abaixo de  $0,7 \times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup> nos dois anos, mas no inverno de 2016 foram constatados aumento nas densidades destas leveduras, diferindo dos outros períodos analisados (Figura 20). Este aumento pode ter ocorrido por ter recebido um aporte maior de efluentes com material contaminado.

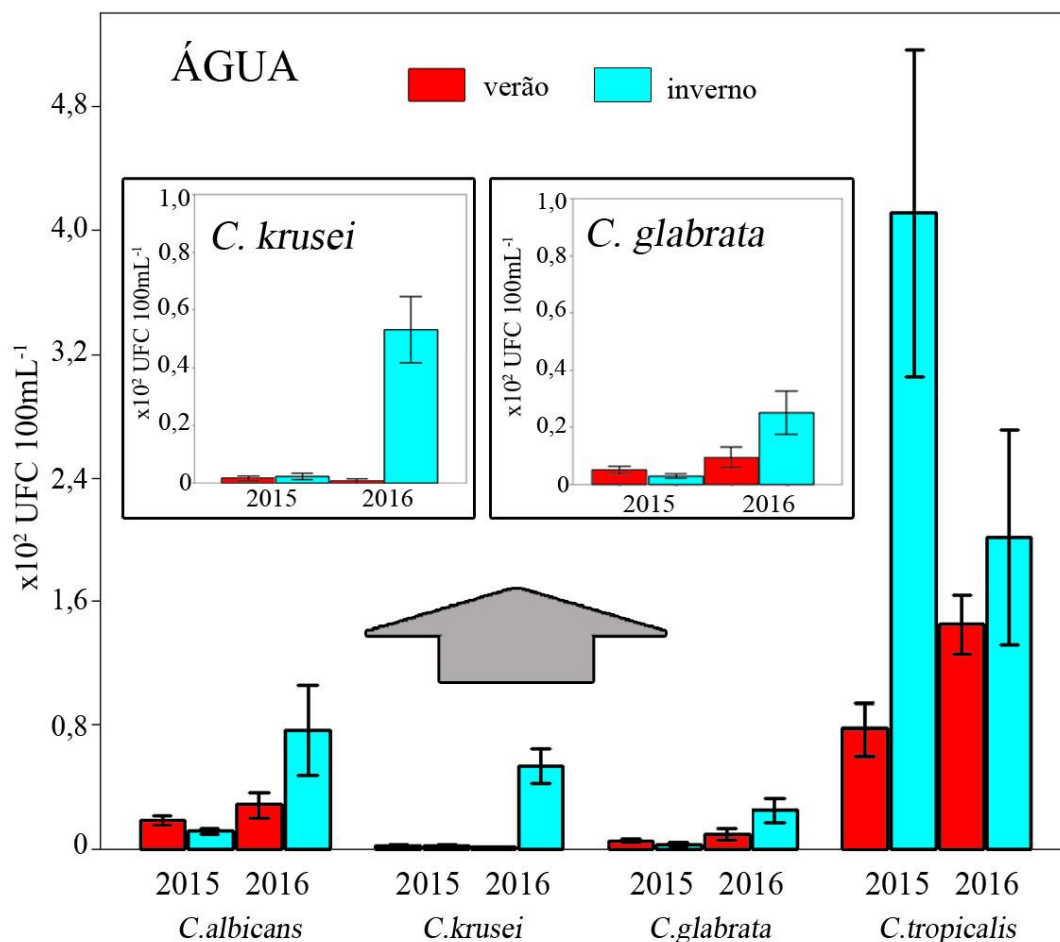


Figura 20: Valores médios da densidade das espécies de *Candida* sp. nos anos de 2015 e 2016 nos períodos do verão e inverno, analisados na água ( $\times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup>) e seu erro padrão representado pelas barras. Microrganismos: *C. albicans*: *Candida albicans*; *C. krusei*: *Candida krusei*; *C. glabrata*: *Candida glabrata*; *C. tropicalis*: *Candida tropicalis*.

Diversos trabalhos citam a *Candida albicans* como sendo a mais encontrada nas amostras analisadas. No estudo de Bhat e Kachwalla (1955) descrevem a levedura *C. tropicalis* como a mais frequentemente isolada da água do mar de Bombay, concluindo que esta espécie provavelmente seja comum encontrar nas águas marinhas. Yan e colaboradores (2010) analisaram água, sedimento marinho, lama, plantas de manguezais e algas marinhas para presença de leveduras marinhas e obtiveram 44 cepas de *Candida tropicalis*, indicando que esta espécie tem ampla distribuição em diferentes ambientes marinho tropical e subtropical.

A espécie *Candida albicans* é o agente etiológico de maior importância por ser frequentemente relacionada a infecções, como micoses (RUEDA, 2002). Esta espécie faz parte da microbiota normal do trato digestório e membranas mucocutâneas de seres



humanos, mas também pode causar doenças como micose superficial ou invasiva (ODDS, 1988).

As leveduras *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata* também podem ser encontradas na microbiota normal humana e de animais homeotérmicos (TAYSI; VAN UDEN, 1964), tendo sido relatadas como importantes patógenos oportunistas a partir da década de 80 (FOONGLADDA et al., 2002).

Hagler e Mendonça-Hagler (1981) examinaram as espécies de leveduras em águas estuarinas e costeiras com diferentes níveis de poluição no estado do Rio de Janeiro, encontrando densidades de leveduras acima de 100 UFC 100mL<sup>-1</sup> em locais com maiores níveis de poluição, enquanto na maioria dos locais com baixo índice de poluição ou não poluídos, foram encontradas densidades inferiores a 100 UFC 100mL<sup>-1</sup>. No presente estudo, somente a densidade média geral da levedura *Candida tropicalis* ultrapassou o valor de 100 UFC 100mL<sup>-1</sup>, demonstrando a existência de fontes de contaminação atuando nessas áreas.

Trabalho de Pinhata (2007) estudou a variação da densidade de *Candida* spp. encontrada nas águas e areias das praias do município de Guarujá (SP), indicando fontes de contaminação existentes nos locais com maior nível de presença deste microrganismo. Pinto e Oliveira (2011) descreveram a preocupação em relação à presença de microrganismos patogênicos no ambiente, sugerindo monitoramento das águas e areias das praias, incluindo leveduras do gênero *Candida*.

Em relação à densidade de *Candida* sp. e as variáveis abióticas no verão somente a densidade de *C. tropicalis* apresentou correlação positiva fraca (FRC) com a salinidade ( $r=0,5788$ ,  $p=0,005$ ) e correlação positiva forte (FC) com a pluviosidade ( $r=0,8185$ ,  $p<0,0001$ ) pelo teste de Correlação de Spearman (Tabela 11), seguindo classificação descrito na Tabela 6. Não foram observadas outras correlações significativas entre os valores das variáveis abióticas mensuradas no verão com as leveduras *C. albicans*, *C. krusei* e *C. glabrata* (Tabela 11).

A espécie *C. krusei* apresentou em correlação fraca negativa para temperatura ( $r=-0,6421$ ,  $p<0,0001$ ) e correlação forte negativa para o parâmetro salinidade ( $r=-0,7206$ ,  $p<0,0001$ ) no período do inverno. A relação entre a salinidade e a densidade desta levedura foi observada, com índice de significância mais forte entre os valores das densidades em relação à elevada salinidade. Esta levedura também apresentou relação

inversa com a temperatura, sendo que as temperaturas altas corresponderam com valores menores da densidade de *C.krusei*

Tabela 11: Resultado da análise estatística de Correlação de Spearman (r) em relação à densidade de microrganismos na água em comparação às variáveis ambientais coletados no verão e no inverno. Nível de significância:  $p < 0,05$ .

VERÃO	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Temperatura (°C)	0,1714	0,203	-0,2899	0,320	-0,0078	0,907	-0,3773	0,161
pH	0,1272	0,452	-0,1608	0,722	0,0401	0,622	-0,1237	0,825
salinidade	0,1996	0,275	-0,1959	0,925	-0,1525	0,914	<b>0,5788</b>	0,005
OD	-0,1740	0,495	-0,0922	0,850	-0,0479	0,480	-0,3575	0,172
pluviosidade	0,2832	0,005	-0,1068	0,776	-0,0887	0,452	<b>0,8185</b>	<0,0001
INVERNO	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>	
Temperatura (°C)	-0,2250	0,002	<b>-0,6421</b>	<0,0001	-0,4774	0,004	-0,0639	0,985
pH	0,1767	0,724	-0,0124	0,894	0,1925	0,730	-0,1647	0,721
salinidade	<b>-0,5570</b>	0,0001	<b>-0,7206</b>	<0,0001	<b>-0,6576</b>	<0,0001	-0,1809	0,576
OD	-0,2441	0,421	-0,2282	0,027	-0,4361	0,080	-0,0167	0,638
pluviosidade	-0,3480	0,175	-0,4447	0,037	-0,3760	0,105	<b>0,6529</b>	<0,0001

Obs.: Os valores acima de correlação fraca (FRC) estão destacados em negrito na Tabela.

No inverno, as leveduras *C. albicans* ( $r = -0,5570$ ) e *C. glabrata* ( $r = -0,6576$ ) apresentaram correlação negativa fraca (FRC) para a variável salinidade (Tabela 11). Estas leveduras relacionaram-se inversamente com os valores da salinidade, sendo que nos valores elevados da salinidade foram observados menores valores da densidade destas leveduras. Kurtzman e Fell (1998) descreve a baixa densidade de leveduras em águas de ambiente hipersalino, indicando que a salinidade é um fator negativo para as leveduras.

A temperatura é um fator importante que influencia no crescimento de algumas espécies de *Candida* em ambientes marinhos, podendo variar a densidade conforme a temperatura do ambiente (BUCK; BUBUCIS; COMBS, 1977; ANDERSON, 1979).

A *C. tropicalis* apresentou correlação fraca positiva com a pluviosidade ( $r = 0,6529$ ,  $p < 0,0001$ ). A densidade desta levedura no inverno apresentou correlação com os valores da pluviosidade, indicando que na presença da chuva os valores obtidos desta levedura foram maiores. De modo geral, como a mesma reação foi observada no verão, os valores da densidade da *C. tropicalis* aumentaram com a ação da chuva.

As leveduras estão presentes em diversos tipos de ambiente onde sofrem influência da temperatura, pH, umidade, e OD, além da predação que afeta o estabelecimento e manutenção dos fungos (LOUREIRO et al., 2005). Apesar de no inverno não ter registro de alta pluviosidade, a *C. tropicalis* apresentou correlação positiva com a pluviosidade, indicando que neste período de chuva, foi detectado o aumento da densidade deste microrganismo.

Em pesquisa nas águas de lagos da região de Lagoa Santa (MG), as leveduras isoladas nos períodos de chuva e seca, não foram encontradas correlação entre os dados ambientais com a presença deste microrganismo (ROSA et al., 1995; MORAIS et al., 1996). Entretanto trabalho de Medeiros (2002) realizado na lagoa Carioca cita a correlação das leveduras com a temperatura e pH. Neste trabalho foram constatadas algumas fracas correlações entre os gêneros de *Candida* e a salinidade, sendo que somente *C. tropicalis* apresentou correlação positiva com a pluviosidade, tanto no verão como no inverno.

#### **6.2.1.3. Fungos filamentosos**

Os valores do oxigênio dissolvido (OD mg L<sup>-1</sup>) variaram de 4,0 a 6,7, com média geral de 5,5 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 12), apresentando se na maioria das amostras dentro dos valores estabelecidos pelo CONAMA 357/2005 para águas salobras de boa qualidade. Apesar de alguns pontos apresentarem OD abaixo de 5,0 mg L<sup>-1</sup>, a média no verão foi 5,1 mg L<sup>-1</sup> e maior no inverno, com 6,2 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 12).

A região entremarés analisada apresentou boa quantidade de OD na água na maior parte das amostragens. O oxigênio sendo considerado um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento da maioria dos microrganismos, o ambiente analisado indica boa aeração e retrata-se favorável para vários organismos e microrganismos aquáticos.

Tabela 12: Parâmetros ambientais obtidos das amostras de água da região entremarés da Baía do Araçá.

parâmetro	Geral		Verão		Inverno	
	min - max	x ± s	min - max	x ± s	min - max	x ± s
Temp. (°C)	22,6 - 31,6	26,2 ± 0,3	24,3 - 31,6	27,7 ± 0,7	22,6 - 25,4	23,9 ± 0,3
pH	7,7 - 8,1	7,9 ± 0,01	7,7 - 8,0	7,9 ± 0,02	7,8 - 8,1	8,0 ± 0,02
salinidade	24,8 - 28,1	27,0 ± 0,1	24,8 - 27,5	26,6 ± 0,1	27,1 - 28,1	27,4 ± 0,07
OD (mg L <sup>-1</sup> )	4,0 - 6,7	5,5 ± 0,1	4,0 - 6,5	5,1 ± 0,2	5,3 - 6,7	6,2 ± 0,1

\*Temp. - Temperatura (°C); \*\*OD - oxigênio dissolvido (mg L<sup>-1</sup>). Onde: min – valor mínimo, max – valor máximo, x – média, s – erro padrão.

Os níveis de pH mantiveram-se levemente alcalino e com pouca variação a longo do estudo, variando de 7,7 a 8,1 (Tabela 12) de acordo com os pontos coletados. Trabalho de Raghukumar et al. (2004) cita que o pH ideal para crescimento e produção de enzimas extracelulares dos fungos marinhos fica entre pH 7 a 8, indicando que os valores de pH mensurados neste trabalho estavam propícios para o crescimento destes fungos.

A salinidade mensurada neste trabalho manteve inferior a 30, sendo classificada como água salobra, conforme determinado pela Resolução CONAMA nº 357/2005, não oscilando muito em toda amostragem, variando a salinidade entre 24,8 a 28,1 (Tabela 12). Mbata (2008) analisou de águas marinhas profundas e hiper salinas do Mar Morto, isolou e identificou vários fungos filamentosos, incluindo os gêneros *Aspergillus* e *Aureobasidium*.

A temperatura mensurada neste trabalho favorece a reprodução e a diversidade dos fungos. Kohlmeyer (1983) e Wong et al. (1998) citam que a temperatura interfere na distribuição e diversidade de fungos filamentosos, sendo que há uma diversidade maior em áreas tropicais, quando comparados com águas temperadas. Fungos marinhos necessitam de temperaturas de 25°C a 30°C para se reproduzir (GRIFFIN, 1981).

Não foi constatada correlação da densidade de fungos filamentosos com os parâmetros ambientais através do teste estatístico Correlação de Spearman, conforme resultado na Tabela 13 (seguindo classificação descrito na Tabela 6), Apesar de Mueller, Bills e Foster (2004) descrever que a salinidade é o fator limitante de crescimento dos fungos, não foi observado correlação da densidade com esta variável abiótica neste trabalho (Tabela 13).

Tabela 13: Valores resultantes da análise estatística da correlação de Spearman (r) dos fungos em relação aos parâmetros abióticos, e com nível de significância  $p < 0,05$ .

	r	p
Temperatura (°C)	-0,160	0,40
pH	0,026	0,89
salinidade	0,271	0,15
OD	0,102	0,59

Silveira e colaboradores (2013) estudaram a presença de fungos e leveduras no estuário da Lagoa dos Patos e praia do Cassino, no Rio Grande do Sul avaliando a variabilidade temporal e espacial, descrevendo que *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. foram as espécies dominantes e que a distribuição dos fungos foi afetada pela negativamente pela salinidade, divergente dos dados encontrados no presente trabalho.

Dentre as quatro coletas realizadas, verificou-se que as média geral dos fungos nas amostras de água foi de  $3,0 \times 10^3$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ , apresentando valores entre  $0,4 \times 10^3$  a  $46,2 \times 10^3$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ , constatando uma elevada variação da densidade entre as amostragens. As coletas realizadas no verão apresentaram as menores densidades, com média de  $1,8 \times 10^3$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ , e no inverno obteve-se valores entre  $0,6 \times 10^3$  e  $46,2 \times 10^3$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ , com média de  $4,9 \times 10^3$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$  (Figura 21).

Lopes et al. (2009) descrevem a distribuição dos fungos em ambiente poluído e não poluído em rio no Portugal e cita que no inverno foram observados menores valores em relação ao verão, sendo que a maior densidade observado no verão teve a menor diversidade de fungos.

A densidade de fungos no inverno foi muito maior em comparação ao verão ( $4,9 \times 10^3$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$  e  $1,8 \times 10^3$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ , respectivamente) (Figura 21), mas não foi observado diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as densidades de verão e inverno (KW=0,01,  $p=0,93$ ).

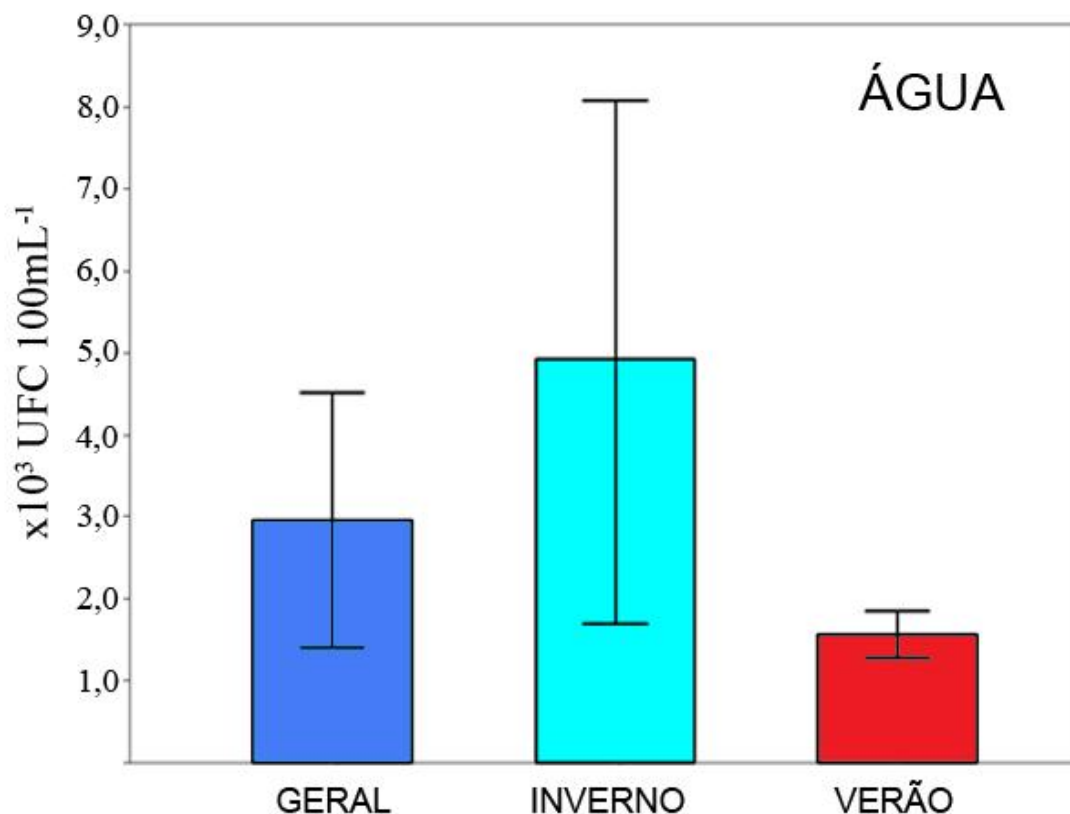


Figura 21: Média das densidades de colônias dos fungos filamentosos coletados na água, separado em inverno e verão (barras indicam os erros padrões). Unidade expressa em  $\times 10^3$  UFC 100mL<sup>-1</sup>.

Analisando a densidade das bactérias *E. coli* e *Enterococcus* spp. juntamente com os fungos filamentosos, observou-se que a densidade dos fungos foi muito mais elevada que as bactérias encontradas na região entremarés da Baía do Araçá (Figura 22). Estatisticamente houve diferença significativa entre a densidade de *E. coli* e fungos filamentosos ( $p=0,026$ ) e entre *Enterococcus* spp. e os fungos ( $p<0,0001$ ) através do teste Kruskal-Wallis (Figura 22).

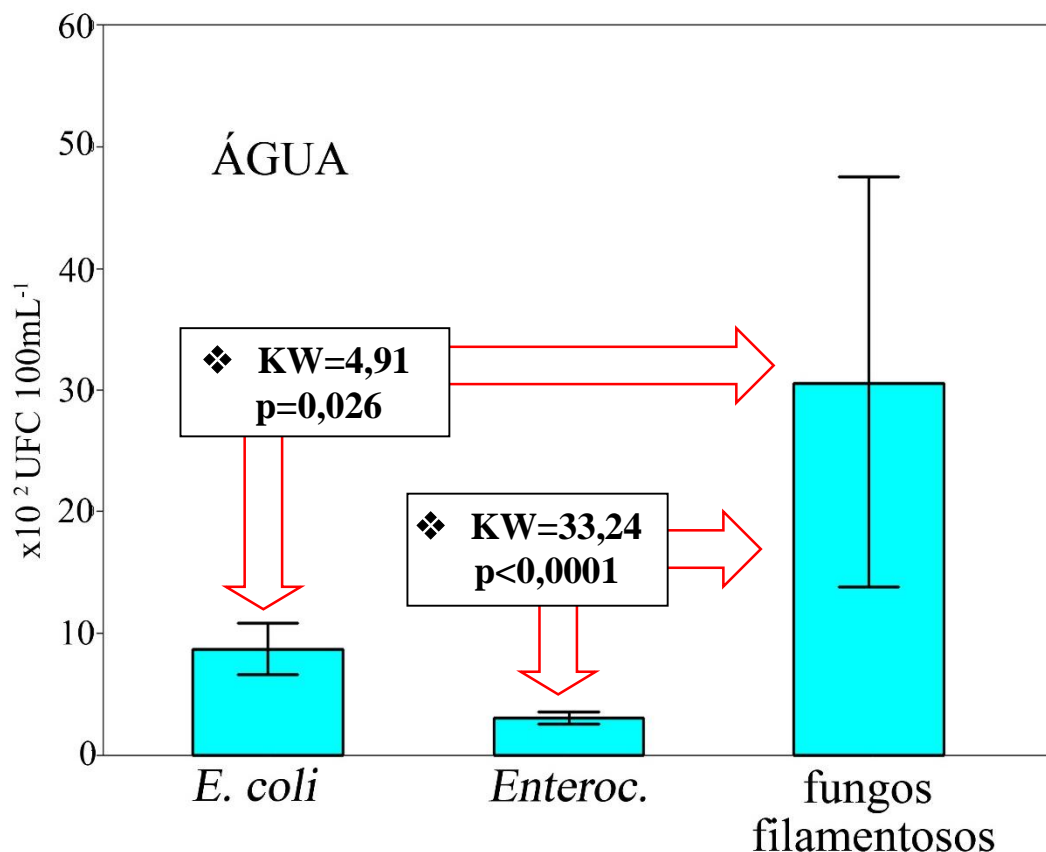


Figura 22: Valores médios das densidades das bactérias e fungos filamentosos e seus erros padrões (representado pelas barras), encontrados na água ( $\times 10^2 \text{ UFC } 100\text{mL}^{-1}$ ). Quadro em destaque representa resultado do teste estatístico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p), diferença entre as densidades da espécie *E. coli* e *Enterococcus* sp. em relação ao período (verão-inverno).  $\diamond$ : representa diferença significativa.

Considerou-se a classificação (modificada) segundo Cabral et al. (2006) dos valores de Spearman (segundo classificação descrito na Tabela 6), não foram observadas correlações entre os fungos filamentosos e *E. coli* e entre os fungos filamentosos e *Enterococcus* spp., indicando que as suas densidades não foram influenciadas entre si (Tabela 14).

Tabela 14: Resultado da correlação de Spearman (r) relacionando as densidades de bactéria *E. coli* e *Enterococcus* spp. com a densidade de fungos filamentosos.

	r	p
<i>E. coli</i> x Fungos filamentosos	0,470	0,79
<i>Enterococcus</i> spp. x Fungos filamentosos	-0,049	0,35

Diversos estudos citaram a relação entre os diferentes microrganismos encontrados no ambiente, seja fungo ou bactéria, analisando a correlação entre eles. Bonadonna et al. (2002) estudou as densidades de bactérias e fungos na Itália, em que cita correlação entre leveduras e fungos filamentosos e entre *E. coli* e *Enterococcus* spp. Entretanto, neste trabalho não foram observados correlações entre os microrganismos analisados.

## 6.2.2. Sedimento

### 6.2.2.1. Bactérias indicadoras de contaminação fecal

A Figura 23 representa as médias gerais e as médias das densidades no verão e no inverno das bactérias indicadoras de contaminação fecal (*Enterococcus* spp. e *E. coli*) nas amostras de areia. A densidade média de *E. coli* encontrados nas amostras de areia foi de  $4,7 \times 10^3$  UFC  $100\text{g}^{-1}$ , com mínima de  $0,04 \times 10^3$  UFC  $100\text{g}^{-1}$  e máxima de  $36,3 \times 10^3$  UFC  $100\text{g}^{-1}$  (Figura 23). Observou-se que a densidade média no verão foi maior em relação ao encontrado no inverno ( $6,3 \times 10^3$  UFC  $100\text{g}^{-1}$  e  $3,7 \times 10^3$  UFC  $100\text{g}^{-1}$ , respectivamente). Não foi observado diferença significativa entre os períodos de verão e inverno na amostra da areia ( $p=0,358$ ) (Figura 23).

As densidades de *Enterococcus* spp. foram maiores quando comparadas às de *E. coli*, com média geral de  $6,9 \times 10^3$  UFC  $100\text{g}^{-1}$ . A densidade de *Enterococcus* sp. no verão foi maior em relação ao inverno ( $9,1 \times 10^3$  UFC  $100\text{g}^{-1}$  e  $4,7 \times 10^3$  UFC  $100\text{g}^{-1}$ , respectivamente) (Figura 23). Estatisticamente foi observado diferença significativa entre verão e inverno nas amostras de areia para as *Enterococcus* spp. (KW=7,02,  $p=0,008$ ) (Figura 23).

Os resultados deste trabalho podem ser comparados com estudos de Sanchez et al. (1986), Oliveira e Pinhata (2008) e Pinto (2010) em relação a análise da contaminação microbiológica das praias. Estudo realizado por Sanchez et al. (1986), em praias da Baixada Santista e uma praia de Ubatuba, verificou a densidade de bactérias *Enterococcus* na areia e constataram elevada contaminação por este microrganismo. Dados semelhantes foram observados no trabalho de Oliveira e Pinhata (2008), em que citaram concentrações de *Enterococcus* spp. na ordem de  $10^3$  UFC  $100\text{g}^{-1}$ , em amostras de areia úmida e areia seca em duas praias de São Vicente (SP).



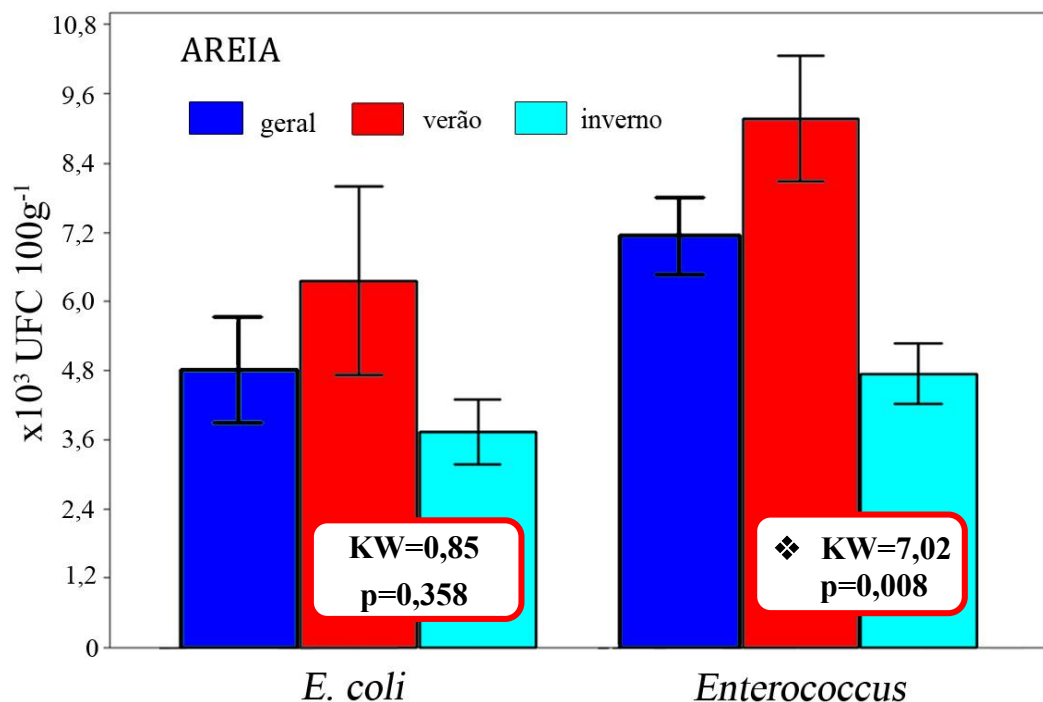


Figura 23: Variação das médias das densidades de *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Enterococcus* sp. nas amostras de areia. Média geral, média do verão e do inverno e seus respectivos erros padrões representado pelas barras. Expresso em  $\times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ . Quadro em destaque representa resultado do teste estatístico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p), diferença entre as densidades da espécie *E. coli* e *Enterococcus* sp. em relação ao período (verão-inverno). ♦: representa diferença significativa.

Trabalhos de Oliveira e Pinhata (2008) e Pinto, Pereira e Oliveira (2012) que avaliaram a contaminação fecal das areias e águas de praias do Estado de São Paulo, analisando a densidade de *Enterococcus* spp entre estes dois compartimentos, e verificaram que a areia apresenta contaminação superior a da água, pois os microrganismos sobrevivem por longos períodos por encontrar condições favoráveis e proteção contra predação.

O verão chuvoso geralmente apresentam contaminação superior em relação aos outros períodos pela água da chuva carrear os lixos e poluições para as praias (ELMANARA et al., 2005; SATO et al., 2005; ANDRAUS, 2006), e pelo aumento de turistas na época, que ocasiona o acúmulo de resíduos, lixo e efluentes, elevando proporcionalmente o contato com areia e água contaminada (ALM; BURKE; SPAIN, 2003; BOUKAI, 2005).

Pinto (2010) analisou areia seca, úmida e a água de praias da Baixada Santista, mostraram maior contaminação fecal na areia seca e úmida em relação ao encontrado águas, sendo que o período do verão apresentou maior contaminação em relação ao inverno.

No ano de 2015 a densidade média de *E. coli* foi menor em relação ao encontrado em 2016 ( $5,6 \times 10^3$  UFC  $100g^{-1}$  e  $6,6 \times 10^3$  UFC  $100g^{-1}$ , respectivamente) (Figura 24). Os *Enterococcus* spp. também apresentaram densidades maiores no ano de 2016, com  $11,5 \times 10^3$  UFC  $100g^{-1}$  em relação ao ano de 2015 ( $3,2 \times 10^3$  UFC  $100g^{-1}$ ), indicando um aumento na contaminação microbiológica no ano de 2016 (Figura 24).

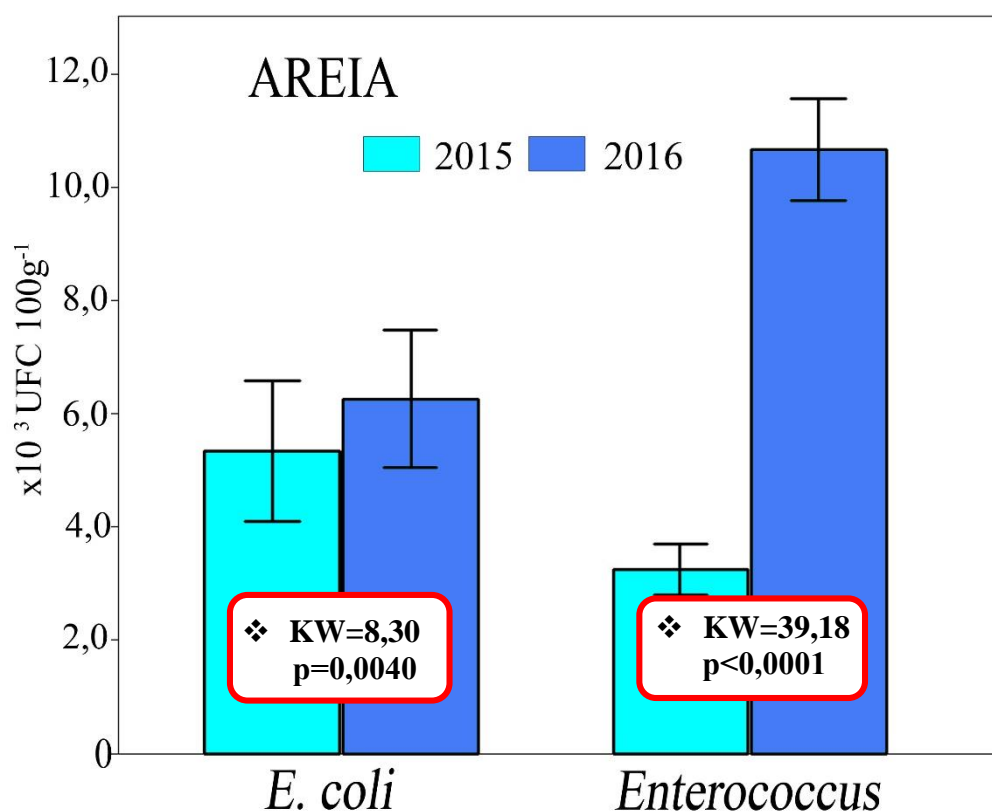


Figura 24: Valores médios das densidades de *E. coli* e *Enterococcus* sp. analisados por ano de coleta, com unidade expressos em  $\times 10^3$  UFC  $100g^{-1}$ . Quadro em destaque representa resultado do teste estatístico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p) entre as densidades da espécie *E. coli* e *Enterococcus* sp. em relação por ano de coleta (2015 e 2016). ❖: representa diferença significativa.

Obteve-se um grande aumento na densidade das bactérias de *Enterococcus* spp. e da *E. coli* em 2016 em relação ao ano anterior (2015). Apesar das densidades nas areias

serem geralmente mais altas do que as observadas nas águas devido ao fenômeno de bioacumulação (MANCINI et al., 2005), a densidade de *Enterococcus* spp. em 2016 foi muito mais elevado, indicando que além da bioacumulação, provavelmente recebeu uma elevada descarga de efluente contendo este microrganismo (Figura 24). Esta elevada densidade mostrou diferença significativa entre os anos de 2015 e 2016 tanto para *E. coli* ( $p=0,0040$ ) e como para os *Enterococcus* spp. ( $p<0,0001$ ) (Figura 24).

Os dados foram separados por ano (2015 e 2016) de coleta e por estação (verão e inverno) para determinar a variação da densidade por período de coleta. A densidade de *E. coli* no verão de 2015 foi de  $5,7 \times 10^3$  UFC  $100g^{-1}$ , diminuindo no inverno ( $1,9 \times 10^3$  UFC  $100g^{-1}$ ), e no verão de 2016 apresentou a maior média entre os períodos ( $6,9 \times 10^3$  UFC  $100g^{-1}$ ), e diminuindo no inverno para  $5,5 \times 10^3$  UFC  $100g^{-1}$ , entretanto ainda apresentando densidade elevada em relação ao ano de 2015 (Figura 25).

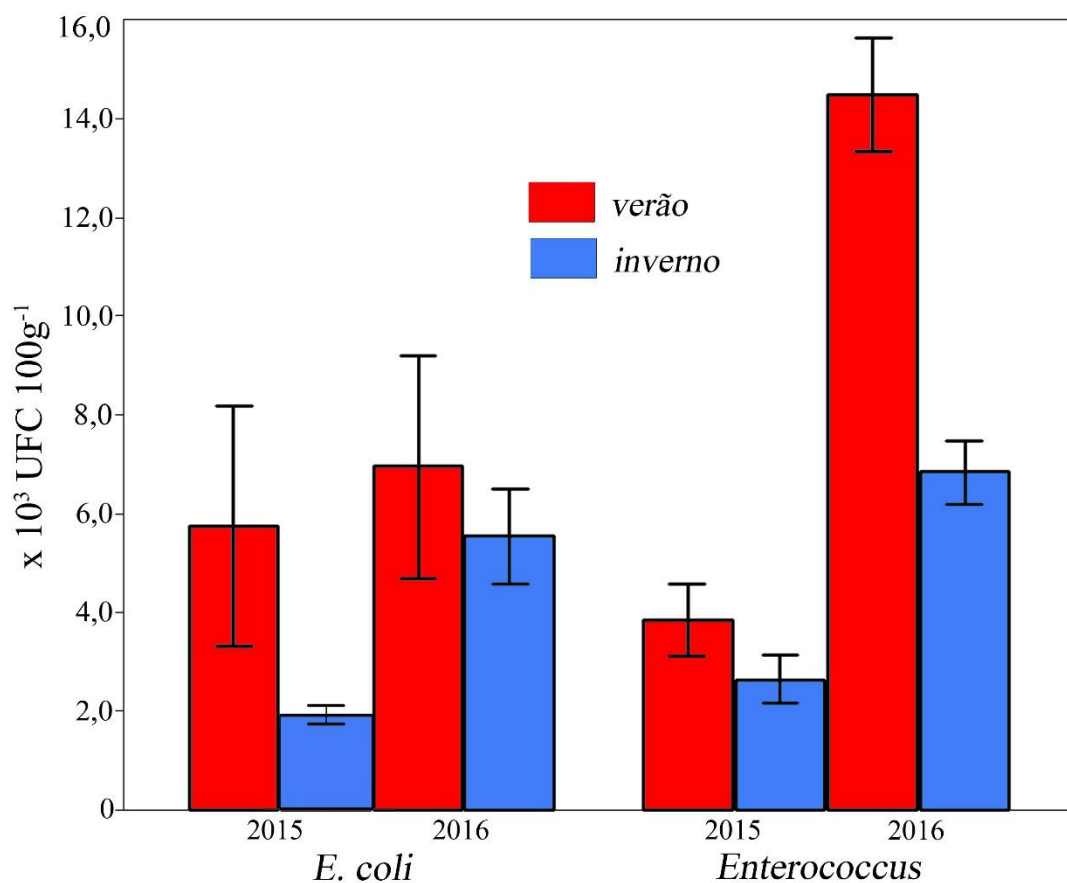


Figura 25: Variação das médias das densidades de *Escherichia coli* (*E. coli*) e *Enterococcus* spp. nas estações de verão e inverno de 2015 e 2016 nas amostras de areia e seus respectivos erros padrões. Unidade expressos em  $x10^3$  UFC  $100g^{-1}$ .

A Figura 25 representa a densidade média das bactérias *E. coli* e dos *Enterococcus* spp., nos períodos verão e inverno de 2015 e de 2016 nas amostras de areia. Tanto a *E. coli* como *Enterococcus* sp. apresentaram densidades maiores no verão e menores no inverno, entretanto no verão de 2016, a densidade de *Enterococcus* sp. foi muito mais elevada que os outros períodos, provavelmente ocasionado por ter recebido um aporte maior na época da coleta ou algum fator ambiental atípico, como a ressaca.

A análise bioquímica para determinar a espécie dos *Enterococcus* spp. seguiu os mesmos procedimentos das amostras de água. Foram testadas 25 cepas isoladas da areia, sendo que uma não foi possível concluir a leitura. Observou-se que a espécie *E. faecium* foi identificada 50% dos isolados seguido do *E. faecalis* com 25,0% das cepas amostradas (Tabela 15).

Tabela 15: Porcentagem das espécies de *Enterococcus* spp. identificados pela técnica bioquímica. (n) quantidades de cepas analisadas

	% das cepas (n=24)
<i>E. faecium</i>	50,0% (12)
<i>E. faecalis</i>	25,0% (6)
<i>E. gallinarum</i>	8,3% (2)
<i>E. duram</i>	8,3% (2)
<i>E. avium</i>	8,3% (2)

Todas as espécies identificadas bioquimicamente neste trabalho, tanto na água como na areia são consideradas patogênicas e estão associadas a infecções cutâneas. Assim como verificado nas amostras de água, a amostra da areia apresentou a predominância da espécie *E. faecium* seguido por *E. faecalis*, em menor proporção.

Similar resultado foi obtido por Oliveira e Pinhata (2008) que analisou a areia de praias recreacionais do Sudeste de Brasil e encontrou predominância nas espécies de *E. faecalis* e *E. faecium*, citando que a contaminação fecal das areias das praias foi principalmente de origem humana pois estas bactérias são mais específicas de humanos. Ferguson et al. (2005) descreve em seu trabalho a presença nas areias de praias de água doce e marinhas no sul da Califórnia, as espécies *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. durans*, e nos sedimentos marinhos, as espécies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. casseliflavus*

e *E. mundtii*, citando que elevados valores desta bactéria indicam retenção e possível ressurgimento no ambiente.

Elevada densidade de *Enterococcus faecium* foram isolados nas amostras de areia, seguido com menor proporção, *E. faecalis*. As grandes quantidades destas bactérias na areia indicam elevada contaminação por esgoto e efluentes não tratados, por serem consideradas bactérias fecais de origem humana (FEACHAM, 1975; FACKLAN; COLLINS, 1989).

#### **6.2.2.2. *Candida* spp.**

A Figura 26 apresenta as médias gerais das densidades obtidas para *Candida* sp. em amostras de areia. A levedura *C. tropicalis* foi a que apresentou maior densidade entre as espécies de *Candida* sp. (média geral de  $2,2 \times 10^3$  UFC  $100\text{g}^{-1}$ ). *C. krusei* apresentou as menores densidades nas amostras de areia, diferentemente das amostras de água (Figura 26), nas quais *C. glabrata* foi a levedura que apresentou menor densidade. No trabalho de Sato et al. (2005) nas amostras de areia de praias marinhas em São Paulo foram detectados concentração de  $3,4 \times 10^4$  UFC  $\text{g}^{-1}$ , densidades muito mais elevadas do que as encontradas neste trabalho.

Elevadas concentrações de leveduras nas areias podem ser explicados pela natureza das partículas de areia oferecem micro-habitats protegidos (fendas e rachaduras), ricas em nutrientes fornecendo locais para sobrevivência e crescimento, e pelo fato da areia filtrar os microrganismos da coluna de água durante o ciclo da maré e aprisionar células provenientes de escoamento de águas superficiais (VOGEL et al., 2007).

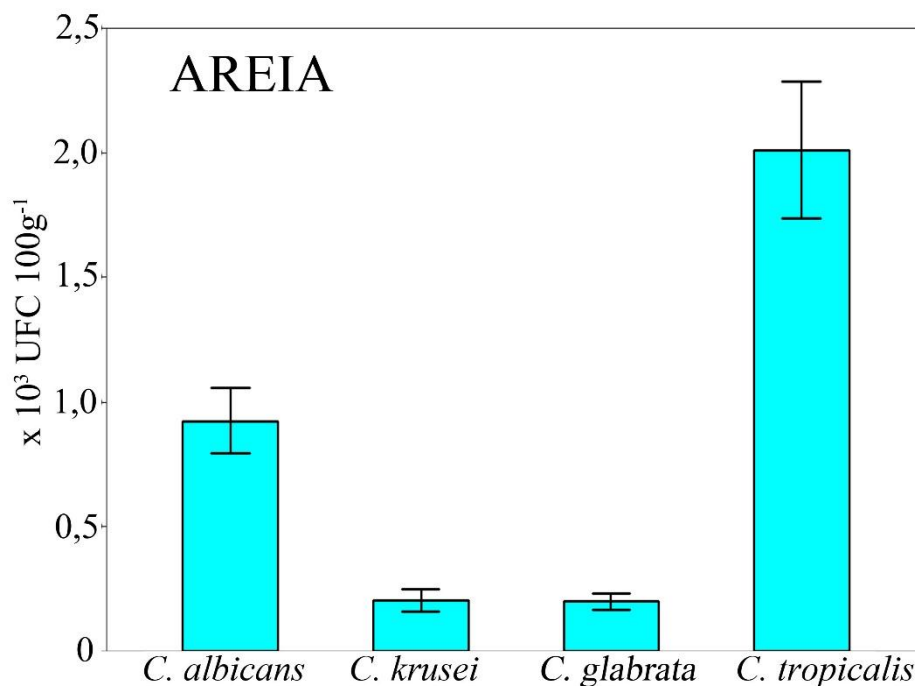


Figura 26: Valores médios dos microrganismos analisados no sedimento ( $\times 10^3$  UFC  $100\text{g}^{-1}$ ) e seu erro padrão representado pelas barras. Microrganismos: *C. albicans*: *Candida albicans*; *C. krusei*: *Candida krusei*; *C. glabrata*: *Candida glabrata*; *C. tropicalis*: *Candida tropicalis*.

No trabalho de Pinhata (2007) os resultados foram similares, onde foram detectadas *C. tropicalis* e *C. krusei* com maior frequência nas areias das praias do Guarujá, e menor frequência as espécies *C. albicans* e *C. glabrata*. Vogel et al. (2007) também cita a *C. tropicalis* como a levedura mais comum em praias do sul da Flórida e atribuiu esse resultado à intensa atividade humana nas praias.

A levedura *C. tropicalis* foi isolada normalmente em animais de homeotérmicos (KURTZMAN; FELL, 1998) e é uma das três espécies de *Candida* não-albicans mais isoladas em hospitais (BINELLI et al., 2006; COLOMBO et al., 2007; NUCCI; COLOMBO, 2007; MIRANDA et al., 2009), geralmente em culturas de sangue e urina (KAUFFMAN et al., 2000; ALVAREZ-LERMA et al., 2003). Baseada na incidência desta levedura no organismo humano, proporcionalmente são encontrados também no ambiente onde são frequentados pelos homens. Esta levedura tem a capacidade de sobreviver por mais tempo no ambiente e crescer nas areias (VOGEL et al., 2007), confirmando os resultados achados neste trabalho, no qual a densidade da *C. tropicalis* foi muito mais elevada em relação às outras leveduras (Figura 26).

A *C. albicans* foi a segunda levedura que apresentou maior densidade nas areias, com  $0,9 \times 10^3$  UFC  $100\text{g}^{-1}$  (Figura 26). Esta espécie apresenta capacidade de aderência a diferentes mucosas e epitélios, e são termotolerantes (SILVA et al., 2012). É uma das leveduras mais isoladas em infecções superficiais e invasivas (SILVA et al, 2012), apresentando assim, resultados similares a *C. tropicalis*, onde são isolados com maior frequência em locais com alta taxa de freqüentadores da praia. Entretanto, esta levedura pode apresentar alta taxa de mortalidade, sendo indicado como indicador de contaminação imediata (PINHATA, 2007). Esta característica pode explicar a densidade de *C. albicans* apresentar menor densidade na areia em relação a *C. tropicalis* neste trabalho.

Hagler, De Oliveira e Mendonça-Hagler (1982) relatam uma elevada densidade de levedura em sedimentos da região entremaré de locais poluídos do estuário, ao longo da Ilha do Fundão, no Rio de Janeiro, com a maior presença de *Pichia kudriavzevii* (= *Candida krusei*). Apesar desta espécie não ser bem adaptada às condições marinhas, podem ser encontradas em ambientes com presença de contaminação doméstica (MEYERS; AHEARN, 1974).

No verão foram detectadas que as leveduras *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* apresentaram densidades menores em relação ao inverno, entretanto as densidades de *C. albicans* no verão foram maiores do que o inverno (Figura 27).

Papadakis et al. (1997) e Kishimoto e Baker (1969) citaram em seus trabalhos maiores densidades de leveduras no verão, pelo aumento da população em contato com a praia, corroborando com os dados encontrados para *C. albicans*. Dados divergentes foram observados entre as outras espécies de *Candida* em que a densidade no inverno foi superior a do verão, resultado que pode ter sido influenciado pelas variações abióticas do ambiente. Estatisticamente, verificou-se que somente a densidade *C. krusei* apresentou diferença significativa (KW=20,15,  $p < 0,0001$ ) entre os dados coletados no verão e no inverno, indicando uma grande variação na densidade entre os períodos analisados (Figura 27).

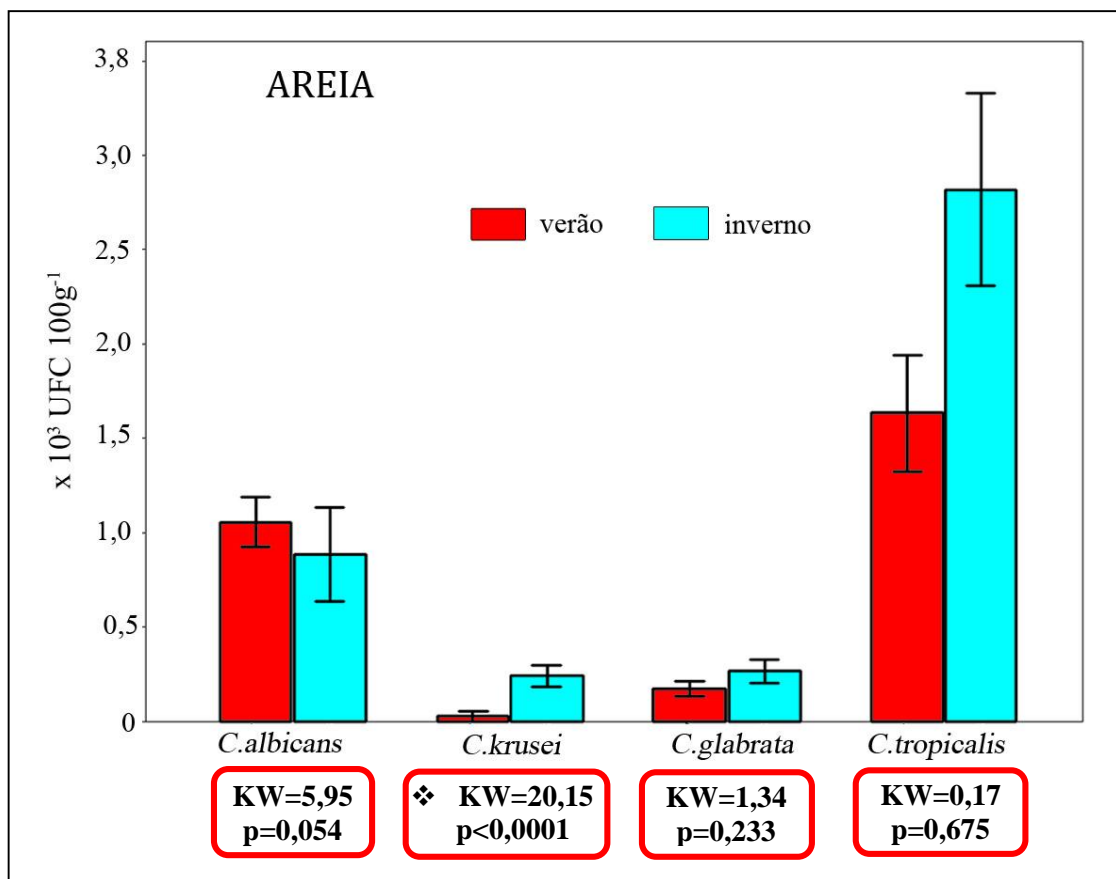


Figura 27: Valores médios dos microrganismos analisados na areia ( $\times 10^3$  UFC  $100\text{g}^{-1}$ ) no verão e no inverno, e seus respectivos erros padrões representado pelas barras. Microrganismos: *C. albicans*: *Candida albicans*; *C. krusei*: *Candida krusei*; *C. glabrata*: *Candida glabrata*; *C. tropicalis*: *Candida tropicalis*. Quadro vermelho em destaque representa resultado do teste estatístico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p), diferença entre as densidades das espécies de *Candida* sp. em relação ao período (verão-inverno). ❖: representa diferença significativa.

Diversos trabalhos descrevem a presença e identificação das leveduras encontradas nos sedimentos de ambientes marinhos no mundo (NAGAHAMA, 2006; LI et al., 2008; ESSIEN; ANTAI; BENSON, 2010; CHI et al., 2012; KANDASAMY; ALIKUNHI; SUBRAMANIAN, 2012) como no Brasil (HAGLER; DE OLIVERA; MENDONCA-HAGLER, 1982; LOUREIRO et al., 2005 e 2011; PINHATA, 2007; ARAÚJO; HAGLER, 2010), destacando o gênero *Candida* como a mais frequentemente encontrada, à semelhança do que foi obtido neste trabalho.

Em relação aos anos analisados, *C. albicans* apresentou densidade maior em 2015 e uma pequena queda no seguinte ano (Figura 28), enquanto que a densidade das outras espécies de *Candida* aumentaram em 2016, sugerindo aumento da contaminação por efluentes domésticos em 2016. As leveduras *C. krusei* e *C. glabrata* foram os que menos



foram detectados neste trabalho, entretanto, também foram observados aumento na densidade em 2016 (Figura 28).

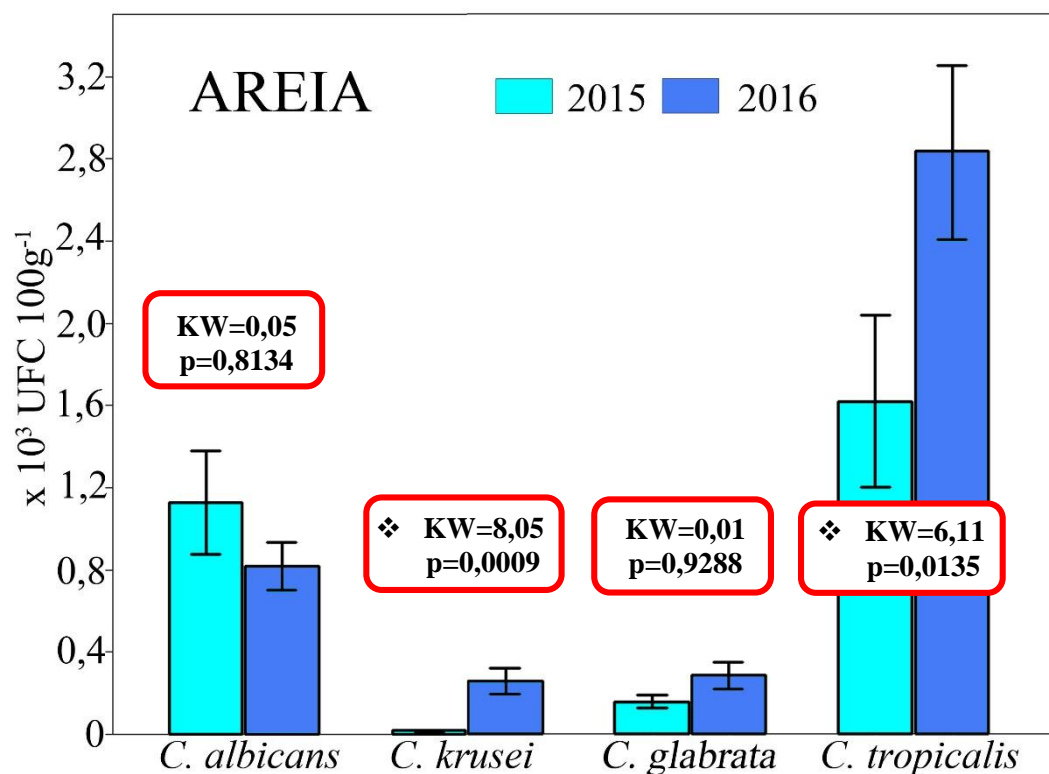


Figura 28: Comparação da média das densidade das leveduras na areia, separado por ano e seus respectivos erros padrões representado pelas barras. Microrganismos: *C. albicans*: *Candida albicans*; *C. krusei*: *Candida krusei*; *C. glabrata*: *Candida glabrata*; *C. tropicalis*: *Candida tropicalis*. Quadro vermelho em destaque representa resultado do teste estatístico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p), diferença entre as densidades das espécies de *Candida* sp. em relação ao período (verão-inverno). ❖: representa diferença significativa.

No resultado das amostras de areia, o teste estatístico Kruskal-Wallis mostrou diferença significativa entre os anos de 2015 e 2016 somente na *C. krusei* (p=0,0009) e *C. tropicalis* (p=0,0135) (Figura 28), indicando grande diferença entre as densidades de 2015 e 2016.

Entre as densidades de *Candida* spp., apesar de apresentarem densidades relativamente pequenas, observou-se a presença destas leveduras em todo o período estudado (Figura 29). *C. krusei* foi a que apresentou menor densidade, sendo que no verão de 2015 ( $0,6 \times 10^1$  UFC 100g<sup>-1</sup>) quase não foi detectado, entretanto, constatou-se que

a densidade foi aumentando ao longo do trabalho, indicando densidade de  $0,5 \times 10^1$  UFC  $100g^{-1}$  na última amostragem (inverno de 2016) (Figura 29).

A densidade de *C. tropicalis* foi baixa no verão de 2015 ( $0,3 \times 10^3$  UFC  $100g^{-1}$ ), aumentou e manteve-se próximo a  $2,8 \times 10^3$  UFC  $100g^{-1}$  nos períodos seguintes, decaindo pouco no inverno de 2016 ( $2,7 \times 10^3$  UFC  $100g^{-1}$ ) (Figura 29). Não foi observado um padrão referente à estação do ano, variando conforme a espécie de levedura. *C. albicans* foi a levedura que mais se manteve estável nas contagens, apesar das variações sazonais e temporais (Figura 29).

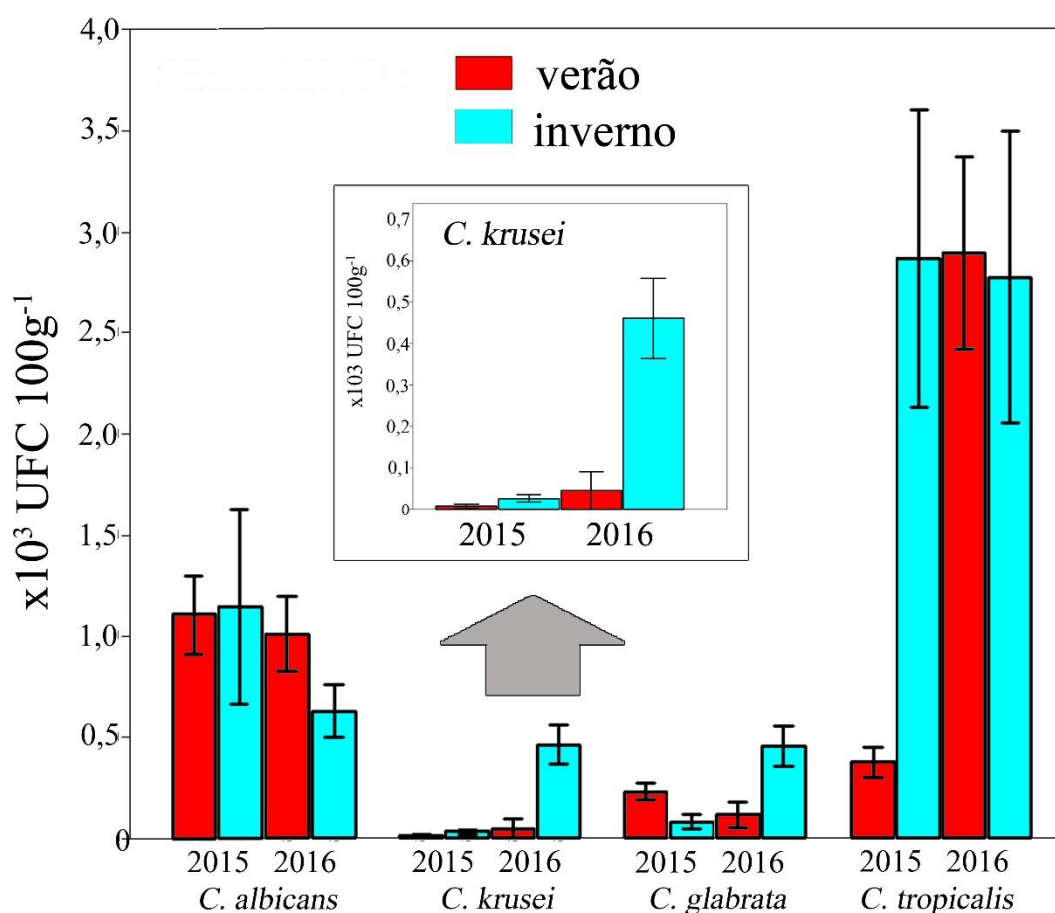


Figura 29: Valores médios das densidades do gênero *Candida* entre os verões e invernos de 2015 e 2016 na areia, sendo expressas em  $x10^3$  UFC  $100g^{-1}$  e seus respectivos erros padrões representado pelas barras. Destaque no quadro para os microrganismos que apresentaram valores médios baixos. Microrganismos: *C. albicans*: *Candida albicans*; *C. krusei*: *Candida krusei*; *C. glabrata*: *Candida glabrata*; *C. tropicalis*: *Candida tropicalis*.

Não foram observados padrões temporais (verão e inverno) e anual nas densidades de *Cândida* spp., sendo que cada espécie apresentou diferentes variações nos períodos amostrados. Em estudos nas águas limpas, *C. tropicalis* e *C. krusei* foram as espécies que mais se destacaram nas comunidades, independentemente de ser marinho ou dulcícola (KUTTY; PHILIP, 2008).

### 6.2.2.3. Fungos filamentosos

A média da densidade dos fungos filamentosos na areia foi de  $3,7 \times 10^4$  UFC  $100\text{g}^{-1}$  variando entre  $0,4 \times 10^4$  UFC  $100\text{g}^{-1}$  e  $42,5 \times 10^4$  UFC  $100\text{g}^{-1}$  (Figura 30). A densidade obtida neste trabalho foi inferior em relação ao trabalho de Larrondo e Calvo (1989) e Alerj (2006). O trabalho de Larrondo e Calvo (1989) analisou densidades de fungos nas areias das praias da costa do Mediterrâneo e obteve densidade variando entre 15 UFC  $\text{g}^{-1}$  e  $76 \times 10^5$  UFC  $\text{g}^{-1}$ . Alerj (2006) examinou presença de parasitos, coliformes totais, termotolerantes e fungos nas areias provenientes da Praia de Copacabana (Rio de Janeiro/RJ), encontrando densidades destes microrganismos entre  $10^5$  a  $10^6$  UFC  $50\text{g}^{-1}$  nas amostras analisadas.

Os fungos encontrados nos sedimentos foram descritos como sendo importantes pelo seu papel no processamento de matéria orgânica detrital dos vegetais (CARLILE; WATKINSON; GOODAY, 2001) e ativos na decomposição de compostos orgânicos, tanto na areia como na água (HARLEY, 1971; MOORE-LANDECKER, 1996).

Apesar de Brandão et al. (2002) citar em seu trabalho que as maiores densidades de fungos filamentosos nas águas e nas areias foram encontradas nas épocas de alta temporada (verão), valores diferentes foram constatados neste trabalho em que a densidade de fungos no inverno foi muito mais elevada em relação ao verão (Figura 30).

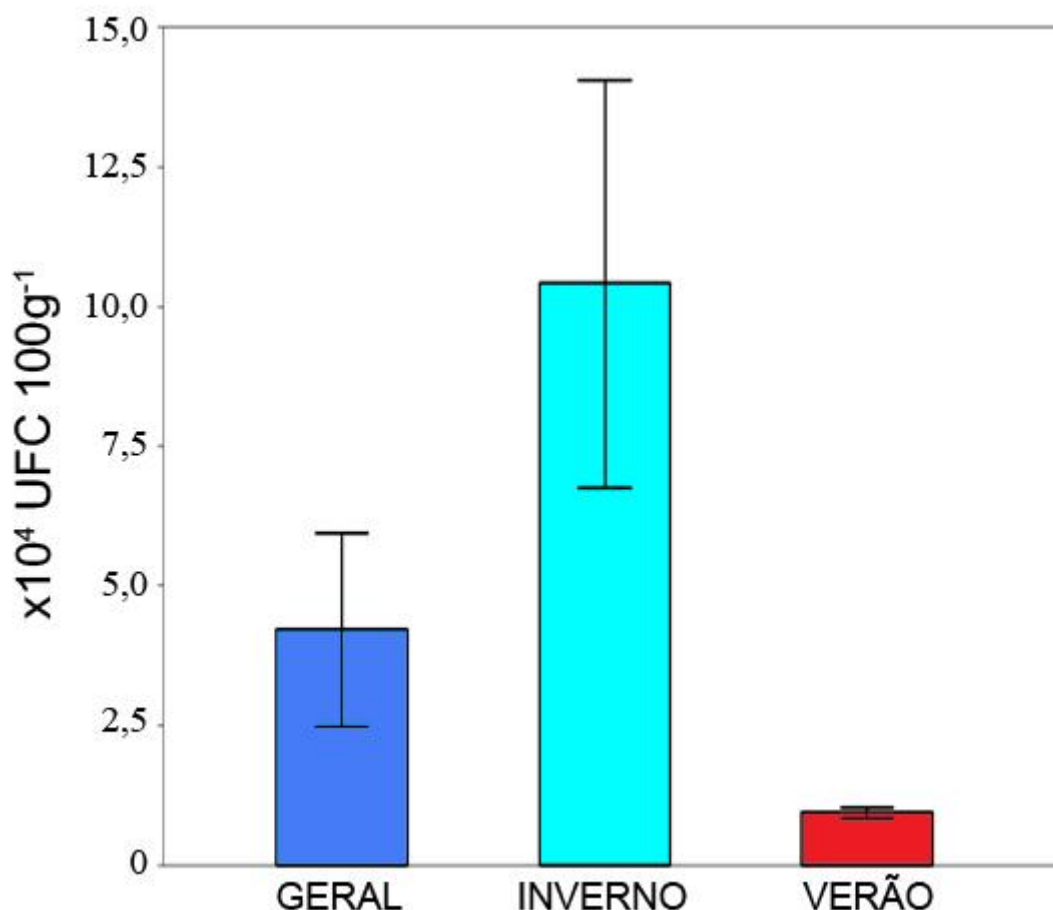


Figura 30: Média das densidades dos fungos filamentosos com seus devidos erros padrões, comparados pela estação do ano (verão e inverno). Expresso em  $\times 10^4$  UFC  $100\text{g}^{-1}$ .

Comparando as densidades de bactéria *E. coli*, *Enterococcus* sp e fungos filamentosos, verificou que houve diferença significativa entre as densidades de *E. coli* e fungos filamentosos (KW=30,38,  $p < 0,0001$ ) e entre *Enterococcus* spp. e fungos filamentosos (KW=19,23,  $p < 0,0001$ ) (Figura 31). A densidade dos fungos filamentosos na areia ( $37,0 \times 10^3$  UFC  $100\text{g}^{-1}$ ) apresentou média muito mais elevada enquanto as bactérias representaram em média na casa dos  $10^3$  ( $4,7 \times 10^3$  de *E. coli* e  $9,4 \times 10^3$  UFCg<sup>-1</sup> de *Enterococcus* sp.) (Figura 31).

Apesar de pequena diferença na densidade entre as bactérias, houve diferença significativa entre eles (KW=10,24,  $p < 0,001$ ). Divergentes dados foram citados em Mancini et al. (2005) em que analisou diversas praias na costa da Itália para a densidade de bactérias e fungos na areia e não foram encontradas correlações entre eles, mas

descrevem a importância da análise da qualidade das areias por representar um maior percentual destes microrganismos em relação à água.

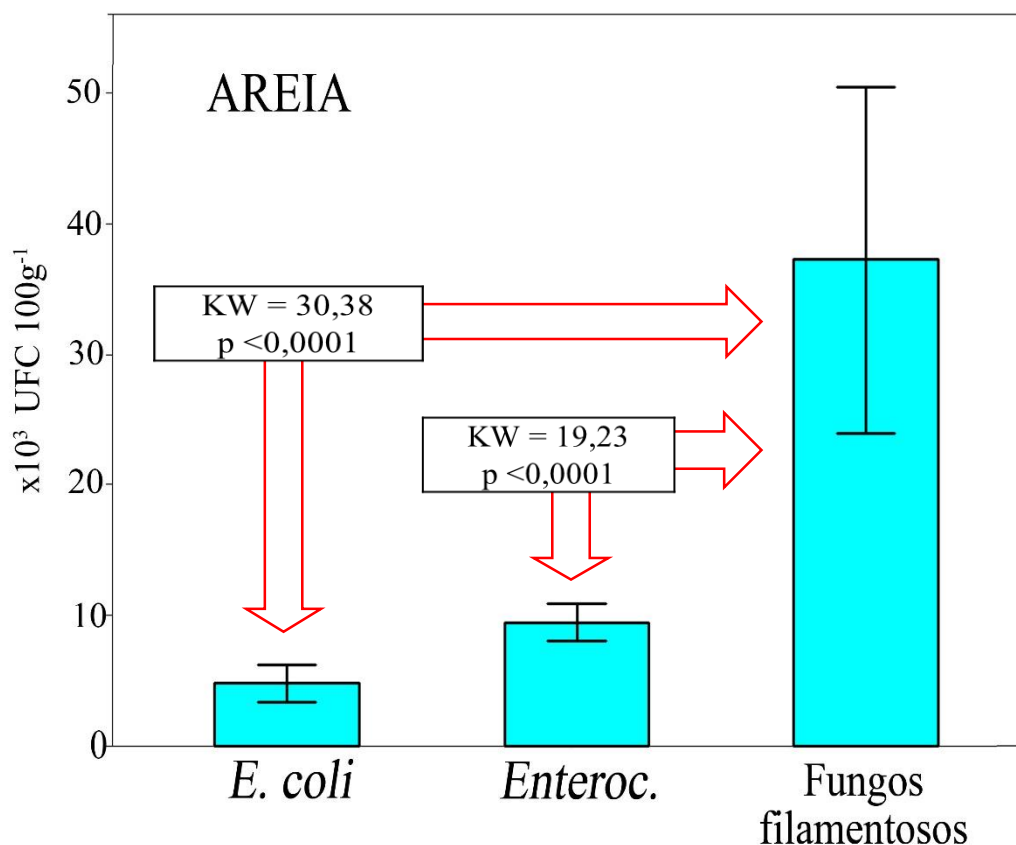


Figura 31: Comparação das médias das densidades entre as bactérias *E. coli*, *Enterococcus* spp. e dos fungos filamentosos, expressos em  $\times 10^3$  UFC  $100g^{-1}$ . Quadro em destaque representa o resultados do testes estatístico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p) entre as densidades da espécie *E. coli* e *Enterococcus* spp. em relação à densidade de fungos filamentosos nas amostras de areia.

Por meio do teste de Correlação de Spearman, observou-se que houve correlação entre as bactérias estudadas e os fungos filamentosos, seguindo classificação descrito na Tabela 6), Verificou-se correlação fraca positiva (FRC) entre a densidade de bactéria *E. coli* e densidade de fungos ( $r=0,64$ ) (Tabela 16), indicando que quando aumentar a densidade das *E. coli*, as densidades dos fungos também vão aumentar. Os *Enterococcus* spp. resultou em correlação fraca negativa ( $r= -0,49$ ) em relação à densidade de fungos, apesar de existir significância ( $p=0,008$ ), a correlação de Spearman indica que a relação é fraca negativamente entre eles.

Tabela 16: Resultado da correlação de Spearman relacionando a densidade das bactérias *E. coli* e *Enterococcus* spp. e dos fungos filamentosos.

	r	p
<i>E. coli</i> x fungos filamentosos	<b>0,6408</b>	0,002
<i>Enterococcus</i> spp. x fungos filamentosos	<b>-0,4929</b>	0,008

Obs.: Os valores acima de correlação fraca (FRC) estão destacados em negrito na Tabela.

Resultados similares foram citados em relação à correlação entre os diferentes microrganismos encontrados no ambiente, seja entre bactérias e fungos, ou leveduras. Bonadonna et al. (2002) estudou as densidades de bactérias e fungos na Itália, em que cita correlação entre leveduras e fungos filamentosos e entre *E. coli* e *Enterococcus* spp. Sabino e colaboradores (2011) estudaram a ocorrência de fungos nas areias das praias marinhas de Portugal e descreve a correlação positiva entre as leveduras e coliformes totais, mas não foram encontradas entre outras bactérias fecais.

### 6.2.3. Comparação Água e Sedimento

Apesar da Baía do Araçá apresentar características de praia e salinidade inferior a 30, a presença de bactérias indicadoras de contaminação fecal foi elevada, indicando uma região que recebe aportes de efluentes, contaminando a água e areia. Utilizou-se o teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p) para comparar o nível de contaminação da bactéria *E. coli*, *Enterococcus* sp. e densidades das espécies *Candida*, obtidos entre as amostras da água e da areia.

No geral, verificou-se que a densidade das bactérias *E. coli* e *Enterococcus* sp. na areia foi muito maior em relação ao encontrado na água, diferindo estatisticamente, com nível de significância  $p < 0,05$  (para *E. coli* o valor foi  $KW=82,19$ , para *Enterococcus* sp. o valor foi de  $KW=107,40$ ) (Tabela 17). Estudos realizados analisando a qualidade microbiológica das praias determinando as densidades de bactérias de origem fecal nas águas e nas areias das praias, obtiveram maiores densidades de microrganismos na areia em relação à coluna d'água (ALM; BURKE; SPAIN, 2003; ELMANAMA et al., 2005; OLIVEIRA; PINHATA, 2008; PINTO; OLIVEIRA, 2011).

Estudo de Craig, Fallowfield e Cromar (2004) analisaram a sobrevivência da *E. coli* em microcosmos simulando três diferentes ambientes costeiros, analisando a água e

sedimento, concluindo que a sobrevivência mais prolongada foi constatada nos sedimentos, o que pode implicar no risco aumentado de exposição à este microrganismo.

Pinto, Pereira e Oliveira (2012) analisaram água, areia úmida e seca da praia do litoral de São Paulo para presença de microrganismos patogênicos. Segundo estes autores a densidade de microrganismos na areia seca, areia úmida e água apresentam valores diferentes, sendo a areia seca a mais contaminada e a água que apresenta menor densidade de microrganismos e que a densidade de microrganismos aumenta no verão devido ao afluxo de turistas, além do tamanho dos grãos do sedimento (CRAPEZ, 2002) e quantidade de matéria orgânica (OLIVEIRA et al., 2007) pode agregar os microrganismos no sedimento.

Tabela 17: Resultados do teste estatístico Kruskal-Wallis (KW) a 95% de significância (p) entre as densidades da espécie *E. coli* e *Enterococcus* spp. em comparando os compartimentos água e areia na visão geral, no verão, no inverno e por ano 2015 e 2016.

água x areia	<i>E. coli</i>		<i>Enterococcus</i> sp.	
	KW	p	KW	p
geral	82,19	<0,0001	107,40	<0,0001
verão	26,06	<0,0001	58,67	<0,0001
inverno	57,79	<0,0001	47,34	<0,0001
2015	44,21	<0,0001	55,90	<0,0001
2016	38,94	<0,0001	58,23	<0,0001

Houve diferenças significativas com percentagem de significancia  $p < 0,0001$  entre as densidades das bactérias coletadas no verão em relação a amostras de água e da areia, tanto para *E. coli* (KW=26,06), como para os *Enterococcus* spp. (KW=58,67), sendo os maiores valores encontrados nas amostras de areia. O mesmo resultado foi obtido nas amostras coletadas no inverno das bactérias *E. coli* (KW=57,79) e *Enterococcus* spp. (KW=47,34) e quando analisados os dados separadamente por ano coletado (Tabela 17). Todas as análises indicaram diferença significativa entre as densidades de bactérias encontradas na água e na areia, sendo que na areia os valores foram muito mais elevados.

São encontradas altas densidades de microrganismos nas areias pelo fato de filtrar estes microrganismos da coluna de água e aprisionar as células entre os espaços, servindo como micro-habitats que protegem e fornecem nutrientes para sobrevivência e crescimento (VOGEL et al., 2007). As elevadas densidades de *Enterococcus* spp.

observadas tanto nas águas como nas amostras de areias, podem ser explicadas pela capacidade de tolerar maior variação ambiental (BRASIL, 2000).

Os valores da densidade média da *E. coli* na areia foi muito maior em relação ao da água, observado diferença estatística entre eles no ano de 2015 (KW=44,21,  $p < 0,0001$ ). Este resultado foi obtido no ano de 2016 para esta bactéria, e igual resultado da bactéria *Enterococcus* spp. em que a densidade da areia foi muito maior em relação ao da água (Tabela 17).

No geral, foram detectadas diferenças significativas entre as densidades das leveduras *Candida albicans* (KW=99,43), *C. tropicalis* (KW=42,49) e *C. glabrata* (KW=13,43), sendo as maiores densidades encontradas nas amostras de areia. Exceto *C. krusei* não houve diferença significativa entre as amostras de água e areia por ser a levedura que apresentou densidades baixas neste trabalho e indicando pouca diferença entre os compartimentos analisados (Tabela 18).

Este mesmo resultado foi obtido no período do verão, apresentando diferenças entre as densidades de leveduras nas águas e nas areias, exceto das *C. krusei*, entretanto no inverno esta levedura apresentou diferença significativa entre as amostras. *C. krusei* apesar da densidade detectada ser bem inferior ao das outras leveduras, constatou no inverno uma elevada densidade na areia em comparação ao da água, detectando diferenças significativas entre os compartimentos.

Tabela 18: Valores resultantes da análise estatística Kruskal-Wallis (KW) comparando as densidades das *Candidas albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* encontrados na água e na areia, no geral, no verão, inverno, e por ano 2015 e 2016. Nível de significância de  $p < 0,05$ .

água x areia	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>	
	KW	p	KW	p	KW	p	KW	p
geral	99,43	<0,0001	0,72	0,33	13,43	0,0117	42,49	<0,0001
verão	53,55	<0,0001	0,71	0,1596	2,19	0,1277	38,22	<0,0001
inverno	43,26	<0,0001	6,92	0,0069	12,61	0,0003	11,41	0,0007
2015	53,06	<0,0001	0,003	0,9455	17,24	0,0071	16,80	0,0115
2016	45,18	<0,0001	28,19	0,0735	1,37	0,2253	28,01	<0,0001

Em uma análise separada por ano, foram detectadas diferenças significativas entre as densidades das leveduras *Candida albicans* nos dois anos (2015: KW=53,06 e 2016: KW=45,18) e *C. tropicalis* (2015: KW=16,80 e 2016: KW=28,01). Constatou diferença



significativa da densidade de *C. glabrata* ente a água e areia no ano de 2015 (KW=17,24), mas não houve diferença no ano de 2016 (KW=1,37), sendo as maiores densidades encontradas nas amostras de areia, mas não diferindo muito nas densidades encontradas.

Exceto a levedura *C. krusei*, não houve diferença significativa entre as amostras de água e areia nos dois anos analisados por ser a levedura que apresentou densidades baixas em todo período deste trabalho e indicando pouca diferença entre os compartimentos analisados (Tabela 18).

A densidade elevada encontrada nas areias das leveduras tem a mesma explicação das descritas nas bactérias. Vogel et al. (2007) descreve a areia como um material que filtra e aprisiona os microrganismos nos espaços, fornecendo abrigo e nutrientes para sobrevivência e crescimento destes organismos. O trabalho de Meyers e Ahearn (1974) relataram que *C. krusei* não é uma espécie bem adaptada às condições marinhas, entretanto Kutty e Philip (2008), cita que as leveduras *C. tropicalis* e *C. krusei* são as espécies que mais se destacaram nas comunidades aquáticas, independentemente de ser marinho ou dulcícola.

Verificou-se que a densidade dos fungos filamentosos na areia foi muito mais elevada na média total em comparação com a água, constatando diferença significativa entre a densidade de água e areia dos fungos filamentosos (KW=36,65,  $p < 0,0001$ ). Ghinsberg et al. (1994) estudaram as águas e areias em praias de Tel Aviv e descreve a que presença desses microrganismos na areia têm densidade maior que na água, além de sugerir que podem ser prejudiciais à saúde, podendo provocar doenças nas pessoas que têm contato com a água e a areia.

Realizou-se a Análise de correspondência Canônica (CCA) para analisar a relação entre as variáveis abióticas mensuradas neste trabalho com a densidade de bactérias e as leveduras do gênero *Candida* isolados da água (Figura 32). O Eixo 1 explicou 51,6% da variabilidade da densidade dos microrganismos, positivamente relacionado com a pluviosidade que se apresentou maiores densidades de *E. coli*, *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*. Em oposição, projetam-se negativamente no eixo 1 as variáveis salinidade, pH, OD, e as densidade das espécies de *Enterococcus* spp. e *Candida tropicalis*.

Para *E. coli* que está a direita do eixo1, apresentou relação inversa com pH, salinidade e OD, indicando que a densidade desta bactéria diminui com o aumento dos valores dos variáveis citados. *Candida albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* revelaram

associação inversa em relação ao parâmetro salinidade, OD e pH. Para estas leveduras, o aumento da salinidade influenciou negativamente na densidade encontrada, e para a *E. coli*, a pluviosidade foi o que apresentou maior influência positiva nas amostras coletadas na água.

O Eixo 2 explicou 40,6% da variável ambiental, no qual mostrou correlação negativa com as variáveis salinidade, temperatura, pluviosidade, e OD, e as bactérias *E. coli* e *Enterococcus spp.* As espécies de *Candida* mostraram correlação positiva com o parâmetro pH. Este eixo dividiu os microrganismos em espécies de *Candida* nas correlações positivas e as bactérias em uma correlação inversa ao das leveduras (Figura 32).

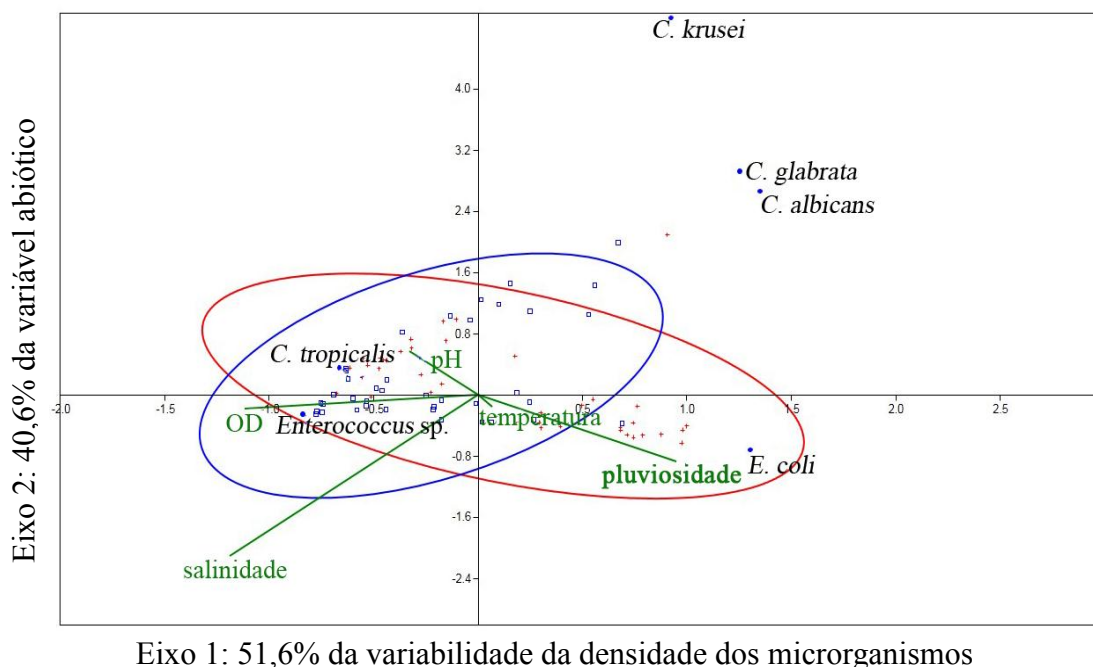


Figura 32: Análise de Correspondência Canônica entre variáveis ambientais mensurados e a densidade de microrganismos na água. Obs.: Temp. - Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ); pH - potencial hidrogenionico; salin - salinidade, OD - oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ ) e pluvios. - pluviosidade (mm). Enter. - *Enterococcus spp*; *C. alb.* - *C. albicans*; *C. trop.* - *Candida tropicalis*; *C. alb.* - *Candida albicans*; *C. glabr.* - *Candida glabrata*. Pontos vermelhos - verão; pontos azuis - inverno.

### 6.3. Resultados Microbiológicos e a Legislação nos corpos d'água

As densidades de *E. coli* obtidas no presente estudo, foram analisadas de acordo com a legislação vigente para águas classe 1 (BRASIL, 2005), que dispõe sobre a qualidade da água para diversos usos, dentre eles atividades de pesca e preservação da

comunidade aquática. Como a água também é utilizada para uso recreativo de contato primário, as densidades de *E. coli* e *Enterococcus* spp. foram analisados de acordo com a legislação CONAMA 274/2000 (o mesmo critério de CONAMA 357/2005 para este uso descrito na Tabela 1).

A Tabela 19 apresenta as médias geométricas das densidades dos microrganismos indicadores de contaminação no período estudado (2015, 2016), para a avaliação da qualidade microbiológica da água em relação à legislação vigente. Foram analisadas as quantidades de amostras que apresentaram acima do limite estabelecido pelas normas vigentes, e estas foram descritas em porcentagem entre parênteses, sendo os valores limites de *E. coli*  $\leq 8,0 \times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup> para CONAMA 357/2005 e CONAMA 274/2000 e para *Enterococcus* spp. valores  $\leq 1,0 \times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup> (BRASIL, 2000). Foram incluídos nesta tabela os valores limites para classificar a água como “própria”, da densidade de *E. coli* para CONAMA 357/2005 e CONAMA 274/2000 para densidade de *Enterococcus* spp. expressos em  $\times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup>, como referência para comparação.

Tabela 19: Densidade em média geométrica de *E. coli* e *Enterococcus* spp. da água (expressos em  $\times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup>) nos anos de 2015 e 2016. Referências dos valores limites das legislações citados nas colunas da direita de bactérias estabelecidos pela legislação.

Média geométrica	ÁGUA ( $\times 10^2$ UFC 100mL <sup>-1</sup> )		Referências - Média geométrica	CONAMA 357,	CONAMA 274
	ano 2015	ano 2016		classe 1 uso recreativo	
	x ± s	x ± s			
<i>E. coli</i>	0,7 ± 0,3 (*0)	1,8 ± 0,7 (*30,0%)		<8,0 em 80% das amostras (*)	
<i>Enterococcus</i> sp.	0,9 ± 0,3 (45,0%)	2,6 ± 0,9 (80,0%)			<1,0 em 80% das amostras

\* = porcentagem de amostras acima do limite estabelecido para *E. coli* de  $<8,0 \times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup>, e  $1,0 \times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup> para *Enterococcus* sp.

Analisando a densidade em média geométrica da bactéria *E. coli* no ano de 2015, resultou que a água estava dentro do limite estabelecido pela legislação, tanto em relação à densidade como na quantidade de amostras dentro dos valores limites. Mas no ano de 2016 verificou um aumento na densidade de bactérias indicadoras de contaminação fecal, tanto de *E. coli* como *Enterococcus* spp. A média geométrica da densidade de *E. coli* em 2015 foi de  $0,7 \times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup> para  $1,8 \times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup> em 2016, com 30% das

amostras ultrapassando o limite estabelecido, indicando que a água estava não estava apropriada para uso recreativo no ano de 2016 (Tabela 19).

Analisando a densidade da média geométrica de *Enterococcus* spp. em 2015, nota-se que o valor apresentou-se dentro dos limites ( $0,9 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ ), entretanto a quantidade de amostras que ultrapassa o limite foi elevado (45% da amostras acima do limite), não podendo ser classificada como “própria” para uso recreativo. Em 2016, tanto a média geométrica ( $2,6 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ ) como a quantidade de amostras acima do limite, a água seria classificada como “imprópria” para recreação.

A legislação CONAMA 274/2000 e CETESB (2017) utilizam os mesmos critérios no que diz respeito a avaliação da qualidade de águas recreacionais, em que considera *E. coli* e *Enterococcus* spp. como indicador microbiológico da qualidade de águas litorânea. A classificação seguiu-se os dados descritos na Tabela 1. Conforme CONAMA 274 (BRASIL, 2000), quando for utilizado mais de um indicador microbiológico, as águas terão as suas condições avaliadas, de acordo com o critério mais restritivo.

Para a análise da qualidade da água da Baía do Araçá, a bactéria *Enterococcus* sp. foi mais restritiva, sendo assim, utilizou-se os dados coletados deste microrganismo para determinar a classificação da água como “imprópria” tanto no ano de 2015 como em 2016.

Realizando uma análise mais detalhada separando por estação verão e inverno e nos anos de coleta, observou-se que na água a média geométrica de *E. coli* em 2015, tanto no verão como no inverno permaneceram dentro dos limites estabelecidos pela legislação vigente (Tabela 20). A densidade da *E. coli* apresentou valores menores no inverno em relação ao verão tanto em 2015 como em 2016, mas somente no verão de 2016 obteve-se amostras com densidades elevadas ultrapassando o limite estabelecido.

Em contrapartida a *Enterococcus* sp. apresentou elevados valores no inverno nos dois anos de análise em relação ao verão. Enquanto que na *E. coli* notou-se variação sazonal (densidades maiores no verão e inverso no inverno), os *Enterococcus* spp. foram aumentando a cada período (verão / inverno). Assim, a água pode ser classificada como “imprópria” para uso recreativo desde o inverno de 2015, utilizando o *Enterococcus* sp. como o microrganismo indicador de contaminação fecal mais restritivo (Tabela 20).

Tabela 20: Densidade em média geométrica de *E. coli* e *Enterococcus* spp. na água (expressos em  $\times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup>) durante o período do verão e inverno, e separados por ano (2015-2016). Quantidade de amostras acima do valor estabelecido descrito em % entre parênteses.

Média geométrica	ÁGUA	INVERNO		VERÃO	
		VERÃO 2015	2015	2016	INVERNO 2016
		x ± s	x ± s	x ± s	x ± s
<i>E. coli</i>		0,9 ± 0,6	0,6 ± 0,4	3,0 ± 1,1	1,1 ± 0,7
		(0%)	(0%)	(*50%)	(*15%)
<i>Enterococcus</i> spp.		0,4 ± 0,1	2,0 ± 0,5	2,3 ± 0,6	3,0 ± 0,6
		(*5%)	(*70%)	(*85%)	(*80%)

Legenda: x = média geométrica, s = erro padrão,

\* = porcentagem de amostras acima do limite estabelecido para *E. coli* de  $<8,0 \times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup>, e  $1,0 \times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup> para *Enterococcus* sp.

Comparando com valores estipulados pelas diretrizes internacionais em relação à balneabilidade da água, sendo indicados valores entre  $2,0 \times 10^2$  e  $5,0 \times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup> para *E. coli* e para *Enterococcus* spp. de  $1,75 \times 10^2$  e  $5,0 \times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup> para categoria satisfatória para recreação (descritas na Tabela 3), poderia ser classificada como própria em 2015 mas imprópria em 2016 pela quantidade de amostras com elevada densidade de *E. coli*. Entretanto, analisando a densidade de *Enterococcus* sp. observou-se que nos dois anos de pesquisa, a quantidade de amostras com densidade elevada desta bactéria classifica a água da praia como imprópria para recreação.

A legislação canadense (HEALTH CANADA, 2012) apresenta limites mais rígidos para as densidades de *E. coli* ( $2,0 \times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup>) e mais leve para *Enterococcus* spp. ( $1,75 \times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup>) comparando com a legislação brasileira. Segundo esta legislação canadense, para avaliar a qualidade da água como satisfatória para recreação, a densidade média ou 10% dos dados não podem ultrapassar este limite de  $2,0 \times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup> para *E. coli*.

Verificando os valores em relação às legislações internacionais, utilizando o limite da legislação mais restrigente, na análise geral a Baía do Araçá apresentou densidades de *E. coli* menores do limite estabelecido, entretanto analisando os valores das amostras resultou na porcentagem de dados com valores elevados muito maiores do que a estabelecida. O microrganismo que mais se destacou com elevada densidade foi o *Enterococcus* sp., ultrapassando o limite descrito pela legislação canadense em 2016, classificando a água como imprópria para uso recreativo.

A comparação dos dados com as diretrizes estrangeiras, tomando cuidado com particularidade de cada ambiente, pode auxiliar na melhor classificação da qualidade microbiológica do ambiente analisado, agregando informações para melhoria das resoluções nacionais.

Trabalhos de Sanchez et al. (1986) e Vieira et al. (2001) sugeriram verificar somente a presença ou ausência da *Candida albicans* nas águas de praias para caracterizar sua classificação. Apesar de inúmeros trabalhos indicarem presença de leveduras patogênicas do gênero *Candida* em águas e sedimentos de praias e estuários (MENDES; NASCIMENTO; OLIVEIRA, 1993; MEDEIROS, 2005), não constam limites estabelecidos para densidades de leveduras na água de uso recreacional como para pesca no Brasil. Neste presente trabalho, foram analisadas as densidades de leveduras do gênero *Candida* sp., na água, por ser considerado um microrganismo patogênico e de suma importância na área clínica.

Pinhata (2007) analisou areia seca e úmida das praias do município de Guarujá para presença de *Candida* e constatou densidades maiores nas areias secas e predomínio das espécies *C. krusei* e *C. tropicalis* nas suas análises. Pinto e Oliveira (2011) descreve valores limites sugeridos na literatura para gênero *Candida* e outros microrganismos para determinar a qualidade dos sedimentos e areias de praias, e sugere que programas de monitoramento sejam estabelecidos.

Observou-se que a densidade de *Candida* spp. na água, juntamente com as bactérias analisadas, resultaram em um grande aumento de 2015 para 2016, passando de  $0,1 \times 10^2$  para  $3,0 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ , sendo que no inverno apresentou média geométrica maior, com  $0,2 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$  em relação ao verão que foi de  $0,07 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ , em 2015. Entretanto em 2016, a densidade média geométrica do gênero *Candida* sp. manteve-se em  $0,3 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$  (Tabela 21).

Tabela 21: Densidade de *Candida* na água (expressos em  $\times 10^2$  UFC 100mL<sup>-1</sup>) durante o verão e inverno no geral e nos anos estudados (2015 e 2016).

		VERÃO	INVERNO	VERÃO	INVERNO
Média geométrica	ÁGUA	2015	2015	2016	2016
		$x \pm s$	$x \pm s$	$x \pm s$	$x \pm s$
	<i>Candida</i> sp.	$0,07 \pm 0,1$	$0,2 \pm 1,0$	$0,3 \pm 0,8$	$0,3 \pm 0,9$

Sendo: x = média geométrica, s = desvio padrão.

#### 6.4. Resultados Microbiológicos e a Legislação para areias de praias

Estudos realizados em Portugal verificaram a densidade de microrganismos considerados patogênicos (*e.g.* *E. coli* e *Candida* sp.) encontrados na areia e a partir dos resultados obtidos, foram sugeridos padrões e limites para definir a qualidade da região. Algumas das propostas sugeridas na literatura em relação a qualidade da areia de praia analisando a densidade de *E. coli* e *Enterococcus* spp. foram Mendes e colaboradores (1993) e Associação Bandeira Azul (ABAE, 2011), citando valores limites para a presença destas bactérias, incluindo a levedura *Candida* sp. por Mendes, Nascimento e Oliveira (1993) (valores descritos na Tabela 4).

Apesar destas propostas estarem sendo estudadas, não existe ainda um padrão ou limite baseado em estudos microbiológicos classificando a areia de uma praia como apropriada ou não para seu uso (BRASIL, 2000). Diversos trabalhos como de Pinto e colaboradores (2012) e Zampieri et al. (2017) analisaram a qualidade microbiológica das águas e areias das praias do litoral de São Paulo, analisando a densidade de *Enterococcus* sp., comparando os dois compartimentos. Estes resultados apresentaram valores maiores nas amostras da areia do que nos da água, indicando que a areia pode promover um risco maior à saúde dos frequentadores das praias do que a água, indicando a importância de uma regulamentação em relação à densidade de microrganismos encontrados na areia.

Neste presente trabalho foi constatado elevada densidade de *Enterococcus* spp. na areia em relação à *E. coli*, conforme descrito anteriormente. Na média geométrica geral, constatou-se densidade de *Enterococcus* sp. de  $2,3 \times 10^3$  UFC 100g<sup>-1</sup> em 2015, e  $9,1 \times 10^3$  UFC 100g<sup>-1</sup> em 2016, com uma média chegando a quase quatro vezes maior ao do ano anterior. A *E. coli* na areia apresentou valores menores que a *Enterococcus* spp., entretanto também apresentou elevação na densidade no segundo ano, passando de  $1,2 \times 10^3$  UFC 100g<sup>-1</sup> para  $3,1 \times 10^3$  UFC 100g<sup>-1</sup> em 2016 (Tabela 22). Os dados resultantes

deste trabalho podem servir como complemento para determinar valores limites para contaminação microbiológica da areia.

Observou-se que a densidade média geométrica da *E. coli* foi maior no inverno ( $2,7 \times 10^3$  UFC  $100\text{g}^{-1}$ ), diferentemente encontrado nos *Enterococcus* spp., no qual essa densidade foi observada no verão com  $6,2 \times 10^3$  UFC  $100\text{g}^{-1}$  (e mais detalhadamente no verão de 2016, com  $13,2 \times 10^3$  UFC  $100\text{g}^{-1}$ ) (Tabela 22).

Tabela 22: Densidade em média geométrica de *E. coli* e *Enterococcus* spp. na areia (expressos em  $\times 10^3$  UFC  $100\text{g}^{-1}$ ) nos anos 2015 e 2016, e por período verão e inverno.

Média geométrica	AREIA	2015		2016		VERÃO		INVERNO	
		2015		2016		2015		2016	
		x ± s	x ± s	x ± s	x ± s	x ± s	x ± s	x ± s	x ± s
	<i>E. coli</i>	1,2 ± 1,2	3,1 ± 1,2	0,8 ± 2,4	1,7 ± 0,1	2,2 ± 2,2	4,3 ± 0,9		
	<i>Enterococcus</i> spp.	2,3 ± 0,4	9,1 ± 0,9	2,9 ± 0,7	1,7 ± 0,5	13,2 ± 1,1	6,2 ± 0,6		

Onde: x = média geométrica, s = erro padrão.

Não constam limites estabelecidos no Brasil para densidades de leveduras na areia de uso recreacional. Neste presente trabalho, foram analisadas as densidades de leveduras do gênero *Candida*, na água como na areia, por ser considerado um microrganismo patogênico, que pode causar doenças aos banhistas e frequentadores das praias. As espécies de *Candida* detectadas neste trabalho foram calculadas utilizando os valores das densidades das espécies em conjunto para gerar médias geométricas e resultados não como espécie, mas como gênero *Candida*.

Similar aos dados encontrados nas densidade das bactérias, a *Candida* sp. apresentou menor valor em 2015 ( $0,3 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ ) e aumentou em 2016 ( $0,6 \times 10^2$  UFC  $100\text{mL}^{-1}$ ) (Tabela 23), semelhante ao observado nas amostras de água. Mendes et al. (1993) sugeriu limite de densidade para gênero *Candida* encontrados na areia como  $1,0 \times 10^3$  UFC  $100\text{g}^{-1}$ , portanto comparando os dados coletados neste trabalho não ultrapassaram este limite sugerido nos dois anos de análise, indicando que a areia pode ser classificada como boa/satisfatória para a presença desta levedura.

Analisando por período, verificou-se que a densidade média geométrica das *Candida* spp. estava dentro do valor indicados por Mendes et al. (1993), sendo somente



no verão de 2016 foi observado maior densidade ( $1,2 \times 10^3$  UFC  $100\text{g}^{-1}$ ), ultrapassando o limite sugerido (Tabela 23).

Tabela 23: Densidade em média geométrica do gênero *Candida* na areia (expressos em  $\times 10^3$  UFC  $100\text{g}^{-1}$ ), nos anos de 2015 e 2016 e por período do verão e inverno.

Média geométrica	AREIA	2015	2016	VERÃO	INVERNO	VERÃO	INVERNO
				2015	2015	2016	2016
		$x \pm s$	$x \pm s$	$x \pm s$	$x \pm s$	$x \pm s$	$x \pm s$
	<i>Candida spp</i>	$0,3 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,08$	$0,3 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,2$

Onde: x = média geométrica, s = erro padrão.

Pesquisas envolvendo as espécies das leveduras em vários ecossistemas aquáticos promovem a melhor compreensão do crescimento, desenvolvimento, potencial patogênico, auxiliando a determinar os microrganismos que possuem características como indicador de contaminação ambiental (GADANHO; SAMPAIO, 2004; ARAÚJO; HAGLER, 2010; LOUREIRO et al., 2011). A presença de leveduras foi citada também em área que recebe esgoto doméstico e industrial na Baía de Sepetiba, RJ (PAGNOCCA; MENDONÇA-HAGLER; HAGLER, 1989), sedimentos do manguezal (ARAÚJO; HAGLER, 2010; LOUREIRO et al., 2011), estuários (VAN UDEN; FELL, 1968; HAGLER; MENDONÇA-HAGLER, 1981; GADANHO; SAMPAIO, 2004). Os gêneros mais frequentemente observados nos habitats marinhos e estuários foram *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces* e *Rhodotorula* (KUTTY; PHILIP, 2008).

## 6.5. Diversidade de fungos

As colônias isoladas foram agrupadas pelas características macro e micromorfológica seguindo a literatura (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; HOUBRAKEN; DEVRIES; SAMSON, 2014; TALAIKHOZANI; PONRAJ, 2015) em três grupos distinguindo pelas estruturas fisiológicas que mais se destacaram, sendo elas a presença de vesícula no conidióforo, ausência de vesícula e formato diferencial do conídio.

Os fungos que apresentaram a característica presença de vesícula no conidióforo foram caracterizados como *Aspergillus* spp. Os fungos em que não foram observadas as vesículas, mas sim a estrutura métula foram agrupados como *Penicillium* spp. Os fungos que apresentaram outras características distintas, como formato diferencial do conídio, presença de rizoides, hifas septadas foram agrupadas no terceiro grupo.

Foram observadas características microscópicas do agrupado da espécie de *Aspergillus* sp. como os conidióforos alargados e arredondados no topo, formando uma vesícula volumosa coberta de fiálides e cadeias de conídios (Figura 33).

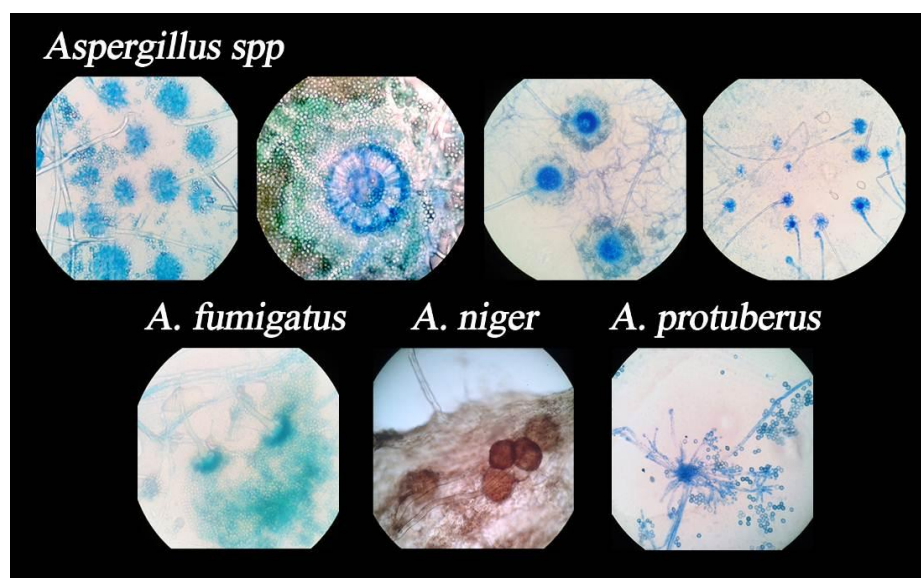


Figura 33: Fungos filamentosos da espécie *Aspergillus* sp. observadas em microscópio ótico, com aumento de 400x.

O fungo *Penicillium* sp. observados microscopicamente apresentou hifas septadas com conidióforos ramificados, métula, fiálide e as cadeias de conídios arredondados (Figura 34).

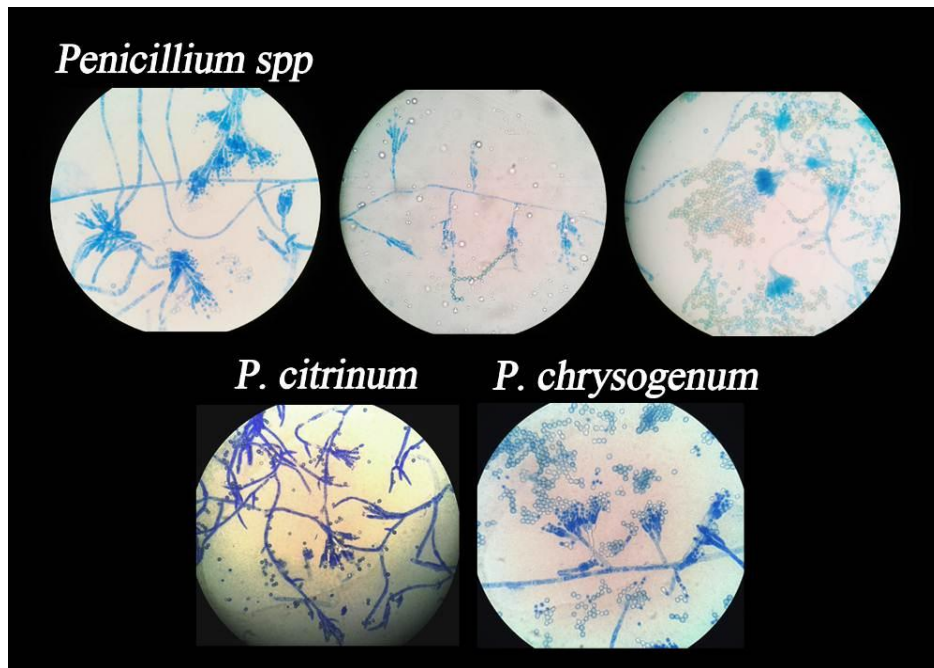


Figura 34: Fungos filamentosos da espécie *Penicillium* sp. observadas em microscópio ótico, com aumento de 1000x.

Algumas características observadas microscopicamente do gênero *Curvularia* foram os conídeos elipsoides largos, assimétricos com um dos lados mais dilatado, septados transversalmente em 4 compartimentos celulares, de coloração marrom escura. Estas características foram descritas por Lima e Furtado (2007), além de que os conidióforos são eretos, septados e não ramificados (Figura 35).

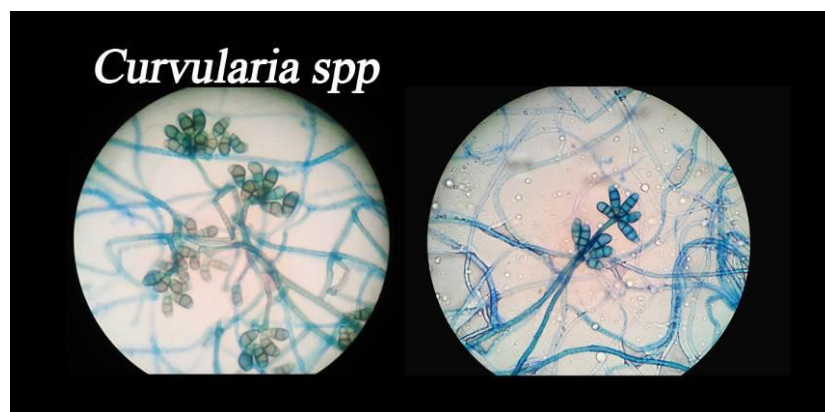


Figura 35: Fungos filamentosos da espécie *Curvularia* sp. observadas em microscópio ótico, com aumento de 400x.

Foram isoladas 208 colônias de fungos filamentosos que apresentaram características morfológicas diferentes, sendo 68 das amostras da água e 140 das amostras da areia. Ao total 15 gêneros foram identificados: *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Paecilomices*, *Penicillium*, *Rhizophus*, *Sporothrix*, *Talaromyces*, *Trichophyton*, *Trichoderma* além dos anamorfos.

Das colônias agrupadas pelas características macro e micromorfológicas e que, apresentaram maior densidade, 20 cepas foram selecionadas para a identificação molecular para as quais foram realizadas a extração, amplificação e sequenciamento para identificação da espécie (7 com características de *Aspergillus*, 11 com características *Penicillium* e 2 colônias com conídio diferencial).

Apesar das cepas separadas para identificação molecular terem apresentado algumas diferenças morfológicas, obteve-se alguns isolados pertencerem a mesma espécie. As cepas com identificações iguais foram: 1, 3, 6, 18 (*Penicillium chrysogenum*), 7, 2, 12, 16 (*P. citrinum*), 4, 10 (*Aspergillus fumigatus*), 15, 23 (*Penicillium spp.*) e 8, 22 (*Aspergillus protuberus*). As cepas 11, 19 e 20 não foram identificadas por problemas na amplificação (os primers utilizados não foram suficientes para um bom sequenciamento).

Baseado nos resultados dos sequenciamentos e no GenBank, foram identificados: *Aspergillus fumigatus*, *A. protuberus*, *A. terreus*, *Penicillium citrinum*, *P. chrysogenum* e *Talaromyces flavus*, *Cladosporium sp.*, *Penicillium sp.* e *Aspergillus sp.* Na Tabela 24 foram descritas as principais identificações dos isolados com similaridade acima de 98%, sendo as espécies *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* as mais comuns. Algumas cepas não foram possíveis identificar até a espécie, com similaridade abaixo de 97%.

As espécies mais identificadas, tanto na água como na areia, pertencem ao gênero *Aspergillus* e *Penicillium*, sendo estes gêneros as mais isoladas nos ambientes aquáticos (JAITLEY, 1987; RICHARDSON; WARNOCK, 2003; DAMARE; RAGHUKUMAR; RAGHUKUMAR, 2006; SONJAK; FRISVAD; GUNDE-CIMERMAN, 2006; HOUBRAKEN; FRISVAD; SAMSON, 2010; DOI et al., 2018).

Tabela 24: Identificação molecular das cepas de fungos filamentosos isolados nas amostras coletadas na Baía do Araçá (identificação acima de 97%).

cód. isolado	Tamanho p.b.	Identificação	query coverage	max ident	N° de acesso
1	713	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100%	99%	JF922035.1
5	591	<i>Talaromyces flavus</i>	99%	98%	JF922044.1
7	767	<i>Penicillium citrinum</i>	100%	100%	AB284185.1
9	707	<i>Cladosporium spp.</i>	100%	99%	KM232484.1
10	792	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100%	99%	KT222005.1
14	743	<i>Aspergillus terreus</i>	100%	99%	KC119206.1
15	716	<i>Penicillium spp.</i>	100%	97%	HM469417.1
22	715	<i>Aspergillus protuberus</i>	100%	100%	KM458640.1

As cepas da espécie *Aspergillus fumigatus* foram isoladas somente na areia da Baía do Araçá. Este fungo é um saprofítico onipresente (HAINES, 1995), sendo encontrado na água, alimento e solo, sobrevivendo em detritos orgânicos (RICHARDSON; WARNOCK, 2003; RAJA; SINGH, 2006). Considerado como agente etiológico mais comum, responsável por aproximadamente 90% das infecções humanas (DIXON; WALSH, 1992; DEROUIN, 1994; LATGÉ et al., 1997), por possuir capacidade termotolerante, crescendo a temperatura entre 15 °C a 53 °C (BHABHRA; ASKEW, 2005; MARTINS; MELO; HEINS-VACCARI, 2005).

No presente estudo, o fungo *Aspergillus terreus* foi isolado majoritariamente das amostras da areia e pouco na água. Este é um fungo marinho facultativo isolado de sedimentos marinhos, que também é distribuído em habitats terrestres e pode crescer sob condições de alto mar (DAMARE; RAGHUKUMAR; RAGHUKUMAR, 2006). Saprófita do solo e produtor de vários metabólitos secundários é uma causa comum de infecções, como aspergilose e de micoses disseminadas (MARTINS; MELO; HEINS-VACCARI, 2005; CARVALHO, 2013).

A espécie *Penicillium chrysogenum* muito comum que pode habitar uma grande variedade de habitats, incluindo os solos de florestas degradadas (JKA; SHARMA; MISHRA, 1992), no gelo subglacial do Ártico, onde se alimentam de plataformas de gelo basal ricas em sedimentos (SONJAK; FRISVAD; GUNDE-CIMERMAN, 2006). Esta espécie também foi isolada do solo de diferentes áreas de Lahore, Paquistão, e testadas para produção de enzima, resultando ser um potente produtor de protease com implicações na área industrial (HAQ; MUKHTAR; UMBER, 2006).

A espécie de *Talaromyces flavus* foi pouco observada neste trabalho, tanto na água quanto na areia. Esta espécie é comumente encontrada no solo, utilizada como controle biológico de alguns agentes patogênicos do solo (MAROIS; FRAVEL; PAPAVIDAS, 1984). *Talaromyces flavus* também produz polissacarídeos únicos como o talaron, uma série de enzimas, utilizado para o controle biológico de pragas (PROKSA, 2010) e na indústria de alimentos.

Dos fungos isolados no total, *Aspergillus* e *Penicillium* foram os gêneros que se destacaram (38,9% e 35,1% respectivamente) (Figura 36). Os outros fungos identificados foram pouco representativo, como *Cladosporium* (4,3%), *Chaetomium* (3,3%), *Trichophyton* (2,8%), *Geotrichum* (2,4%) e *Fusarium* (2,4%).

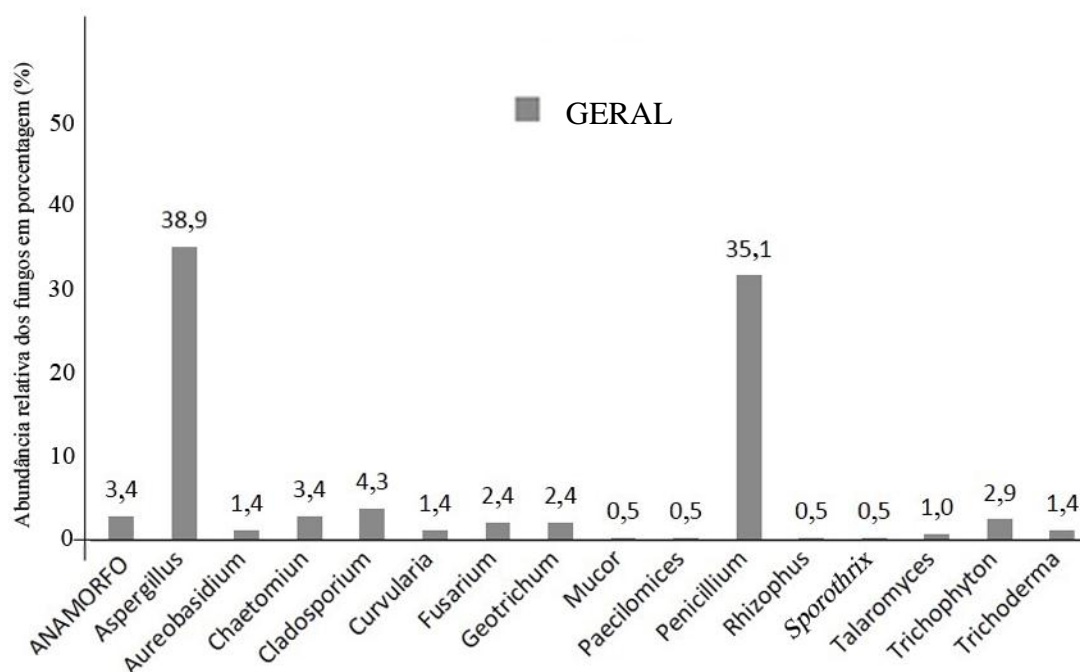


Figura 36: Abundancia relativa dos gêneros dos fungos filamentosos isolados da água e da areia, identificadas morfologicamente.

Na água, o fungo do gênero *Aspergillus* (39,7%) foi a espécie mais observada, seguido de *Penicillium* (19,1%) e *Cladosporium* (8,8%) (Figura 37), diferentemente da areia em que *Penicillium* foi o mais observado (42,8%), seguidos de *Aspergillus* (38,5%) e *Chaetomium* (2,8%) (Figura 37). A maioria dos fungos foram observados em ambas as amostras mas os gêneros *Paecilomices*, *Rhizophus* e *Sporothrix* foram observados somente nas amostras da água e *Mucor* e *Thichoderma* somente na areia.

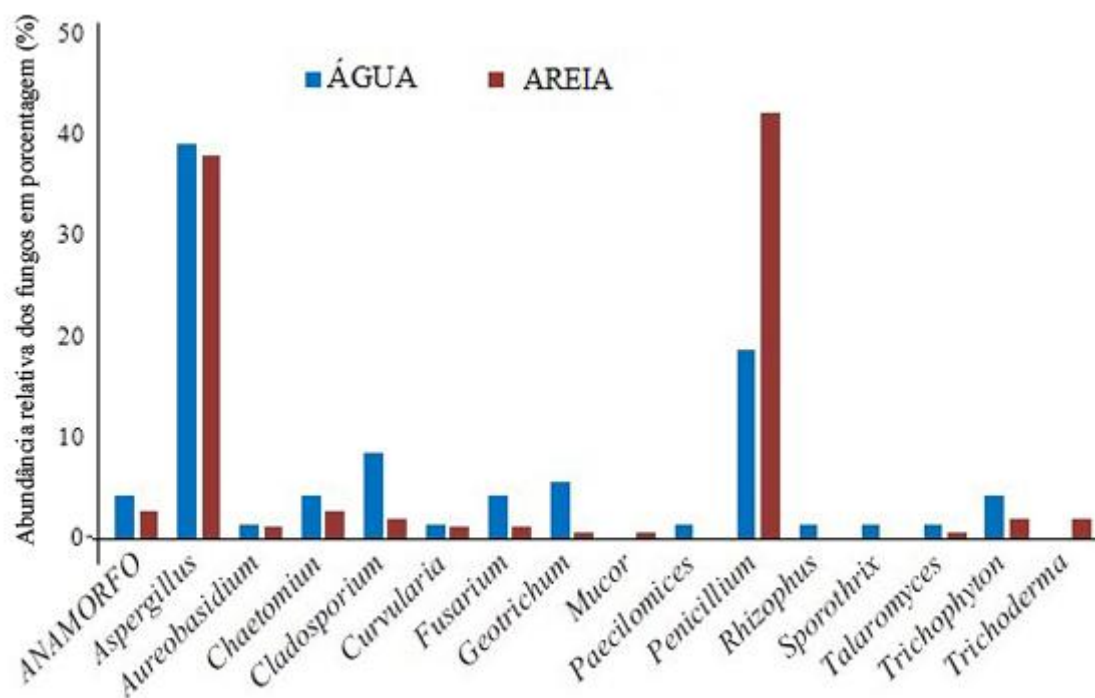


Figura 37: Abundância relativa dos fungos filamentosos identificados morfologicamente das amostras isoladas, separados em água e areia.

Na água *Aspergillus* foi o gênero dominante no período do inverno representando 54,5%, seguido de *Penicillium* (25,0%). Diferentemente no verão, os gêneros *Cladosporium* (20,8%) e *Aspergillus* (12,5%) foram os que apresentaram maior abundância relativa, não apresentando dominância e mais dispersos (Figura 38A).

Em relação à areia, também foram observados dominância de dois gêneros, o *Penicillium* (47,2%) e *Aspergillus* (40,8%), em relação aos outros gêneros. Enquanto no verão as espécies observadas foram mais dispersas, não apresentando forte dominância, observando que *Aspergillus* (20,0%), *Cladosporium* (13,3%) e *Trichoderma* (13,3%) foram os mais encontrados. O gênero *Aureobasidium* foi observado somente nas coletas de verão tanto na água como na areia (Figura 38B).

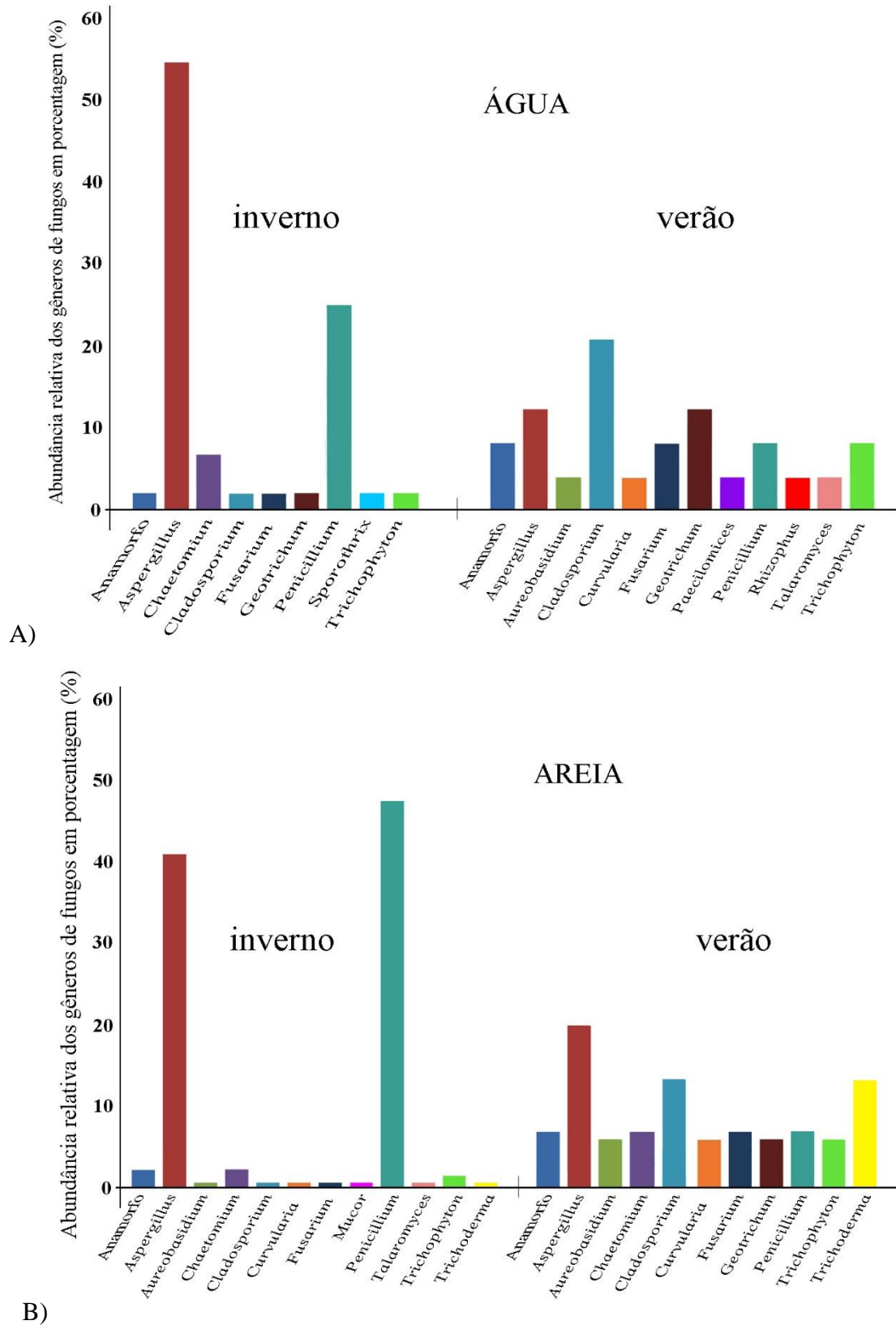


Figura 38: Densidade de fungos filamentosos apresentados em porcentagem (%) na água (A) e na areia (B) em relação a estação do ano verão e inverno.



Resultado similar foi observado no trabalho realizado por Gomes et al. (2008), que analisaram água com elevada salinidade e pH alcalino da Praia da Casa Caiada (PE) e isolou 50 espécies de fungo, sendo *Aspergillus* e *Penicillium* os mais frequentes. Em estudo de Gomes et al. (2011), *Penicillium* foi considerado o gênero com maior diversidade na estação de estiagem no sedimento coletado no manguezal da Barra das Jangadas, Pernambuco. Sengupta e Chaudhuri (1995) isolaram fungos do sedimento de do estuário do rio Ganges na Índia, no qual predominaram os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

Gomes et al. (2008) analisaram a água e o sedimento da praia de Olinda, Pernambuco, durante as estações seca e chuvosa e identificaram *Aspergillus*, *Penicillium* sp. e anamorfos como os mais frequentes, seguidos de *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Paecilomyces*, entre outros. No sul da Índia foram coletadas amostras de água, sedimentos e alguns organismos aquáticos e diferentes espécies de *Aspergillus* sp. foram identificadas, entre elas, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus* e *A. terricola* (BABU et al., 2010).

Os fungos do gênero *Cladosporium* apresentam distribuição mundial e podem ser isolados de diversos substratos, como água e sedimento (GOMES et al., 2008) e ambientes aquáticos (XIONG et al., 2009; SILVEIRA; LOBATO; ABREU, 2013). Mbata (2008) isolou fungos filamentosos de águas marinhas profundas e hiper salinas, entre eles *Chaetomium globosum*, *Aspergillus versicolor*, *Hortaea wemeckii* e *Aureobasidium pullulans*. O fungo *A. pullulans* encontra-se distribuída em ambientes marinhos com condições ambientais variadas, podendo ser aplicadas em diversas indústrias biotecnológicas (LIU et al., 2008), pela capacidade de produzir várias enzimas como protease, lipase, celulase entre outros (CHI et al., 2009).

No Brasil, o fungo do gênero *Paecilomyces* foi isolado das areias da Praia de Ipanema/RJ (SARQUIS; OLIVEIRA, 1996), na água e sedimento da praia de Olinda, Pernambuco (GOMES et al., 2008) e na água do estuário da Lagoa dos Patos, RS (SILVEIRA; LOBATO; ABREU, 2013). Marante et al. (2012) isolaram uma nova cepa de *Paecilomyces variotti* do ambiente marinho e comprovaram que esta era capaz de produzir compostos bioativos voláteis e não voláteis, como lipídeos e peróxido de ergosterol.

Vários estudos citam a capacidade de produção de enzimas por fungos filamentosos com aplicações biotecnológicas, tais como aquelas produzidas pelos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, como por exemplo a celulase (CASTILLO et al., 1994; ZHANG; KIM, 2010), a xilanase (SHAH; MADAMWAR, 2005; ZHANG; KIM 2010), lipase (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2005; ZHU et al., 2009), a amilase (PRABAKARAN et al., 2009; MISHRA; DADHICH, 2010).

Fato preocupante é que alguns fungos identificados neste trabalho são conhecidos pela sua patogenicidade, como o *Aspergillus fumigatus*, *A. terreus* (MARTINS; MELO; HEINS-VACCARI, 2005; WALSH et al., 2008), *Penicillium chrysogenum* (BARCUS; BURDETTE; HERCHLINE, 2005) e *Penicillium citrinum* (HOUBRAKEN; FRISVAD; SAMSON, 2010). Apesar de alguns fungos serem conhecidos pela sua patogenicidade, espécies como *Aspergillus fumigatus* e *A. terreus* também são citadas como potenciais degradadoras de hidrocarbonetos (ATLAS, 1981; CHAILLAN et al., 2004). *Penicillium chrysogenum* tem a capacidade de produzir amilase (PRABAKARAN et al., 2009; SILVA et al., 2011) e protease alcalina (ZHU et al., 2009) e *P. citrinum* apresenta ótima produção de lipase (SILVA; BRUNO; CASTRO, 2009) e produção de celulase (SANTOS et al., 2017). Apesar de algumas espécies de fungos tenham capacidade de produção de enzimas, não são utilizados nas aplicações biotecnológicas pela sua patogenicidade.

De acordo com Wilhm e Dorris (1968) e Piedras et al. (2006) o índice de diversidade de Shannon-Wiener ( $H'$ ) pode fornecer, além de informações sobre a biodiversidade e sua conservação, também sobre o impacto a que estão submetidos os ambientes, sugerindo os seguintes valores para avaliar a qualidade como:  $H' < 1,0$  indicando forte poluição;  $H' =$  entre 1,0 a 3,0 com poluição moderada e  $H' > 3,0$  como sendo sem poluição.

A maior diversidade de fungos foi observada na areia durante o verão ( $H'=2,38$ ) pelo Índice de Diversidade de Shannon-Wiener ( $H'$ ) e a menor diversidade foram observados na água durante o inverno ( $H'=0,87$ ). O período do verão provavelmente é o mais diverso (maior índice de Shannon) que no período do inverno devido a melhor distribuição das espécies. Conforme Wilhm e Dorris (1968), os dados analisados da Baía do Araçá indica que todo o sistema apresenta índices de forte poluição a moderada.

O Índice do Chao 1 consiste em estimador simples do número absoluto de espécies em uma amostra, baseado no número de espécies raras (MAGURRAN, 1988). Levando em conta dos resultados deste teste e água do período do verão (Chao1=14) foi a que apresentou maior riqueza (Tabela 25), indicando que dentre os compartimentos analisados, foi observado na água a maior quantidade de espécies de fungos coletados no período do verão neste trabalho.

Tabela 25: Valores obtidos do Índice de Diversidade de Shannon-Wiener ( $H'$ ) e Riqueza do ambiente por Chao 1 das espécies de fungos filamentosos isolados da água e da areia, nos períodos do verão e do inverno.

	água		areia	
	$H'$	Chao-1	$H'$	Chao-1
verão	2,11	14	2,38	12
inverno	0,87	10	1,20	13

A diversidade de fungos em ambientes marinhos e correlacionado ao potencial para aplicações biotecnológicas têm sido descritas por diversos pesquisadores (GAYLARD, BELLINASSO; MANFIO, 2005; PASSOS et al., 2009; PEREIRA; FREITAS, 2012; BONUGLI-SANTOS et al., 2015).

Considerando que a Baía do Araçá sofre impactos ambientais diversos, causados pelos derrames acidentais das atividades da indústria petrolífera, e pela proximidade ao Porto de São Sebastião e Terminal Petrolífero Almirante Barroso (TEBAR), os fungos presentes nas águas e nas areias tem papel importante na degradação e remoção de compostos derivados do petróleo do ambiente, transformando-os em substâncias como gás carbônico e água, bioremediando as áreas afetadas e diminuindo os impactos negativos causados por esses contaminantes, sendo, portanto, fundamental a manutenção da biodiversidade destes microrganismos no sistema.

Cabe ressaltar que os resultados deste trabalho identificaram a presença de fungos de interesse biotecnológico, com possibilidade de embasar futuros trabalhos para análise e utilização de compostos provenientes da microbiota tanto para obtenção de compostos bioativos quanto para uso em biorremediação.

Deste modo, a preservação das comunidades microbianas apresenta benefício para todo o ecossistema, pois a biodiversidade tornou-se uma questão importante para a sustentabilidade do ecossistema. Além disso, estudos de diversidade podem ajudar a

explicar melhor sobre os microrganismos autóctones, alterações biológicas associadas com distúrbios ambientais, sustentabilidade de plantas e animais e do ecossistema.

## 7. CONCLUSÕES FINAIS

A falta de legislação ou normas para monitorar a qualidade sanitária das areias de praias dificulta na caracterização e classificação do ambiente. Para proteger o tanto o local como os frequentadores, são necessários estabelecer padrões e critérios para monitorar e preservar o ambiente. A areia sofre influência direta da qualidade da água e variação ambiental em relação à presença de microrganismos. É comprovado que as areias apresentam maiores densidades em relação à água, por agregar os materiais decantados e servir de abrigo para muitos organismos. Assim sendo importante estabelecer programas de monitoramento para a qualidade microbiológica das areias das praias recreacionais em conjunto com a qualidade da água para determinar e classificar a balneabilidade da praia.

Atualização dos critérios das legislações devem ser realizadas conforme a variação ambiental e populacional, com propósito de classificar corretamente o ambiente analisado. Inclusão da determinação da densidade de leveduras patogênicas nas normas pode contribuir para melhorar na análise da qualidade microbiológica da região.

A preservação das comunidades microbianas apresenta benefício para a biodiversidade e tornou-se uma questão importante para um ecossistema mais sustentável. Além disso, estudos de diversidade podem ajudar a esclarecer sobre os microrganismos nativos, alterações biológicas associadas com distúrbios ambientais, sustentabilidade de plantas e ecossistemas.

A presença de fungos filamentosos no ambiente podem indicar capacidade de sobrevivência em ambientes com ação antrópica. Os fungos filamentosos isolados neste trabalho podem apresentar maior resistência e até mesmo potencial de biodegradação de substâncias contaminantes, por sobreviverem em ambientes contaminados, podendo embasar um possível trabalho em relação ao uso dos fungos para biorremediação e biodegradação.

Perspectivas futuras: Continuar análise da diversidade microbiológica da Baía do Araçá e testar futuramente os fungos isolados neste trabalho para a capacidade de produção de enzimas de interesse biotecnológicos e farmacêuticos.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABAE (Associação Bandeira Azul da Europa). **Monitorização da qualidade das areias em zonas balneares**. Época balnear 2010. Lisboa, 32p., 2011.
- ABRAHAM, T. J.; GHOSH, S.; NAGESH, T.; SASMAL, D. Distribution of bacteria involved in nitrogen and sulfur cycles in shrimp culture systems of West Bengal, India. **Aquaculture**, v. 239, Issues 1–4, p. 275-288, 2004.
- ALERJ. Assembléia Legislativa do Estado do Rio de Janeiro: Comissão de Defesa do Meio Ambiente. **Relatório da qualidade da areia das praias da Guanabara**. 2006.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4ed. New York: John Wiley & Sons. 869p., 1996.
- ALITTO, R. A. S.; BUENO, M. L.; DiDOMENICO, M.; BORGES, M. Annotated checklist of Echinoderms from Araçá Bay, Southeastern Brazil, Check List, **The Journal of Biodiversity Data**, v.12, n.1, article 1836, 2016.
- ALM, E. W.; BURKE, J.; SPAIN, A. Fecal indicator bacteria are abundant in wet sand at freshwater beaches. **Water Research**, v. 37, p. 3978-3982, 2003.
- ALMEIDA, B.C. **Diversidade de bactérias em amostras de água do mar no Canal de São Sebastião**. 2009. Tese (Doutorado) da Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Ecologia microbiana. 198p. 2009.
- ALONGI, D. M. Present state and future of the world's mangrove forests. **Environmental Conservation**, v. 29, n. 03, p. 331–349, 2002.
- ALVAREZ-LERMA, F.; NOLLA-SALAS, J.; LEÓN, C.; PALOMAR, M.; JORDÁ, R.; CARRASCO, N.; BOBILLO, F. Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. **Intensive Care Medicine**, v. 29, p. 1069–1076, 2003.
- AMARAL, A. C. Z.; MIGOTTO, A. E.; TURRA, A.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. Araçá: biodiversidade, impactos e ameaças. **Biota Neotrópica**, v. 10, n. 1, p. 219-264, 2010.
- AMARAL, A. C. Z.; MORGADO, E. H. Alteraciones en la fauna de anélidos poliquetos de Araçá, São Sebastião (SP - Brasil). **Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v.19, n.72, p.147-152, 1994.
- AMARAL, A. C. Z.; TURRA, A.; CIOTTI, A. M.; WONGTSCHOWSKI, C. L. D. B. R.; SCHAEFFER-NOVELLI, Y. **Vida na Baía do Araçá**. São Paulo: Editora Lume, 100p., 2015.

AN, Y-J.; KAMPBELL, D. A.; BREIDENBACH, P. G. *Escherichia coli* and total coliforms in water and sediments at lake marinas. **Environmental Pollution**, v.120, p.771-778, 2002.

ANA (Agência Nacional das Águas). **Panorama das águas superficiais no Brasil**. Brasília: Editora Eletrônica; 2005. Disponível em: [http://www.ana.gov.br/AcoesAdministrativas/CDOC/Catalogo\\_imgs/Panorama/ANA-IQA.swf](http://www.ana.gov.br/AcoesAdministrativas/CDOC/Catalogo_imgs/Panorama/ANA-IQA.swf) . Acesso em: Dez 2014.

ANDERSON, J. H. In vitro survival of human pathogenic fungi in Hawaiian beach sand. **Medical Mycology**, v. 17, p. 13–22, 1979.

ANDERSON, K. L.; WHITLOCK, J. E.; HARWOOD, V. J. Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. **Applied Environmental Microbiology**, v.71, n.6, p.3041–3048, 2005. PubMed: 15933000.

ANDRADE, V. C. **Estrutura e funcionamento da alça microbiana nos sedimentos da Baía do Araçá, São Sebastião - SP**. 2015. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 64p., 2015.

ANDRAUS, S. **Aspectos microbiológicos da qualidade sanitária das águas do mar e areias das praias de Matinhos, Caiobá e Guaratuba-PR**. 2006. Dissertação de mestrado em Ciência do solo, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 108p., 2006.

ANDRE, P.; METZGER, C.; PETEY, S.; MULLER, D.; VIDON, D. J. M. Chemiluminescence of enterococci isolates from freshwater. **FEMS Microbiology Letters**. v. 245, p. 123-129, 2005.

ANDREA, L. W.; HARTAL, P. G.; GODFREY, D. G.; HILL, J. L.; SEGARS, W. I. Potential of *Enterococcus faecalis* as a human fecal indicator for Microbial source Tracking. **Journal of Environmental Quality**, v. 31, p. 1286-1293, 2002.

ANDREOTE, F. D.; JIMÉNEZ, D. J.; CHAVES, D.; DIAS, A. C.; LUVIZOTTO, D. M.; DINI-ANDREOTE, F.; FASANELLA, C. C.; LOPEZ, M. V.; BAENA, S.; TAKETANI, R. G.; DeMELO, I. S. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. **PLoS One**, v. 7, n. 6, e38600, 2012.

APHA (American Public Health Association). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. APHA, AWWA, WEF. 23th Edition., 2017.

ARAÚJO, F. V.; HAGLER, A. N. Leveduras associadas a sedimentos em diferentes manguezais fluminenses. **Gerenciamento Costeiro Integrado**. Ano 4, n. 6, (In Press), 2010.

ARIAS, C.A.; MURRAY, B.E. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v.10(4), p.266–278, 2012.

ARVANITIDOU, M.; KANELLOU, K.; VAGIONA, D.G. Diversity of Salmonella spp. and fungi in northern Greek rivers and their correlation to fecal pollution indicators. **Environmental Research**, v. 99, p. 278–284, 2005.

ATLAS, R. M. Microbial degradation of Petroleum Hydrocarbons – an Environmental Perspective. **Microbial Review**: p. 180-209, 1981.

AUGUSTIN, J. O.; GROENEWALD, J. Z.; NASCIMENTO, R. J.; MIZUBUTI, E. S. G.; BARRETO, R. W.; ELLIOT, S. L.; EVANS, H. C. Yet more “weeds” in the garden: fungal novelties from nests of leaf-cutting ants. **PLoS One**, v. 8, e82265, 2013.

BABU, R.; VARADHARAJAN, P.; SOUNDARAPANDIAN, D.; BALASUBRAMANIAN, R. Fungi diversity in different coastal marine ecosystem along South East Coastal of India. **Microbiological Research**. v.1, n.3, p.175-178, 2010.

BARCUS, A. L.; BURDETTE, S. D.; HERCHLINE, T. E. Intestinal invasion and disseminated disease associated with *Penicillium chrysogenum*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 4, n. 21, p. 1-4, 2005.

BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J. P.; GROSS, W. B. Colibacillosis In: SAIF W. M. **Diseases of poultry**. (11<sup>a</sup> ed.). Iowa, p. 138-144, 2003.

BARTRAM, J.; REES, G. **Monitoring bathing waters - A Practical Guide to the Design and Implementation of Assessments and Monitoring Programmes**. E; FN Spon, New York, 311p., 2000.

BAUMGARTEN, M. G. Z.; POZZA, S. A. **Qualidade de Águas**. Descrição de Parâmetros Químicos referidos na Legislação Ambiental. Rio Grande: Editora da FURG, 166p., 2001.

BELÚCIO, L. F. **Comunidades bêmicas de moluscos da zona entremarés da região do Araçá, São Sebastião, SP**, Campinas. 1995. Dissertação apresentada para Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 157p., 1995.

BHABHRA, R.; ASKEW, D. S. Thermotolerance and virulence of *Aspergillus fumigatus*: role of the fungal nucleolus, **Medical Mycology**, v. 43, n. 1, p. 87-93, 2005.

BHAT, J. V.; KACHWALLA, N. Marine yeasts off the Indian coast. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section B**, v. 41, Issue 1, p. 9–15, 1955.

BINELLI, C. A.; MORETTI, M. L.; ASSIS, R. S.; SAUAIA, N.; MENEZES, P. R.; RIBEIRO, E.; GEIGER, D. C.; MIKAMI, Y.; MIYAJI, M.; OLIVEIRA, M. S.; BARONE, A. A.; LEVIN, A. S. Investigation of the possible association between nosocomial candiduria and candidaemia. **Clinical Microbiol and Infection**, v. 12, p. 538–543, 2006.



BLACKWELL, M.; SPATAFORA, J. W. **Fungi and Their Allies**. In: Mueller GM, Bills GF, Foster M, editors. Biodiversity of Fungi: Standard Methods for Inventory and Monitoring. New York: Academic Press; p. 7-21, 2004.

BOEHM, A. B.; SASSOUBRE, L. M. **Enterococci as indicators of environmental fecal contamination**. In Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N (eds). Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, 21p., 2014.

BOEHM, A. B.; GRANT, S. B.; KIM, J. H.; MOWBRAY, S. L.; MCGEE, C.D.; CLARK, C.D.; FOLEY, D.M.; WELLMAN, D. E. Decadal and shorter period variability of surf zone water quality at Huntington Beach, California. **Environmental Science & Technology**, v.18, p.3885–3892, 2002.

BOEHS, G.; ABSHER, T. M.; CRUZ-KALED, A. C. Ecologia populacional de *Anomalocardia brasiliensis* (Gmelin, 1791) (Bivalvia, Veneridae) na baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 259-270, 2008.

BOGGS, S., "**Principles of Sedimentology and Stratigraphy**. Prentice Hall", New Jersey, 765p, 1995.

BONADONNA, L.; BRIANCESCO, R.; CATALDO, C.; DI GIROLAMO, I. Microbiological quality of seaside sands: a beach in Latium. **Igiene e Sanità Pubblica**, In Italian, LVIII: p. 43–54, 2002.

BONDARYK, M.; KURZATKOWSKI, W.; STANISZEWSKA, M. Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. **Postepy Dermatologii Alergologii**, v. 30, p. 293–301, 2013.

BONUGLI-SANTOS R. C.; VASCONCELOS, M. R. DosS.; PASSARINI, M. R. Z.; VIEIRA, G. A. L.; LOPES, V. C. P.; MAINARDI, P. H.; DosSANTOS, J. A.; DUARTE, L. DeA.; OTERO, I. V. R.; YOSHIDA, A. M. DaS.; FEITOSA, V.A.; PESSOA Jr, A.; SETTE, L.D. Marine-derived fungi: diversity of enzymes and biotechnological applications. **Frontier Microbiology**, v. 6, article 269, 15p., 2015. doi: 10.3389/fmicb.2015.00269

BOUKAI, N. **Qualidade Sanitária da Areia das Praias do Município do Rio de Janeiro: Diagnóstico e Estratégia para Monitoramento e Controle**. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Centro de Tecnologia e Ciências, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 160 p., 2005.

BRANDÃO, J.; WERGIKOSKY, B.; ROSADO, C.; NORONHA, G.; ROSADO, L.; VERÍSSIMO, C.; FALCÃO, M.L.; GIRALDES, A.; SIMÕES, M.; REBELO, H.; VERÍSSIMO, C. **Qualidade Microbiológica de Areias de Praias Litorais: relatório final**, Instituto do Ambiente, 132p., 2002.

BRANDÃO, L. R.; MEDEIROS, A. O.; DUARTE, M.C.; BARBOSA, A. C.; ROSA, C. A. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts isolated by multiple-tube fermentation from three freshwater lakes in Brazil. **Journal of Water and Health**, v. 2, n. 8, p. 279-289, 2010.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Conselho Nacional de Meio Ambiente**. Resolução 274 de 29 de Novembro de 2000. Dispõem sobre a Balneabilidade das águas. 2000.

BRASIL. Agência Nacional da Vigilância Sanitária (ANVISA). **Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001**. Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos em alimentos. 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica**. Modelo VII, 27p. 2004.

BRASIL. **Conselho Nacional do Meio Ambiente**. 2005. Resolução nº 357, do dia 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF. 2005.

BRILHANTE, R. S. N.; PAIVA, M. A. N.; SAMPAIO, C. M. S.; TEIXEIRA, C. E. C.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; LEITE, J. J. G.; MOREIRA, C. A.; SILVA, L.P.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Yeasts from *Macrobrachium amazonicum*: a focus on antifungal susceptibility and virulence factors of *Candida spp*. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 76, p. 268–277, 2011.

BUCK, J. D.; BUBUCIS, P. M.; COMBS, T. J. Occurrence of human associated yeasts in bivalve shellfish from Long Island Sound. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, p. 370-378, 1977.

CABELLI, V. J. **Health effects criteria for marine recreational waters**. Research Triangle Park: USEPA, 98 p. 1983. EPA-600/1-80-031.

CABRAL, J. P. S. Water Microbiology. Bacterial pathogens and water. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.7, p.3657-3703, 2010.

CABRAL, S. A. S.; AZEVEDO JUNIOR, S. M.; LARRAZABAL, M. E. Abundância sazonal de aves migratórias na área de proteção ambiental de Piaçabuçu, Alagoas, Brasil. **Revista Brasileira Zoologia**, v. 23, n. 3, p.865-869, 2006.

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention**. Fungal Diseases. Candidiasis. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/index.html>. Acesso em: Agosto2017.

CALDERONE, R. A. Introduction and historical perspectives. *Candida and Candidiasis*. ASM Press, Washington, DC. p. 15–25, 2002.

CAMPOS, L. C.; TRABULSI, L. R. *Escherichia*. In.: TRABULSI, L.R. et al. *Microbiologia*. 3 ed. São Paulo: Atheneu, p.215-228, 2002.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. *The fungi*, 2nd ed. Academic Press, San Diego. 558 p., 2001.

CARVALHO, L. I. C. **Aspergillus e Aspergilose – Desafios no combate da doença**. 2013. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Fernando Pessoa, 43p., 2013.

CASTILLO, M. R.; GUTIERREZ-CORREA, M.; LINDEN, J. C.; TENGERTDY, R. P. Mixed culture solid substrate fermentation for cellulolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, v. 16, p. 967-972, 1994.

CASTRILLÓN, A. L.; GAMBALE, W.; CORRÊA, B. Leveduras isoladas de águas do Rio Solimões e do Rio Tarumá-Mirim (Negro). Estudo preliminar. *Revista de Microbiologia*, v.22, p.102, 1991.

CASTRO, B. M.; MIRANDA, L. B.; SILVA, L. S.; FONTES, R. F. C.; PEREIRA, A. F.; COELHO, A. L. **Processos físicos: hidrografia, circulação e transporte, Oceanografia de um Ecossistema Subtropical: Plataforma de São Sebastião, SP**, São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo: p.59-121, 2008.

CATTOIR, V.; LECLERCQ, R. Twenty-five years of shared live with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, p. 731-742, 2013.

CEBIMAR (Centro de Biologia Marinha Universidade de São Paulo). **Dados da Estação Meteorológica do CEBIMar/USP - São Sebastião (Estação Davis)**. Disponível em: <http://cebimar.usp.br/index.php/pt/informacoes-ambientais/estacao-meteorologica-do-cebimar-usp-sao-sebastiao-estacao-davis.html>. Acesso em: Agosto de 2017.

CERUTTI, R. L.; BARBOSA, T. C. P. **Contribuição ao conhecimento da poluição doméstica na Baía Norte, área da Grande Florianópolis, SC**. 1996. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 129p., 1996.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo). **Relatório de monitoramento de emissários submarinos / CETESB**. São Paulo: CETESB. 106p. 2007.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo). **Relatório de qualidade das praias no estado de São Paulo 2016** [recurso eletrônico] / CETESB; Coordenação geral Maria Helena R.B. Martins; Coordenação técnica Nelson

Menegon Jr., Cláudia Condé Lamparelli; Equipe técnica Cláudia Condé Lamparelli [et al.]. 184p. 2017.

CHAILLAN, F.; FLÈCHE, A. LE.; BURY, E.; PHANTHAVONG, Y.; GRIMONT, P.; SALIOT, A.; OUDOT, J. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon degrading microorganisms. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 587–595, 2004.

CHEN, Y-S.; YANAGIDA, F.; CHEN, L-Y. Isolation of marine yeasts from coastal waters of northeastern Taiwan. **Aquatic Biology**, v. 8, p.55–60, 2009.

CHEUNG, W. H.; CHANG, K. C.; HUNG, R. P.; KLEEVENS, J. W. Health effects of beach water pollution in Hong Kong. **Epidemiology Infection**, v. 105, p. 139–162, 1990.

CHI, Z.; WANG, F.; CHI, Z.; YUE, L; LIU, G.; ZHANG, T. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p.793–804, 2009.

CHI, Z.-M.; LIU, T.-T.; CHI, Z.; LIU, G.-L.; WANG, Z.-P. Occurrence and Diversity of Yeasts in the Mangrove Ecosystems in Fujian, Guangdong and Hainan Provinces of China. **Indian Journal Microbiology** v. 52, n. 3, p.346–353, 2012.

CHOI, S.; CHU, W.; BROWN, J.; BECKER, S. J.; HARWOOD, V. J.; JIANG, S.C. Application of enterococci antibiotic resistance patterns for contamination source identification at Huntington Beach, California. **Marine Pollution Bulletin**, v.6, p. 748-755, 2003.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T.; SILVA, L. R. B. F.; MONFARDINI, L. P. D. A.; CUNHA, A. K. B.; RADY, P.; ALVES, T.; ROSAS, R. C. Prospective Observational Study of Candidemia in São Paulo, Brazil: Incidence Rate, Epidemiology, and Predictors of Mortality. **Infect Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, p. 570–576, 2007.

COOKE, W. B. The enumeration of yeasts population in sewage treatment plant. **Mycologia**, v. 57, p.969-703, 1965.

COOKE, W. B.; MATSUURA, G.S. A study of yeast populations in a waste stabilization pond system. **Protoplasma**, v. 57, Issue 1–4, p. 163–187, 1963.

COSTA, L. L.; CEBALLOS, B. S. O.; CELEIDE, M. B. S.; CAVALCANTI, M. L. F. Eficiência de Wetlands construídos com dez dias de retenção hidráulica na remoção de colíforos e bacteriófagos. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 3, n. 1, 23p., 2003.

COLWELL, R.; CODDINGTON, J. A. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, London B series, London, v. 345, p. 101-118, 1994.

CRAIG, D. L.; FALLOWFIELD, H. J.; CROMAR, N. J. Use of microcosms to determine persistence of *Escherichia coli* in recreational coastal water and sediment and validation with in situ measurements. **Jornal & Applied Microbiology**, v. 96, p. 922-930, 2004.

CRAPEZ, M. A. C. Bactérias Marinhas. In: Pereira RC, Soares-Gomes A, organizadores. **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, p.84-101, 2002.

DADA, A. C.; AHMAD, A.; USUP, G.; HENG, L.Y. Speciation and antimicrobial resistance of Enterococci isolated from recreational beaches in Malaysia. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 185, n. 2, p. 1-18, 2012.

DALLAS, H. F.; DAY, J. A. **The effect of water quality variables on aquatic ecosystems: a Review**. Water Research Commission, Report No. TT 224/04. Pretoria, South Africa. 224p., 2004.

DAMARE, S.; RAGHUKUMAR, C.; RAGHUKUMAR, S. Fungi in deep-sea sediments of the Central Indian Basin. **Deep-Sea Research I**, v. 53, p. 14–27, 2006.

DANOVARO, R.; MARRALE, D.; DELL'ANNO, A.; DELLA CROCE, N.; TSELEPIDES, A.; FABIANO, M. Bacterial response to seasonal changes in labile organic matter composition on the continental shelf and bathyal sediments of the Cretan Sea. **Progress in Oceanography**, v.46, p.345–366, 2000.

DE BAERE, T.; CLAEYS, G.; VERSCHRAEGEN, G.; DEVRIESE, L.A.; BAELE, M.; VAN VLEM, B.; VANHOLDER, R.; DEQUIDT, C.; VANEECHOUTTE, M. Continuous ambulatory peritoneal dialysis peritonitis due to *Enterococcus cecorum*. **Journal Clinical Microbiology**, v. 38, p. 3511-3512, 2000.

DEROUIN, F. Special issue on aspergillosis. **Pathologie Biologie**, v. 42, p. 625-736, 1994.

DEVRIESE, L. A.; LAURIER, L.; DE HERDT, P.; HAESBROUCK, F. Enterococcal and streptococcal species isolated from faeces of calves, young cattle and dairy cows. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 72(1), p. 29–31, 1992.

DIXON, D. M.; MIGLIOZZI, J.; COOPER, C. R.; JR, SOLIS, O.; BRESLIN, B.; SZANISZLO, P. J. Melanized and non-melanized multicellular form mutants of *Wangiella dermatitidis* in mice: mortality and histopathology studies. **Mycoses**, v. 35, p. 17–21, 1992.

DOI, S. A.; BARBIERI, E.; MARQUES, H. L. A. Densidade colimétrica das áreas de extrativismo de ostras em relação aos fatores ambientais em Cananeia (SP). **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.19, n.2, p.165-171, 2014.

DOI, S. A.; PINTO, A. B.; CANALI, M. C.; POLEZEL, D. R.; MERGUIZO, R. A. C.; OLIVEIRA, A. J. F. C. de. Density and Diversity of Filamentous Fungi in the Water and

Sediment of Araçá Bay in São Sebastião, São Paulo, Brazil. **Biota Neotropica**, v.18(1):e20170416. p.1-9, 2018.

DOTTORI, M.; SIEGLE, E.; CASTRO, B. M. Hydrodynamics and water properties at the entrance of Araçá Bay, Brazil. **Ocean Dynamics**, v.65, p.1731–1741, 2015.

EDBERG, S. C.; ALLEN, M.; SMITH, D. B. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: comparison with the standard multiple tube fermentation method. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.6, p.1595 -1601, 1988.

EDGE, T. A.; HILL, S. Multiple lines of evidence to identify the sources of fecal pollution at a freshwater beach in Hamilton Harbour, Lake Ontario. **Water Research**, v. 41, n. 16, p. 3585-3594, 2007.

ELMANAMA, A. A.; FAHD, M. I.; AFIFI, S.; ABDALLAH, S.; BAHR, S. Microbiological beach sand quality in Gaza Strip in comparison to seawater quality. **Environmental Research**, v. 99, p. 1–10, 2005.

ESSIEN, J. P.; ANTAI, S. P.; BENSON, N. U. Microbial population dynamics as a function of sediment salinity gradients in the Qua Iboe Estuary Mangrove swamp (Nigeria). **Research Journal of Microbiology**, v.5, n.9, p.915-925, ref.29, 2010.

EU (Official Journal of the European Union). **Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC**. European Union. 2006.

EUZÉBI, J. P. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature – genus Enterococcus**. Disponível em: <http://www.bacterio.net/enterococcus.html>. Acessado em: Janeiro de 2017.

FACKLAM, R. R.; CARVALHO, M. G. S.; TEIXEIRA, L. M. History, Taxonomy, Biochemical Characteristics and antibiotic Susceptibility testing of Enterococci. In: Gilmore, M.S. (Ed.) *The enterococci: pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance*. Washington: **ASM Press**, p. 1-54, 2002.

FACKLAM, R. R.; COLLINS, M. D. Identification of Enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 731 – 734, 1989.

FATTAL, B.; PELEG-OLEVSKY, E.; AGURSKY, T.; SHUVAL, H. I. The association between morbidity among bather and microbial quality of sea water. **Water Science Technology**, v.18, p.59-69, 1987.

FENCHEL, T. The Microbial Loop – 25 years later. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.366, p.99-103, 2008.

FERGUSON, D. M.; MOORE, D. F.; GETRICH, M. A.; ZHOWANDAI, M. H. Enumeration and speciation of enterococci found in marine and intertidal sediments and coastal water in southern California. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, n.3, p.598–608, 2005. PubMed PMID: 16108802.

FINEGOLD, S. M.; SUTTER, V. L.; MATHISON, G. E. Normal indigenous intestinal flora. In: Human intestinal microflora in health and disease. D.J. Hentges (ed.). **Academic Press**, New York, p. 3–31, 1983.

FLEISHER, J. M.; KAY, D.; SALMON, R. L.; JONES, F.; WYER, M. D.; GODFREE, A. F. Marine waters contaminated with domestic sewage: nonenteric illnesses associated with bather exposure in the United Kingdom. **American Journal Public Health**, v.86, p.1228–1234, 1996.

FOONGLADDA, S.; HAOUHARN, P.; SAKULMAIWATANA, P.; CHAIPRASERT, A. Comparative evaluation of Candida Select test and conventional methods for identification of *Candida albicans* in routine clinical isolates. **Mycoses**. v.45, p.75-78, 2002

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Editora Artmed: Porto Alegre, RS, 424p., 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. Atheneu: São Paulo, 182p., 2003.

FUJITA, T.; KOMEMUSHI, S.; YAMAGATA, K. Relationship between environmental factors, yeasts and coliforms in the Yodo river. **Journal of Fermentation Technology**, v.65, p.193-197, 1987.

FURTADO, V. V. "**Sedimentação Quaternária no Canal de São Sebastião**", Publ. Esp. Intituto Oceanográfico nº1, 1995.

GADANHO, M.; SAMPAIO, J. P. Application of temperature gradient gel electrophoresis to the study of yeast diversity in the estuary of the Tagus river, Portugal. **FEMS Yeast Research**, v.5, p.253–261, 2004.

GAYLARD, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.8, n.34, 2005.

GERARDO, N.M.; MUELLER, U.G.; PRICE, S.L.; CURRIE, C.R. Exploiting a mutualism: parasite specialization on cultivars within the fungus-growing ant symbiosis. **Proceedings Biological Sciences**, v.271, p.1791–1798, 2004.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Agentes bacterianos de toxinfecções alimentares**. In: Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. São Paulo: Ed. Varela. Parte 12, p.199-258, 2001.

GHINSBERG, R. C.; BAR DOV, L.; ROGOL, M.; SHEINBERG, Y.; NITZAN, Y. Monitoring of selected bacteria and fungi in sand and sea water along the Tel Aviv coast. **Microbios**. v.77, p.29–40, 1994.

GILMORE, M. S.; LEBRETON, F.; VAN SCHAİK, W. Genomic transition of enterococci from gut commensals to leading causes of multidrug-resistant hospital infection in the antibiotic era. **Current Opinion in Microbiology**, v.16(1), p.10–16, 2013.

GOMES, D. N. F.; CAVALCANTI, M. A. Q.; FERNANDES, M. J. S.; LIMA, D. M. M.; PASSAVANTE, J. Z. O. Filamentous fungi isolated from sand and water of “Bairro Novo” and “Casa Caiada” beaches, Olinda, Pernambuco, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.68, n.3, p.577-582, 2008.

GOMES, D. N. F.; CAVALCANTI, M. A.de; PASSAVANTE, J. Z. deO. Fungos filamentosos isolados de sedimento do manguezal barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil. **Tropical Oceanography**, Recife, v.39, n.1, p.69-78, 2011.

GORDON, S.; SWENSON, J. M.; HILL, B. C.; PIGOTT, N. E.; FACKLAM, R. R.; COOKSEY, R. C.; THORNSBERRY, C.; ENTEROCOCCAL STUDY GROUP; JARVIS, W. R.; TENOVER, F. C. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p. 2373-2378, 1992.

GRIFFIN, D. H. **Fungal Physiology**. Canada: John Wiley & Sons. 383p., 1981.

GRISI, T. C. S. L.; GORLACH-LIRA, K. The Abundance of some Pathogenic Bacteria In Mangrove Habitats of Paraíba do Norte Estuary and Crabmeat Contamination of Mangrove Crab *Ucides cordatus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n.1, p.227-234, 2010.

GUBITOSO, S.; DULEBA, W.; TEODORO, A. C.; PRADA, S. M.; DaROCHA, M. M.; LAMPARELLI, C. C.; BEVILACQUA, J. E.; MOURA, D. O. Estudo geoambiental da região circunjacente ao emissário submarino de esgoto do Araçá, São Sebastião (SP). **Revista Brasileira de Geociências**, v.38, n.3, p.467-475, 2008.

GUBITOSO, S. **Influência de efluentes domésticos e petroquímicos em sedimentos e carapaças de foraminíferos do canal de São Sebastião, SP**. 2010. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 128p., 2010.

GUTIÉRREZ, M.; PANTOJA, S.; QUIÑONES, R.; GONZÁLEZ, R. First record of filamentous fungi in the coastal upwelling ecosystem off central Chile. **Gayana**, v.74, n.1, p.66-73, 2010.



HAGLER A. N. **Yeasts as Indicators of Environmental Quality**. In: Péter G., Rosa C. (eds) Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. The Yeast Handbook. Springer, Berlin, Heidelberg. p. 515-532, 2006.

HAGLER, A. N.; AHEARN, D. G. **Ecology of Aquatic yeasts**. (In: Rose, A.H. and Harrison, J.S. The Yeasts: Biology of Yeasts, 2nd Edition. Academic Press, London, p. 181-205, 1987.

HAGLER, A. N.; DE OLIVEIRA, R. B.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. Yeasts in the Intertidal Sediments of a Polluted Estuary in Rio de Janeiro, Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 48, p. 53-56, 1982.

HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.41, n.1, p.173-178, 1981.

HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; ROSA, C. A.; MORAIS, P. B. Yeasts as an example of microbial diversity in Brazilian ecosystems. **Oecologia Brasiliensis**, v. 1, p. 225–244, 1995.

HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L.; SANTOS, E. A.; FARAGE, S.; SILVA FILHO, J. B.; SCHRANK, A.; DE OLIVEIRA, R. B. Microbial pollution indicators in Brazilian tropical and subtropical marine surface waters. **Science total Environment**, v.12, n.58, p.151-160, 1986.

HAINES, J. Aspergillus in compost: straw man or fatal flaw. **Biocycle**, v.6, p.32-35, 1995.

HALL, T.A. BioEdit 5.0.9: **A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. Nucleic Acids Symposium Series, 41, 1999.

HALLER, L.; AMAEDEGNATO, E.; POTÉ, J.; WILDI, W. Influence of freshwater sediment characteristics on persistence of faecal indicator bacteria. **Water, Air, and Soil Pollution**, v.203, Issue 1–4, p.217–227, 2009.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. **PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis**. Palaeontol Electron., Version 2.16, 187p., 2001. [http://palaeoelectronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeoelectronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)

HAQ, I-U.; MUKHTAR, H.; UMBER, H. Production of Protease by *Penicillium chrysogenum* Through Optimization of Environmental Conditions. **Journal of Agriculture & Social Sciences**, v.2, n.1, p.23-25, 2006.

HARLEY, J. L. Fungi in Ecosystems. **Journal of Applied Ecology**, v.8, n.3, p.627-642, 1971.

HAYDEN, M. K.; TRENHOLME, G. M.; SCHULTZ, J. E.; SAHM, D. F. In Vivo Development of Teicoplanin Resistance in a VanB *Enterococcus faecium* isolate. **The Journal of Infectious Diseases**, v.167, Issue 5, p.1224–1227, 1993. <https://doi.org/10.1093/infdis/167.5.1224>

HEALTH CANADA. **Guidelines for Canadian Recreational Water Quality**, Third Edition. Water, Air and Climate Change Bureau, Healthy Environments and Consumer Safety Branch, Health Canada, Ottawa, Ontario. (Catalogue No H129-15/2012E). 161p., 2012.

HENRIQUE, P.M. **Caracterização molecular de elementos VanA em enterococos com genótipo e fenótipo discrepantes relativos à resistência aos glicopeptídeos**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, 70p., 2007.

HILL, G. T.; MITKOWSKI, N. A.; ALDRICH-WOLFE, L.; EMELE, L. R.; JURKONIE, D. D.; FICKE, A.; MALDONARO-RAMIREZ, S.; LYNCH, S. T.; NELSON, E. B. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.15, p.25-36, 2000.

HOUBRAKEN, J.; DeVRIES, R.P.; SAMSON, R.A. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. **Advances in Applied Microbiology**, v.86, p.199-249, 2014.

HOUBRAKEN, J. A. M. P.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Taxonomy of *Penicillium citrinum* and related species. **Fungal Diversity**, v.44, p.117–133, 2010.

HUNTER-CEVERA, J.; KARL, D.; BUCKLEY, M. **Marine Microbial Diversity: the key Earth's habitability**. Washington, D.C. American Academy of Microbiology, 2005.

HUYCKE, M. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. S. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. **Emerging Infectious Diseases journal**, v.4(2), p.239–249, 1998.

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente). **CPEA 685 – Companhia Docas de São Sebastião** – Capítulo 7, 25p., 2009. Disponível em: [http://licenciamento.ibama.gov.br/Porto/Porto%20Sao%20Sebastiao%20-%20ampliacao/Pdf/Cap\\_7\\_Analise\\_Integrada.pdf](http://licenciamento.ibama.gov.br/Porto/Porto%20Sao%20Sebastiao%20-%20ampliacao/Pdf/Cap_7_Analise_Integrada.pdf). Acesso em: Dezembro 2017.

JAITLEY, A. K.; RAI, J. N. Thermophilic and thermotolerant fungi isolated from mangroves swamps. **Mycologia**, v.6, n.74, p.1021-1022, 1982.

JAITLEY, A. K. pH optima of the fungi isolated from mangroves soils in India. **Transactions of the Mycological Society of Japan**, v.28, p.137-143, 1987.

JKA, D. K.; SHARMA, G. D.; MISHRA R. R. Ecology of soil microflora and mycorrhizal symbionts in degraded forests at two altitudes. **Biology and Fertility of Soils**, v.12, p.272-278, 1992.

JENG, H. C.; ENGLAND, A. J.; BRADFORD, H. B. Indicator organisms associated with stormwater suspended particles and estuarine sediment. **Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic Hazardous Substances & Environmental Engineering**, v.40, p.779–791, 2005. PubMed PMID: 15792299.

JONES, E. B. G.; SAKAYAROJ, J.; SUETRONG, S.; SOMRITHIPOL, S.; PANG, K. L. Classification of marine Ascomycota, anamorphic taxa and Basidiomycota. **Fungal Diversity**, v. 35, p. 1-187, 2009.

KANDASAMY, K.; ALIKUNHI, N. M.; SUBRAMANIAN, M. Yeasts in marine and estuarine environments. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v.3(6), p.74 – 82, December 2012.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews: microbiology**, London, v.2, n.2, p.123-140, 2004.

KAUFFMAN, C. A.; VAZQUEZ, J. A.; SOBEL, J. D.; GALLIS, H. A.; MCKINSEY, D. S.; KARCHMER, A. W.; SUGAR, A.M.; SHARKEY, P. K.; WISE, G. J.; MANGI, R.; MOSHER, A.; LEE, J. Y.; DISMUKES, W. E. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. The National Institute for Allergy and Infectious Diseases (NIAID) Mycoses Study Group. **Clinical Infectious Diseases**, v.30, n.1, p.14–18, 2000.

KAY, D.; JONES, F.; WYER, M. D.; FLEISHER, J. M.; SALMON, R. L.; GODFREE, A. F.; ZELENAUCH-JACQUOTTE, A.; SHORE, R. Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing: results from randomised exposure. **The Lancet**, v. 344, Issue 8927, p. 905-909, 1994.

KISHIMOTO, R. A.; BAKER, C. E. Pathogenic and potentially pathogenic fungi isolated from beach sands and selected soils of Oahu, Hawaii. **Mycologia**, v.61, p.537–548, 1969.

KLICH, M. A. **Identifications of common *Aspergillus* species**. New Orleans: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 116p., 2002.

KOHLMEYER, J. Geography of marine fungi. **Australian Journal of Botany, Suppl.** Ser.10, p.67–76, 1983.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P.C. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008.

KORAJKIC, A.; BROWNELL, M. J.; HARWOOD, V. J. Investigation of human sewage pollution and pathogen analysis at Florida Gulf Coast beaches. **Journal of Applied Microbiology**, v.110(1), p.174–183, 2011.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J. W. **The yeast: a taxonomic study**. 4ed. Amsterdan: Elsevier Science B.V., 1055p., 1998.

KUTTY, S.N.; PHILIP, R. Marine yeasts-a review. **Yeast**. v. 25, p. 465-483, 2008.

LAMPARELLI, C.C. **Mapeamento dos ecossistemas costeiros do Estado de São Paulo**. Secr. Meio Ambiente, CETESB, São Paulo, 108 p., 1999.

LAMPARELLI, C. C. **Desafios para o licenciamento e monitoramento ambiental de emissários submarinos: a experiência de São Paulo**. In: SECRETARIA DE MEIO AMBIENTE (SMA). Emissários submarinos: projeto, avaliação de impacto ambiental e monitoramento. São Paulo: SMA, p.11–23, 2006.

LAMPARELLI, C. C.; SATO, M. I. Z.; BRUNI, A. C. A. **Qualidade sanitária das águas das praias e sua correlação com a ocorrência de distúrbios gastrointestinais em banhistas**. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Ambientais e Saúde – CBPAS, 3, 2003, Santos. Anais...Santos: Núcleo de pesquisas ambientais da Baixada Santista (NPA-BS), p.192–195, 2003.

LARRONDO, J.V.; CALVO, M.A. Fungal density in the sands of the Mediterranean coast beaches. **Mycopathologia**, v.108, p.185–193, 1989.

LATGÉ, J.P.; PARIS, S.; SARFATI, J.; DEBEAUPUIS, J.P.; BEAUVAIS, A.; JATON OGAY, K.; MONOD, M. Infectivity of *Aspergillus fumigatus*. In H. Vanden Bossche, D. A. Stevens, and F. C. Odds (ed.), Host-fungus interplay. **National Foundation for Infectious Diseases**, Bethesda, Md. p.99–110, 1997.

LAYTON, B.A.; WALTERS, S.P.; LAM, L.H.; BOEHM, A.B. Enterococcus species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v.109, n.2, p.539–547, 2010. PubMed: 20132375.

LEBARON, P., HENRY. A.; LEPEUPLE, A.S.; PENA, G.; SERVAIS, P. An operational method for the real-time monitoring of *E. coli* numbers in bathing waters. **Marine Pollution Bulletin**, v.50, p.652-659, 2005.

LEBRETON, F.; WILLEMS, R. J. L.; GILMORE, M. S. **Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization**. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, p.1-41, 2014.

LEVINSON, N.; JAWETZ, E. **Microbiologia média e imunologia**. 7 ed., Porto Alegre, Editora Artmed, 2005.

LI, J.; CHI, Z. M.; WANG, X. H.; WANG, L.; SHENG, J.; GONG, F. Occurrence and diversity of *Pichia spp.* in marine environments. **Journal of Ocean University China**, v.7, p.281–286, 2008.

LIM, C. S.; ROSLI, R.; SEOW, H. F.; CHONG, P. P. Candida and invasive candidiasis: back to basics. **European Journal of clinical microbiology & infectious diseases**: official publication of the European Society of Clinical Microbiology, v.31, n.1, p.21–31, 2012. 10.1007/s10096-011-1273-3.

LIMA, A.; FURTADO, M. Espécies do gênero *Curvularia* (fungos anamórficos: Hyphomycetes) na Ilha de Santiago, Cabo Verde. **Portugaliae Acta Biology**, Lisboa, v.22, p.145-156, 2007.

LITOPOULO-TZANETAKI, E.; TZANETAKIS, N. Microbiological study of whitebrined cheese made from raw goat milk. **Food Microbiology**, v.9, p.13–19, 1992

LIU, Z.; WANG, L.; CHI, Z.; LI, J. Production, purification and characterization of an extracellular lipase from *Aureobasidium pullulans* HN2.3 with potential application for the hydrolysis of edible oils. **Biochemical Engineering Journal**, v.40, p.445–451, 2008.

LOKA-BHARATHI, P. A.; OAK, S.; CHANDRAMOHAN, D. Sulfate-reducing bacteria from mangrove swamps II: Their ecology and physiology. **Oceanologia Acta**, v.14, p.163-171, 1991.

LONGO, L. L.; AMADO FILHO, G. M. **O conhecimento da fauna marinha bentônica brasileira através dos tempos**. História, Ciências, Saúde – Manguinhos, Rio de Janeiro, v.21, n.3, p.995-1010, jul.-set. 2014.

LOPES, M.; ASSIS, A. S.; ASSIS, M. R. C.; FULL, R. M. C. Distribution of yeasts and Filamentous fungi in polluted and non polluted stream of Douro Basin, NE Portugal. **Ecology and Environmental Protection**. International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM, p.495-502, 2009.

LÓPEZ-PILA, J. M.; SZEWZYK, R. Estimating the infection risk in recreational waters from the faecal indicator concentration and from the ratio between pathogens and indicators. **Water Research**. v.34, n.17, p.4195-4200, 2000.

LOUREIRO, S. T. A.; CAVALCANTI, M. A. Q.; NEVES, R. P.; PASSAVANTE, J. Z. D. O. Yeasts isolated from sand and seawater in beaches of Olinda, Pernambuco State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.333–337, 2005.

LOUREIRO, S. T. A.; CAVALCANTI, M. A. Q.; NEVES, R. P.; PASSAVANTE, J. Z. O. Leveduras isoladas de sedimento do manguezal de Barra das Jangadas, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil. **Tropical Oceanography**, Recife, v. 39, n. 1, p. 60-68, 2011.

- MACÊDO, S. J., MONTES, M. de J. F.; LINS, I. C. **Características Abióticas da Área.** In: BARROS, H. M.; ESKINAZI LEÇA, E.; MACÊDO, S. J.; LIMA, T. eds. Gerenciamento participativo de estuários e manguezais. Recife, UFPE. p.7-25, 2000.
- MAIER, L. M.; OLIVEIRA, V. R.; REZENDE, K. C. R.; VIEIRA, V. D. R.; CARVALHO, C. R. **Avaliação da presença de fungos e bactérias patogênicas em duas praias do município do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro, 13p., 2003.
- MAGANTI, H. B. **Species and genotype diversities of yeasts in the clinical and natural environments in Hamilton,** McMaster University, Ontario. Master of Science Biology. 108p., 2011
- MALANI, P. N.; KAUFFMAN, C. A.; ZERVOS, M. J. **Enterococcal disease, epidemiology, and treatment.** In M. S. Gilmore, D. B. Clewell, P. Courvalin, G. M. Dunne, B. E. Murray,; L. B. Rice, *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*, Washington, D. C.: ASM Press., p.385-408, 2002.
- MANCINI, L.; D'ANGELO, A. M.; PIERDOMINICI, E.; FERRARI, C.; ANSELMO, A.; VENTURI, L.; FAZZO, L.; FORMICETTI, P.; IACONELLI, M.; PENNELLI, B. Microbiological quality of Italian beach sands. **Microchemical Journal**, v.79, p.257–261, 2005.
- MARANTE, F.J.T.; MIOSO, R.; BARRERA, J.B.; GONZÁLEZ, J.E.G.; RODRIGUEZ, J.J.S.; LAGUNA, H.B. Structural characterization and metabolite profiling of the facultative marine fungus *Paecilomyces variotti*. **Annal Microbiology**, v.62, issue 4, p.1601-1607, 2012.
- MARCELINO, E.B. **Sistematização dos projetos de emissários submarinos da SABESP e avaliação de desempenho através do modelo computacional CORMIX.** 2000. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 2000.
- MARGULIS, L.; CHAPMAN, M. J. **Kingdoms and Domains: An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth.** Academic Press, 732 p., 2009.
- MAROIS, J. J.; FRAVEL, D. R.; PAPAVIDAS, G. C. Ability of *Talaromyces flavus* to occupy the rhizosphere. **Soil Biology Biochemistry**, v.16, n.4, p.387–390, 1984.
- MAGURRAN, A. E. **Ecological diversity and its measurement.** New Jersey: Princenton University Press, p.1-114, 1988.
- MARTINS, J. E. C.; MELO, N. T.; HEINS-VACCARI, E. M. **Atlas de Micologia: diagnostico laboratorial,** Editora Manole Ltda, 63p., 2005.
- MARTINY, J. B. H.; BOHANNAN, B. J. M.; BROWN, J. H.; COLWELL, R. K.; FUHRMAN, J. A.; GREEN, J. L.; HORNER-DEVINE, M. C.; KANE, M.; KRUMINS, J. A.; KUSKE, C. R.; MORIN, P. J.; NAEEM, S.; OVREAS, L.; REYSENBACH, A. L.;

SMITH, V. H.; STALEY, J. T. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. **Nature Reviews Microbiology**, v.4, p.102–112, 2006.

MATSUURA, Y. Contribuição ao estudo da estrutura oceanográfica da região sudeste entre Cabo Frio (RJ) e Cabo de Santa Marta Grande (SC). **Ciência e Cultura**, v.38(8), p.1439-1450, 1986.

MBATA, T. I. Isolation of fungi in hyper saline Dead Sea water. Sudanese. **Journal of Public Health**, v. 3, p. 170-172, 2008.

MCBRIDE, G. B.; SALMOND, C.E.; BANDARANAYAKE, D.R.; TURNER, S.J.; LEWIS, G.D.; TILL, D.G. Health effects of marine bathing in New Zealand. **International Journal of Environmental Health Research**, v.8, p.173–189, 1998.

MCFETERS, G.A.; SINGH, A. Effects of stress on the aquatic environment in enteric bacteria. **The Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 559-569, 1991.

MEDEIROS, A.O. **Caracterização dos indicadores de qualidade de água e da diversidade de leveduras em ambientes aquáticos da bacia do rio Doce, Minas Gerais, Brasil. Belo Horizonte. 2002.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Microbiologia da UFMG, 92p., 2002.

MEDEIROS, A.O. **Influência de impactos antrópicos em fungos isolados em ambientes aquáticos.** Tese de Doutorado. Belo Horizonte. Departamento de Microbiologia da UFMG, 141p., 2005.

MELLMAN, R.L.; SPISAK, G.M.; BURAKOFF, R. *Enterococcus avium* bacteremia in association with ulcerative colitis. **American Journal of Gastroenterology**, v.87, p.337-338, 1992.

MELO, R.R. **Análise da qualidade microbiológica do peixe (*Eugerres brasiliensis*, Curvier 1830) e das águas do Estuário do Rio Itanhaém, SP, Brasil. 2015.** Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências do campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 70P., 2015.

MENDES, B.; NASCIMENTO, M. J.; OLIVEIRA, J. S. Preliminary characterisation and proposal of microbiological quality standard of sand beaches. **Water Science and Technology**, Oxford, v.27, n.3-4, p.453 – 456, 1993.

MENDES, B.; URBANO, P.; ALVES, C.; MORAIS, J.; LAPA, N; NASCIMENTO, J.; OLIVEIRA, J. F. S. Fungi as environmental microbiological indicators. **Water Science Technology**, v.38(12), p.155-162, 1998.

MENDONÇA-HAGLER, L. C.; VIEIRA, R. H. S. F.; HAGLER, A. N. Microbial quality of water, sediment, fish and shellfish in some Brazilian coastal regions. **Oecologia Brasiliensis - Aquatic Microbial Biology in Brazil**, v.9, p.197-216, 2001.

MEYERS, S. P.; AHEARN, D. G. Implication of Yeasts and Yeast-like Fungi in Marine Process. **Veröffentlichungen des Instituts für Meeresforschung in Bremerhaven**. Suppl., v. 5, p. 321-338, 1974.

MIRANDA, L. N.; VAN DER HEIJDEN, I. M.; COSTA, S. F.; SOUSA, A. P.; SIENRA, R. A.; GOBARA, S.; SANTOS, C. R.; LOBO, R. D.; PESSOA, V. P.; LEVIN, A.S. Candida colonisation as a source for candidaemia. **Journal Hospital Infection**, v.72, p. 9–16, 2009.

MISHRA, B.K.; DADHICH, S.K. Production of Amylase and Xylanase Enzymes from soil Fungi of Rajasthan. **Journal of Advanced Research and Development**. v.1, n.1, p.21-23, 2010.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. **Gerência de Biodiversidade Aquática e Recursos Pesqueiros**. Panorama da conservação dos ecossistemas costeiros e marinhos no Brasil. Brasília: MMA/SBF/GBA, 148 p., 2010.

MÖLLER, E. M.; BAHNWEIG, G.; SANDERMANN, H.; GEIGER, H.H. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. **Nucleic Acids Research**, v.20, p.6115–6116, 1992.

MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**. New Jersey: Prentice Hall Inc. 574 p., 1996.

MORAIS, P. B.; RESENDE, M. A.; ROSA, C. A.; BARBOSA, F. A. R. Occurrence and dial distribution of yeast in a Paleo-karstic lake of Sotheastern Brazil. **Revista de Microbiologia**, v.27, p.182-188, 1996.

MORENO, M.; FERRERO, T.; GRANELLI, V.; MARIN, V.; ALBERTELLI, G.; FABIANO, M. Across shore variability and trophodynamic features of meiofauna in a microtidal beach of the NW Mediterranean. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v.66, p.357-367, 2006.

MOUNA, H.; AHMED, A.; OMAR, A. An evaluation of environmental factors affecting the survival of *Escherichia coli* in coastal area, Oualidia lagoon. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.3, n.10, p.710-721, 2014. ISSN: 2319-7706.

MUELLER, G. M.; BILLS, G. F.; FOSTER, M. S. **Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods**. Elsevier Academic Press, San Diego, p.1-4, 2004.

MURATORI M. C. S.; OLIVEIRA, A. L.; RIBEIRO, L. P.; COSTA, A. P. R.; FERNANDES, S. H.; LEITE, R. C. Corporacion entre el método estándar sugerido por Aphyay los métodos simplete y pentifilm, para la identificacion del grupo coliforme y de *Escherichia coli* en tilapia (*Oreochremis* sp) piocedente de piscicultura de água Dulce. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.32, p.15-19, 2000.



MURRAY, B. E. Life and times of the enterococcus. **Clinical Microbiology Reviews**, v.3, p.46-65, 1990.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; LANDRY, M. L.; PFALLER, M. A. **Manual of Clinical Microbiology**. 9<sup>a</sup> ed. Washington, DC: ASM, 2488p., 2007.

NAGAHAMA, T. **Yeast biodiversity in freshwater, marine and deep-sea environments**. In: C. A. Rosa, & P. Gábor (Eds.), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer, Berlin, p.241-262, 2006.

NASER, S.; THOMPSON, F. L.; HOSTE, B.; GEVERS, D.; VANDEMEULEBROECKE, K.; CLEENWERCK, I.; THOMPSON, C. C.; VANCANNEYT, M.; SWINGS, J. Phylogeny and Identification of Enterococci by atpA Gene Sequence Analysis. **Journal of clinical Microbiology**, v.43, n.5, p.2224–2230, 2005.

NEGRI, M.; MARTINS, M.; HENRIQUES, M.; SVIDZINSKI, T.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Examination of potential virulence factors of *Candida tropicalis* clinical isolates from hospitalized patients. **Mycopathologia**, v.169, p.175–182, 2010.

NHMRC (National Health and Medical Research Council). **Guidelines for managing risks in recreational water**. Australian Government, Canberra. 216p., 2008.

NIENCHESKI, L. F. H.; BAUMGARTEN, M. G. Z.; CABRERA, L.; KALIL, S. J. Patos Lagoon: indicators of organic pollution. **Journal of Coastal Research**, v.39, p.1357-1359, 2006.

NOBLE, R. T.; MOORE, D. F.; LEECASTER, M. K.; MCGEE, C. D.; WEISBERG, S. B. Comparison of total coliform, fecal coliform, and enterococcus bacterial indicator response for ocean recreational water quality testing. **Water Research**, v.37, p.1637-1643, 2003.

NOVOTNY, C.; SVOBODOVA, K.; ERBANOVA, P.; CAJTHAML, T.; KASINATH, A.; LANG, E.; SASEK, V. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil biology & biochemistry**, v.36, p.1545-1551, 2004.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.58, p.77–82, 2007.

ODDS, F.C. **Candida and candidoses**. Ecology of *Candida* and epidemiology of candidoses. 2<sup>o</sup> ed. London: Ballière Tindall, 468p., 1988.

OKSUZ, S.; SAHIN, I.; YILDIRIM, M.; GULCAN, A.; YAVUZ, T.; KAYA, D.; KOC, A.N. Phospholipase and proteinase activities in different *Candida* species isolated from

anatomically distinct sites of healthy adults. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v.60, p.280–283, 2007.

OLIVEIRA, A. J. F. C.; PINHATA, J. M. W. Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. **Water Research**, v.42, n.8-9, p.2242-2250, 2008.

OLIVEIRA, A. J. F. C.; HOLLNAGEL, H. C.; MESQUITA, H. S. L.; FONTES, R. F. C. Physical, chemical and microbiological characterization of the intertidal sediments of Pereque Beach, Guarujá (SP), Brazil. **Marine Pollution Bulletin**. v.54, Issue 7, p.921-927, 2007.

OLIVEIRA, D. R. P.; CASTRO, A. C. L.; NASCIMENTO, A. R.; SOARES, L. S.; PORTO, H. L. R. Avaliação do grau de contaminação microbiológica do Estuário do Rio Paciência, Estado do Maranhão. Labomar. **Arquivos de Ciência do Mar**. v. 45, n. 1, p. 56–61, 2012.

OLIVEIRA, L. G.; CAVALCANTI, N. A. deQ.; PASSAVANTE, J. Z. deO.; FERNANDES, M. J.dos.; LIMA, D. M. deM. Filamentous fungi isolated from Candeias Beach, Pernambuco, Brazil. **Hoehnea**, v38(2), p.215-220, 2011.

OLIVEIRA, R.S. **Densidade e diversidade de fenótipos de resistência a antimicrobianos de *Enterococcus* sp, *Escherichia coli* e *Aeromonas* sp isoladas de água, sedimento e mexilhão coletados em Santos e Itanhaém, São Paulo, Brasil**. 2016. (Dissertação em Biodiversidade Aquática) Câmpus do Litoral Paulista, UNESP. 62p. 2016.

PAGNOCCA, F. C.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. Yeasts associated with the white shrimp *Penaeus schmitti*, sediment, and water of Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brasil. **Yeast**, v.5, p.479–483, 1989.

PAPADAKIS, J. S.; MAVRIDOU, A.; RICHARDSON, S. C.; LAMPRINI, M.; MARCELOU, U. Bather-related microbial and yeast populations in sand and seawater. **Water Research**, v.31, p.799–804, 1997.

PASSOS, C. T.; BURKERT, J. F. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V. Biodegradação de fenol por uma nova linhagem de *Aspergillus* sp. isolada de um solo contaminado do sul do Brasil. **Química Nova**, v.32, n.4, p 950-954, 2009.

PASSOS, C. T.; SILVA, A. P. R.; BRAGA, A. R. C.; SANZO, A. V. L.; KALIL, S. J. Variação Sazonal da Contaminação por Coliformes na Areia e Água da Praia do Cassino, Rio Grande – RS. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza, v.44, n.1, p.21-26. 2011.

PEÇANHA, M. P.; PAGNOCCA, F. C.; RUGANI, C. A.; NEVES, F. A. Yeast and other parameters of pollution of Ribeirão Claro stream in Rio Claro, São Paulo. **Revista de Microbiologia**, v.27, p.177-181, 1996.

PEREIRA, A. R. B.; FREITAS, D. A. F. Uso de microrganismos para a biorremediação de ambientes impactados. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**. v.6, n.6, p.995–1006, 2012.

PEREIRA, C. R. **Efeitos da contaminação fecal sobre a dinâmica e a estrutura da alça microbiana em areias de praias do litoral norte do estado de São Paulo**. 2014. 79p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Área: Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2014.

PEREIRA, C. R.; ZAMPIERI, B. D. B.; OLIVEIRA, R. S.; OLIVEIRA, A. J. C. F. **Microrganismos indicadores de contaminação fecal de areias de praias recreacionais marinhas**. X Congresso de Ecologia do Brasil, São Lourenço, MG. p.1-2. 2011

PIEDRAS, S. R. N.; BAGER, A.; MORAES, P. R. R.; ISOLDI, L. A.; FERREIRA, O. G. L.; HEEMANN, C. Macroinvertebrados bentônicos como indicadores de qualidade de água na barragem Santa Bárbara, Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.494-500, 2006.

PINHATA, J. M. W. **Variação espaço-temporal da densidade de Enterococos e Candida sp. em águas e areias de praias do município do Guarujá, SP**. 2007. Trabalho de Conclusão de Curso – Campus Experimental do Litoral Paulista, Universidade Estadual Paulista, São Vicente. 59p. 2007.

PINTO, K. C. **Avaliação sanitária das águas e areias de praias da Baixada Santista, São Paulo**. 2010. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 241p., 2010.

PINTO, A. B.; OLIVEIRA, A. J. F. C. Diversidade de micro-organismos indicadores utilizados na avaliação da contaminação fecal de areias de praias recreacionais marinhas: estado atual do conhecimento e perspectivas. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v.35, n.1, p.105-114, 2011.

PINTO, A. B.; PEREIRA, C. R.; DE OLIVEIRA, A. J. F. C. Densidade de *Enterococcus sp* em águas recreacionais e areias de praias do município de São Vicente-SP, Brasil e sua relação com parâmetros abióticos. **Mundo da Saúde**, v.36, n.4, p.587-593, 2012.

PITT, J.I. **A laboratory guide to common Penicillium species**. Academic Press, Australia, 182p., 1985.

PLDS/Araçá. **Plano Local de Desenvolvimento Sustentável da Baía do Araçá**. Org.: TURRA, A.; SANTOS, C. R.; PERES, C. M.; SEIXAS, S. C.; SHINODA, D. C.; STORI, F. T.; XAVIER, L. Y.; ANDRADE, M. M.; SANTANA, M. F. M.; RODRIGUES, M. V.; GRILLI, N. M.; JACOBI, P. R.; SARAFINI, T. Z. 1ª Edição. São Paulo: Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, 69p., 2016.

PRABAKARAN, M.; THENNARASU, V.; MANGALA, R. A.; BHARATHIDASAN, R.; CHANDRAKALA, N.; MOHAN, N. Comparative studies on the enzyme activities of wild and mutant fungal strains isolated from sugarcane field. **Indian Journal Science Technology**, v.2, n.11, p.46–49, 2009.

PRABAKER, K.; WEINSTEIN, R. A. Trends in antimicrobial resistance in intensive care units in the United States. **Current Opinion in Critical Care: Infectious**, v.17(5), p.472–479, 2011.

PRATES, A. P. L.; GONÇALVES, M. A.; ROSA, M. R. **Panorama da conservação dos ecossistemas costeiros e marinhos no Brasil**. Brasília: MMA, 2012. 152 p.

PROKSA, B. *Talaromyces flavus* and its metabolites. **Chemical Papers**, v.64, p.696–714, 2010.

PRUSS, A. Review of epidemiological studies on health effects from exposure to recreational water. **International Journal Epidemiology**, Oxford, v.27, n.1, p.1-9, 1998.

QUINN, P. J. Sesonal occurrence of yeasts and other fungi in freshwater lake. **Transactions of the British Mycological Society**, v.83, p.53-58, 1984.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas**. 1ª ed. Porto Alegre: editora Artmed, 512p., 2005.

RAGHUKUMAR, C. Marine fungal biotechnology: an ecological perspective. **Fungal Diversity**, v.31, p.19-35, 2008.

RAGHUKUMAR, C.; RAGHUKUMAR, S.; SHEELU, G.; GUPTA, S. M.; BAGENDER, B.; RAO, B. R. Buried in time: culturable fungi in a deep-sea sediment core from the Chagos Trench, Indian Ocean. **Deep Sea Research**, v.51, p.1759–1768, 2004.

RAJA, N. S.; SINGH, N. N. Disseminated invasive aspergillosis in an apparently immunocompetent host, **Journal Microbiology, Immunology and Infection**, v.39, n.1, p.73-77, 2006.

RAPER, K. B.; FENNELL, D. I. **The genus Aspergillus**. Huntington: Robert E. Krieger. 686p., 1977.

REGO, J. C. V. **Qualidade Sanitária de Água e Areia de Praias da Baía de Guanabara**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências na área da Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública-ENSP, Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 132p., 2010.

RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D. W. **Fungal Infection Diagnosis and Management**, 3th edition. Victoria, Blackwell Publishing Asia Pty Ltd., p.61-73, 2003.

RICKLEFS, R. A economia da Natureza. 5 ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Kogan, 470p., 2003.

RISTORI, C. A.; IARIA, S. T.; GELLI, D. S.; RIVERA, I. N. G. Pathogenic bacteria associated with oysters (*Crassostrea brasiliiana*) and estuarine water along the south coast of Brazil. **International Journal of Environmental Health Research**, v.17, n.4, p.259-269, 2007.

ROHDEN, R; ROSSI, E. M.; SCAPIN, D.; CUNHA, F. B.; SARDIGLIA, C. U. Monitoramento microbiológico de águas subterrâneas em cidades do Extremo Oeste de Santa Catarina. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.14, n.6, p.2199-2203, 2009.

ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. **Tratado de Microbiologia**. Editora Manole, São Paulo, v.2. 126p., 1991.

ROSA, C. A.; REZENDE, M. A.; BARBOSA, F. A. R.; MORAIS, P. B.; FRANZOT, S. P. Yeast diversity in a mesotrophic lake on the karstic plateau of Lagoa Santa, MG-Brazil. **Hidrobiologia**, v.308, p.103-108, 1995.

ROSA, C. A.; RESENDE, M. A.; FRANZOT, S. P.; MORAIS, P. B.; BARBOSA, F.A.R. Distribuição de leveduras e coliformes em um lago do Karst do planalto de Lagoa Santa, MG-Brazil. **Revista de Microbiologia**, v.21, p.19-24, 1990.

ROZEN, Y.; BELKIN, S. Survival of enteric bacteria in seawater. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, p.513-529, 2001.

RUEDA, R. Micosis superficiales y dermatomycosis. **Colombia Médica**. v.33, p.10-16, 2002.

RUOFF, K. L. **Streptococcus**. In: Murray, P.R. (ed.) Manual of clinical microbiology. 6<sup>th</sup> ed. Washington DC: ASM Press, p. 299-307, 1995.

RUOFF, K. L.; DE LA MAZA, L.; MURTAGH, M. J.; SPARGO, J. D.; FERRARO, M. J. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. **Journal Clinical Microbiology**, v. 28, p. 435–437, 1990.

SABINO, R.; SAMPAIO, P.; CARNEIRO, C.; ROSADO, L.; PAIS, C. Isolates from hospital environments are the most virulent of the *Candida parapsilosis* complex. **BMC Microbiology**, v. 11, n. 180, p. 1-10, 2011.

SAMARANAYAKE, L. P.; FIDEL, P. L.; NAGLIK, J. R.; SWEET, S. P.; TEANPAISAN, R.; COOGAN, M. M.; BLIGNAUT, E; WANZALA, P. Fungal infections associated with HIV infection. **Oral Diseases**, v.8, p.151–160, 2002.

SANCHEZ, P. S.; AGUDO, E. G.; CASTRO, F. G.; ALVES, M. N.; MARTINS, M. T. Evaluation of the sanitary quality of marine recreational waters and sands from beaches of the São Paulo State, Brazil. **Water Science and Technology**, v.18, p.61–72, 1986.

SANT'ANNA, E. M.; WHATELY, M. H. Distribuição dos manguezais do Brasil. **Revista Brasileira de Geografia**. Rio de Janeiro, v. 43, n. 1, p. 47-63, 1981.

SANTOS, D. A.; OLIVEIRA, M. M.; CURVELO, A. A. S.; FONSECA, L. P.; PORTO, A. L. M. Hydrolysis of cellulose from sugarcane bagasse by cellulases from marine-derived fungi strains. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.121, p.66-78, 2017.

SARANYA, S.; MOORTHY, K.; SAKTHIVEL, S.; MALAR, S. S. A. S.; PUNITHA, T.; VINODHINI, R.; BHUVANESHWARI, M.; KANIMOZHI, C. Prevalence and antifungal susceptibility pattern of *Candida albicans* from low socio-economic group. **International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.6, n.2, p.158-162, 2014.

SARQUIS, M.I.M.; OLIVEIRA, P.C. Diversity of microfungi in the Sandy soil of Ipanema Beach, Rio de Janeiro, Brazil. **Journal Basic Microbiology**, v.36, n.1, p.51-58, 1996.

SATO, M. I. Z.; DI BARI, M.; LAMPARELLI, C. C.; TRUZZI, A. C.; COELHO, M.C.L.S.; HACHICH, E.M. Sanitary quality of sands from marine recreational beaches of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.321–326, 2005.

SCOTT, T. M.; ROSE, J. B.; JENKINS, T. M.; FARRAH, S. R.; LUKASIK, J. Microbial Source Tracking: Current Methodology and Future Directions. **Applied Environmental Microbiology**, v.68, p.5796-5803, 2002.

SENGUPTA, A.; CHAUDHURI, S. Ecology of microfungi in mangroves sediments at the Ganges river estuary in Índia. **Indian Forester**, v.121, issue 9, p.807–812, 1995.

SGHIR, A.; GRAMET, G.; SUAUA, A.; ROCHET, V.; POCART, P.; DORE, J. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. **Applied Environmental Microbiology**, v.66, p.2263–2266, 2000. doi: 10.1128/AEM.66.5.2263-2266.

SHAH, A. R.; MADAMWAR, D. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. **Process Biochemistry**, v.40, p.1763-1771, 2005.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, Y. C. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**. v.19, n.8, p.627-662, 2005.

SHEARER, C.; DESCALS, E.; KOHLMAYER, B.; KOHLMAYER, J.; MARVANOVÁ, L.; PADGETT, D.; PORTER, D.; RAJA, H. A.; SCHMIT, J. P.; THORTON, H. A.; VOGLYMAYR, H. Fungal biodiversity in aquatic habitats. **Biodiversity and Conservation**, v.16, p.49–67, 2007.

SHERMAN, R. E.; FAHEY, T. J.; HOWARTH, R. W. Soil-plant interactions in a neotropical mangrove forest: iron, phosphorus and sulfur dynamics. **Oecologia**, v.115, p.553-563, 1998.

SILVA, D. C. V.; TIAGO, V. P.; MATOS, J. L. S.; PAIVA, L. M.; SOUZA-MOTTA, C. M. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. **Revista Brasileira de Botânica**, v.34, n.4, p.607-610, 2011.

SILVA, G. S.; BRUNO, L. M.; CASTRO, H. F. Seleção e Imobilização de Fungos Filamentosos Produtores de Lipase Intracelular. **Química Nova**, Fortaleza, v.5, n.8, p.01-07, 2009.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Review**, v.36, p.288-305, 2012.

SILVEIRA, E. S.; LOBATO, R. C.; ABREU, P. C. Fungos e Leveduras no Estuário da Lagoa dos Patos e Praia do Cassino, RS, Brasil. **Atlântica, Rio Grande**, v.35, n.1, p.45-54, 2013.

SINCLAIR, R. G.; ROSE, J. B.; HASHSHAMC, S. A.; GERBAD, C. P.; HAAS, C. N. Criteria for selection of surrogates used to study the fate and control of pathogens in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v.78, n.6, p.1969-1977, 2012.

SINTON, L. W. Faecal streptococci as faecal pollution indicators: a review. Part II: Sanitary significance, survival and use. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v.27, p.117-137, 1993.

SMA. Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo. **Atlas of the environmental Conservation Units of the State of São Paulo**. Part I. The Coast. Secretaria de Meio Ambiente do Estado de São Paulo, SP., 1997.

SMAC (Secretaria Municipal de Meio Ambiente do Município do Rio de Janeiro). **Resolução n ° 468 de 28 de janeiro de 2010**. Dispõe sobre a análise e informações das condições das areias das praias no Município do Rio de Janeiro. D.O. Rio de 29/01/2010 • ANO XXIII • N° 211. 2010.

SONJAK, S.; FRISVAD, J. C.; GUNDE-CIMERMAN, N. *Penicillium* mycobiota in Arctic subglacial ice. **Microbial Ecology**, v.52, p.207-216, 2006.

SOUZA, J. B.; DANIEL, L. A. Inativação dos microrganismos indicadores *Escherichia coli*, colifagos e *Clostridium perfringens* empregando ozônio. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**. v.4, n.2, p.265-273, 2008.

TABAK, H.; COOKE, W. B. Growth and metabolism of fungi in an atmosphere of nitrogen. **Mycologia**, v.60, n.1, p.115-140, 1968.

TALAIKHOZANI, A.; PONRAJ, M. **Identification of Molds & Bacteria made Easier for Engineers**. Lambert Academic Publishing. 72p., 2015.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: Resistência do estafilococo, do entereococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.3, p.281-301, 2000.

TAYSI, I.; VAN UDEN, N. Occurrence and Population Densities of Yeast Species in an Estuarine-Marine Area. **Limnology and Oceanography**, v.9(1), p.42-45, 1964.

TEODORO, A. C.; DULEBA, W.; GUBITOSO, S. Estudo multidisciplinar (geoquímica e associações de foraminíferos) para caracterizar e avaliar intervenções antrópicas na Baía do Araçá, Canal de São Sebastião, SP. **Geologia USP. Série Científica**, v.11, n.1, p.113–136, 2011.

THOMAZ, S. M. O papel ecológico das bactérias e teias alimentares microbianas em ecossistemas aquáticos. **Perspectivas da Limnologia no Brasil**. São Luís: Editora União, p. 147-167, 1999.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Ed. Artmed. Porto Alegre, 10 ed. 967p., 2012.

TUCCI, C. E. M.; MENDES, C. A. **Avaliação Ambiental Integrada de Bacia Hidrográfica**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília. 302p., 2006.

USEPA (United States Environmental Protection Agency). **Recreational Water Quality Criteria**. Office of Water (EPA-820-F-12-058), Washington, DC. 69p., 2012.

VALDEZ, R. H.; GROSBELLI, P. P. **Análise microbiológica de areias de praças públicas da cidade de Palmas (PR)**. *Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais*, 2012.

VAN GOETHEM, G. F.; LOUWAGIE, B. M.; SIMOENS, M. J.; VANDEVEN, J. M.; VERHAEGEN, J. L.; BOOGAERTS, M. A. *Enterococcus casseliflavus* septicaemia in a patient with acute myeloid leukaemia. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.13, p.519–520, 1994.

VAN UDEN, N.; FELL, J. W. Marine yeasts (*In*: Droop, M.R. and Wood, E.J.F. (eds.), *Advances in Microbiology of the Sea*. **Academic Press**, New York, p. 167-201, 1968.

VAN WYK, D. A. B. **Diversity and characteristics of yeasts in water sources of the North West Province**. Master of Science in Environmental Science. Faculty of Natural Science, North-West University. 129p., 2012.



VANUCCI, M. **Os manguezais e nós: uma síntese de percepções**. São Paulo. EDUSP, 233p, 1999.

VAZ-DOS-SANTOS, A. M.; GRIS, B. Length-weight relationships of the ichthyofauna from a coastal subtropical system: a tool for biomass estimates and ecosystem modelling. **Biota Neotropica**. 16(3): e20160192.

VELOSO, V. G.; CARDOSO, R. S.; FONSECA, D. B. **Adaptações e biologia da macrofauna de praias arenosas expostas com ênfase nas espécies da região entre-marés do litoral fluminense**. Oecologia Brasiliensis. Vol. III: Ecologia de praias arenosas do litoral brasileiro. 1997.

VIDALI, M. Biorremediation: an overview. **Journal of Applied Chemistry**, v.73, n.7, p.1163-1172, 2001.

VIEIRA, R. H. S. F.; RODRIGUES, D. P.; MENEZES, E. A.; EVANGELISTA, N. S.DES.; DOS REIS, E. M .F.; BARRETO, L.M.; GONÇALVES, F.A. Microbial contamination of sand from major beaches in Fortaleza, Ceará State, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.77-80, 2001.

VOGEL, C.; ROGERSON, A.; SCHATZ, S.; LAUBACH, H.; TALLMAN, A.; FELL, J. W. Prevalence of yeasts in beach sand at three bathing beaches in South Florida. **Water Research**, v.41, p.1915–1920, 2007.

WALSH, T. J.; ANAISSIE, E. J.; DENNING, D. W.; HERBRECHT, R.; KONTOYIANNIS, D. P.; MARR, K. A.; MORRISON, V. A.; SEGAL, B. H.; STEINBACH, W. J.; STEVENS, D. A.; BURIK, J. Van; WINGARD, J.R.; PATTERSON, T. F. Infectious diseases society of America. Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v.46, p.327-360, 2008.

WALSH, T. J.; GROLL, A.; HIEMENZ, J.; FLEMING, R.; ROILIDES, E.; ANAISSIE, E. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. **Clinical Microbiology & Infection**, v.10, Suppl.1, p. 48-66, 2004.

WERNER, G.; COQUE, T. M.; HAMMERUM, A. M.; HOPE, R.; HRYNIEWICZ, W.; JOHNSON, A.; KLARE, I.; KRISTINSSON, K. G.; LECLERCQ, R.; LESTER, C. H.; LILLIE, M.; NOVAIS, C.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PEIXE, L.V.; SADOWY, E.; SIMONSEN, G. S.; TOP, J.; VUOPIO-VARKILA, J.; WILLEMS, R. J.; WITTE, W.; WOODFORD, N. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. **Euro Surveillance**, v.13(47), 2008.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequence of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. In: PCR protocols: A Guide to Methods and Applications, 1990.

WHITMAN, R. L.; NEVERS, M. B. Foreshore sand as a source of *Escherichia coli* in nearshore water of a Lake Michigan beach. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.5555–5562, 2003. PubMed: 12957945.

WHO (World Health Organization). **Guidelines for Safe Recreational Waters**. Water Environments. Volume I: Coastal and Fresh –Waters. WHO/EOS/98.14, World Health Organization, Geneva, 208p. 1998.

WHO (World Health Organization). **Guidelines for safe recreational water environments**. Vol. 1. Coastal and fresh waters. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 253p. 2003.

WILHM, J.; DORRIS, T. Biological parameters for water quality criteria. **Biological Science**, Washington, DC, n.18, p.477- 481, 1968.

WONG, M. K. M.; GOH, T. K.; HODGKISS, I. J.; HYDE, K. D.; RANGHOO, V. M.; TSUI, C. K. M.; HO, W. H.; WONG, W. S. W.; YUEN, T. K. Role of fungi in freshwater ecosystems. **Biodiversity and Conservation**, v 7, p.1187-1206, 1998.

XAVIER, L. Y.; STORI, F. T.; TURRA, A. **Desvendando os oceanos: Um olhar sobre a Baía do Araçá – São Paulo**: Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, 1a edição, São Paulo, 62p., 2016. ISBN: 9788598729305.

XIONG, H.; QI, S.; XU, Y.; MIAO, L.; QIAN, P.Y. Antibiotic and antifouling compound production by the marine-derived fungus *Cladosporium sp.* F14. **Journal of Hydro-environment Research**, v.2, p.264-270, 2009.

YAMAHARA, K. M.; WALTERS, S. P.; BOEHM, A. B. Growth of enterococci in unaltered, unseeded beach sands subjected to tidal wetting. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v.75, n.6, p.1517- 1524, 2009.

YAN, K.; ZHANG, Y.; CHI, Z. Distribution and diversity of *Candida tropicalis* strains in different marine environments. **Journal Ocean University of China**, v.9, p.139–144, 2010.

YANONG, R. P. Fungal diseases of fish. **Veterinary Clinics North Am Exot Anim Pract.**, v. 6, p. 377-400, 2003.

ZAK, J.C.; WILLING, M.R. **Fungal Biodiversity Patterns**. En: Mueller GM, Bills GF, Foster MS (Eds) Biodiversity of Fungi: Inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press. London, 2004.

ZAMPIERI, B. D. B. **Ocorrência e distribuição de bactérias resistentes a metais pesados em sedimentos da Baía do Araçá, São Sebastião**. Dissertação apresentada para Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro. 78p. 2015.

ZAMPIERI, B.D.B.; OLIVEIRA, R.S.; PINTO, A.B.; ANDRADE, V.C.; BARBIERI, E.; CHINELLATO, R.M.; OLIVEIRA, A.J.F.C. Comparison of bacterial densities and resistance in different beach compartments: should water be your main concern? **O Mundo da Saúde**, São Paulo –v.40A, p. 461-482, 2017.

ZEHMS, T.T.; MCDERMOTT, C.M.; KLEINHEINZ, G.T. Microbial concentrations in sand and their effect on beach water in Door County, Wisconsin. **Journal of Great Lakes Research**, v. 34, p. 524–534, 2008.

ZHANG, S.; HOU, S.; MA, X.; QIN, D.; CHEN, T. Culturable bacteria in Himalayan glacial ice in response to atmospheric circulation. **Biogeosciences, European Geosciences Union**, v.4 (1), p.1-9, 2007.

ZHANG, C.; KIM, S.K. Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects. **Marine Drugs**, v. 8, p. 1920-1934, 2010.

ZHU, H.Y.; TIAN, Y.; HOU, Y.H.; WANG, T.H. Purification and characterization of the cold-active alkaline protease from marine cold-adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010. **Molecular Biology Reports**, v.36, n.8, p.2169-2174, 2009.