



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Roberta Fonseca de Mendonça Freire

Avaliação física, química e microbiológica dos Rios Pará
(Abaetetuba – PA), Dendê (Barcarena – PA) e Baía do Guajará
(Belém – PA) para utilização como bioindicadores de alteração
ambiental

BELÉM-PA

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ROBERTA FONSECA DE MENDONÇA FREIRE

Avaliação física, química e microbiológica dos Rios Pará (Abaetetuba – PA), Dendê (Barcarena – PA) e Baía do Guajará (Belém – PA) para utilização como bioindicadores de alteração ambiental

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Pará, como parte do requisito para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador:

Prof. Dr. Alberdan Silva Santos

BELÉM-PA

2010



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS NATURAIS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Roberta Fonseca de Mendonça Freire

Avaliação física, química e microbiológica dos Rios Pará (Abaetetuba – PA), Dendê (Barcarena – PA) e Baía do Guajará (Belém – PA) para utilização como bioindicadores de alteração ambiental

Data da aprovação: Belém-PA. 27-09-2010

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Alberdan Silva Santos – ICEN/UFPA
(Orientador)

Prof^a. Dr^a. Regina Celi Sarkis Müller – ICEN/UFPA
(Membro)

Prof^a. Dr^a. Luciana Pereira Xavier – ICB/UFPA
(Membro)

BELÉM
2010

Freire, Roberta Fonseca de Mendonça

Avaliação física, química e microbiológica dos Rios Pará (Abaetetuba – PA), Dendê (Barcarena – PA) e Baía do Guajará (Belém – PA) para utilização como bioindicadores de alteração ambiental / (Roberta Fonseca de Mendonça Freire); orientador, Alberdan Silva Santos. – 2010.

96f. il. 28 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará. Instituto de Ciências Exatas e Naturais. Programa de Pós-Graduação em Química. Belém, 2010.

1. Química Ambiental. 2. Água-Microbiologia. I. Santos, Alberdan Silva, orient. II. Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Programa de Pós-Graduação em Química, III. Título.

CDD 22. ed. 577.14

Aos meus familiares, em especial aos meus queridos pais, Helem Freire e José Vicente Freire, que sempre me aconselharam e apoiaram, dando carinho e atenção e mostrando o caminho certo a seguir, estando sempre em meus pensamentos e no coração, representando verdadeiros exemplos de que me orgulho.

Ao meu noivo, Romildo Borcem, que esteve sempre ao meu lado me apoiando e ajudando a superar etapas difíceis, assim como compartilhando os momentos alegres durante mais esta de conquista.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por ter me dado sabedoria, coragem e fé que nunca me faltaram durante esta etapa de aprendizagem;

Ao meu orientador Prof. Dr. Alberdan Silva Santos por ter me orientado e me auxiliado tanto na minha formação profissional quanto na formação pessoal;

A **FAPESPA** pela concessão da bolsa de estudo;

A **Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em Química e ao Laboratório de Investigação Sistemática em Biotecnologia – LabISisBio**, pelo espaço concedido para realização deste trabalho;

A **minha querida amiga Isabel Cristina Lima**, que esteve sempre comigo nos momentos alegres e difíceis de minha vida;

A **minha irmã Ana Claudia Freire** e ao **meu cunhado Marcelo Mendes**, que estiveram sempre ao meu lado me aconselhando e apoiando nos momentos alegres e difíceis durante esta etapa de minha vida;

A **minha querida tia, irmã, madrinha e mãe Rosimar Fonseca** por todo amor, carinho e conselhos que sempre me deu e que me ajudou na minha formação pessoal;

A todos os meus colegas e amigos do **Laboratório de Investigação Sistemática em Biotecnologia (LabISisBio)** pelo apoio dado para a realização deste trabalho;

A **Débora Banna**, pela amizade, companheirismo e dedicação a este trabalho, e pelos momentos de descontração e por ter passado comigo as dificuldades para realização deste trabalho;

A Cinthia Bandeira e Ronilson Freitas pela cooperação dada nos momentos de dificuldades na escrita deste trabalho;

Ao Sr. Luis Carlos (Lucas), pelo auxílio prestado na coleta na Baía do Guajará por meio do transporte concedido.

Ao **Setor de Meio Ambiente, do Instituto Evandro Chagas-PA**, através do **Pesquisador Marcelo de Oliveira Lima e sua equipe** pela realização das coletas e análises dos parâmetros físico e químicos de amostra de águas;

Ao **Laboratório de Polimorfismo de DNA (ICB/UFPA)**, em especial a Silvanira e ao Prof. Dr. Arthur Silva pela colaboração na análise do perfil microbiano por DHPLC;

Ao **Laboratório de Química Analítica e Ambiental (LAQUANAM/ICEN/UFPA)**, através da Prof^a. Dra. Simone de Fátima P. Pereira e Rafaela Miranda, pelos equipamentos concedidos para a coleta das amostras na Baía do Guajará;

A **Secretaria de Pós Graduação em Química (PPGQ)**, que sempre com boa vontade, ajudou e orientou com documentações, em especial a Léia Martins, a Rossi e ao coordenador Prof. Dr. Cláudio Nahum Alves;

A Prof^a Dra. Regina Müller e a Prof^a Dra. Luciana Xavier pelas correções e sugestões repassadas no exame de qualificação deste trabalho;

E a todos que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho.

*“(...) A quem muito foi dado, muito será
pedido; a quem muito foi confiado, muito
mais será exigido.”*

(Lc 12, 48)

SUMARIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE GRÁFICOS	17
LISTA DE APÊNDICES	18
LISTA DE ANEXO	19
LISTA DE SIGLAS	20
1. INTRODUÇÃO	22
2. OBJETIVO GERAL	24
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3. REVISÃO DA LITERATURA	25
3.1. ECOSSISTEMAS AQUÁTICOS.....	25
3.2. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DAS ÁGUAS.....	25
3.3. BIOINDICADORES DE QUALIDADE DA ÁGUA.....	26
3.4. BIOMONITORAMENTO DE ÁGUAS SUPERFICIAIS.....	27
3.5. QUALIDADE DA ÁGUA.....	28
3.6. VARIÁVEIS DA QUALIDADE DA ÁGUA.....	28
3.6.1. Potencial hidrogeniônico (pH)	28
3.6.2. Temperatura	29
3.6.3. Oxigênio Dissolvido (OD)	29
3.6.4. Sólidos totais (ST)	30
3.6.5. Turbidez	30
3.6.6. Nitrato (NO₃) e Nitrito (NO₂)	31
3.6.7. Fosfato (PO₄)	31
3.7. TÉCNICAS DE ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS.....	32
3.7.1. Técnicas de contagem de heterotróficos	32
3.7.2. Técnicas de análise genética do perfil microbiano	33
3.7.2.1. Reação em Cadeia com Polimerase (PCR).....	33
3.7.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Desnaturante (DHPLC).....	34
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIVARIADA.....	35

3.9. REGIÃO EM ESTUDO.....	36
3.9.1. Rio Pará.....	36
3.9.2. Rio Dendê.....	36
3.9.3. Baía do Guajará.....	37
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1. ÁREA DE ESTUDO.....	38
4.2. COLETA DAS AMOSTRAS.....	39
4.3. ANÁLISE DOS PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS.....	41
4.4. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA – MÉTODO DE PLAQUEAMENTO EM SUPERFÍCIE (“SPREAD PLATE”).....	42
4.4.1. Preparo do meio de cultura.....	42
4.4.2. Preparo da solução salina peptonada.....	42
4.4.3. Preparação das amostras.....	42
4.4.4. Diluições seriada da amostra.....	43
4.4.5. Inóculo e cultivo.....	43
4.4.6. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).....	44
4.5. ANÁLISE DO PERFIL MICROBIANO POR CROMATOLOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA DESNATURANTE.....	44
4.5.1. Separação e concentração das bactérias de interesse.....	45
4.5.2. Extração do DNA total.....	46
4.5.3. Condições da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).....	47
4.5.4. Condições do DHPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Desnaturante).....	48
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
5.1. BAÍA DO GUAJARÁ (CONTROLE).....	50
5.1.1. Análise dos parâmetros físicos e químicos.....	50
5.1.2. Análise microbiológica.....	50
5.1.3. Perfil das populações microbianas analisadas por DHPLC.....	51
5.2. RIO PARÁ.....	52
5.2.1. Análise dos parâmetros físicos e químicos.....	52
5.2.2. Análise microbiológica.....	57
5.2.3. Perfil das populações microbianas analisadas por DHPLC.....	60

5.3. RIO DENDÊ.....	67
5.3.1. Análise dos parâmetros físicos e químicos.....	67
5.3.2. Análise microbiológica.....	72
5.3.3. Perfil das populações microbianas analisadas por DHPLC.....	74
6. CONCLUSÕES.....	80
7. RECOMENDAÇÕES.....	81
REFERÊNCIAS.....	82
APÊNDICES.....	88
ANEXO.....	96

RESUMO: O presente trabalho foi realizado no Rio Pará (Abaetetuba-PA), Rio Dendê (Barcarena-PA) e Baía do Guajará (Belém-PA) com o objetivo desenvolver uma metodologia para utilização da microbiota aquática como bioindicador de alteração ambiental, utilizando-se de técnicas de microbiologia por meio de contagem de heterotróficos, e biologia molecular através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Desnaturante (DHPLC). Também foi utilizada a análise estatística multivariada de agrupamento hierárquico para interpretação dos resultados obtidos. Foram realizadas quatro coletas entre janeiro/2009 a abril/2010, no qual os parâmetros físicos, químicos e as unidades formadoras de colônias foram analisados. A metodologia microbiológica baseou-se na contagem de heterotróficos em placas (“SPREAD PLATE”) e a análise do perfil microbiano por DHPLC. Os parâmetros físicos e químicos foram comparados com a Resolução CONAMA 357/2005 e somente os parâmetros pH e OD de abril/2009 do Rio Dendê ficaram fora do limite da legislação. Em relação as unidades formadoras de colônias a Resolução não faz referência. Os Rios Pará e Dendê apresentaram valores abaixo de unidades formadoras de colônias em comparação ao controle. Os resultados foram analisados por estatística de agrupamento hierárquico para interpretação dos dados obtidos. Concluindo que a alteração ambiental encontrada é proveniente de ação antrópica.

Palavras chaves: *análise microbiológica em águas de rios, Spread Plate, microbiologia aquática.*

ABSTRACT:

This study was conducted in River Pará (Abaetetuba-PA), River Dendê (Barcarena-PA) and Baía Guajará (Belém-PA) in order to develop a methodology for use of aquatic flora as bioindicator of environmental change, using techniques of microbiology by heterotrophic plate count, and molecular biology through Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC). Was also used to analyze multivariate hierarchical clustering (HCA) for the interpretation of results. Four samples were taken from the January/2009 at abril/2010, in which the physical, chemical and colony-forming units were analyzed. The methodology was based on microbiological heterotrophic plate count ("SPREAD PLATE ") and microbial analysis of the profile by DHPLC. The physical and chemical parameters were compared with Resolution CONAMA 357/2005 and only the parameters pH and DO of April of 2009 River Dendê remained outside the limits of legislation. Regarding the CFU resolution does not reference. Dendê and Pará Rivers were below the colony forming units compared to control. The results were statistically analyzed by hierarchical clustering for data interpretation. Concluding that the environmental change is found from human action.

Key words: *microbiological analysis of water in rivers, Spread Plate, aquatic microbiology*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa representativo do Rio Pará e Baía do Guajará.....	36
Figura 2	Mapa representativo do Rio Dendê.....	37
Figura 3	Localização do Rio Pará.....	39
Figura 4	Localização do Rio Dendê.....	40
Figura 5	Localização da Baía do Guajará.....	40
Figura 6	Garrafa de van Dorn utilizada para coleta na zona afótica.....	41
Figura 7	Espalhamento das amostras.....	43
Figura 8	Sistema de filtração.....	46
Figura 9	Sentido dos iniciadores.....	47
Figura 10	Correlação dos resultados obtidos.....	57
Figura 11	Placa com colônias cultivadas.....	59
Figura 12	Correlação dos resultados obtidos.....	72
Figura 13	Placa com colônias cultivadas.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Rios de coleta, coordenadas, zona e dia de coleta.....	38
Tabela 2	Parâmetros físicos e químicos da Baía do Guajará.....	50
Tabela 3	Códigos, tempo de retenção e UFC correspondente aos cromatogramas da Baía do Guajará – zona fótica.....	52
Tabela 4	Códigos, tempo de retenção e UFC correspondente aos cromatogramas da Baía do Guajará – zona afótica.....	52
Tabela 5	Parâmetros físicos e químicos do Rio Pará.....	53
Tabela 6	Comparação dos parâmetros físicos e químicos entre Rio Pará e controle, zona fótica.....	56
Tabela 7	Diluição, média dos números de colônias e as UFC do Rio Pará para as duas zonas.....	58
Tabela 8	Códigos, tempo de retenção e UFC correspondente aos cromatogramas do Rio Pará – zona fótica.....	62
Tabela 9	Códigos, tempo de retenção e UFC correspondente aos cromatogramas do Rio Pará – zona afótica.....	65
Tabela 10	Parâmetros físicos e químicos do Rio Dendê.....	68
Tabela 11	Comparação dos parâmetros físicos e químicos entre Rio Dendê e controle, zona afótica.....	71
Tabela 12	Diluição, média dos números de colônias e as UFC do Rio Dendê para as duas zonas.....	73
Tabela 13	Códigos, tempo de retenção e UFC correspondente aos cromatogramas do Rio Dendê – zona fótica.....	76

Tabela 14	Códigos, tempo de retenção e UFC correspondente aos cromatogramas do Rio Dendê – zona afótica.....	78
-----------	----------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Parâmetros físicos e químicos do Rio Pará. A: pH, B: temperatura, C: OD, D: sólidos totais, E: micronutrientes.....	55
Gráfico 2	Tendência do perfil microbiológico do Rio Pará em comparação ao controle e sazonalidade.....	60
Gráfico 3	Dendograma de similaridade das UFC (zona fótica) do Rio Pará.....	63
Gráfico 4	Dendograma de similaridade das UFC (zona fótica) do Rio Pará no decorrer dos períodos de coleta em comparação ao controle.....	64
Gráfico 5	Dendograma de similaridade das UFC (zona afótica) do Rio Pará...	66
Gráfico 6	Dendograma de similaridade das UFC (zona afótica) do Rio Pará no decorrer dos períodos de coleta em comparação ao controle.....	67
Gráfico 7	Parâmetros físicos e químicos do Rio Dendê. A: pH, B: temperatura, C: OD, D: sólidos totais, E: micronutrientes.....	70
Gráfico 8	Tendência do perfil microbiológico do Rio Dendê em comparação ao controle e sazonalidade.....	74
Gráfico 9	Dendograma de similaridade das UFC (zona fótica) do Rio Dendê...	77
Gráfico 10	Dendograma de similaridade das UFC (zona fótica) do Rio Dendê no decorrer dos períodos de coleta em comparação ao controle.....	77
Gráfico 11	Dendograma de similaridade das UFC (zona afótica) do Rio Dendê.....	79
Gráfico 12	Dendograma de similaridade das UFC (zona afótica) do Rio Dendê no decorrer dos períodos de coleta em comparação ao controle.....	79

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice I	Cromatograma da Baía do Guajará – zona fótica.....	88
Apêndice II	Cromatograma da Baía do Guajará – zona afótica.....	88
Apêndice III	Cromatograma do Rio Pará, coleta janeiro/2009 – zona fótica....	89
Apêndice IV	Cromatograma do Rio Pará, coleta janeiro/2009 – zona afótica..	89
Apêndice V	Cromatograma do Rio Pará, coleta abril/2009 – zona fótica.....	90
Apêndice VI	Cromatograma do Rio Pará, coleta abril/2009 – zona afótica.....	90
Apêndice VII	Cromatograma do Rio Pará, coleta outubro/2009 – zona fótica..	91
Apêndice VIII	Cromatograma do Rio Pará, coleta outubro/2009 – zona afótica.....	91
Apêndice IX	Cromatograma do Rio Pará, coleta abril/2010 – zona fótica.....	92
Apêndice X	Cromatograma do Rio Pará, coleta abril/2010 – zona afótica.....	92
Apêndice XI	Cromatograma do Rio Dendê, coleta abril/2009 – zona fótica.....	93
Apêndice XII	Cromatograma do Rio Dendê, coleta abril/2009 – zona afótica...	93
Apêndice XIII	Cromatograma do Rio Dendê, coleta outubro/2009 – zona fótica.....	94
Apêndice XIV	Cromatograma do Rio Dendê, coleta outubro/2009 – zona afótica.....	94
Apêndice XV	Cromatograma do Rio Dendê, coleta abril/2010 – zona fótica.....	95
Apêndice XVI	Cromatograma do Rio Dendê, coleta abril/2010 – zona afótica...	95

LISTA DE ANEXO

Anexo I	Mapa pluviométrico – Abril/2009.....	96
---------	--------------------------------------	----

LISTA DE SIGLAS

ACN – Acetonitrila

CETESB – Companhia Estadual de Tecnologia de Saneamento Básico

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DHPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Desnaturante

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

dNTPs – Desoxinucleotídeo trifosfato

GPY – Meio de cultura composto por Glicose, Peptona e Extrato de levedura

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IEC – Instituto Evandro Chagas

Min. – Minuto

OD – Oxigênio Dissolvido

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – potencial Hidrogeniônico

STS – Sólidos Totais em Suspensão

TDS – Sólidos Totais Dissolvidos

TEAA – Acetato de Trietilamônia

TE – Tris-EDTA

UFC – Unidade Formadora de Colônias

UNT – Unidade Nefelométrica de Turbidez

1. INTRODUÇÃO

Este trabalho é baseado no sub projeto intitulado “INVESTIGAÇÃO DO PERFIL DAS FLORAS MICROBIANAS FÓTICA E AFÓTICA DAS ÁGUAS DOS RIOS PRÓXIMOS À ZONA INDUSTRIAL E PORTUÁRIA DA VILA DO CONDE NO MUNICÍPIO DE BARCARENA”, sendo parte integrante do projeto “INTERAÇÕES DE VIGILÂNCIA AMBIENTAL EM SAÚDE NA ÁREA INDUSTRIAL E PORTUÁRIA DOS MUNICÍPIOS DE ABAETETUBA E BARCARENA”, em parceria com o Instituto Evandro Chagas (IEC – PA).

O foco principal deste trabalho foi analisar a utilização da microbiota aquática como indicadores biológicos de alteração ambiental.

Os rios são sistemas complexos por serem receptores naturais de drenagens das áreas adjacentes. Possuem características físicas, químicas, biológicas e hidrológicas refletindo em muitas influências entre elas climáticas, geológicas, geomorfológicas e cobertura vegetal da região, considerando que esses fatores caracterizam o ambiente natural do sistema. A composição química da água depende das atividades exercidas em torno do sistema, como construção de represas, efluente industrial e doméstica, entre outros, além das características terrestres adjacentes e do seu grau de alteração, que podem influenciar nas características físicas, químicas, microbiológicas e qualidade da mesma (BERNARDI *et al*, 2009).

A contaminação de rios, lagos e mananciais é uma consequência da ação antrópica e podem ser pontuais como despejos domésticos e efluentes industriais, ou difusas, como águas de escoamento dos solos agrícolas que podem transportar partículas sólidas, pesticidas e fertilizantes (FALQUETO, 2008).

A biota aquática está em constante exposição a uma grande quantidade de substâncias tóxicas que são lançadas no ambiente vindas de diversas fontes de emissão, como lixos tóxicos, oriundos de efluentes industriais, processos de drenagem agrícola, derrames acidentais de lixos químicos e esgotos domésticos lançados em rios e mares contribuem para alteração dos ecossistemas aquáticos com uma ampla gama de agentes tóxicos como metais pesados, agrotóxicos, compostos orgânicos, entre outros (ARIAS *et al*, 2007).

A análise de um corpo d'água pode revelar o uso inadequado do solo adjacente, os efeitos dos lançamentos de efluentes e seu potencial de

autodepuração, ou seja, sua capacidade de se restabelecer o equilíbrio após o recebimento de efluentes (PEDROZA, 2009).

Os indicadores biológicos são utilizados para avaliar impactos ambientais por serem sensíveis a qualquer alteração nos parâmetros físicos e químicos, oriundos de despejos industriais e/ou domésticos que causam mudança na biota aquática.

A maioria dos trabalhos que tratam de bioindicadores para alteração ambiental está relacionado ao grupo de coliformes por serem mais facilmente encontrados em fezes humanas e outros mamíferos. Entretanto, para os demais microrganismos aquáticos para utilização como bioindicadores são raros os trabalhos existentes.

Este trabalho tem como objetivo desenvolver uma metodologia para utilização da microbiota aquática como bioindicador de alteração ambiental, utilizando-se de técnicas de microbiologia por meio de contagem de heterotróficos, biologia molecular e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Desnaturante (DHPLC). Também foi utilizada a análise estatística multivariada de agrupamento hierárquico para interpretação dos resultados obtidos.

Os rios utilizados para compor este trabalho foram Rio Pará (Abaetetuba-PA), Rio Dendê (Barcarena-PA) e como controle Baía do Guajará (Belém-PA), sendo que as coletas foram realizadas no período de janeiro/2009 a abril/2010.

Os dados obtidos podem fornecer informações importantes sobre a influência antrópica nos rios, servindo de base para estudos microbiológicos futuros em outras áreas na Amazônia.

2. OBJETIVO GERAL

- Adaptar e descrever o modo de aplicação de uma metodologia de utilização da microbiota aquática como indicador de alteração ambiental.

2.1. Objetivos Específicos

- Correlacionar os parâmetros físicos, químicos e microbiológicos em amostras de águas do rio;
- Investigar a microbiota (bactérias) das águas dos rios através das unidades formadoras de colônias e técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Desnaturante (DHPLC);
- Avaliar o potencial bioindicador de poluição dos microrganismos aquáticos.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Ecossistemas aquáticos

No ecossistema ocorre a interação de forma equilibrada dos seres vivos entre si e com o meio ambiente, através da reciclagem de matéria e do uso eficiente da energia solar (BRAGA, 2005).

Quando não ocorre interferência antrópica, o corpo d'água é um sistema estável, equilibrado e auto-suficiente, apresentando em toda sua extensão características topográficas, climáticas, botânicas, zoológicas, hidrológicas e geoquímicas invariáveis (BRAGA, 2005).

Os ecossistemas são formados por elementos abióticos composto por matéria inorgânica ou sem vida como água, ar, solo, e elementos bióticos, representado pelos seres vivos (MARTINS, 2009). Estes elementos interagem-se de forma estreita, uma vez que compostos como O_2 , CO_2 e H_2O estão em constante fluxo entre os seres vivos e o ambiente externo (BRAGA, 2005).

De acordo com PINTO-COELHO (2000) o O_2 é um elemento essencial em todos os ecossistemas aquáticos. Em lugares onde a quantidade de O_2 na água foi alterada, deve-se a ação do homem, em particular, devido as águas residuais não depuradas. A extinção de muitas espécies se deu pela ação dos despejos de origem humana que reduziu a biodiversidade na maioria dos ecossistemas.

3.2. Aspectos microbiológicos de águas

O meio ambiente é composto por organismos que desempenham vários papéis na cadeia alimentar, como produtores, consumidores e decompositores. Eles também são importantes como fontes de alimento para o homem e atua na recuperação da qualidade das águas poluídas. Na água, os microrganismos desenvolvem suas atividades biológicas de nutrição, respiração e excreção, que modificam o caráter químico e ecológico no ambiente aquático (BRAGA, 2005).

A coluna d'água é classificada de acordo com a penetração de luz, sendo dividida em zonas. A zona fótica é a região superficial onde há penetração de luz suficiente para a realização da fotossíntese, possuindo elevada concentração de oxigênio, que é essencial a microbiota aquática. A zona afótica consiste na região

onde não há incidência de luz e, conseqüentemente, não ocorre fotossíntese (PEREIRA, 2002).

Os organismos aquáticos podem ser dos grupos de vírus, bactérias, fungos, algas, protozoários, peixes, mamíferos entre outros (BRAGA, 2005).

As bactérias são organismos importantes para a qualidade de água. São organismos microscópicos simples, que necessitam de poucos nutrientes para seu desenvolvimento e se multiplicam rapidamente. Portanto, a população pode dobrar em minutos desde que possua grande quantidade de compostos orgânicos (ALBERTS *et al*, 2002).

As bactérias possuem aspectos positivos e negativos. O aspecto positivo está relacionado com a função da bactéria como biorremediadores de derramamento de óleo no mar, de toxinas presentes em poços subterrâneos e de derrames químicos; podem ser constituintes dos detritos que integram a cadeia trófica, servindo como fonte de alimentos para outros organismos aquáticos; a partir do consumo de OD presente na água, as bactérias podem atuar como decompositoras de matéria orgânica solúvel ou particulada (DI BERNARDO *et al*, 2002).

As bactérias, além de biorremediadoras, podem ser utilizadas na indústria alimentícia, no processo de fermentação do leite e derivados (BURITI & SAAD, 2007); e farmacêutica, na produção de antibióticos (STROBEL & DAISY, 2003) e vitaminas B2 e B12 (SILVA *et al*, 2005) e C (OLIVEIRA *et al*, 2010).

Segundo MORITA *et al* (2006), os aspectos negativos das bactérias estão relacionados a fatores ou situações que causam enfermidades, tanto para seres humanos quanto para outros animais; quando há algum tipo de desequilíbrio ambiental, causam alterações nas características físicas e químicas da água que favorece a seleção de determinadas espécies de microrganismos de potencial patogênico.

3.3. Bioindicadores de qualidade da água

De acordo com SILVA (2008), os bioindicadores consistem em parâmetros biológicos tanto qualitativo quanto quantitativo à nível de indivíduo, população ou comunidade, sendo sensível as variações das condições ambientais, estabelecido por uma mudança natural ou perturbação do meio.

Os indicadores biológicos devem possuir características físicas, químicas ou ambientais que possam ser observadas através de mudanças na presença ou ausência, quantidade, ou no comportamento na espécie, sendo considerada como indicativo de alteração do meio (SILVA, 2008).

As comunidades biológicas de ecossistemas aquáticos são formadas por organismos que apresentam adaptações a determinadas condições ambientais, apresentando limites de tolerância a diferentes alterações do ambiente (GOULART, 2003).

Os principais bioindicadores estudados são do grupo coliforme, pois a presença de coliformes totais que indica apenas uma estimativa do grau de contaminação por mamíferos (NIEWEGLOWSKI, 2006).

3.4. Biomonitoramento de águas superficiais

O biomonitoramento consiste em empregar parâmetros biológicos para avaliar a qualidade da água, baseando-se na resposta dos organismos em relação as alterações do ecossistema (BUSS *et al*, 2003). Os organismos bioindicadores apresentam uma tolerância estreita ou específica aos fatores ecológicos (LOBO, *et al*, 2002).

De acordo com BUSS *et al* (2008), o monitoramento biológico ou biomonitoramento baseia-se nas respostas dos organismos em relação ao meio onde vivem, pois a biota aquática é capaz de responder a uma série de distúrbios, sendo eles naturais ou antrópicos, mostrando a realidade recente das condições ambientais.

A diferença entre o monitoramento através de métodos físicos e químicos e o biomonitoramento, é que o primeiro aborda o tipo e a intensidade de fatores, inferindo apenas indiretamente sobre os efeitos nos organismos. O biomonitoramento fornece informações sobre os efeitos estressores no sistema, podendo influenciar sobre a qualidade e quantidade do distúrbio. O uso combinado destas ferramentas aumenta o potencial de detecção das causas e facilita a avaliação dos efeitos estressores sobre os ecossistemas aquáticos (BUSS *et al*, 2008).

Segundo GODOI (2008), diversos sistemas e índices foram elaborados para a utilização de bioindicadores de avaliação da qualidade da água, entretanto muitos

estudos não contemplam as regiões tropicais. Apesar do uso desta metodologia ser possível, questiona-se que as condições climáticas do hemisfério norte ser bem diferente das observadas no hemisfério sul e que influenciam diretamente na composição das características dos componentes bióticos e abióticos dos ecossistemas.

Os trabalhos que relacionam o uso de bioindicadores (coliformes) para avaliar a qualidade de sistemas aquáticos estão concentrados nas regiões sul e sudeste do país (NIEWEGLOWSKI, 2006; MORELLI, 2008; PEDROZA, 2009; ZANINI, 2009).

3.5. Qualidade da água

A qualidade da água é reflexo do efeito da combinação de muitos processos que ocorrem ao longo do curso d'água (PETERS, 2000). A qualidade da água não está relacionada somente pelas características físicas e químicas, e sim em função da qualidade de todo o funcionamento do ecossistema (ZANINI, 2009).

De acordo com ZANINI (2009), o uso da água depende de suas propriedades físicas, químicas e microbiológicas, e, em consequência, do grau de poluição. As fontes de poluição de origem antrópica podem ser pontuais (efluentes domésticos e industriais) ou difusas (insumos agrícolas).

Segundo a CETESB (2008) as variáveis que influenciam na qualidade da água são temperatura, turbidez, pH, condutividade e OD.

3.6. Variáveis da qualidade da água

3.6.1. Potencial Hidrogeniônico (pH)

A variação de pH pode ser de origem natural através de processos biológicos (fotossíntese e respiração), oxidação da matéria orgânica, absorção de gases da atmosfera e também por turbulência e aeração. Assim como de origem antrópica, através de despejos domésticos e industriais (MARTINS, 2009).

O pH é importante devido a muitas reações químicas que ocorrem no meio ambiente e que pode ser afetada pela sua variação. Sistemas biológicos também são bastante sensíveis ao pH, sendo que o meio deve estar entre 6,5 e 8,5 para que os organismos não sofram grandes danos (BRAGA, 2005).

Segundo NIEWEGLOWSKI (2006), os efluentes não devem causar oscilação de pH no corpo d'água maior que 0,5 unidades para não afetar a vida aquática.

A Resolução CONAMA nº 357/2005 define um pH variando de 6,0 a 9,0.

3.6.2. Temperatura

A temperatura influencia em quase todos os processos físicos, químicos e biológicos, que refletem na vida aquática. Com o acréscimo da temperatura aumentam a taxa das reações químicas e biológicas, e diminuem a solubilidade dos gases, por exemplo, oxigênio dissolvido (MARTINS, 2009).

A elevação de temperatura pode causar alterações físicas como na densidade, viscosidade e no oxigênio dissolvido. Para efeitos químicos, acelera as reações químicas e bioquímicas, e alteração biológica, pode se tornar letal a organismos adaptados a determinadas condições físicas (MARTINS, 2009).

De acordo com a Resolução CONAMA nº 357/2005, a temperatura não pode ultrapassar a 40°C.

3.6.3. Oxigênio Dissolvido (OD)

O oxigênio dissolvido é uma variável de suma importância, pois é necessário para a respiração da maioria dos organismos aquáticos.

O OD na água é proveniente por meio de difusão atmosférica ou pelo processo de fotossíntese de plantas aquáticas, que posteriormente é consumido na oxidação da matéria orgânica viva ou morta e respiração de organismos presentes no meio aquático (MARTINS, 2009; NIEWEGLOWSKI, 2006).

Tanto a alta quanto a baixa quantidade de oxigênio dissolvido é indicativo das fontes de poluição causada nas águas superficiais por despejos orgânicos. Valores baixos podem indicar a presença de matéria orgânica e valores altos podem ser pelo crescimento desordenado de algas, pois elas liberam o oxigênio durante o processo de fotossíntese (MARTINS, 2009).

Segundo a CETESB (2002), a contribuição fotossintética de oxigênio só é considerada expressiva quando grande parte da atividade bacteriana na decomposição de matéria orgânica ocorre, e após o desenvolvimento também de protozoários, que além de decompositores, consomem bactérias clarificando as

águas e permitindo a penetração de luz. Este efeito pode influenciar na avaliação do grau de poluição da água, quando se avalia apenas a concentração de OD. Sob este ponto de vista, águas poluídas são aquelas que apresentam baixa concentração de OD, devido ao seu consumo na decomposição de compostos orgânicos.

As bactérias consomem o OD durante o processo metabólico de conversão da matéria orgânica em compostos simples e inertes, como água e CO₂, e enquanto houver matéria orgânica provenientes das fontes de poluição, as bactérias crescem e se multiplicam consumindo mais OD (CETESB, 2002).

Para a Resolução CONAMA nº 357/2005, a quantidade de OD não pode ser inferior a 5,0 mg/L.

3.6.4. Sólidos Totais (ST)

Os sólidos totais avaliam a quantidade de partículas dissolvidas e não dissolvidas existente no corpo d'água, constituído principalmente de sais inorgânicos, pequenas quantidades de matéria orgânica e gases dissolvidos (LIMA, 2001).

De acordo com NIEWEGLOWSKI (2006), a agricultura, as estações de tratamento de esgotos, esgotos não tratados, efluentes industriais tratados ou não tratados, e mineração são as principais fontes de contaminação da água por sólidos suspensos.

O limite estabelecido pela Resolução CONAMA nº 357/2005 deve ser inferior a 500 mg/L para sólidos dissolvidos totais.

3.6.5. Turbidez

A turbidez é causada pela presença de materiais sólidos em suspensão, como partículas inorgânicas (areia, argila), plâncton, detritos orgânicos e outras substâncias como zinco, ferro, compostos de manganês, resultantes do processo natural de erosão ou por adição de despejos domésticos ou industriais (MARTINS, 2009).

A turbidez excessiva influencia no processo de fotossíntese, pois impede ou dificulta a penetração de luz (NIEWEGLOWSKI, 2006).

Para a Resolução CONAMA nº 357/2005, a turbidez deve ser inferior a 100 UNT (Unidades Nefelométricas de Turbidez).

3.6.6. Nitrato (NO₃) e Nitrito (NO₂)

Segundo MARTINS (2009) o nitrogênio pode estar presente na água sob várias formas, tais como molecular, amônia, nitrito e nitrato. É um elemento indispensável ao crescimento de algas, entretanto, o seu excesso pode provocar o desenvolvimento exagerado desses organismos.

Para os organismos vivos, a principal forma do nitrogênio como nutriente é o nitrato (NO₃), produto da decomposição de matéria orgânica em uma série de compostos orgânicos e inorgânicos realizados por bactérias. O nitrato pode ser obtido também por meio da ação de bactérias fixadoras de nitrogênio e das descargas elétricas que ocorrem na atmosfera (BRAGA *et al*, 2005).

O nitrito (NO₂) é resultado da conversão do amônio (NH₄) e amônia (NH₃), que posteriormente, através do processo de nitrificação, o nitrito é convertido em nitrato por um grupo de bactérias quimiossintetizantes (BRAGA *et al*, 2005).

A Resolução CONAMA nº 357/2005 estabelece o limite para nitrato inferior a 10 mg/L e para nitrito, inferior a 1 mg/L.

3.6.7. Fosfato (PO₄)

O fósforo é um elemento indispensável para o crescimento de algas e quando em altas concentrações pode conduzir um crescimento exagerado desses organismos. Pode ser de origem natural, proveniente da dissolução de compostos do solo e da decomposição da matéria orgânica; e de origem antrópica, através de despejos domésticos e industrial, detergentes, excrementos de animais, inseticidas e pesticidas (MARTINS, 2009).

De acordo com LIMA (2001), pela ação dos microrganismos, a concentração de fósforo pode ser baixa (menor 0,5 mg/L) em águas naturais e valores acima de 1 mg/L são geralmente indicativos de águas poluídas.

Para a Resolução CONAMA nº 357/2005, a quantidade de fósforo total deve ser inferior a 0,025 mg/L.

3.7. Técnicas de análises microbiológicas

3.7.1. Técnicas de contagem de heterotróficos

As bactérias heterotróficas são seres que não produzem seu próprio alimento, consumindo matéria orgânica produzida por outros seres vivos.

A contagem de heterotróficos ou contagem padrão em placas é um procedimento com objetivo de estimar o número de bactérias heterotróficas na água, sendo utilizada, particularmente, como uma ferramenta de acompanhamento das variações nas condições de processo, como de águas minerais, ou a eficiência das diversas etapas de tratamento, quando relacionado com águas tratadas (SILVA, 2005).

O método de contagem em placas é uma técnica utilizada para quantificação de microrganismos, podendo ser utilizado tanto para contagem de heterotróficos, bolores, leveduras, quanto para outros grupos, gêneros e espécies. O procedimento básico consiste na inoculação da amostra (e suas diluições) em placas contendo meio de cultura sólido, seguida de incubação até crescimento visível (FRANCO, 2008).

Este método se baseia no princípio de que cada célula microbiana presente na amostra irá se agrupar e formar uma colônia visível e isolada, quando fixada em meio de cultura adequado (FRANCO, 2008).

Muitas vezes, as células microbianas ocorrem em agrupamentos (pares, tétrades, cachos, cadeias) não sendo possível estabelecer uma relação direta entre o número de colônias e o número de células. Portanto, essa correlação é feita entre o número de colônias e o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), que pode ser utilizada tanto para células individuais quanto para agrupamentos característicos de certos microrganismos (SILVA, 2005).

De acordo com SILVA (2005) existem três procedimentos básicos para a contagem de microrganismos em placas, a seguir:

1. **Plaques em profundidade (“POUR PLATE”)**: Este método permite inocular até 2 mL de amostra ou suas diluições, sendo indicado para análise de amostra com contagens acima de 10^2 /mL, pois a inoculação de diluições abrange uma ampla faixa de variação e permite a

separação dos microrganismos com diferentes tensões de oxigênio. Possui limite de detecção de 1 UFC/mL e apresenta algumas limitações, sendo a principal a necessidade de fusão do meio de cultura antes do uso, com isso alguns meios contendo suplementos com componentes sensíveis ao calor após a esterilização, não podem ser aquecidos para a fusão do ágar antes do uso.

2. **Plaqueamento em superfície (“SPREAD PLATE”)**: Este método consiste na inoculação da amostra diretamente na superfície do meio de cultura sólido, já distribuídos nas placas. É considerado vantajoso sob alguns aspectos, pois não expõe os microrganismos ao calor do meio fundido, permitindo a visualização de características morfológicas e diferenciais de colônias, facilita a transferência de colônias e não exige que o meio seja translúcido. A principal desvantagem é o volume inoculado que é limitado a capacidade de absorção de líquido pelo meio de cultura, que não permite mais que 0,5 mL por placa. O procedimento padrão visa a inoculação de 0,1 mL por placa de cada diluição, com limite de detecção de 10 UFC/mL.
3. **Filtração em membrana**: Este método é limitado a análise de amostras líquidas límpidas, sem sólidos em suspensão, que possam ser filtradas em membrana de poro 0,22 μ m. Permitindo analisar quantidades de volume maiores, concentrando na membrana os microrganismos presentes. O limite de detecção é de 1 UFC por volume inoculado, indicado para amostras com contagens abaixo do limite de detecção dos outros métodos.

3.7.2. Técnica de análise genética do perfil microbiano

A análise do perfil microbiano através das diferenças genéticas consiste em técnicas básicas: extração e purificação do material genético, PCR e DHPLC.

3.7.2.1. Reação em Cadeia com Polimerase (PCR)

A Reação da Polimerase em Cadeia baseia-se na multiplicação geométrica de um único fragmento de DNA em milhões de cópias em poucas

horas. A multiplicação é realizada com a ação da DNA polimerase + dNTPS + 2 primers, que utiliza como molde um segmento de fita simples de DNA. Esta enzima é capaz de construir a fita complementar a esse segmento, através da polimerização de nucleotídeos adicionados ao sistema. O início da cópia é realizada a partir de dois oligonucleotídeos iniciadores 5' → 3', denominados primers, complementares as extremidades 3' e 5' do fragmento de DNA a ser copiado (FRANCO, 2008).

A metodologia do PCR é simples e consiste basicamente de ciclos que envolvem três passos:

1º passo: desnaturação térmica do DNA duplex e separação em fitas simples a temperatura de 95°C por 1 minuto;

2º passo: anelamento que consiste na diminuição da temperatura e a ligação dos oligonucleotídeos iniciadores, a 62°C por 40 segundos;

3º passo: extensão através da polimerização com formação da fita complementar, a 72°C por 30 segundos.

Sintetizada a primeira cópia, o processo recomeça podendo se repetir de 20 a 30 vezes, o que permite uma amplificação para até 10^5 a 10^6 cópias de cada fragmento de DNA original.

A polimerase utilizada (DNA polimerase) é termorresistente, e todas as etapas são realizadas em um único recipiente, bastando adicionar todos os compostos e variar apenas a temperatura. Incubadoras de alta sensibilidade e rápido ajuste de temperatura, denominadas termocicladores, foram especialmente desenvolvidas para as técnicas de PCR (FRANCO, 2008).

3.7.2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Desnaturante (DHPLC)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Desnaturante (DHPLC) é uma técnica nova e promissora para análise da comunidade bacteriana, monitoramento e identificação, permitindo a separação dos produtos da PCR utilizando um "ion-pair" do sistema de HPLC de fase reversa (BARLAAN, 2005).

Este método consiste na discriminação nas diferenças genéticas do gene 16S rRNA de espécies de bactérias baseado na eficiência e sensibilidade na detecção e discriminação de diferentes seqüências genéticas. Esta discriminação é feita através de populações bacterianas por análise dos cromatogramas com os tempos de retenção para cada grupo. Estes cromatogramas são comparados com um controle

e a partir deste estima-se o nível de impacto sofrido. Este método consiste de técnicas como a extração do DNA, amplificação do PCR e análise do perfil microbiano pelo DHPLC (BARLAAN, 2005).

Os resultados dos cromatogramas do DHPLC não somente fornecem a descrição da união bacteriana, mas também permite o monitoramento do progresso ou posição de certas populações bacterianas, baseada na exibição dos tempos de retenção.

De acordo com XIAO (2001), o método de DHPLC não só revela a presença de uma incompatibilidade, localização e natureza química do seqüenciamento, constitui também uma grande abordagem de custo/benefício, devido a seqüência de alta similaridade entre os indivíduos.

O DHPLC tem a capacidade de detectar as variações nas seqüências de DNA, sendo possível aperfeiçoar o método para permitir a avaliação dos diferentes tipos de complexo de populações microbianas e monitorar as populações de ambientes de interesse (BARLAAN, 2001).

3.8. Análise estatística multivariada

A estatística multivariada é uma ferramenta amplamente empregada para mostrar como as amostras se relacionam, ou seja, o quanto são semelhantes de acordo com as variáveis utilizadas, sendo os métodos mais indicados a Análise dos Componentes Principais (ACP) ou a Análise por Agrupamento Hierárquico (AAH) (FERREIRA, 1996).

A análise de componentes principais (ACP) consiste em explorar a interdependência entre as variáveis, reduzindo o número de variáveis que são capazes de explicar as informações dos dados experimentais (FERREIRA, 1996).

A análise de agrupamentos hierárquicos (AAH) tem por objetivo agrupar as variáveis em subgrupos homogêneos de acordo com alguma medida de similaridade, refletindo as semelhanças de suas propriedades (MINGOTI, 2005).

Os agrupamentos hierárquicos podem ser: ligação simples ou vizinho mais próximo (single linkage or nearest neighbour), ligação completa ou vizinho mais distante (complete linkage or farthest neighbour), média (aritmética ou ponderada) das distâncias (average linkage) (MINGOTI, 2005).

Segundo ANGELO *et al* (1987) quanto mais próximos estiverem os pontos no espaço amostral, mais similares eles serão. Os resultados podem ser exibidos na forma de dendograma em função das similaridades.

Os dendogramas representam a similaridade e dissimilaridade entre os pares de elementos da matriz de dados.

3.9. Região em estudo

3.9.1. Rio Pará

O Rio Pará nasce na região das ilhas e deságua entre o Cabo Maguari e a Ponta Curuçá, no Oceano Atlântico, sendo um dos principais formadores da Baía do Guajará. Une-se ao Rio Amazonas através do estreito de Breves, separando a Ilha do Marajó do continente (figura 1). E também divide Abaetetuba dos municípios de Muaná e Ponta de Pedras (BRASIL CHANEL, 2010).



Figura 1. Mapa representativo do Rio Pará e Baía do Guajará.

Fonte: www.cpatu.embrapa.br, 2010.

3.9.2. Rio Dendê

O Rio Dendê nasce nas mediações de uma indústria de alumínio, tendo seu sentido nordeste/sudoeste e deságua no Rio Pará (figura 2, pag. 37). Ao longo do rio concentram-se os grupos de pequenos pescadores e agricultores. A ocupação as margens do rio não é tão acentuada, predominando ainda a mata ciliar, porém o rio

é atualmente alvo de despejo de rejeitos domésticos e industriais, deixando este ambiente quase sem vida aquática (RODRIGUES, 2008).

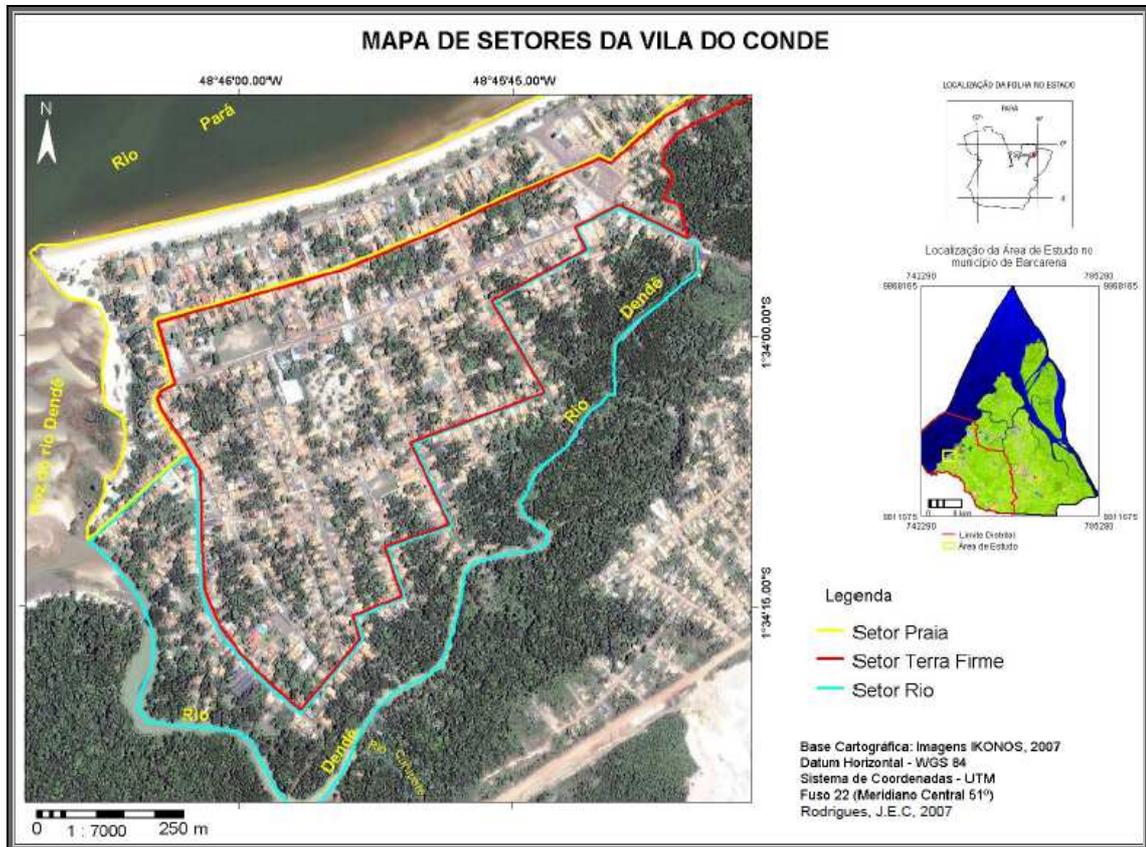


Figura 2. Mapa representativo do Rio Dendê.

Fonte: Rodrigues, 2008.

3.9.3. Baía do Guajará

A Baía de Guajará localiza-se a nordeste da Baía do Marajó e estende-se da confluência entre os Rios Acará e Guamá até a Ilha de Mosqueiro, recebe também influência do Rio Pará (figura 1, pag. 36). Está localizada na Região Metropolitana de Belém e é tipicamente flúvio-estuarina, situada em um domínio de mesomaré com amplitude máxima de 3.8 metros. A frente de Belém concentra-se indústrias e importantes núcleos habitacionais. Esta área é constituída por várzeas e rios que são utilizados pela população local como via de transporte, fonte de subsistência alimentar e econômica (GONÇALVES *et al*, 2005; GREGORIO *et al*, 2006).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Área de estudo

O presente estudo foi realizado nos rios em torno dos Municípios de Abaetetuba e Barcarena no Estado do Pará no trecho em torno da área portuária e industrial instalada no Distrito de Vila do Conde (Barcarena) até a sede municipal de Abaetetuba.

Os rios estudados foram: Rio Pará e Rio Dendê e como referência a Baía do Guajará localizada as margens da Cidade de Belém.

Na tabela 1 se encontra as descrições dos locais de coleta.

Tabela 1. Rios de coletas, coordenadas, zona e dia de coleta

Rio	Ponto	Coordenadas	Zona	Dias de coleta
Baía do Guajará	01	Long. 1h 25' 20" Lat. 48h 1' 13.8"	Fótica e Afótica	13.04.10
Rio Dendê	01	Long. 48° 46' 05.7" Lat. 1° 34' 13.4"	Fótica e Afótica	26.01.09
				25.04.09
				02.10.09
				28.04.10
Rio Pará	03	Long. 48° 53' 15.47" Lat. 1° 41' 25.3"	Fótica e Afótica	26.01.09
				24.04.09
				03.10.09
				26.04.10

4.2. Coleta das amostras

As coletas foram realizadas nos rios como mostra a tabela 1 (pag. 38). Estas coletas foram realizadas pela equipe do Instituto Evandro Chagas, com ajuda de uma embarcação do corpo de bombeiros e um barco menor de motor de popa com capacidades compatíveis para o deslocamento da equipe envolvida no trabalho de coleta. A coleta na Baía do Guajará foi realizada pela equipe do Laboratório de Investigação Sistemática em biotecnologia, com auxílio de uma lancha particular.

Foram analisadas 18 amostras durante o período, sendo coletadas na vazante, nas zonas fótica e afótica, tanto para contagem de unidades formadoras de colônias, realizada no Laboratório de Microbiologia (LabISisBio) quanto para análise do perfil microbiano por DHPLC no Laboratório de Polimorfismo de DNA. Todos os pontos foram referenciados com o auxílio de um GPS e posteriormente lançados em uma base cartográfica e plotados em mapa de localização (figuras 3, 4 e 5; pag. 40). Para cada análise foi coletada separadamente 500mL de amostra.

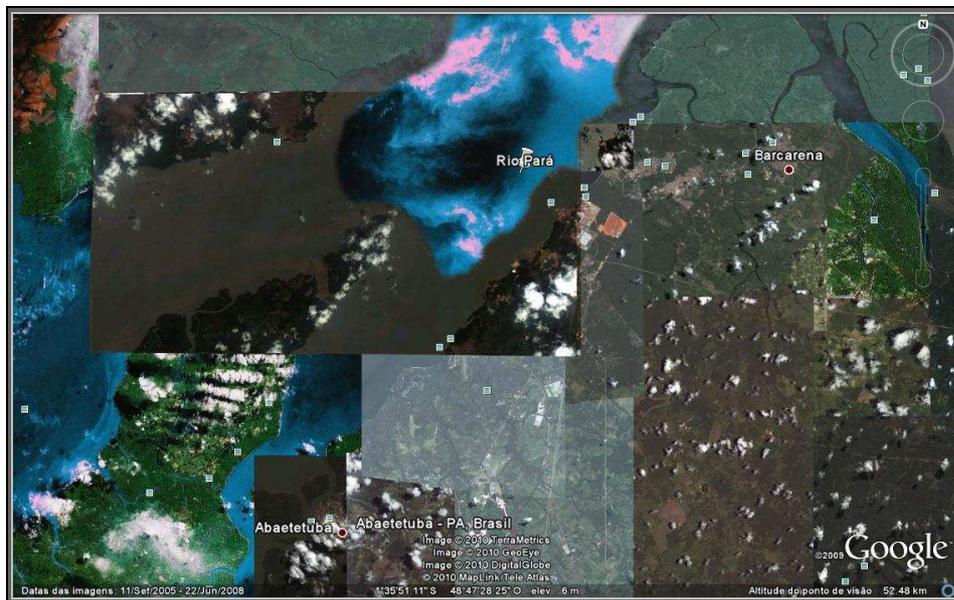


Figura 3. Localização do Rio Pará

Fonte: Google Earth, 2010



Figura 4. Localização do Rio Dendê

Fonte: Google Earth, 2009

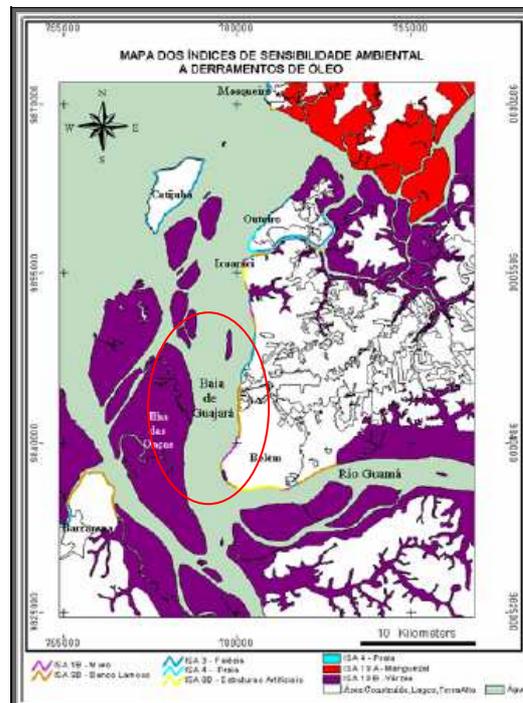


Figura 5. Localização da Baía do Guajará

Fonte: Gonçalves *et al*, 2006

A coleta na zona fótica foi realizada em frascos de polipropileno de 500mL estéreis, os quais foram submersos invertidos, a 30 cm abaixo da superfície da água. Os frascos foram lentamente movidos de forma a posicionarem-se com a

abertura voltada contra a corrente. Após o preenchimento de 4/5 de sua capacidade, estes foram vedados e acondicionados em caixas isotérmicas sob refrigeração (4 a 10°C) e transportados nestas mesmas condições até os laboratórios.

A profundidade para coleta em zona afótica foi determinada utilizando-se disco de SECCHI de 30 cm de diâmetro.

A coleta na zona afótica foi realizada por meio de garrafas de van Dorn (figura 6), em profundidades variáveis. Essas garrafas têm por característica principal um dispositivo que permite que as mesmas sejam fechadas após a captação da amostra. Retirou-se, prioritariamente, a unidade amostral destinada à análise microbiológica, a fim de evitar contaminação ou alteração na referida unidade.



Figura 6. Garrafa de van Dorn utilizada para coleta na zona afótica

4.3. Análise dos parâmetros físicos e químicos

As análises dos parâmetros pH, temperatura e oxigênio dissolvido (OD) foram realizados *in situ*. Sólidos totais dissolvidos (TDS), sólidos totais em suspensão (STS), turbidez, cloreto, nitrato, nitrito, amônio, amônia, fosfato e sulfato foram analisados nos Laboratórios do Instituto Evandro Chagas, na Seção de Meio Ambiente.

4.4. Análise microbiológica – Método de Plaqueamento em Superfície (“Spread Plate”)

Esta metodologia consiste no método de plaqueamento em superfície (spread plate), em que a água é inoculada e espalhada em placas de Petri contendo o meio de cultura sólido GPY (glicose, peptona e extrato de levedura). Em seguida, as placas foram invertidas e incubadas a 35°C por 78h, e a cada 24h contadas as colônias contidas nas placas. Através do número de colônias são estimadas as unidades formadoras de colônias do rio impactado e por comparação a um controle pode-se estimar o nível de impacto sofrido. Abaixo está o procedimento experimental que consiste nos preparos do meio de cultura e das soluções, inóculo, cultivo e contagem das unidades formadoras de colônias (SILVA, 2005)

4.4.1. Preparo do meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o GPY (Glicose, Peptona, Extrato de Levedura), composto por 20g de glicose (VETEC), 5g de peptona (BACTO™), 5g de extrato de levedura (BACTO™) e 20g de Agar (BACTO™) em 1000mL de água estéril, segundo Health Protection Agency (2004).

4.4.2. Preparo da solução salina peptonada

Esta solução é utilizada para a preparação da solução mãe e as respectivas diluições. A solução salina é preparada no dia e composto por 8,5g de cloreto de sódio e 1g de peptona (BACTO™) em 1000mL de água destilada. Em seguida é esterilizada em autoclave a 121°C por 20 minutos (HERRERA, 2001).

4.4.3. Preparação das amostras

Em erlermeyer de 250mL, adiciona-se 225mL da solução salina e 25mL da amostra e homogeneiza-se. Esta solução é denominada de solução mãe.

4.4.4. Diluições seriada da amostra

Em tubos de ensaio contendo 9mL da solução salina, adiciona-se 1mL da solução mãe. Essa é a diluição 10^{-1} . Para a diluição 10^{-2} , transfere-se 1mL da diluição 10^{-1} para um tubo de ensaio com 9mL de solução salina. Para as diluições subsequentes (10^{-3} a 10^{-5}) segue-se retirando 1mL da diluição anterior e transferindo-se para o tubo com 9mL de solução salina (SILVA, 2005).

4.4.5. Inóculo e cultivo

Nas placas de petri, adiciona-se o meio de cultura e aguarda-se solidificar.

Inocula-se 0,1mL de cada diluição e da solução mãe na superfície de diferentes placas previamente preparadas e, com auxílio de uma alça de Drigalski, espalha-se o inóculo pela superfície do meio, até que todo o excesso de líquido seja absorvido (figura 7). Incuba-se as placas a 35°C por 72h. Foram realizadas os experimentos em duplicata.



Figura 7. Espalhamento das amostras

4.4.6. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

A cada 24h, conta-se os números de colônias existentes nas placas. De acordo com a 20ª edição do Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater (1997), considera-se as placas que obtiveram contagem entre 30 a 300 colônias para o cálculo das Unidades Formadoras de Colônias por mL, seguindo a equação abaixo:

$$UFC = \frac{n^{\circ} \text{ colonia} \times \text{inv.diluição}}{\text{vol.inoculado}} \text{ ou } UFC = \frac{n^{\circ} \text{ colonia} \times \text{inv.diluição}}{0,1}$$

4.5. Análise do perfil microbiano por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Desnaturante (DHPLC)

O DHPLC é relativamente uma técnica nova que utiliza a formação de heteroduplex para detecção das variações genéticas entre o DNA tipo selvagem e fitas de DNA com mutações com referência ao homoduplex parcialmente desnaturado (BARLAAN, 2005).

A técnica consiste na detecção das mutações que geram diferentes conformações na dupla hélice.

O método se baseia na passagem dos amplicons por uma coluna de cromatografia líquida de fase reversa composta por partículas de poliestireno que foram carregadas positivamente pela corrida da solução tampão TEAA (acetato de trietilamônia). A carga negativa do DNA, em razão dos seus grupos fosfatos, permite que os fragmentos fiquem agregados na coluna através dos agrupamentos de amônia do tampão TEAA (BARLAAN, 2005).

A eluição das moléculas de DNA é feita pela passagem do solvente orgânico, acetonitrila (ACN), que na proporção de aumenta sua concentração, diminui a atração entre os fragmentos de DNA e TEAA. Através da força de ligação entre os duplexes, os fragmentos com menor força são eluídos primeiro. E com detector de ultravioleta, a absorvância é medida e os resultados enviados ao computador, que fornece gráficos com picos referentes ao tempo de retenção que permite a análise das populações bacterianas (BARLAAN, 2005).

O método baseia-se na eluição parcial das moléculas de DNA, seguido da interação do pareamento dos íons dos reagentes. Sob condições desnaturante parcial a uma determinada vazão do gradiente do tampão, as amostras de DNA de bactérias com variações na seqüência apresentam diferenças nos tempos de retenção com base na quantidade de DNA (BARLAAN, 2005).

Este método consiste de técnicas como preparação das amostras, extração do DNA, amplificação do PCR e a análise das amostras por DHPLC.

Os resultados dos cromatogramas do DHPLC não somente fornece a descrição da união bacteriana, mas também permiti o monitoramento do progresso ou posição de certas populações bacterianas, baseada na exibição dos tempos de retenção. Estes cromatogramas são comparados com um controle e a partir deste estima-se o nível de impacto sofrido.

Este procedimento foi realizado no Laboratório de Polimorfismo de DNA (UFPA).

4.5.1. Separação e concentração das bactérias de interesse

Aproximadamente 500mL da amostra filtrou-se em sistema de filtração a vácuo com kitassato e funil de aço inoxidável devidamente esterilizados (figura 8, pag. 46). Cada amostra passou por várias etapas de filtração, como se segue:

Em uma primeira etapa de pré filtração, utilizou-se papel de filtro devidamente estéril para retenção de partículas maiores como folhas e sementes. Em seguida, utilizou-se membrana de pré filtro AP15 em microfibra de vidro, 47mm de diâmetro (MILLIPORE), na qual a amostra foi submetida a mais duas filtrações, e estas foram descartados.

Na segunda etapa, a amostra foi filtrada uma vez em membrana HA em ester de celulose, 0,45 μ m de poro, 47mm de diâmetro, quadriculada (MILLIPORE) e cortado em pequenos quadrados e armazenados em tubo Falcon com solução de STE (cloreto de sódio 5M + tris-HCl 1M pH 8 + EDTA 100mM), devidamente identificados.

Nesta ultima etapa, a solução com a amostra da segunda etapa foi filtrada uma vez em membrana GS em ester cellulose, 0,22 μ m de poro, 47mm de diâmetro, lisa (Whatmam), na qual foi cortado em pequenos quadrados e armazenados em

tubo Falcon com solução de STE, devidamente identificado. Esta membrana foi utilizada para extração do DNA.



Figura 8. Sistema de filtração

4.5.2. Extração do DNA total

Para as amostras de água previamente filtradas, extraiu-se o DNA utilizando-se a Lisozima. Em seguida, adicionado SDS, Proteinase K, e colocou-se em banho Maria a 50°C por 1h.

Posteriormente, extraiu-se com fenol e centrifugado a 10000g por 15 minutos e o sobrenadante retirou-se para um novo tubo.

A este tubo acrescentou-se acetato de sódio 3M e misturou-se cuidadosamente, e em seguida adicionou-se etanol 95% e misturado por inversão, deixando em repouso para decantar. O sobrenadante é retirado e o pellet seco.

O pellet é resuspendido em tampão TE (tris-EDTA) e adicionado RNaseA, incubando-se a 37°C por 30 minutos.

O DNA é precipitado com acetato de amônia 5M e isopropanol, incubando-se a temperatura ambiente por 5 minutos.

Em seguida, centrifuga-se por 10 minutos e o pellet é lavado 2 vezes com etanol 70%. Seca-se o pellet e dissolve-se em TE.

Adiciona-se volume igual de clorofórmio, misturando por inversão e centrifuga-se a 10000g por 5 minutos.

O sobrenadante é transferido para um novo tubo e adicionado acetato de sódio 3M, agitando cuidadosamente, e adiciona-se etanol 95%, misturando por inversão. Lava-se com etanol 70% por 2 vezes e dissolve-se em TE.

4.5.3. Condições da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)

Este procedimento consiste na ampliação do fragmento 16S rDNA (KOLLER, 2002). A amplificação é realizada com dois iniciadores (primers) que sintetizam as fitas de DNA nesta região em dois sentidos ao mesmo tempo, sendo em uma fita no sentido direto e na outra pelo inverso (figura 9).

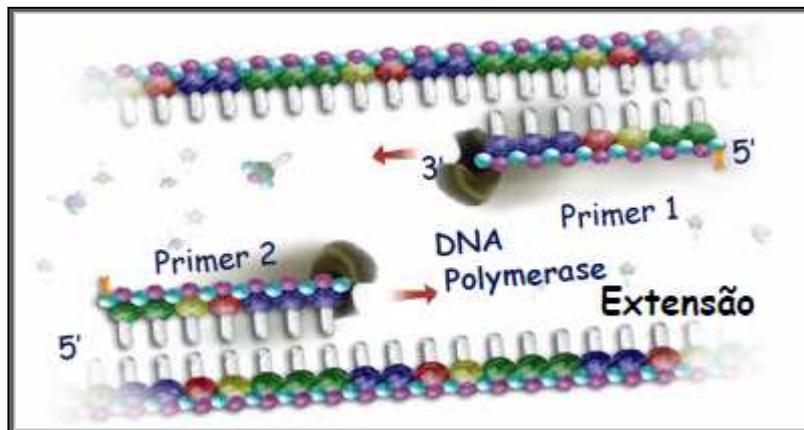


Figura 9. Sentido dos iniciadores.

Fonte: <http://blogdasmicro.blogspot.com/>

Para amplificação do DNA total das bactérias das amostras de água, foram realizadas reações de PCR utilizando os iniciadores abaixo:

- PCR I (amplificação)
- ✓ Bact 16SW-8F (sentido direto)
 - 5' – AGA GTT TGA T(CT) (AC) TGG CTC AG – 3'
 - 4.7OD (Densidade óptica)
- ✓ Uni 16S-1407R (sentido reverso)
 - 5' – GAC GGG GGT G(AT)G T(AG)C AA – 3'
 - 1.8OD (Densidade óptica)

Para a reação da PCR utiliza-se um volume final de 50 µL contendo: 35 µL de água, 5 µL de Tampão de PCR, 3 µL de MgCl₂ 3,0 mM, 2 µL de dNTPs 5mM, 1 µL de cada primer 5 pmol, 0,5 µL de *Taq* DNA polimerase (1U) e 0,5 µL de DNA template.

A amplificação foi realizada em termociclador (Peltier Thermal Cycler – MJ Reasearch) de acordo com a seguinte programação: 30 ciclos de: 2 minutos a 95°C para desnaturação inicial; 1 minuto a 95°C para desnaturação; 40 segundos a 62°C para anelamento e 30 segundos a 72°C para extensão; e 1 ciclo para extensão final de 5 minutos a 72°C.

4.5.4. Condições do DHPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Desnaturante)

Este procedimento consiste na separação dos agrupamentos bacterianos através dos grampos GC agregados a uma região dentro do 16S que facilita os fragmentos de DNA a se aderir a coluna. Posteriormente com a passagem do eluente em concentração crescente, os fragmentos com menor afinidade com a coluna vão se desagregando em menor tempo, seguido dos de maior afinidade, que são registrados nos cromatogramas com os tempos de retenção correspondente a cada agrupamento bacteriano (XIAO, 2001).

Para a amplificação para o DHPLC utilizam-se os seguintes primers específicos com grampos GC:

- PCR II (primer com grampos GC)

- ✓ OligoName: FP6 40 (interno)

5' – CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG
GCC TAC GGG AGG CAG CAG – 3'

11.9OD (Densidade óptica)

- ✓ 534R (sentido reverso)

5'-ATT ACC GCG GCT GCT GCT GG-3'

Os produtos da segunda PCR com grampo GC foram separados por DHPLC (Transgenomics™, USA - sistema Transgenomic WAVE) em coluna de

cromatografia líquida de fase reversa DNASEP[®]HT (Transgenomic, Omaha, NE), composta por partículas de poliestireno carregadas positivamente pela passagem do tampão TEAA (acetato de trietilamônia). Foram injetados 10 µL do produto amplificado e 2 µL de água na coluna a uma temperatura de 63,5°C, com fluxo de 0,9 mL/min. A eluição das moléculas de DNA foi feita pela passagem de um solvente orgânico, acetonitrila (ACN), que na medida em que aumenta sua concentração, diminui a atração entre os fragmentos de DNA e o TEAA.

4.6. Análise Estatística

As estimativas de desvio padrão (ds) dos valores de UFC foram calculadas através da fórmula $ds = \pm (\sum(x_i - x_m)^2 / (N-1))^{0,5}$.

Para avaliação dos dados obtidos através de estatística multivariada foi empregada a Análise Hierárquica de Agrupamento (AHA), utilizando o software Statistica versão 9.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. BAÍA DO GUAJARÁ (CONTROLE)

5.1.1. Análise dos parâmetros físicos e químicos

A Baía do Guajará foi escolhida como controle devido está afastado da área estudada e o ponto selecionado encontra-se longe da orla da cidade de Belém e próximo da margem do outro lado da Baía.

Foi realizada somente uma coleta em abril/2010 e os parâmetros medidos foram somente pH, Temperatura e Oxigênio Dissolvido como mostra a tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros físicos e químicos da Baía do Guajará.

Baía do Guajará (controle)		
ABRIL/2010		
Parâmetros	ZONA FOTICA	ZONA AFOTICA
pH	6,12	5,76
Temperatura (°C)	30,6	30,40
Oxigênio Dissolvido*	6,40	6,00

* mg/L

Observa-se que o pH na zona fótica foi maior que na afótica, sendo que somente na zona fótica está em concordância ao exigido pela Resolução CONAMA nº 357/2005.

A variação de temperatura e oxigênio dissolvido é relativamente baixa entre as duas zonas, estando ambas em conformidade com a Resolução CONAMA nº 357/2005.

5.1.2. Análise microbiológica

A Baía do Guajará apresentou uma baixa quantidade de UFC. Os microrganismos encontrados são oriundos da própria Baía, pois como Belém possui tratamento de esgoto, a água que é lançada na Baía vai com poucos

microrganismos e também o ponto coletado encontra-se do outro lado, não possuindo esgotos próximos.

Devido a baixa quantidade de UFC, só foi possível analisar os microrganismos usando a amostra *in natura*, ou seja, sem nenhuma diluição que o método propõe.

Mesmo a amostra *in natura* a quantidade de microrganismos foram baixos. Na zona fótica foi de $700 \pm 4,94$ UFC/mL, enquanto na afótica foi mais elevada sendo de $7300 \pm 15,55$ UFC/mL.

Observa que na zona afótica a concentração de UFC foi elevada, isso se deve a deposição de folhas e galhos provenientes do ambiente circundante. Fato este que é confirmado pelo valor maior de oxigênio dissolvido, pois revela o consumo do mesmo pelo processo metabólico das bactérias.

Os trabalhos que tratam de bioindicadores de contaminação são relacionados ao grupo de coliformes, pois somente são encontrados quando há o despejo de esgotos. Entretanto, o uso de microrganismo como indicadores biológicos são mais amplos e caracterizam melhor o nível de poluição.

5.1.3. Perfil das populações microbianas analisadas por DHPLC

Os cromatogramas confirmaram esta baixa quantidade de microrganismos, pois apresentaram, na zona fótica somente 3 picos e na afótica 4 picos relevantes de agrupamentos microbianos (APENDICE I e II, pag. 88).

Através dos cromatogramas observa-se uma diversidade populacional microbiana entre as duas zonas, que são representados pelos tempos de retenção, em que cada pico corresponde a um agrupamento microbiano.

Em cada pico correspondente ao tempo de retenção foi calculado um percentual da área total e conseqüentemente foram determinadas as quantidades de UFC correspondente a cada pico.

O código, tempo de retenção, área, percentual e UFC correspondente a cada área encontra-se na tabelas 3 e 4 (pag. 52).

Os resultados dos cromatogramas do DHPLC não somente fornece a descrição da união bacteriana, mas também permiti o monitoramento do progresso ou posição de certas populações bacterianas, baseada na exibição dos tempos de retenção.

Tabela 3. Códigos, tempo de retenção e UFC da Baía do Guajará – Zona fótica

BAÍA DO GUAJARÁ – ZONA FOTICA		
CODIGOS	TR	UFC ^a
15	8,7	256
17	8,9	358
21	9,3	85

TR: Tempo de Retenção (min.); ^aUFC/mL.

Tabela 4. Códigos, tempo de retenção e UFC da Baía do Guajará – Zona afótica

BAÍA DO GUAJARÁ – ZONA AFOTICA		
CODIGOS	TR	UFC ^a
12	8,3	1927
14	8,6	1394
16	8,8	3679
21	9,3	299

TR: Tempo de Retenção (min.); ^aUFC/mL.

Os resultados das análises dos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos da Baía do Guajará foram utilizados como ponto de referência para os demais rios. Ressalta-se que os sistemas são relativos.

5.2. RIO PARÁ

5.2.1. Análise dos parâmetros físicos e químicos

Os resultados das análises de alguns parâmetros físicos químicos realizados pela equipe do Instituto Evandro Chagas nas amostras coletadas no Rio Pará encontra-se na tabela 5 (pag. 53).

Tabela 5. Parâmetros físicos e químicos do Rio Pará.

Rio Pará					
Parâmetros	JANEIRO/2009	ABRIL/2009	OUTUBRO/2009	ABRIL/2010	IEC/2008
pH	7,7	6,7	NR	NR	7,1
Temperatura (°C)	29,6	29,2	NR	NR	29,4
Oxigênio Dissolvido*	7,4	6,7	NR	NR	8,4
Sólidos Totais Dissolvidos – TDS*	22,0	18,0	NR	NR	17,5
Turbidez**	9,5	11,5	NR	NR	29,0
Sólidos Totais em Suspensão – STS*	5,0	5,5	NR	NR	12,0
Cloreto*	2,1734	1,5539	NR	NR	NR
NO ₂ *	0,6592	0,0053	NR	NR	0,0015
NO ₃ *	0,1943	0,1322	NR	NR	0
NH ₃ *	0,0104	0,0011	NR	NR	0,37
NH ₄ *	0,0126	0,0012	NR	NR	NR
PO ₄ *	0,0038	0,0010	NR	NR	NR
SO ₄ *	2,0120	0,8392	NR	NR	NR

* mg/L; **UNT; NR: não realizado

Analisando os valores de pH em cada período de coleta, observou-se que em abril/2009 apresentou o menor valor.

Não houve grande variação nos parâmetros temperatura, sólidos totais em suspensão, nitrato e fosfato durante os períodos de coleta. Entretanto, oxigênio dissolvido, sólidos totais dissolvidos, turbidez, nitrito, amônio, amônia e sulfato sofreram variação significativa, sendo que no mês de janeiro/2009, a maioria, foi mais elevada.

Todos os parâmetros analisados estão em concordância com os limites estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357/2005, com exceção da temperatura.

Em relatório do IEC (2008), foram realizadas análises físicas e químicas em um trecho do Rio Pará. Estas coletas foram realizadas no dia 15 de maio de 2008 em vários pontos selecionados pela equipe do IEC. A fim de comparação com as análises de abril de 2009, foi selecionado o ponto 019M de coordenada Longitude 01°33'30,8" e Latitude 048°46'18,4". Comparando-se maio/2008 e abril/2009, observa-se que após um ano houve queda no oxigênio dissolvido, turbidez, sólidos totais em suspensão e amônia (tabela 5, pag. 53).

No gráfico 1 (pag. 55) apresenta-se o perfil da variação dos parâmetros nas coletas no decorrer do ano de 2009. Observa-se que em abril/2009 todos os parâmetros foram mais baixos que os demais meses com exceção da turbidez. Este período houve grande quantidade pluviométrica, o que pode ter proporcionado aumento da turbidez devido ao carreamento de matéria orgânica da cidade (ANEXO I, pag. 96).

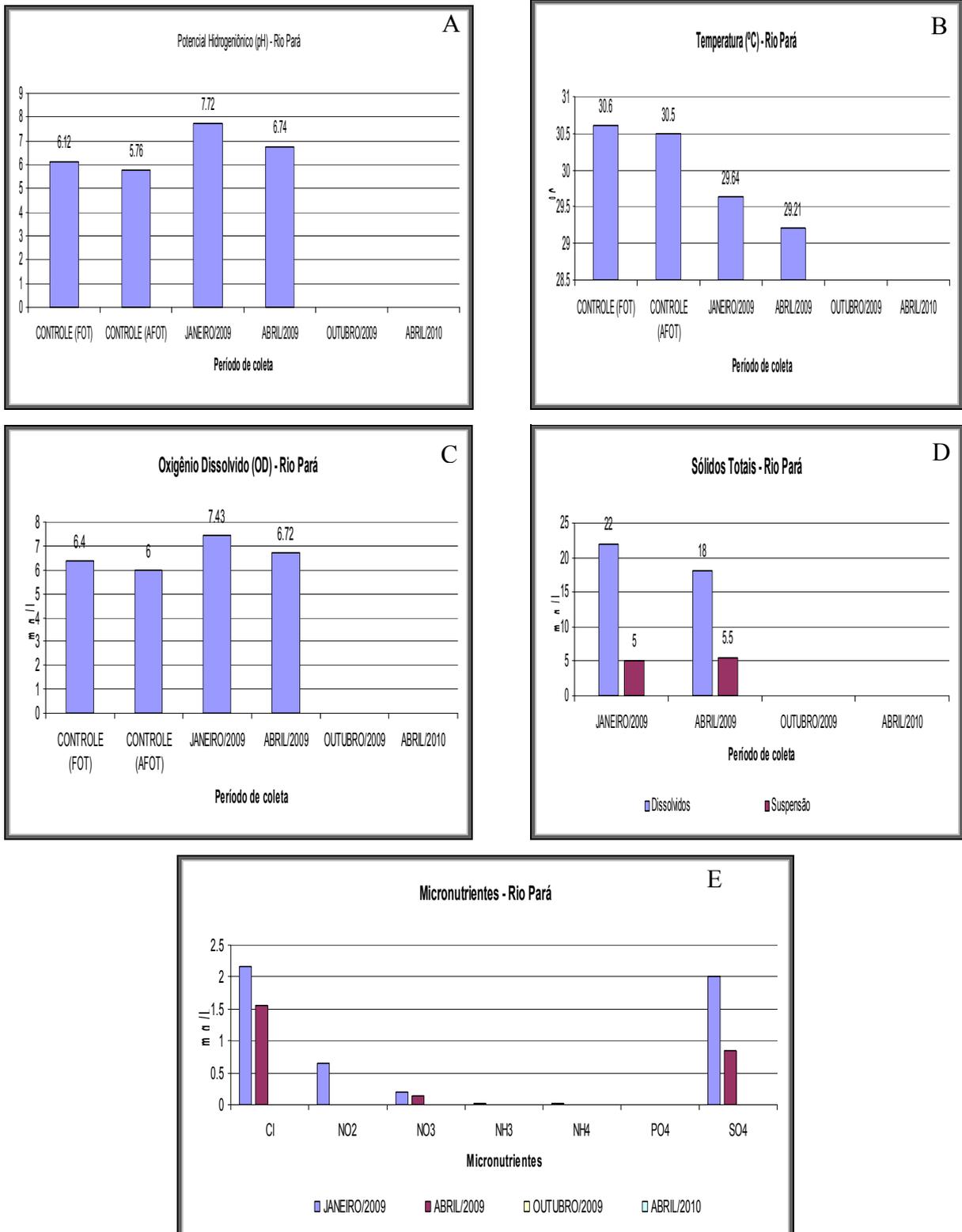


Gráfico 1. Parâmetros físicos e químicos do Rio Pará. A: pH, B: temperatura, C: OD, D: sólidos totais, E: micronutrientes.

Na tabela 6 (pag. 56) estão apresentados os parâmetros físicos e químicos do Rio Pará em comparação ao controle. Observa-se que os parâmetros pH e oxigênio

dissolvido, no controle, estão abaixo dos encontrados no Rio Pará, com exceção da temperatura (gráfico 1A, B, C; pag. 55)

Tabela 6. Comparação dos parâmetros físicos e químicos entre Rio Pará e controle, zona fótica

Rio Pará					
Parâmetros	JANEIRO/2009	ABRIL/2009	OUTUBRO/2009	ABRIL/2010	CONTROLE
pH	7,7	6,7	NR	NR	6,1
Temperatura (°C)	29,6	29,2	NR	NR	30,6
Oxigênio Dissolvido*	7,4	6,7	NR	NR	6,4

* mg/L; NR: não realizado

Os principais parâmetros físicos e químicos que influenciam na presença dos microrganismos são pH, temperatura, oxigênio dissolvido e turbidez.

O pH influencia diretamente nos microrganismos, devido interferir na regulação do equilíbrio químico que ocorre naturalmente nos ecossistemas aquáticos. O aumento da temperatura faz com que diminua o OD, pois diminui a solubilidade dos gases. O oxigênio dissolvido influencia diretamente nas unidades formadoras de colônias, pois é utilizada pelos microrganismos aeróbios e anaeróbios não estritos para respiração. A turbidez influencia diretamente no oxigênio dissolvido, pois com o aumento da turbidez impede a penetração da luz e, conseqüentemente, afeta o processo de fotossíntese, diminuindo a produção de oxigênio. As unidades formadoras de colônias devem se relacionar entre si, pois as concentrações devem ser constantes.

A figura 10 (pag. 57) ilustra como os resultados obtidos se correlacionam nos diferentes períodos de coletas.

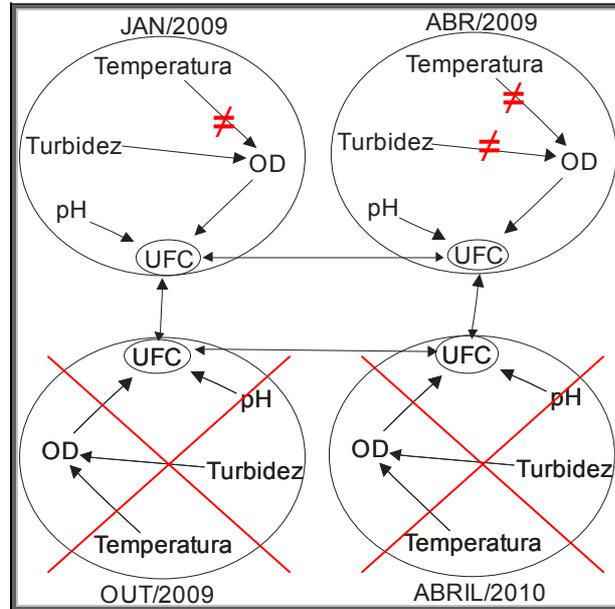


Figura 10. Correlação dos resultados obtidos.

Observação: O x em vermelho representa que não foi realizada a análise neste período. O sinal ≠ indica que não houve influência.

Em janeiro/2009, observa-se a influência do OD sobre a turbidez e UFC, e do pH nas UFC, entretanto a temperatura não se observa influência na OD. Em abril/2009, as UFC influenciam no pH e OD, porém não se observa influência da temperatura e turbidez. As análises dos parâmetros em outubro/2009 e abril/2010 não foram realizadas.

Pelo fato da maioria dos parâmetros encontrados se relacionarem com as UFC, não foi possível utilizar de análises estatísticas para discriminar os parâmetros e as UFC nos períodos de coletas.

5.2.2. Análise microbiológica

O Rio Pará é o rio de maior porte da região, possuindo um elevado fluxo de grandes navios, e por este motivo recebe grande quantidade de efluentes oriundas dessas embarcações.

Na tabela 7 (pag. 58), encontra-se a média da quantidade de colônias cultivadas (figura 11, pag. 59) nas placas após 78h de incubação e as unidades formadoras de colônias para cada coleta, tanto na zona fótica quanto afótica.

Tabela 7. Diluição, média dos números de colônias e as unidades formadoras de colônias do Rio Pará para as duas zonas

Meses de coletas Zona	Janeiro/2009	Abril/2009	Outubro/2009	Abril/2010
Zona Fótica				
Diluição	10^{-1}	10^{-1}	10^{-2}	SM
Média do nº de colônias ± ds	$31,5 \pm 6,4$	$160,5 \pm 7,8$	$5,5 \pm 12,5$	$15,5 \pm 18,4$
UFC (ufc/mL)	315×10	1605×10	55×10^2	155
Zona Afótica				
Diluição	10^{-1}	10^{-1}	SM	SM
Média do nº de colônias ± ds	$122,5 \pm 65,8$	$67,0 \pm 12,7$	$94,0 \pm 93,3$	$60,5 \pm 110,5$
UFC (ufc/mL)	1225×10	67×10^2	94×10	605

SM: solução mãe; ds: desvio padrão

Na zona fótica, quando relacionado as diluições em que foi encontrada a faixa de contagem, houve um aumento das UFC's no período de 2009 onde foi encontrada em outubro/2009 uma diluição de 10^{-2} . Entretanto já em abril/2010 a quantidade de UFC diminuiu, sendo encontrada na solução mãe.

Já na zona afótica, janeiro e abril/2009 as contagens foram realizadas na diluição 10^{-1} e havendo uma diminuição na quantidade de UFC nos demais períodos, em que foi considerada a solução mãe, sendo que em abril/2010 observou-se a menor quantidade.

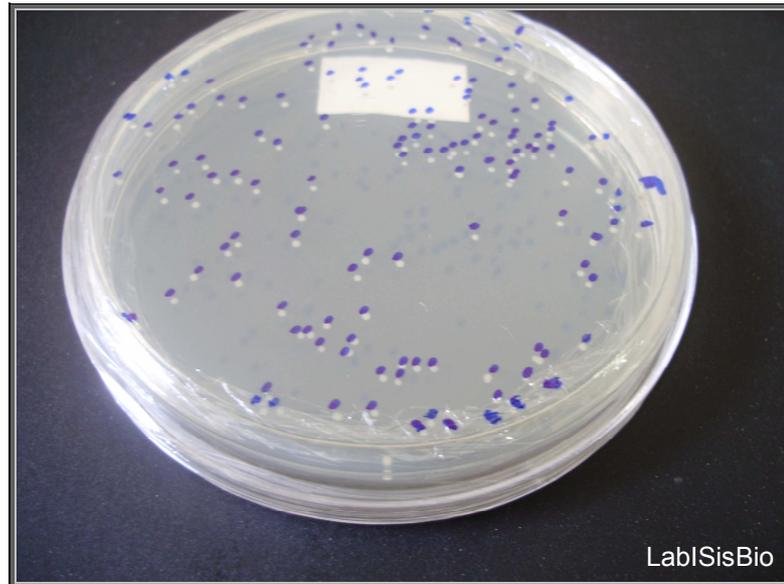


Figura 11. Placa com colônias cultivadas

O gráfico 2 (pag. 60) apresenta o perfil microbiológico através das unidades formadoras de colônias do Rio Pará em comparação ao controle e a sazonalidade. Observa-se que há diferenças nas quantidades de microrganismos entre as duas zonas, em que tanto a zona fótica quanto a afótica apresentou, em abril/2010, menor quantidade de UFC, sendo também menor que o controle.

A zona fótica, a partir de abril/2009, houve um decaimento das unidades formadoras de colônias. A zona afótica apresentou um decaimento no decorrer dos períodos de coleta. Analisando o período de um ano (abril/2009 e abril/2010) observa decaimento nas UFC nas duas zonas em abril/2010.

Quando comparado ao controle, as quantidades de UFC em janeiro, abril e outubro/2009 são elevadas, isto se deve ao fato dos despejos dos esgotos de Barcarena atingir diretamente o rio.

Em abril/2009, foi o período de maior concentração de UFC, devido ao alto índice pluviométrico ocorrido na região, o que provocou o carreamento de material orgânico da cidade para o rio (ANEXO I, pag. 96)

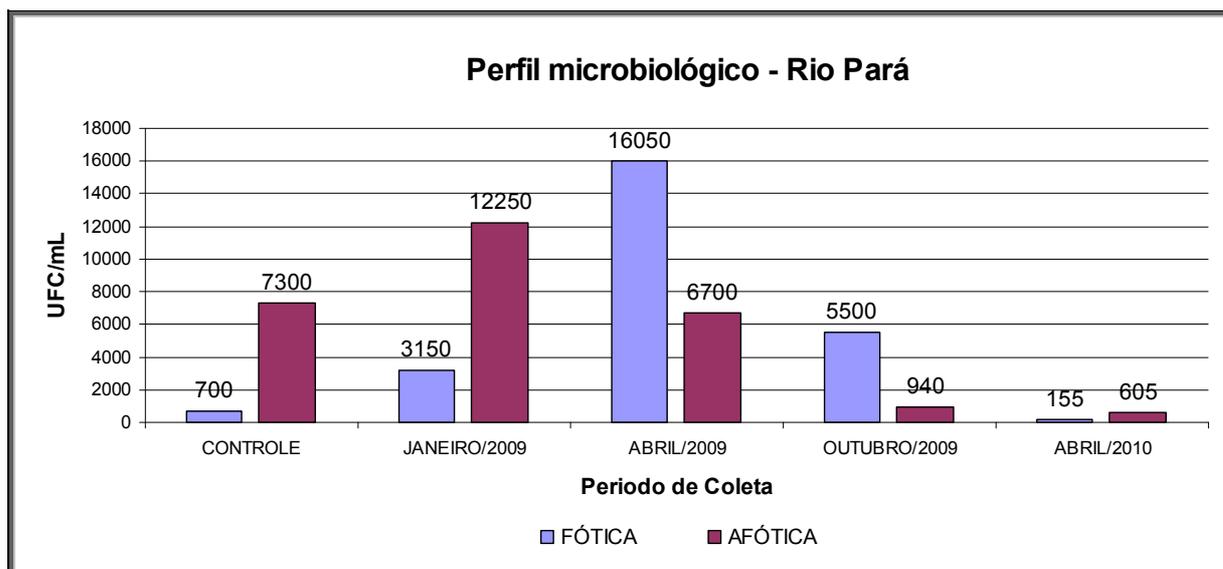


Gráfico 2. Tendência do perfil microbiológico do Rio Pará em comparação ao controle e sazonalidade.

5.2.3. Perfil das populações microbianas analisadas por DHPLC

Os cromatogramas foram analisados tanto entre a sazonalidade quanto em comparação ao controle.

Neste primeiro momento foi analisado em sazonalidade, onde se observou que em janeiro e abril/2009, na zona fótica, apresentou em comum o tempo de retenção em 10,5 min, porém com o decorrer do período de coleta houve diminuição das UFC. O tempo de 8,9 min apareceu em três períodos de coleta, sendo que em menor concentração de UFC em abril/2010 (APENDICES III, V, IX; pag. 89, 90, 92). Os agrupamentos com tempo em 11,1 e 11.3 min. apareceu em duas coletas consecutivas (janeiro e abril/2009), entretanto em maior quantidade em abril/2009 (APENDICES III, V; pag. 89, 90). O tempo de 9.5 min. apareceu em abril/2009 e abril/2010 porém em abril/2010 houve diminuição brusca na quantidade (APENDICES V, IX; pag. 90, 92. Tabela 8, pag. 62).

Na zona afótica o pico em 9,3 min. apareceu em janeiro/2009 e abril/2010, sendo que em janeiro apresentou maior quantidade. O tempo 10,1 min. foi encontrado em janeiro com maior quantidade que em abril/2009 (APENDICES IV, VI, X; pag. 89, 90, 92. Tabela 9, pag. 65).

Comparando as duas zonas, alguns agrupamentos aparecem em ambas nos períodos de abril e outubro/2009, mas na afótica em menor quantidade. (APENDICES V, VI, VII, VIII; pag. 90, 91. Tabelas 8 e 9; pag. 62 e 65).

Quando comparado ao controle, na zona fótica, o tempo de 8,7 min. aparece em abril/2009 e em maior quantidade. O tempo de 8,9 min. nas três coletas em que foi encontrada, em abril/2009 apresentou maior quantidade. O agrupamento com tempo de 9,4 min., em outubro/2009 foi maior que o controle (APENDICES I, V, VII; pag. 88, 90, 91. Tabelas 3 e 8; pag. 52 e 62).

Já na zona afótica, o tempo 8,2 min. aparece em abril/2010 e em menor quantidade em relação ao controle. Enquanto que o tempo 9,3 min. apareceu em janeiro/2009 em maior quantidade e abril/2010 em menor (APENDICES II, IV, X; pag. 88, 89, 92. Tabelas 4 e 9; pag. 52 e 65).

BARLAAN (2005) encontrou semelhanças e diferenças na composição dos agrupamentos bacterianos com base nos tempos de retenção. Na maioria das amostragens foram encontradas tempos de retenção semelhantes. Entretanto outras populações tenderam a aumentar ou diminuir durante todo o período amostral. Os tempos de retenção encontrados nas análises de espécies de bactérias marinhas foram acima de 11.8 min, sendo que no Rio Pará o maior tempo de retenção foi de 11.3 min.

O Rio Pará apresenta uma grande variedade de microrganismos que podem ser da própria flora microbiana natural ou que são lançados através de esgotos domésticos. Entretanto, possui pouca semelhança com os microrganismos da Baía do Guajará.

Tabela 8. Códigos, tempo de retenção e UFC correspondente aos cromatogramas do Rio Pará – Zona fótica

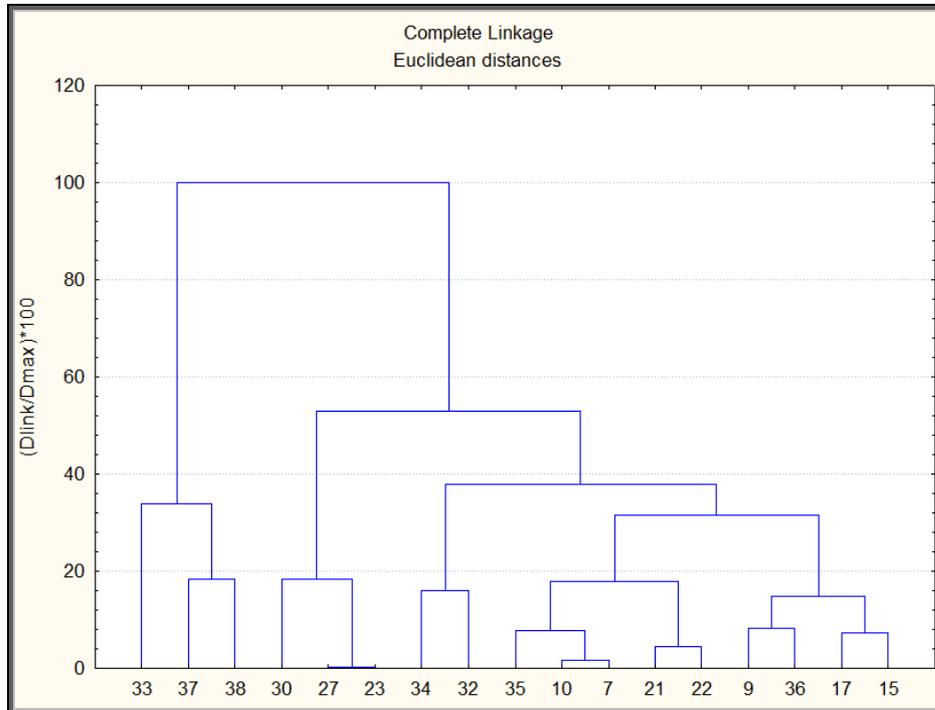
Códigos	TR	JAN/2009 ^a	ABR/2009 ^a	OUT/2009 ^a	ABR/2010 ^a	CONTROLE ^a
7	7,7	NP	NP	566	NP	NP
9	7,9	NP	NP	NP	25	NP
10	8,0	NP	NP	495	NP	NP
15	8,7	NP	513	NP	NP	256
17	8,9	280	401	NP	110	358
21	9,3	NP	NP	1320	NP	NP
22	9,4	NP	NP	1133	NP	85
23	9,5	NP	1027	NP	14	NP
27	10,0	NP	1027	NP	NP	NP
30	10,3	NP	1878	NP	NP	NP
32	10,5	1496	NP	4235	5	NP
33	10,7	NP	2953	NP	NP	NP
34	10,8	888	NP	NP	NP	NP
35	10,9	NP	NP	852	NP	NP
36	11,0	375	NP	NP	NP	NP
37	11,1	NP	4349	709	NP	NP
38	11,3	110	3900	NP	NP	NP

TR: tempo de retenção (min); NP: não presente; ^aUFC

Na tabela 8, observa-se que existem agrupamentos microbianos que aparecem em somente uma coleta (outubro/2009) e não foi encontrada no controle, significando que este pode não pertencer a própria flora microbiana. Entretanto, no mesmo período, não há ocorrência de um agrupamento que foi encontrado nos demais períodos incluindo o controle, isto se deve por se tratar de um microrganismo sensível, pois neste período as águas da Amazônia se tornam um pouco salobra. O tempo de retenção 10.5 min. apareceu em três coletas, porém houve diminuição das concentrações de UFC no decorrer dos períodos de coleta. O tempo de 9.5 min. apareceu somente nos períodos de abril/2009 e abril/2010, onde o nível pluviométrico foi maior e conseqüentemente houve o carreamento de

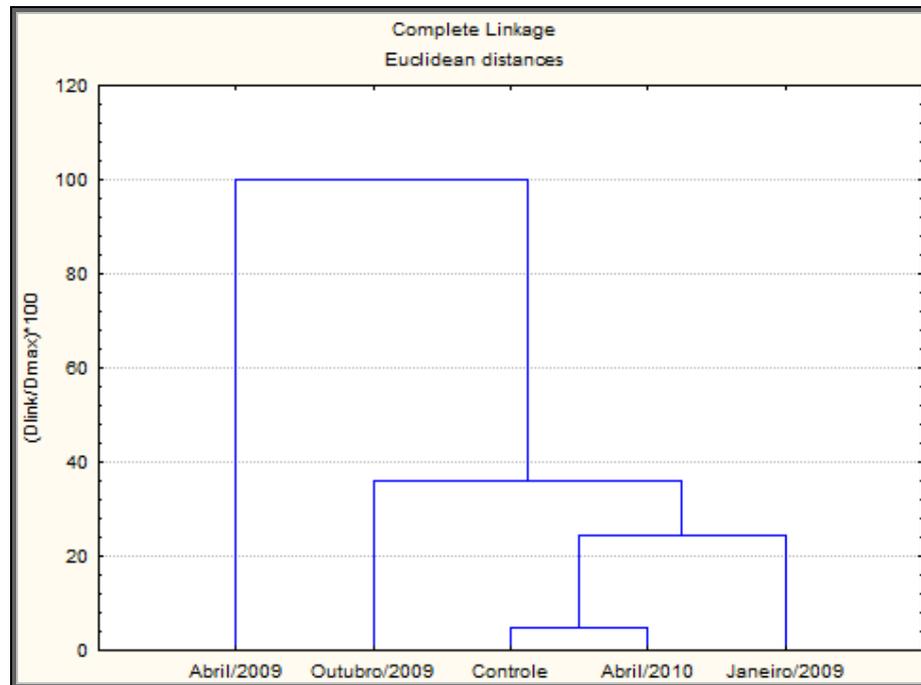
microrganismos da cidade de Abaetetuba, sendo que em abril/2010 houve diminuição brusca na concentração de UFC.

Gráfico 3. Dendograma de similaridade das UFC (zona fótica) do Rio Pará



Para compor o gráfico relacionou-se a UFC com o tempo de retenção correspondente a cada código. Como se observa no gráfico 3, houve a discriminação dos agrupamentos representados pelos códigos 33 (10.7 min.), 37 (11.1 min.) e 38 (11.3 min.) referentes ao período de abril/2009 (tabela 8, pag. 62) devido apresentarem maiores concentrações de UFC.

Gráfico 4. Dendograma de similaridade das UFC (zona fótica) do Rio Pará no decorrer dos períodos de coleta em comparação ao controle



O gráfico 4, observa-se a similaridade entre abril/2010 e o controle, pois apresentaram nas mesmas quantidades de agrupamentos e concentrações de UFC próximos, seguido da similaridade com janeiro/2009 e posteriormente de outubro/2009. Entretanto, discriminou abril/2009 devido apresentar maior número de UFC e distante aos demais períodos de coleta, fato este ocasionado pelo carreamento de matéria orgânica oriunda da cidade, provocada pelo maior índice pluviométrico em abril/2009 (ANEXO I, pag. 96).

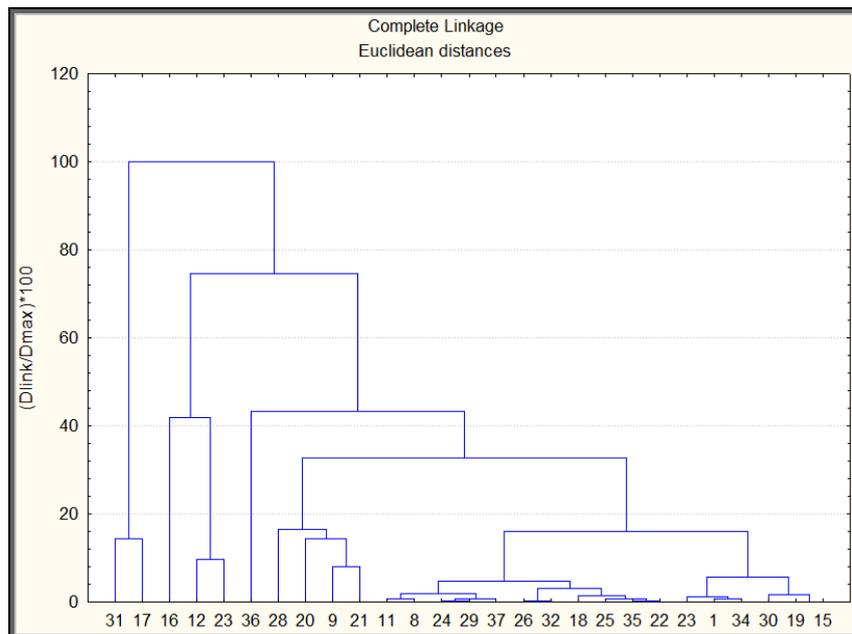
Tabela 9. Códigos, tempo de retenção e UFC correspondente aos cromatogramas do Rio Pará – Zona afótica

Códigos	TR	JAN/2009 ^a	ABR/2009 ^a	OUT/2009 ^a	ABR/2010 ^a	CONTROLE ^a
1	3,2	NP	536	NP	28	NP
8	7,8	NP	NP	NP	58	NP
9	7,9	1580	NP	NP	NP	NP
11	8,2	NP	NP	NP	97	NP
12	8,3	NP	NP	NP	NP	1927
15	8,7	NP	844	NP	NP	NP
16	8,8	NP	NP	NP	292	368
17	8,9	4079	NP	NP	NP	NP
18	9,0	NP	NP	148	NP	NP
19	9,1	NP	851	NP	NP	NP
20	9,2	784	NP	NP	NP	NP
21	9,3	1262	NP	NP	88	299
22	9,4	NP	NP	74	NP	NP
23	9,5	NP	596	NP	NP	NP
23	9,5	NP	NP	NP	NP	1394
24	9,7	NP	NP	NP	17	NP
25	9,8	NP	NP	107	NP	NP
26	9,9	NP	NP	239	NP	NP
28	10,1	1262	764	NP	NP	NP
29	10,2	NP	NP	NP	25	NP
30	10,3	NP	764	NP	NP	NP
31	10,4	3283	NP	NP	NP	NP
32	10,5	NP	NP	247	NP	NP
34	10,8	NP	556	NP	NP	NP
35	10,9	NP	NP	86	NP	NP
36	11,0	NP	1789	NP	NP	NP
37	11,1	NP	NP	37	NP	NP

TR: tempo de retenção (min.); NP: não presente; ^aUFC

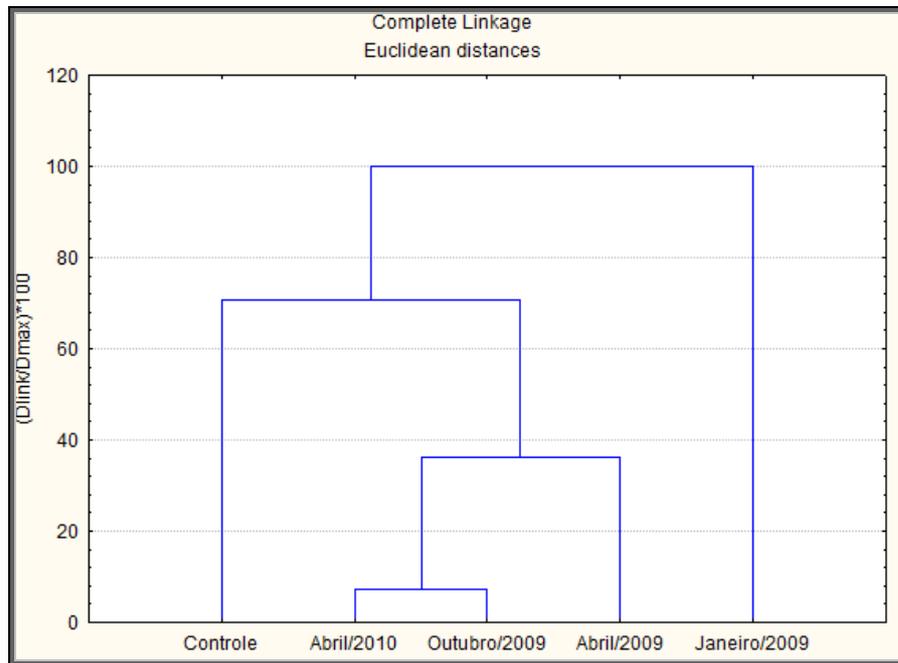
Na tabela 9 (pag. 65) observa-se que em abril/2009 e outubro/2009 apresentaram uma diversidade microbiana, onde ocorreu o aparecimento de agrupamentos totalmente distintos entre si e dos demais períodos, incluindo o controle. Em janeiro/2009 e abril/2010 observa o aparecimento somente nestes períodos de três agrupamentos diferentes e que também não apareceu no controle. Os agrupamentos de abril/2009 e abril/2010 são totalmente distintos.

Gráfico 5. Dendograma de similaridade das UFC (zona afótica) do Rio Pará



Observa-se no gráfico 5, a separação em dois grupos principais, sendo discriminado os agrupamentos representados com os códigos 17 (8.9 min.) e 31 (10.4 min.) referentes ao período de janeiro/2009 (tabela 9, pag. 65) devido apresentarem maiores concentrações de UFC.

Gráfico 6. Dendograma de similaridade das UFC (zona afótica) do Rio Pará no decorrer dos períodos de coleta em comparação ao controle



No gráfico 6, observa-se a similaridade entre outubro/2009 e abril/2010, pois apresentaram concentrações de UFC próximos, e discriminou janeiro/2009 devido apresentar maior concentração de UFC em relação aos demais períodos. Abril/2009, outubro/2009 e abril/2010 apresentaram similaridade com o controle.

5.3. RIO DENDÊ

5.3.1. Análise dos parâmetros físicos e químicos

Os resultados das análises de alguns parâmetros físicos químicos realizados pela equipe do Instituto Evandro Chagas nas amostras coletadas no rio Dendê encontram-se na tabela 10 (pag. 68).

Tabela 10. Parâmetros físicos e químicos do Rio Dendê.

Rio Dendê					
Parâmetros	JANEIRO/2009	ABRIL/2009	OUTUBRO/2009	ABRIL/2010**	IEC/2007
pH	6,6	5,2	6,8	NR	3,6
Temperatura (°C)	28,4	26,1	29,0	NR	27,1
Oxigênio Dissolvido*	8,8	4,5	7,5	NR	NR
Sólidos Totais Dissolvidos – TDS*	26,0	25,0	26,0	NR	225,5
Turbidez**	23,5	69,5	13,5	NR	3,0
Sólidos Totais em Suspensão – STS*	15,5	43,5	8,0	NR	8,0
Cloreto*	6,0978	0,0642	2,2092	NR	3,2
NO ₂ *	3,2978	0	0,0007	NR	0,007
NO ₃ *	0,1654	0,0057	0,0976	NR	1,8
NH ₃ *	0,2925	0,0128	0,0208	NR	0
NH ₄ *	0,3552	0,0156	0,0252	NR	NR
PO ₄ *	0,0021	0	0	NR	0,17
SO ₄ *	7,8374	0,1829	2,988	NR	231,0

* mg/L; **UNT; NR: não realizado

Em todos os parâmetros observa-se uma grande variação no decorrer dos períodos de coleta, com exceção dos sólidos totais dissolvidos.

Analisando os valores de pH e oxigênio dissolvido em cada período de coleta, observa-se que em abril/2009 apresentou o menor valor e abaixo da Resolução CONAMA nº 357/2005, nos demais períodos de coletas ficou na faixa dos valores fixados pela resolução.

Em abril/2009 ocorreu elevação na concentração de sólidos totais solúveis em comparação aos outros períodos de coleta e, conseqüentemente, da turbidez, este fato pode ter ocorrido pelo carreamento de solos pelas águas pluviais que foram bastante altas neste período (ANEXO I, pag. 96). Observa-se ainda a diminuição do oxigênio dissolvido.

Todos os parâmetros analisados estão em concordância com os limites estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 357/2005, com exceção do pH e OD da coleta de abril/2009.

Em relatório do IEC (2007), foram realizadas análises físicas e químicas no Rio Dendê. Estas coletas foram realizadas em fevereiro de 2007 devido a um incidente ocorrido na região, sendo coletados em vários pontos selecionados pela equipe do IEC. A fim de comparação com as análises de janeiro de 2009, foi selecionado apenas o ponto AS16 (vazante) contido no relatório, referente como próximo a foz, sendo o ponto mais próximo ao deste trabalho. No presente relatório do IEC/2007 observa-se que os parâmetros pH, turbidez, STS e NH₃ estão abaixo do contido neste trabalho e outros parâmetros encontra-se acima quando comparados a este trabalho (tabela 10, pag. 68). Mesmo não constando a análise de oxigênio dissolvido e microbiológica, após dois anos, verifica-se supostamente uma recuperação do rio.

No gráfico 7 (pag. 70) está apresentado o perfil da variação dos parâmetros nas coletas no decorrer do ano. Observa-se que em abril todos os parâmetros ficaram abaixo dos demais períodos de coletas, com exceção de turbidez e sólidos totais solúveis.

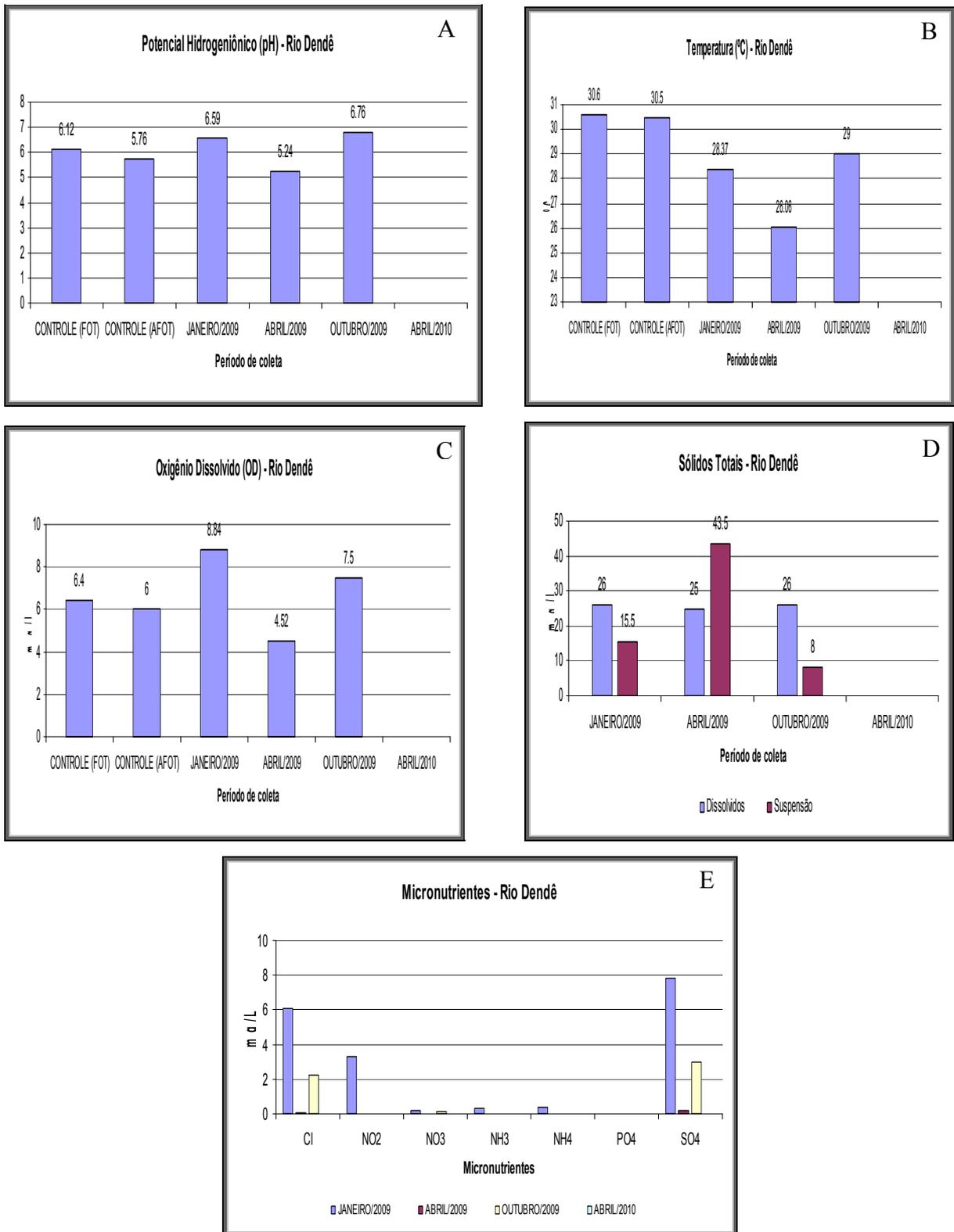


Gráfico 7. Parâmetros físicos e químicos do Rio Dendê. A: pH, B: temperatura, C: OD, D: sólidos totais, E: micronutrientes.

Na tabela 11 estão apresentados os parâmetros físicos e químicos do Rio Dendê em comparação ao controle. O pH não sofreu muita variação em relação ao controle. A temperatura do controle encontra-se um pouco elevada que as do rio Dendê, em consequência o oxigênio dissolvido, no controle, encontra-se abaixo dos valores referente ao rio, pois com o aumento da temperatura ocorre a diminuição do oxigênio dissolvido na água. Em todos os parâmetros, no mês de abril/2009 estão abaixo das demais coletas (gráfico 7A, B, C, pag. 70).

Tabela 11. Comparação dos parâmetros físicos e químicos entre Rio Dendê e controle, zona fótica

Rio Dendê					
Parâmetros	JANEIRO/2009	ABRIL/2009	OUTUBRO/2009	ABRIL/2010	CONTROLE
pH	6,6	5,2	6,8	NR	6,1
Temperatura (°C)	28,4	26,1	29,0	NR	30,6
Oxigênio Dissolvido*	8,8	4,5	7,5	NR	6,4

* mg/L; NR: não realizado

Os principais parâmetros físicos e químicos que influenciam na presença dos microrganismos são pH, temperatura, oxigênio dissolvido e turbidez.

A figura 12 (pag. 72) ilustra como os resultados obtidos se correlacionam nos diferentes períodos de coletas.

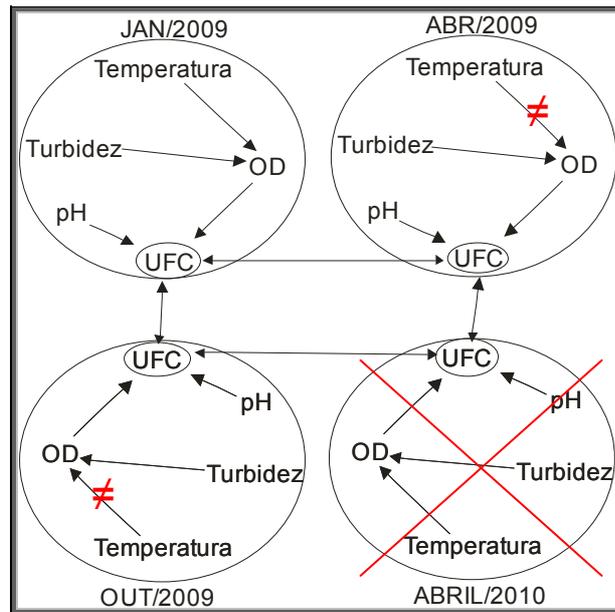


Figura 12. Correlação dos resultados obtidos.

Observação: O x em vermelho representa que não foi realizada a análise neste período. O sinal ≠ indica que não houve influência.

Na coleta de janeiro/2009, observa-se a influência da temperatura e turbidez sobre o OD, e em consequência o pH e OD sobre as UFC. Em abril/2009 e outubro/2009, não há influência da temperatura no OD, entretanto, observa-se interação do OD com a turbidez e UFC, e do pH com as UFC. A análise dos parâmetros abril/2010 não foi realizada.

Pelo fato dos parâmetros encontrados se relacionarem com as UFC, não foi possível utilizar de análises estatísticas para discriminar os parâmetros e as UFC nos períodos de coletas.

5.3.2. Análise microbiológica

O Rio Dendê localiza-se próximo a Vila do Conde e de uma empresa de beneficiamento de Caulim, sendo que este rio está em recuperação após vazamento em 2007 (IEC, 2007).

Na tabela 13 (pag. 73), encontra-se a média da quantidade de colônias cultivadas (figura 13, pag. 75) nas placas após 78h de incubação e as unidades formadoras de colônias para cada coleta, tanto na zona fótica quanto afótica.

Tabela 12. Diluição, média dos números de colônias e as unidades formadoras de colônias do Rio Dendê para as duas zonas

Zona	Meses de coletas			
	Janeiro/2009	Abril/2009	Outubro/2009	Abril/2010
Zona Fótica				
Diluição	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}	SM
Media do nº de colônias ± ds	17,5 ± 7,8	36,5 ± 3,5	13 ± 1,4	26,5 ± 19,1
UFC (ufc/mL)	175x10	365x10	13x10 ²	265
Zona Afótica				
Diluição	10^{-1}	10^{-1}	10^{-1}	SM
Media do nº de colônias ± ds	46,0	29,5 ± 6,4	10 ± 1,4	36,5 ± 2,1
UFC (ufc/mL)	4563	295x10	10 ³	365

SM: solução mãe; ds: desvio padrão

Nas zonas fótica e afótica, as diluições em que foi encontrada a faixa de contagem foram constantes (10^{-1}), com exceção da ultima coleta no qual a faixa foi na solução mãe.

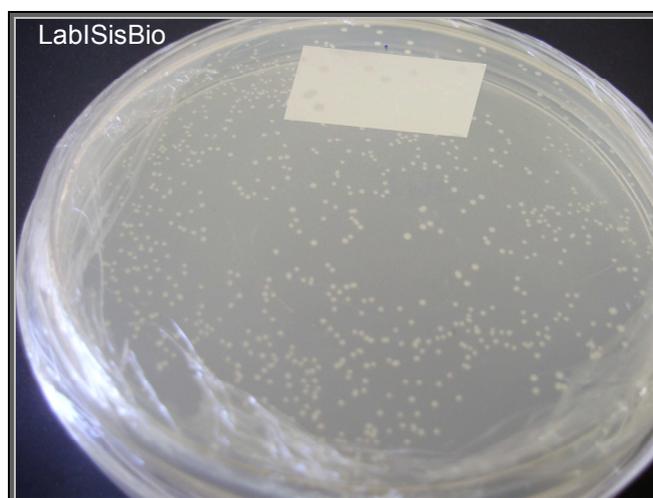


Figura 13. Placa com as colônias cultivadas

O gráfico 8 apresenta o perfil microbiológico através das unidades formadoras de colônias do Rio Dendê em comparação ao controle e a sazonalidade.

Na zona fótica, a partir de abril/2009 houve diminuição das UFC no decorrer do período de coleta, sendo que em abril/2010 apresentou menor concentração de UFC em comparação ao controle.

Na zona afótica, ocorreu a diminuição na concentração de UFC no decorrer dos períodos de coleta.

Comparando as UFC no período de um ano depois (abril/2009 e abril/2010) observa-se diminuição nas quantidades de UFC, tanto na zona fótica quanto afótica.

Observa-se que há diferenças nas quantidades de microrganismos entre as duas zonas, em que tanto a zona fótica quanto a afótica apresentou em abril/2010 menor quantidade de UFC.

Quando comparado ao controle, as quantidades de UFC na zona fótica foi menor durante todo o período em relação ao controle. Entretanto, na afótica somente em abril/2010 foi menor que o controle, sendo as demais coletas com maior quantidade.

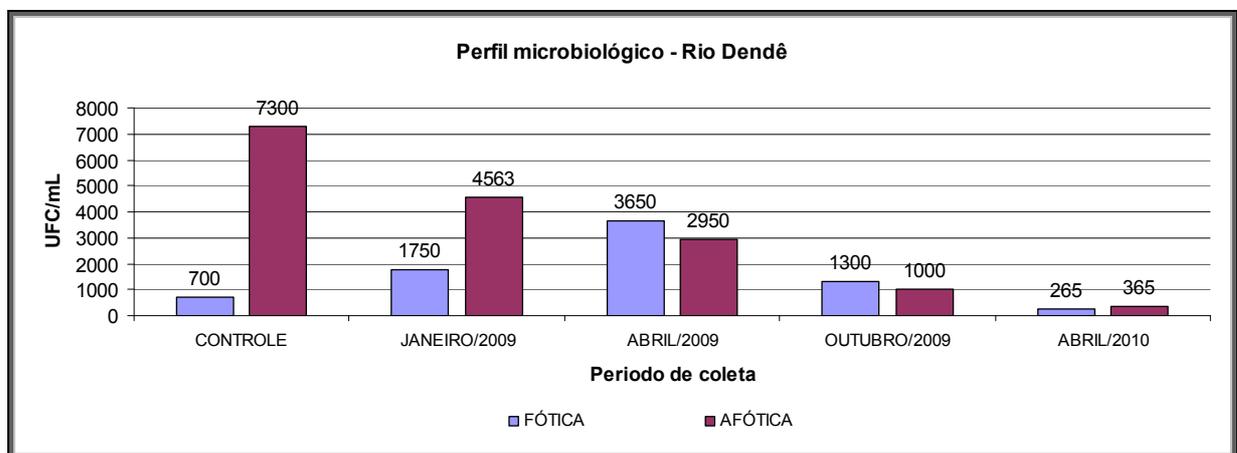


Gráfico 8. Tendência do perfil microbiológico do Rio Dendê em comparação ao controle e sazonalidade.

5.3.3. Perfil das populações microbianas analisadas por DHPLC

Os cromatogramas foram analisados tanto entre a sazonalidade quanto em comparação ao controle.

Neste primeiro momento foi analisado em sazonalidade, onde se observou que não houve agrupamentos semelhantes entre os períodos de coleta tanto na zona fótica quanto na afótica, o que significa que os microrganismos podem ser transitórios para cada período (APENDICES XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI; pag. 93, 94, 95. Tabelas 13 e 14, pag. 76 e 78).

Comparando as duas zonas, somente em abril/2010 apareceu agrupamento semelhante no tempo de retenção 3,7 min., porém na zona afótica a quantidade foi um pouco maior que na fótica (APENDICES XV, XVI; pag. 95. Tabelas 13 e 14, pag. 76 e 78).

Quando comparado ao controle, a zona fótica apenas um agrupamento semelhante de microrganismos com tempo de retenção 8.7 min. (APENDICES I, XI, XIII, XV; pag. 88, 93, 94, 95. Tabelas 3 e 13, pag. 52 e 76).

Já na zona afótica, somente o tempo 9,3 min. aparece em abril/2009 e em menor quantidade em relação ao controle (APENDICES II, XII; pag. 88, 93. Tabelas 4 e 14, pag. 52 e 78).

BARLAAN (2005) em seu estudo com espécies de bactérias marinhas encontrou tempos de retenção variando de 11.8 min. e 23 min. havendo flutuações da população bacteriana durante o período de amostragem. No Rio Dendê o maior tempo de retenção encontrado foi de 12.8 min.

O Rio Dendê apresenta uma grande variedade de microrganismos que podem ser da própria flora microbiana natural ou que são lançados através de esgotos domésticos. Entretanto, possui somente uma semelhança com os microrganismos da Baía do Guajará na zona afótica.

De acordo com Barlaan (2005), as bactérias são diferenciadas em termos de composição, abundância e presença ou ausência de populações bacterianas no decorrer das coletas.

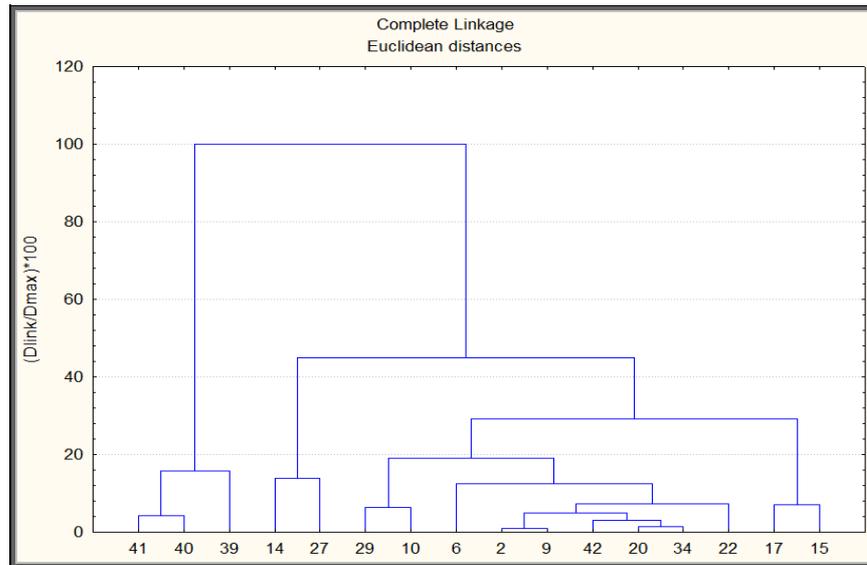
Tabela 13. Códigos, tempo de retenção e UFC correspondente aos cromatogramas do Rio Dendê – Zona fótica

Códigos	TR	JAN/2009 ^a	ABR/2009 ^a	OUT/2009 ^a	ABR/2010 ^a	CONTROLE ^a
2	3,7	NP	NP	NP	47	NP
6	7,6	NP	NP	NP	158	NP
9	7,9	NP	NP	NP	59	NP
10	8,0	NP	NP	133	NP	NP
14	8,6	NP	NP	543	NP	NP
15	8,7	NP	536	NP	NP	256
17	8,9	NP	NP	NP	NP	358
20	9,2	NP	NP	39	NP	NP
22	9,4	NP	NP	NP	NP	85
27	10,0	NP	NP	342	NP	NP
29	10,2	NP	NP	225	NP	NP
34	10,8	NP	NP	18	NP	NP
39	11,4	NP	1343	NP	NP	NP
40	11,7	NP	1175	NP	NP	NP
41	12,0	NP	1113	NP	NP	NP
42	12,8	NP	18	NP	NP	NP

TR: tempo de retenção (min.); NP: não presente; ^aUFC

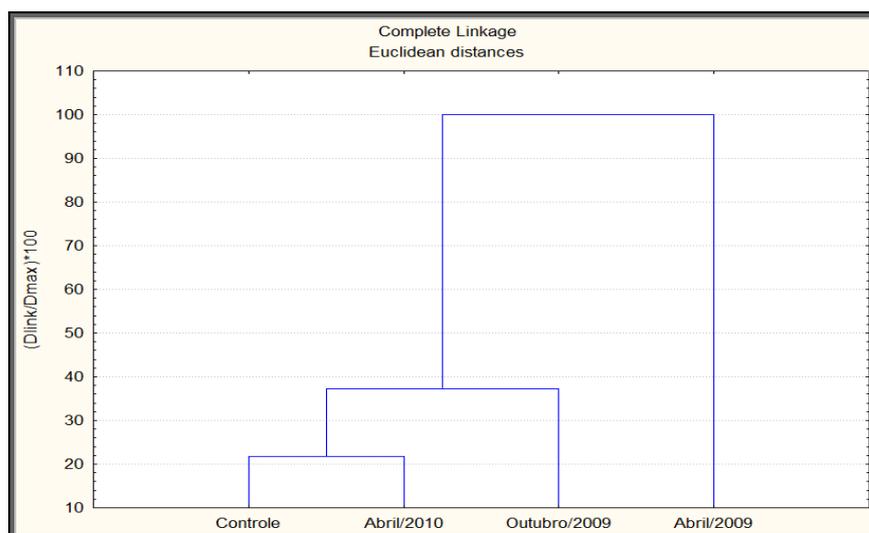
Na tabela 13, observa-se que o controle apresentou agrupamentos semelhantes com o Rio Dendê (8.7 min.). Em abril/2009 os agrupamentos microbianos foram opostos a abril/2010, sendo que em abril/2009 houve tempos de retenção menores (não ultrapassando 7.9 min.), enquanto que em abril/2010 os agrupamentos apareceram após 11,4 min., sendo que neste período (abril/2010) nenhum semelhante ao controle. Em outubro/2009 aparecem populações que não foram detectadas em outras coletas e nem no controle, significando que este pode não pertencer a própria flora microbiana e nesta época. Somente o tempo de retenção 8.7 min. aparece em duas coletas (abril/2009 e controle), porém em menor concentração no controle. Há ocorrência de microrganismos distintos do controle.

Gráfico 9. Dendograma de similaridade das UFC (zona fótica) do Rio Dendê



Para compor o gráfico relacionou-se a UFC com o tempo de retenção correspondente a cada código. Como se observa no gráfico 9, houve a discriminação dos agrupamentos representados pelos códigos 39 (11.4min.), 40 (11.7 min.) e 41 (12.0 min.) referentes ao período de abril/2009 (tabela 13, pag. 76) devido apresentarem maiores concentrações de UFC.

Gráfico 10. Dendograma de similaridade das UFC (zona fótica) do Rio Dendê no decorrer dos períodos de coleta em comparação ao controle



O gráfico 10, observa-se a similaridade entre abril/2010 e o controle, pois apresentaram concentrações de UFC próximos, e discriminou abril/2009 devido

apresentar maior número de UFC e distante aos demais períodos de coleta, fato este ocasionado pelo carreamento de material orgânico oriunda da cidade provocada pelo maior índice pluviométrico na região (ANEXO I, pag. 96).

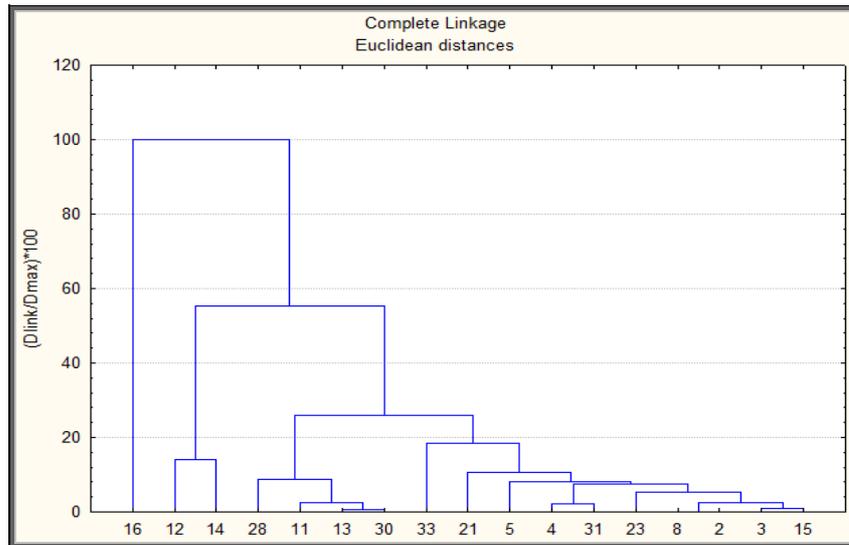
Tabela 14. Códigos, tempo de retenção e UFC correspondente aos cromatogramas do Rio Dendê – Zona afótica

Códigos	TR	JAN/2009 ^a	ABR/2009 ^a	OUT/2009 ^a	ABR/2010 ^a	CONTROLE ^a
2	3,7	NP	NP	NP	73	NP
3	4,0	NP	NP	12	NP	NP
4	4,9	NP	NP	120	NP	NP
5	7,4	NP	NP	NP	217	NP
8	7,8	NP	NP	NP	75	NP
11	8,2	NP	678	NP	NP	NP
12	8,3	NP	NP	NP	NP	1927
13	8,5	NP	767	NP	NP	NP
14	8,6	NP	NP	NP	NP	1394
15	8,7	NP	NP	53	NP	NP
16	8,8	NP	NP	NP	NP	3679
21	9,3	NP	141	NP	NP	299
23	9,5	NP	189	NP	NP	NP
28	10,1	NP	436	NP	NP	NP
30	10,3	NP	737	NP	NP	NP
31	10,4	NP	NP	208	NP	NP
33	10,7	NP	NP	607	NP	NP

TR: tempo de retenção (min.); NP: não presente; ^aUFC

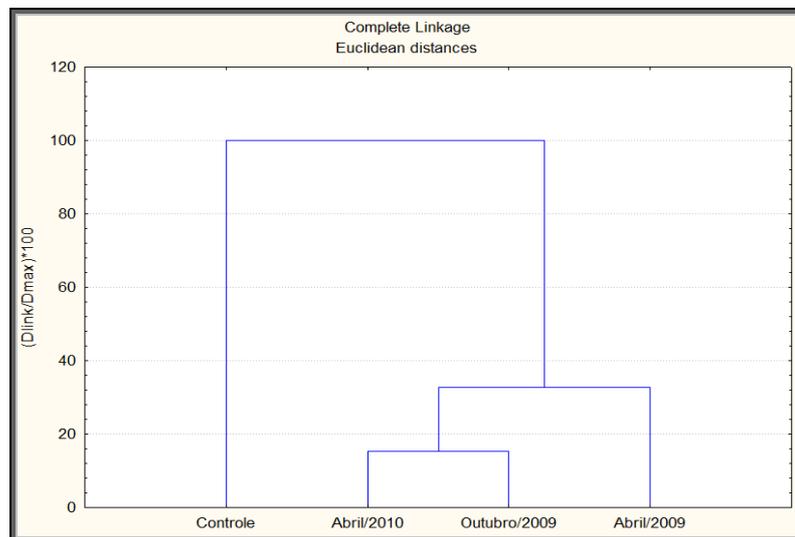
Na tabela 14 observa-se agrupamentos distintos entre os períodos de coleta, incluindo o controle, o que pode significar que os microrganismos são transitórios para cada período. Somente o tempo de retenção 9,3 min. aparece em abril/2009 e em menor quantidade em relação ao controle.

Gráfico 11. Dendograma de similaridade das UFC (zona afótica) do Rio Dendê



Observa-se no gráfico 11, a separação em dois grupos principais, sendo discriminado o agrupamento representado pelo código 16 (8.8 min.) referente ao controle (tabela 14, pag. 78) devido apresentar maior concentração de UFC.

Gráfico 12. Dendrograma de similaridade das UFC (zona afótica) do Rio Dendê no decorrer dos períodos de coleta em comparação ao controle



O gráfico 12, observa-se a similaridade entre abril/2010 e outubro/2009, pois apresentaram quantidades de UFC similares e discriminou o controle devido apresentar maior concentração de UFC, fato este ocasionado pela matéria orgânica oriunda de galhos que se deposita no fundo da Baía

6. CONCLUSÕES

O biomonitoramento da qualidade de água é um instrumento importante para avaliação ambiental que consiste em acompanhamento microbiológico sistemático, com duração de no mínimo 2 anos, em regiões consideradas de risco.

A quantificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) não pode ser utilizada para análise de alteração ambiental, principalmente quando não se tem um histórico da área em estudo.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Desnaturante (DHPLC) se mostrou uma técnica viável para caracterização de agrupamentos microbianos, entretanto sem a identificação das espécies microbianas não se pode avaliar o grau de poluição.

Entre as diversas análises multivariadas, a Análise de Agrupamento Hierárquico foi a que melhor descreveu os resultados obtidos a partir das quantidades de Unidades Formadoras de Colônias

Dessa forma, este trabalho apresenta um aspecto relevante no sentido da adaptação do uso da flora microbiana aquática como bioindicadores

7. RECOMENDAÇÕES

Os microorganismos aquáticos apresentam indicativo de grande potencial bioindicador, com algumas restrições como número de repetições, a identificação da flora microbiana, identificação e quantificação da ação antrópica.

Ajustando essas variáveis as UFC podem ser utilizadas como parâmetro de análise dos microorganismos como bioindicadores de alteração ambiental.

E juntamente com este biomonitoramento, deveria incluir a identificação das espécies microbianas presentes para uma possível construção de um banco de dados da microbiota da região Amazônica.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da biologia celular – uma introdução à biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

ANGELO, H.; CASTRO, L. H. R.; HOSOKAWA, R. T. H. **Metodologia para definir grupos homogêneos de propriedades rurais com cobertura florestal**. IPEF, n.36, 51-56, 1987.

ARIAS, A. R. L. et al. **Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos**. Ciência e Saúde Coletiva, v.12, n.1, 61-72, 2007.

BARLAAN, E. A. et al. **Profiling and monitoring of microbial populations by denaturing high-performance liquid chromatography**. Journal of Microbiological Methods. v.61, 399-412, 2005.

BERNARDI, J. V. E. et al. **Aplicação da análise das componentes principais na ordenação dos parâmetros físico-químicos no alto rio Madeira e afluentes, Amazônia Ocidental**. Geochimica Brasiliensis, v.23, n.1, 79-90, 2009.

BRAGA, B. et al. **Introdução à engenharia ambiental**. 2ª ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005.

BRASIL CHANEL. Disponível em: http://www.brasilchanel.com.br/municipios/mostrar_municipio.asp?home=Abaetetuba&uf=PA&tipo=lazer. Acesso em 22 de agosto de 2010.

BURITI, F. C. A.; SAAD, S.M.I. **Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana**. Archivos Latinoamericanos de Nutricion, v.57, n.4, 373-380, 2007.

BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN, J. L. **Bases conceituais para aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios**. Cadernos de Saúde Pública, v.2, n.19, 465-473, 2003.

BUSS, D. F.; OLIVEIRA, R. B.; BAPTISTA, D. F. **Monitoramento biológico de ecossistemas aquáticos continentais**. Oecologia Brasiliensis, v.12, n.3, 339-345, 2008.

CETESB, Companhia Estadual de Tecnologia de Saneamento Básico e de Defesa do Meio Ambiente. **Relatório da qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB, 2002.

CETESB, Companhia Estadual de Tecnologia de Saneamento Básico e de Defesa do Meio Ambiente. **IQA – Índice de qualidade das águas**. São Paulo: CETESB, 2008.

CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA nº 357**, de 17 de março de 2005. Brasília, 2005.

DI BERNARDO, L.; DI BERNARDO, A.; CENTURIONE FILHO, P. J. **Ensaio de tratabilidade de água e dos rios resíduos aerados em estações de tratamento de água**. São Carlos: Rima, 2002.

FALQUETO, Milena Aímola. **Avaliação do índice de qualidade da água (IQA) e dos elementos químicos nas águas e nos sedimentos do rio Corumbataí-SP**. 2008. 118f. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

FERREIRA, D. F. **Análise multivariada**. Lavras, MG, 1996.

FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T. (colaboradora). **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

GODOI, Evelyn Loures de. **Monitoramento de água superficial densamente poluída – o córrego Pirajuçara, região metropolitana de São Paulo, Brasil**. 2008. 117f. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GONÇALVES, F. D. et al. **Técnicas automáticas para geração de mapas de índices de sensibilidade ambiental a derramamentos de óleo na Baía do Guajará, Belém-PA**. Revista Brasileira de Cartografia nº 58/03, 255-262, 2006.

Google Earth, 2009

Google Earth, 2010

GOULART, M. D. C.; CALLISTO, M. **Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental**. Revista da FAPAM, ano 2, n.1, 2003.

GREGORIO, A. M. da S. et al. **Depósitos lamosos da Baía do Guajará (Pará, Amazônia, Brasil)**. In: SEMAMA ACADEMICA DOS ALUNOS DE PÓS GRADUAÇÃO EM GEOCIÊNCIAS, 1, 2006, Porto Alegre. Resumos... Porto Alegre: UFRGS, 2006, p. 63-66.

Health Protection Agency (2004). **Plate count agar**. National Standard Method MSOP 44 Issue 3. Disponível em: http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp.

HERRERA, A. G. **Psychrotrophic microorganisms: agar plate methods, homogenization, and dilutions**. **Methods in Biotechnology**. Food Microbiology Protocols, v.14, 2001.

http://clima1.cptec.inpe.br/~rclima/monitoramento_brasil.shtml. Acesso em 09 de setembro de 2010.

http://www.cpatu.embrapa.br/wbicgc/MAPA%20TURISTICO%20DE%20BELEM&20II%20JAN_II.jpg/image_view_fullscreen/. Acesso em 22 de agosto de 2010.

<http://blogdasmicro.blogspot.com/>. Acesso em 02 de novembro de 2010.

INSTITUTO EVANDRO CHAGAS. Relatório IEC-SEMAM 005/2007. Belém, 2007. 39p.

INSTITUTO EVANDRO CHAGAS. Relatório IEC-SEMAM 009/2008. Belém, 2008. 8p.

KOLLER, Francisco Fernando de Castilho. **Discriminação de ambientes aquáticos poluídos e não poluídos através da amplificação e clivagem do rDNA 16S**.

2002, 101f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

LIMA, Beatriz Nunes Rondon. **Modelagem integrada para gestão da qualidade da água na Bacia do Rio Cuiabá**. 2001. 184f. Tese (Doutorado). Faculdade de Engenharia Civil. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

LOBO, E. A.; CALLEGARO, V. L. M.; BENDER, E. P. **Utilização de algas diatomáceas epilíticas como indicadores da qualidade da água em rios e arroios da região hidrográfica do Guaíba, RS, Brasil**. Santa Cruz do Sul, RS: EDUNISC, 2002.

MARTINS, Mauro. **Variação e tendências dos parâmetros de qualidade de água do ecossistema aquático da microbacia hidrográfica Córrego da Onça no município de Ilha Solteira/SP**. 2009. 65f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005.

MORELLI, M. M.; ALMEIDA, M. M.; TURECK, S. V. Z. **Análise microbiológica da água do Rio Lageado Acelo, Cascavel, Paraná, Brasil**. Revista Brasileira de Biociências, v.6, supl. 1, 57-58, 2008.

MORITA, M. et al. **Utilização de indicadores bacterianos e a pesquisa de *Salmonella spp* na avaliação da qualidade sanitária de águas de pesqueiro**. In: ESTEVES, K. G.; SANT'ANNA, C. L. (Ed.). **Pesqueiros sob uma visão integrada de meio ambiente, saúde pública e manejo**. São Carlos: Rima, cap.7, p.91-104, 2006.

NIWEGLOWSKI, Ana Márcia Altoé. **Indicadores de qualidade da água na bacia hidrográfica do rio Toledo - PR**. 2006. 218f. Dissertação (Mestrado). Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

OLIVEIRA, A. L. D. de et al. **Estudo de bactérias do gênero *Gluconobacter*: isolamento, purificação, identificação fenotípica e molecular.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.30, n.1, 106-112, 2010.

PEDROZA, A. O. R. M.; CARVALHO, E. M. de; MONTEIRO, L. de A. **Aspectos físico-químicos e microbiológicos do córrego Estiva em rio Brilhante/MS.** Interbio, v.3, n.1, 35-41, 2009.

PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. (organizadores). **Biologia marinha.** Rio de Janeiro: Interciência, 2002.

PETERS, N. E.; MEYBECK, M. **Water quality degradation effects on freshwater availability: impacts to human activities.** Water International, Urbana, v.25, n.2, 214-221, 2000.

PINTO-COELHO, R. M. **Fundamentos de ecologia.** Porto Alegre: Artmed, 2000.

RODRIGUES, JOSÉ ADILSON CARDOSO. **Risco tecnológico: uma análise do Porto de Vila do Conde como área de potencial de ameaça ao vazamento de óleo para comunidades em situação de vulnerabilidade.** 2008. 95f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Geografia e Cartografia. Universidade Federal do Pará, Belém.

SILVA, D. D. V. et al. **Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa. Parte 2: aminoácidos e vitaminas.** Revista Analytica, outubro/novembro, n.19, 63-73, 2005.

SILVA, M. S. G. M.; QUEIROZ, J. F. de; TRIVINHO-STRIXINO, S. **Indicadores biológicos de qualidade.** In: QUEIROZ, J. F. de; SILVA, M. S. G. M.; TRIVINHO-STRIXINO, S. (Ed.). **Organismos bentônicos: biomonitoramento de qualidade de águas.** São Paulo: Embrapa Meio Ambiente, cap.2, p. 26-34, 2008.

SILVA, N. da. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica da água.** São Paulo: Varela, 2005.

Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater, 20^a edição: APHA, 1997.

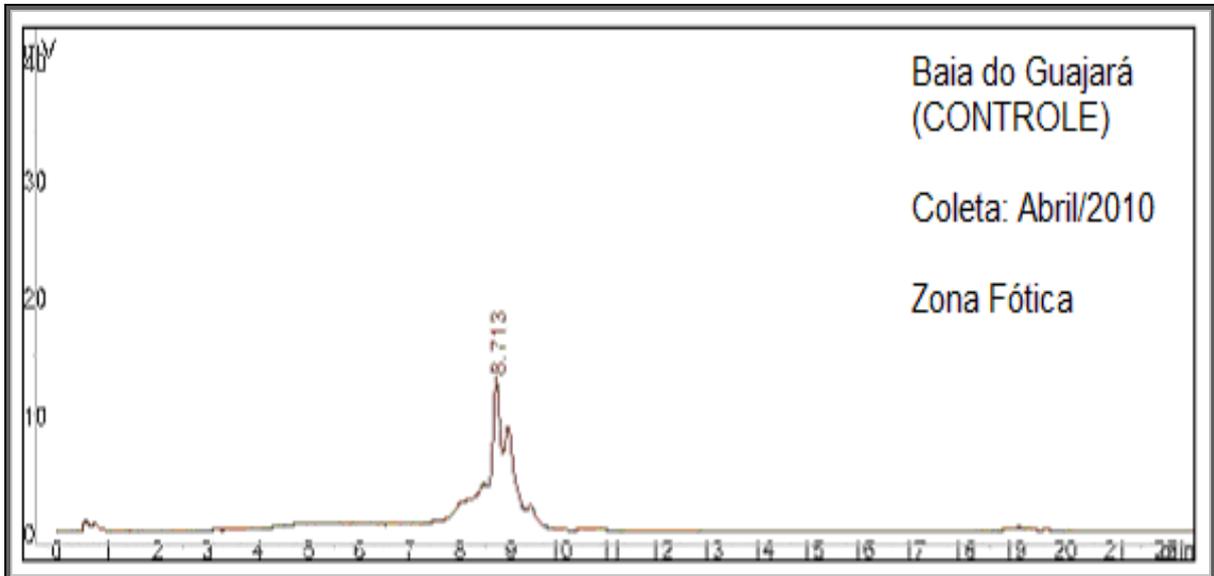
STROBEL, G.; DAISY, B. **Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products**. Microbial Mol. Biol. Rev., v.67, n.4, 491-502, 2003.

XIAO, W.; OEFNER, P. J. **Denaturing high-performance liquid chromatography: a review**. Human Mutation, v.17, 439-474, 2001.

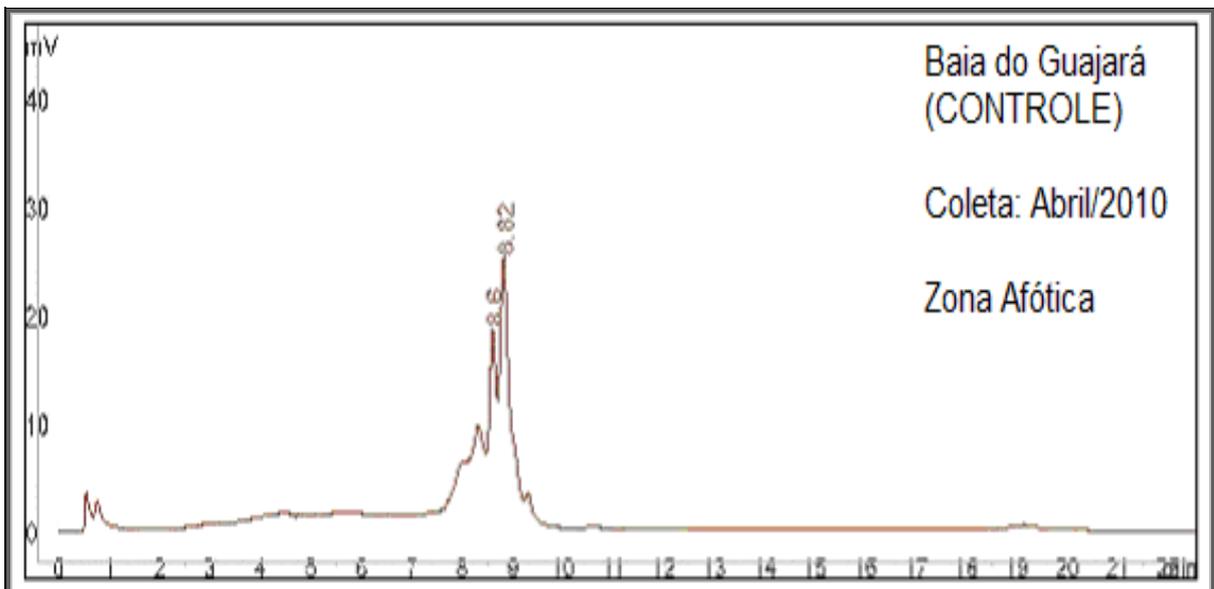
ZANINI, Helen Lira Henriques Torres. **Caracterização limnológica e microbiológica do córrego Rico que abastece Jaboticabal (SP)**. 2009. 75f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

APÊNDICE

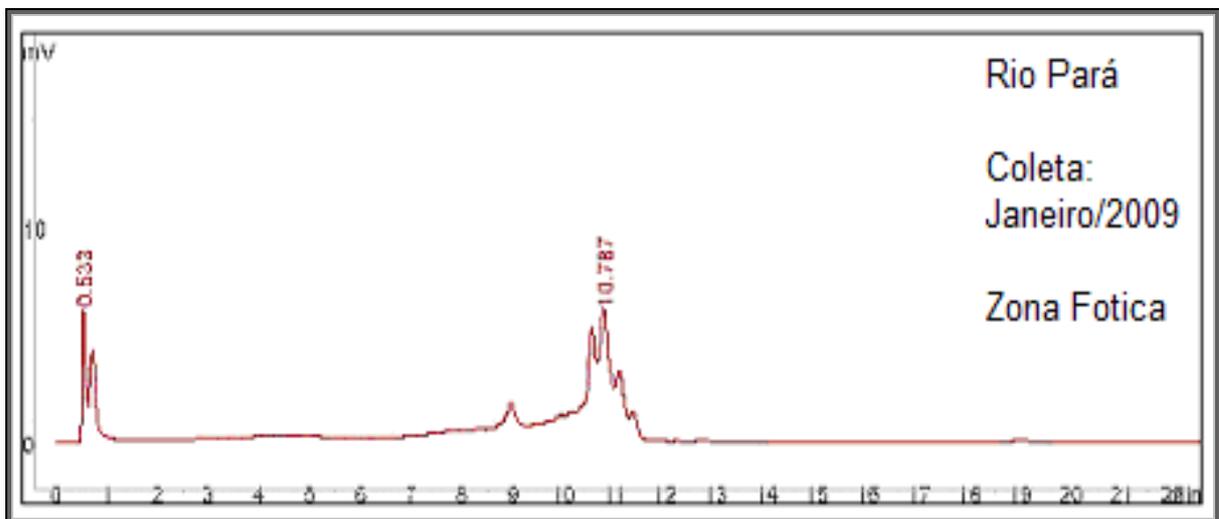
APENDICE I – Cromatograma da Baía do Guajará – zona fótica



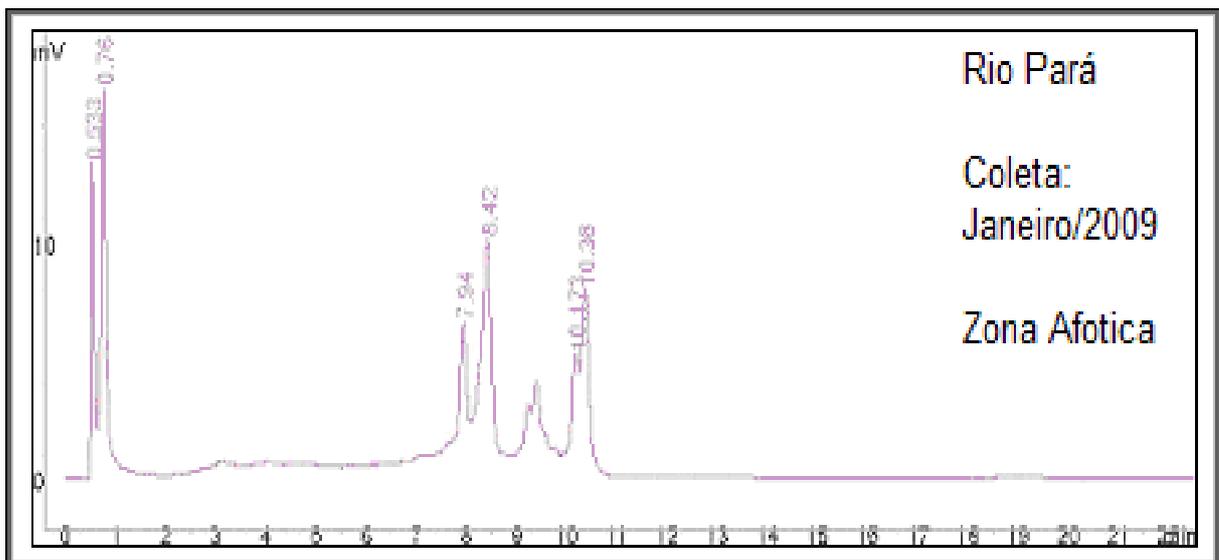
APENDICE II – Cromatograma da Baía do Guajará – zona afótica



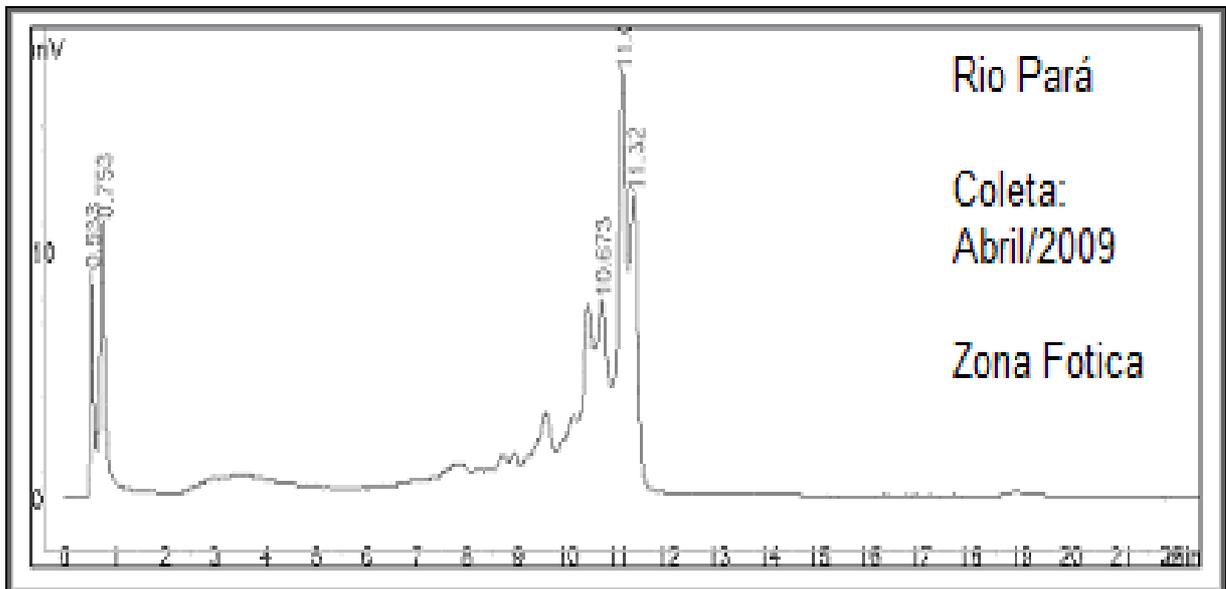
APENDICE III – Cromatograma do Rio Pará, coleta de janeiro/2009 – zona fótica



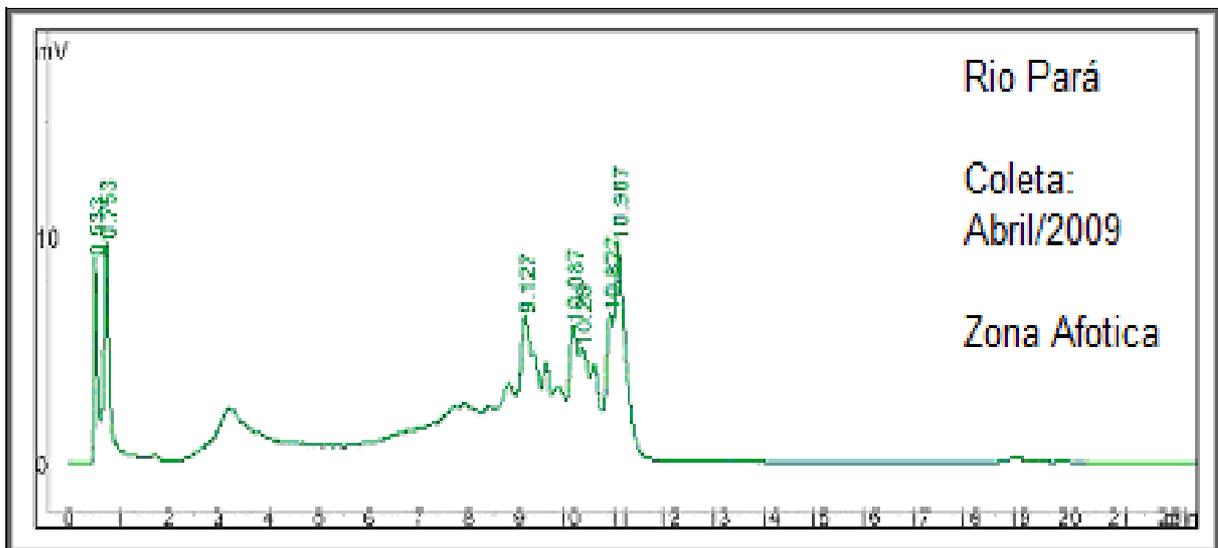
APENDICE IV – Cromatograma do Rio Pará, coleta de janeiro/2009 – zona afótica



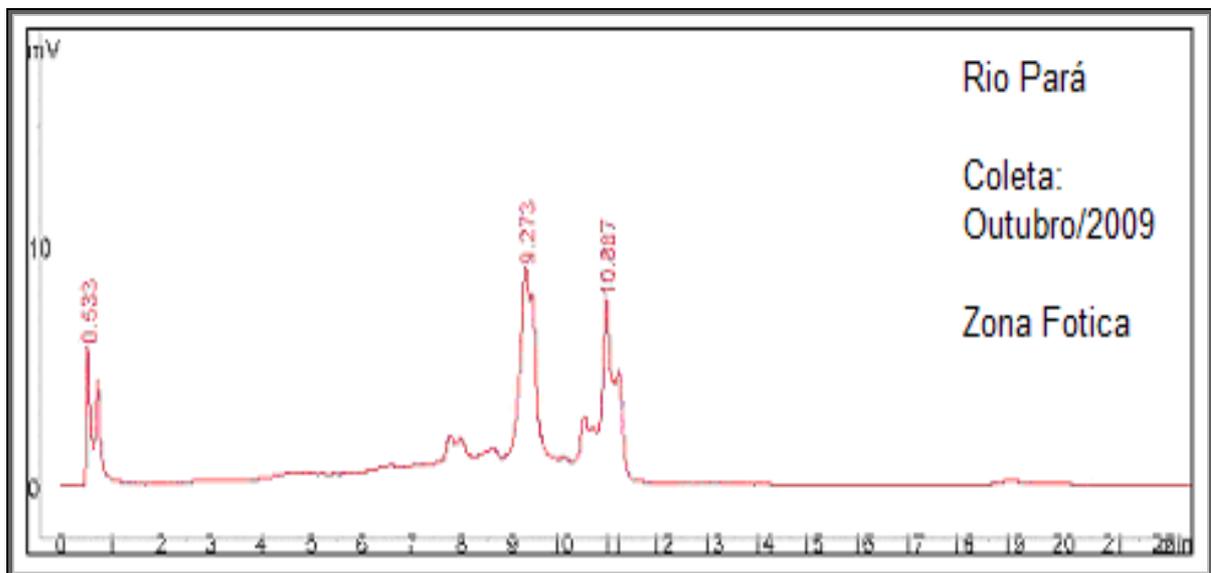
APENDICE V – Cromatograma do Rio Pará, coleta de abril/2009 – zona fótica



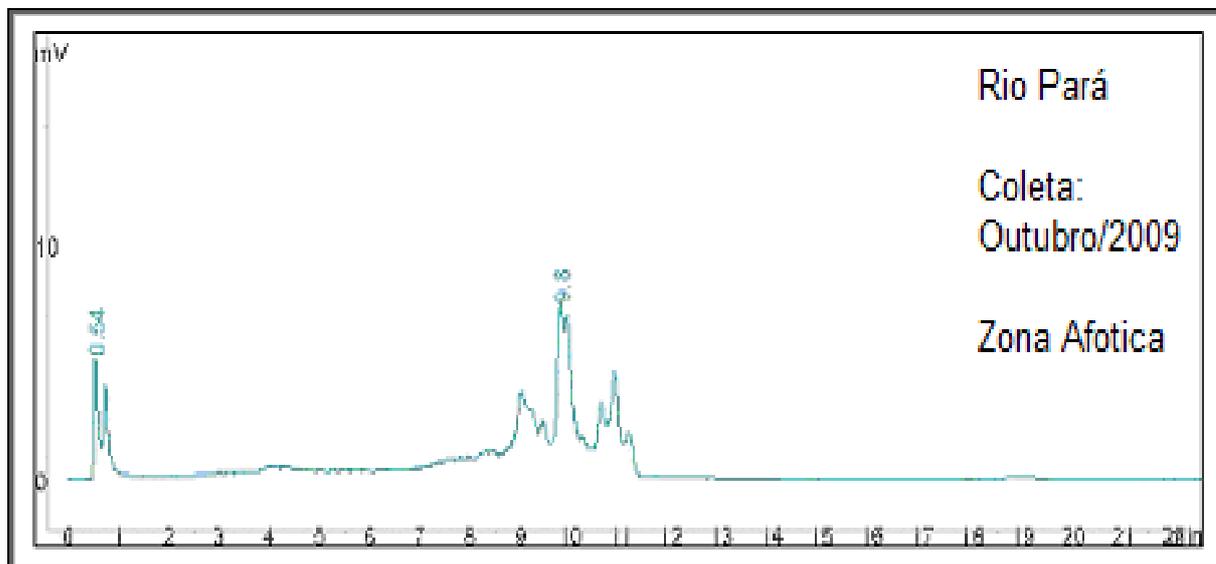
APENDICE VI – Cromatograma do Rio Pará, coleta de abril/2009 – zona afótica



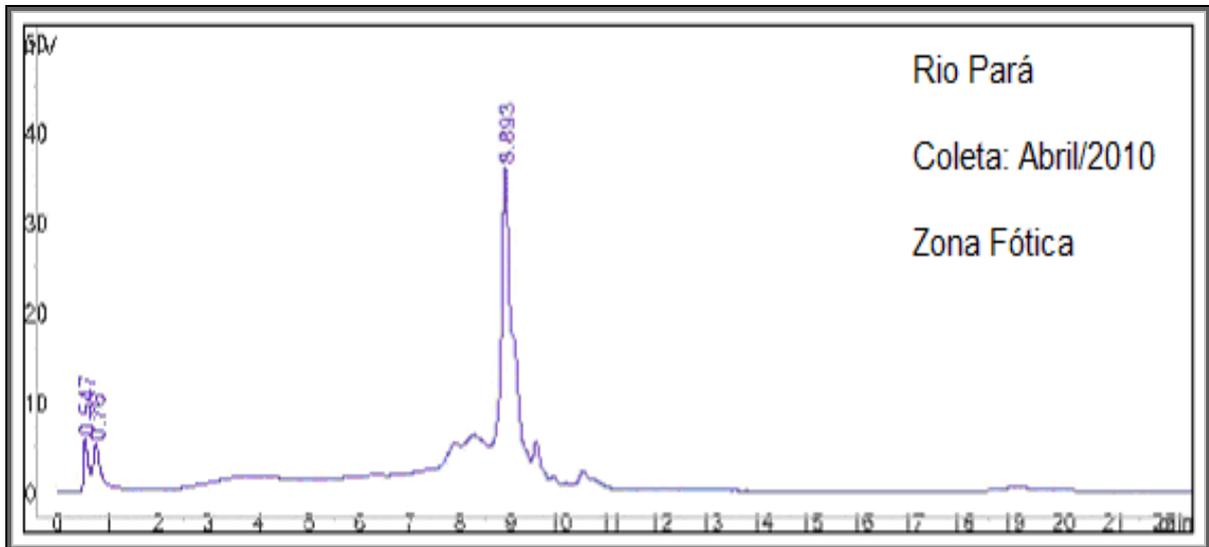
APENDICE VII – Cromatograma do Rio Pará, coleta de outubro/2009 – zona fótica



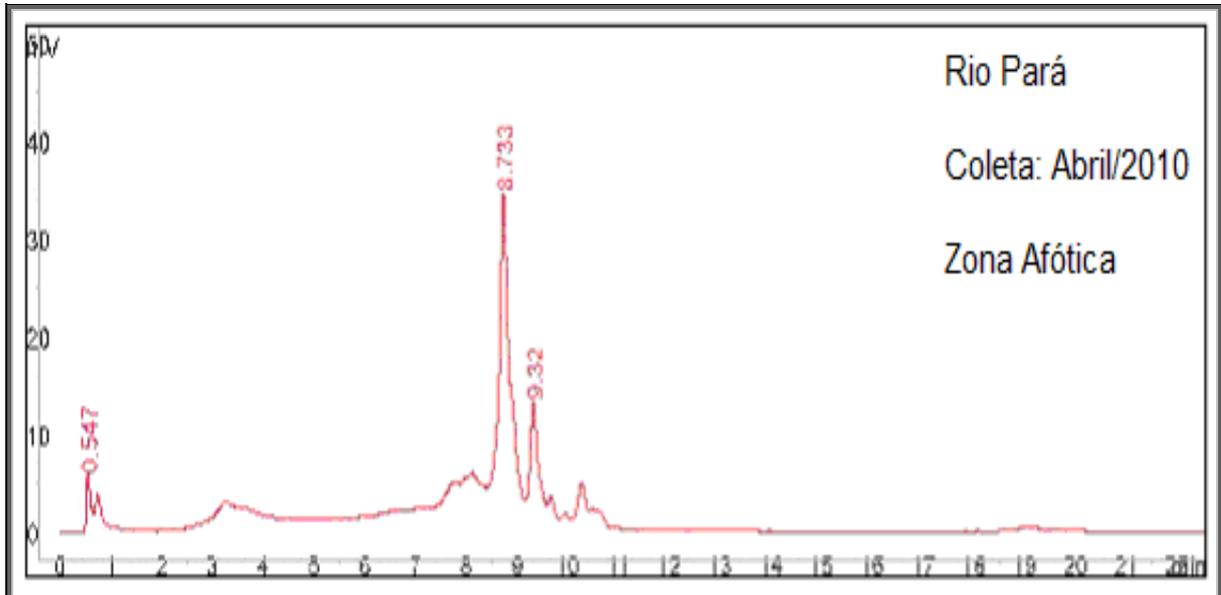
APENDICE VIII – Cromatograma do Rio Pará, coleta de outubro/2009 – zona afótica



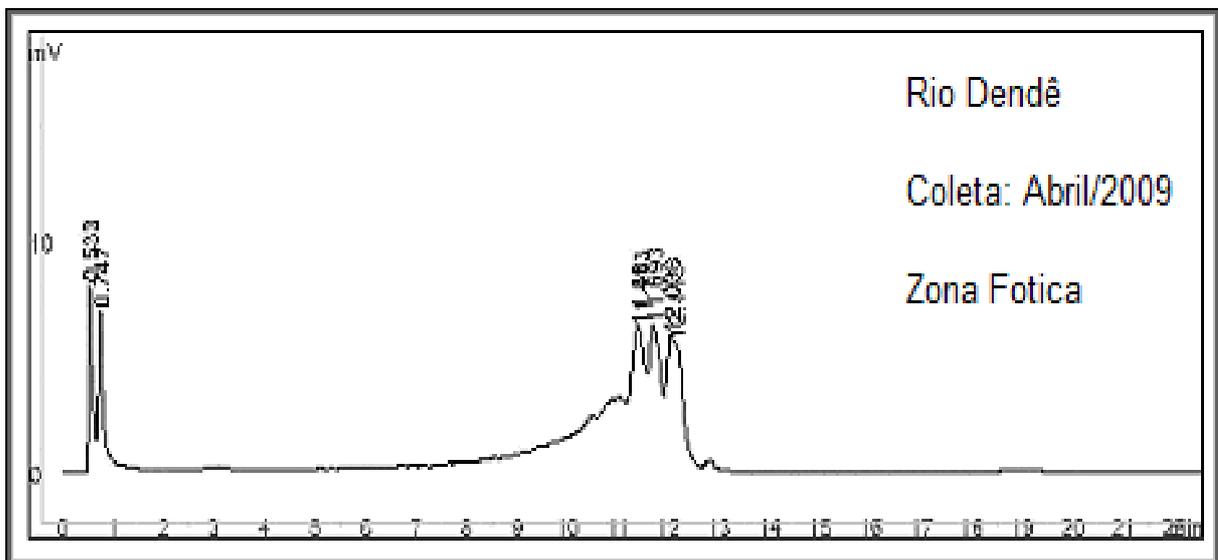
APENDICE IX – Cromatograma do Rio Pará, coleta de abril/2010 – zona fótica



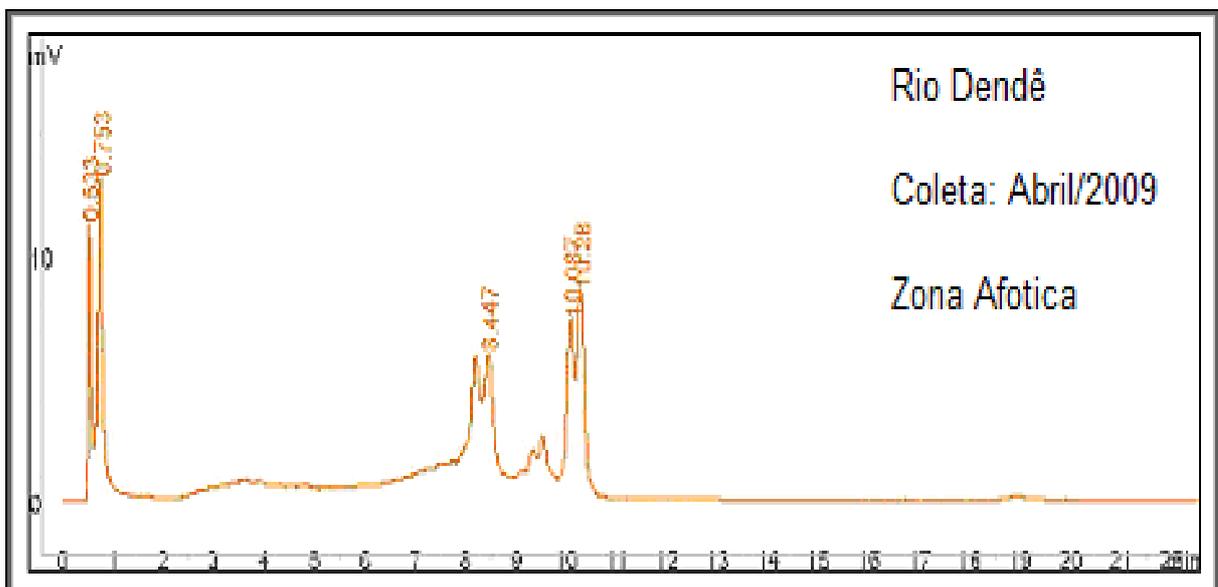
APENDICE X – Cromatograma do Rio Pará, coleta de abril/2010 – zona afótica



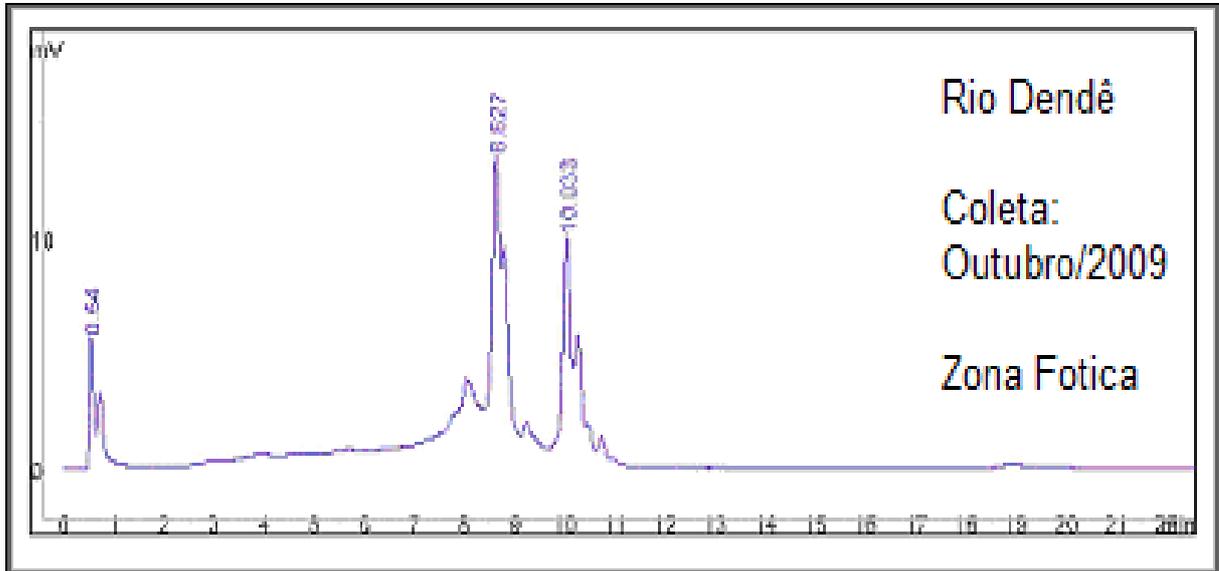
APENDICE XI – Cromatograma do Rio Dendê, coleta de abril/2009 – zona fótica



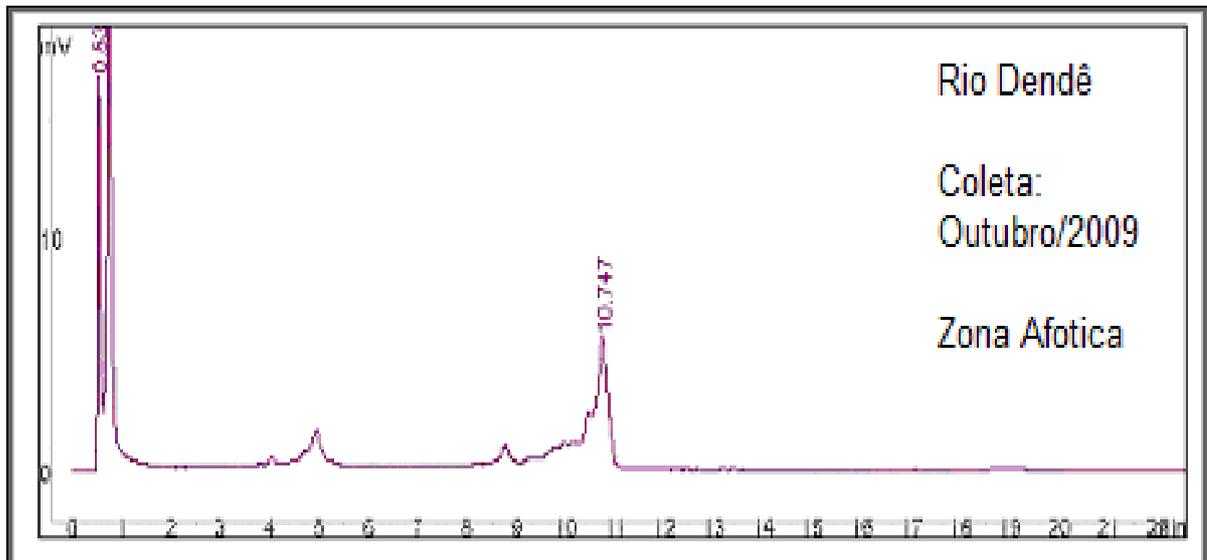
APENDICE XII – Cromatograma do Rio Dendê, coleta de abril/2009 – zona afótica



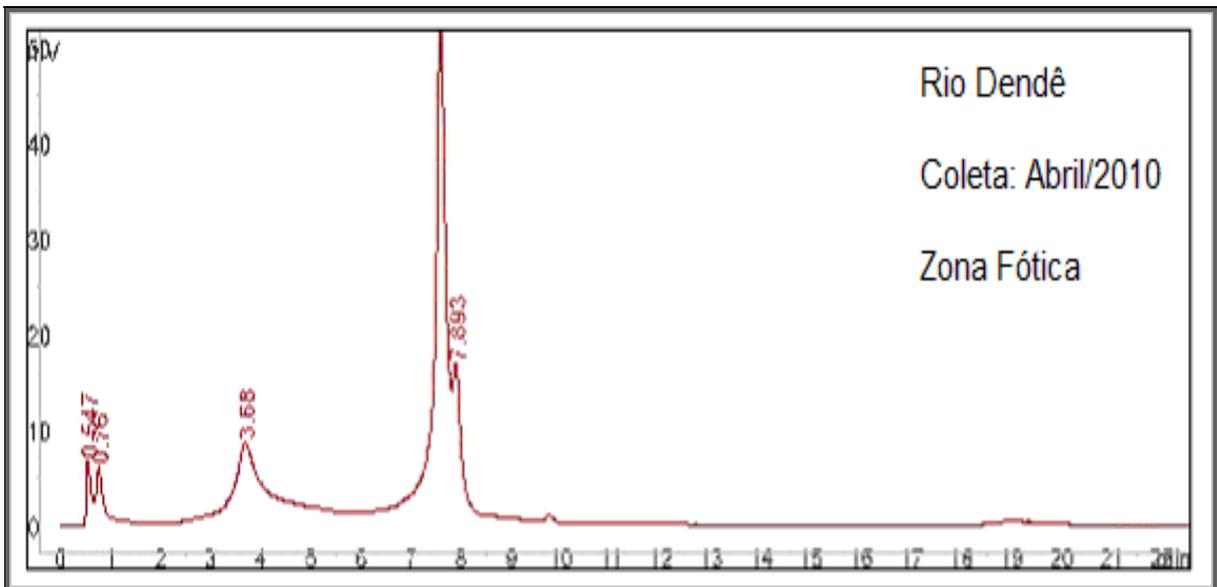
APENDICE XIII – Cromatograma do Rio Dendê, coleta de outubro/2009 – zona
fótica



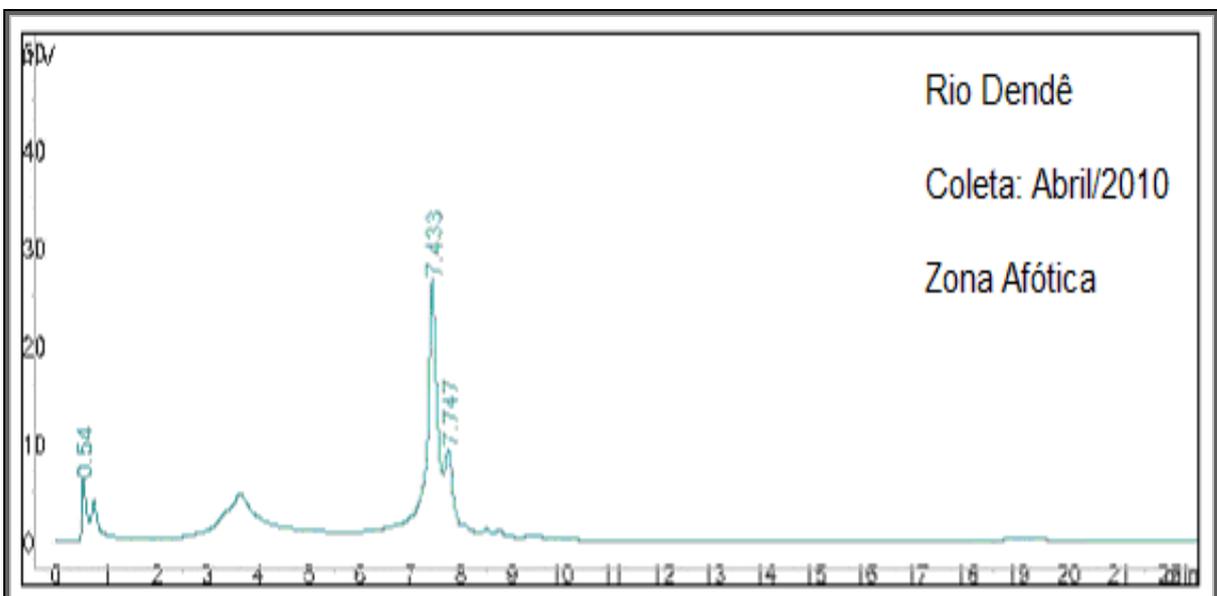
APENDICE XIV – Cromatograma do Rio Dendê, coleta de outubro/2009 – zona
afótica



APENDICE XV – Cromatograma do Rio Dendê, coleta de abril/2010 – zona fótica

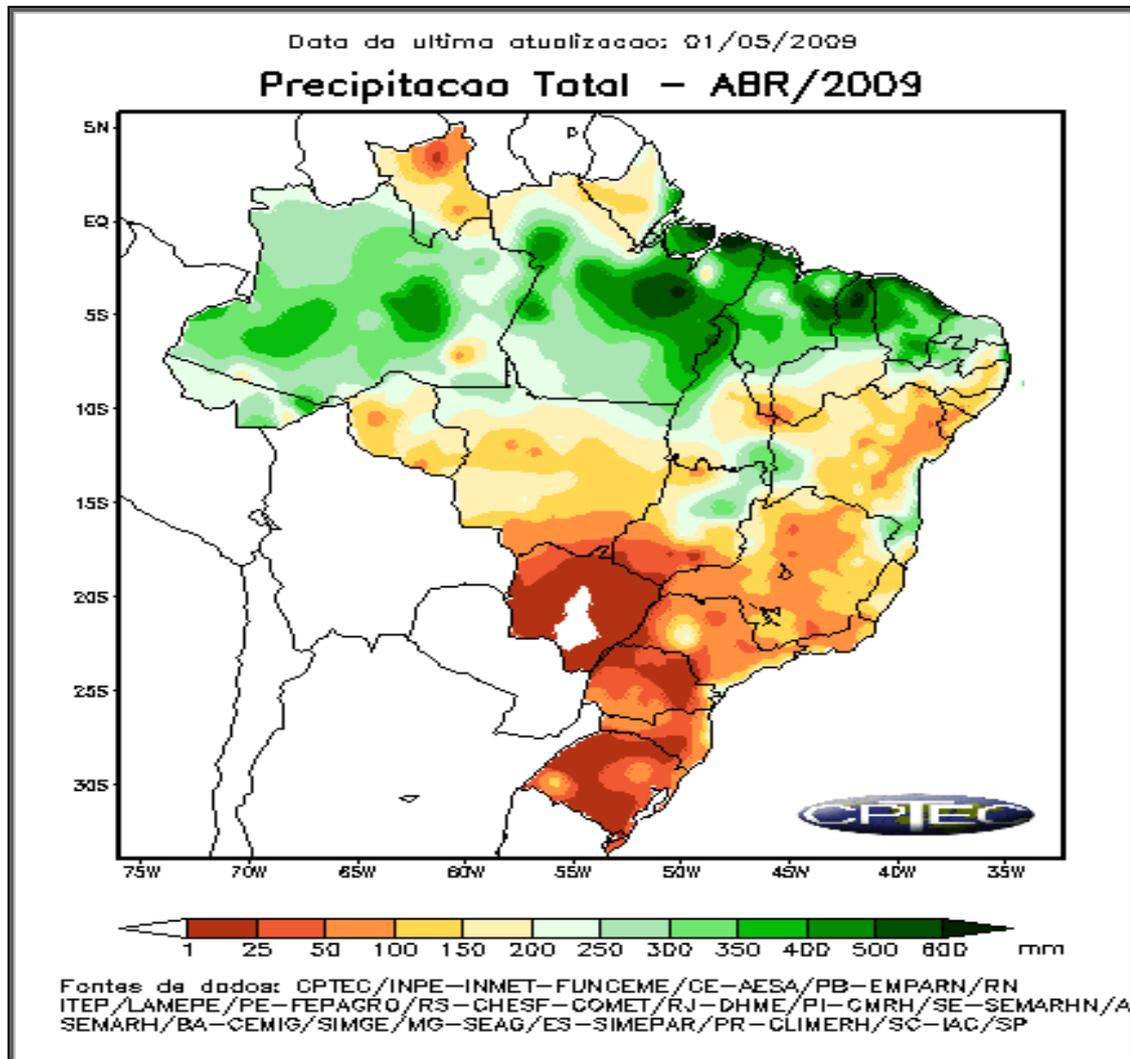


APENDICE XVI – Cromatograma do Rio Dendê, coleta de abril/2010 – zona afótica



ANEXO

ANEXO I – Mapa pluviométrico – Abril/2009



Fonte: CPTEC, 2010

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)