

**SILVIA TEREZA AZÊDO LOUREIRO**

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DAS PRAIAS  
DE CASA CAIADA E BAIRRO NOVO, OLINDA - PERNAMBUCO  
QUANTO A FATORES DE PATOGENICIDADE**

**RECIFE**

**2002**

**SILVIA TEREZA AZÊDO LOUREIRO**

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DAS PRAIAS  
DE CASA CAIADA E BAIRRO NOVO, OLINDA - PERNAMBUCO  
QUANTO A FATORES DE PATOGENICIDADE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação  
em Biologia de Fungos da Universidade Federal de  
Pernambuco, para obtenção de Título de Mestre.

Orientadora: Dra. Maria Auxiliadora de Queiroz  
Cavalcanti.

**Recife  
2002**

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DAS PRAIAS DE  
CASA CAIADA E BAIRRO NOVO, OLINDA – PERNAMBUCO  
QUANTO A FATORES DE PATOGENICIDADE**

**Dissertação de mestrado aprovada pela banca examinadora em 26 de fevereiro de 2002**

**Examinadores:**

---

**Dra. Maria Auxiliadora de Queiroz Cavalcanti ( orientadora – Depto. de Micologia – UFPE)**

---

**Dr. Walderez Gambale (Dept. de Microbiologia – USP)**

---

**Dr. José Zanon de Oliveira Passavante (Dept. de Oceanografia – UFPE)**

## **DEDICO**

### A DEUS

Presente em todos os momentos, principalmente os mais difíceis, concedendo oportunidades de aprendizado, revelando seu poder e glória a cada instante de minha vida.

A minha mãe,

Terezinha Azêdo Loureiro, pelo incentivo, apoio, compreensão e amor, sem este apoio eu nada seria.

A minha filha

Carolina Tereza Azêdo de Araújo, pela compreensão e amor.

A minha sobrinha

Joanalice Azêdo que me ajudou nessa trajetória, tão importante da minha vida.

Aos meus colegas, pessoas que me ajudaram no transcorrer desta pesquisa, acreditando na seriedade do meu trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, na pessoa do Prof. Dr. Francisco Cordeiro Neto, pelas facilidades concedidas, viabilizando a realização desta pesquisa.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos da Universidade Federal de Pernambuco, na pessoa da Prof.<sub>a</sub> Neiva Tinti de Oliveira, pelas facilidades concedidas e estímulos recebidos durante a realização desta pesquisa.

A Secretaria de Educação do Estado de Pernambuco pela dispensa concedida.

À Prof.<sub>a</sub> Dra. Maria Auxiliadora Cavalcanti pela valiosa orientação, dedicação e incentivos no decorrer de todo o curso e principalmente no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. José Zanon de Oliveira Passavante, do Departamento de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco, pela dedicação, incentivo e sugestões no transcorrer desta pesquisa.

À Doutoranda Rejane Pereira Neves pela colaboração na identificação das espécies isoladas.

À minha mãe Terezinha Azêdo pelo apoio dado em todos os momentos difíceis na elaboração desta pesquisa.

À minha família que sempre me apoiou e incentivou durante a minha vida acadêmica.

À Companhia Pernambucana de Controle da Poluição Ambiental e Administração de Recursos Hídricos ( CPRH) pelo fornecimento da Análise da Água das praias de casa Caiada e Bairro Novo, Olinda, Pernambuco.

Aos meus amigos de curso que participaram desta etapa de minha vida acadêmica e pessoal dando um ótimo suporte afetivo e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste pesquisa.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 Mapa da área de estudo ( Olinda-PE) situando as áreas de coletas nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo .....	25
Figura 2Frequência de ocorrência de espécies de leveduras isoladas nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo (Olinda, Pernambuco) .....	50
Figura 3Leveduras isoladas no período de verão nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo, Olinda, Pernambuco.....	51
Figura 4 Leveduras isoladas no período de inverno nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo, Olinda, Pernambuco.....	52
Figura 5 Dendrograma de similaridade das espécies isoladas nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo, nos períodos de verão e inverno.....	46
Figura 6 Expressão da atividade fosfolipásica positiva de <i>Rhodotorula minuta</i> , evidencia da pela formação de halo (↑) .....	56
Figura 7Expressão da atividade proteásica positiva de <i>Candida diddensiae</i> , evidenciada pela formação de halo ( ↓).....	56

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 Leveduras isoladas da praia de Casa Caiada no período de verão.....	37
Tabela 2 Leveduras isoladas da praia de Casa Caiada no período de inverno .....	38
Tabela 3 Leveduras isoladas da praia de Bairro Novo no período de verão .....	39
Tabela 4 Leveduras isoladas da praia de Bairro Novo no período de inverno.....	40
Tabela 5 Dados de colimetria das praias de Casa Caiada e Bairro Novo durante os períodos de coletas .....	41
Tabela 6 Unidades formadoras de colônias de leveduras isoladas nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo, durante os períodos de verão e inverno .....	42
Tabela 7 Parâmetros hidrológicos, pH, temperatura e salinidade da água e dados do solo das praias de Casa Caiada e Bairro Novo, Olinda- Pernambuco .....	49
Tabela 8 Características de patogenicidade detectadas nas amostras de leveduras isoladas nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo.....	53

## **RESUMO**

Com o objetivo de isolar, identificar e caracterizar amostras de leveduras quanto a fatores de patogenicidade, foram coletadas 16 amostras de solo e 16 amostras de água nos meses de dezembro/2000 e fevereiro/2001, correspondendo ao período de verão e junho e julho/2001, correspondendo ao período de inverno, considerando a baixa-mar e preamar. As amostras foram coletadas em superfície e profundidade, sendo 20 cm para o solo e 1m para a água. Foi utilizado 50g de solo e suspenso em 90 ml de água destilada esterilizada. Dessa suspensão 0,5 ml foram semeados em triplicata em Sabouraud extrato de levedura, acrescido de cloranfenicol, contidos em placas de Petri. Nas mesmas condições de semeio foram utilizados 0,5ml de água. Foram isoladas 58 amostras de leveduras distribuídas em 4 gêneros e 31 espécies: *Candida* (19), *Brettanomyces* (3), *Rhodotorula* (4) e (5) de *Trichosporon*. A frequência de ocorrência demonstrou que *Brettanomyces bruxellensis* pode ser considerada abundante em solo de superfície na praia de Casa Caiada. Para as características de patogenicidade observou-se que das 58 amostras testadas 44 cresceram a 37°C, apresentando bom crescimento, tanto quanto à temperatura ambiente; na detecção da atividade fosfolipásica e proteásica 7 e 3 amostras apresentaram atividade enzimática positiva, respectivamente.

## **ABSTRACT**

The objective was to isolate, to identify and to distinguish samples of yeast by pathogenic factors. The authn collected 16 samples of sand and 16 of water in december/2000 and february/2001, summer time and june and july/2001, winter time. The samples were collected from the surface (20cm) and profundity depth (1m). It was used 50g of sand in 90ml of sterilized distilled water from where was removed 0,5ml seed three times on Petri's plaque with Sabouraud and chorophenicol at the same condition the water was seed. The frequency of the occurrence demonstrated that *Brettanomyces bruxellensis* can be considered plentiful for sand of the shore of Casa Caiada beach. From 58 (fifty eight) samples 44 presented a good growth on 37°C either on ambiental temperature for pathogenic characteristics. 7 samples showed phospholipasic activity and 3 proteasic one.

## SUMÁRIO

### AGRADECIMENTOS

### LISTA DE FIGURAS

### LISTA DE TABELAS

### RESUMO

### ABSTRACT

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	13
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	15
2.1. Ocorrência de leveduras de ambientes marinhos .....	15
2.2. Caracterização de leveduras quanto a fatores de patogenicidade .....	18
<b>3. DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO.....</b>	22
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	26
4.1. Coleta do solo .....	26
4.2. Coleta da água.....	26
4.3. Meios de cultura utilizados .....	26
4.4. Isolamento e purificação dos fungos .....	30
4.5. Identificação dos fungos do solo e da água .....	31
4.6. Parâmetros hidrológicos, pH, temperatura e salinidade da água e dados do solo das praias de Casa Caiada e Bairro Novo .....	31
4.6.1. Altura das marés.....	31
4.6.2. Salinidade da água. ....	31
4.6.3. pH ( potencial hidrogeniônico do solo e da água).....	32
4.6.4. Temperatura do solo e da água.....	32
4.7. Pluviometria .....	32
4.8. Colimetria da água .....	32
4.9. Detecção de características de patogenicidade .....	32
4.9.1 Crescimento a 37°C .....	32
4.9.2 Detecção de fosfolipase.....	33

4.9.3 Detecção de protease.....	33
4.10. Frequência de ocorrência .....	33
4.11. Análise de similaridade.....	34
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>35</b>
5.1. Isolamento e identificação das leveduras do solo e da água, durante os períodos de verão e inverno nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo..	35
5.2. Parâmetros hidrológicos, pH, temperatura e salinidade da água e dados do solo das praias de Casa Caiada e Bairro Novo .....	44
5.3. Frequência de ocorrência de leveduras isoladas nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo .....	44
5.4. Análise de similaridade entre as espécies isoladas.....	45
5.5. caracterização de fatores de patogenicidade de amostras de leveduras isoladas nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo.....	47
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>57</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>58</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As leveduras são microrganismos eucariontes, quimiorganotróficos, pertencentes ao Reino Fungi. Não possuem mecanismos de locomoção e são aclorofilados. São predominantemente unicelulares, reproduzem-se sexuadamente por ascospores e assexuadamente por brotamento, cissiparidade ou a combinação desses dois processos. Alguns gêneros caracterizam-se por apresentar apenas blastoconídios, enquanto outros, além de blastoconídios, formam pseudo-hifas e hifas rudimentares. As leveduras são filogeneticamente heterogêneas, pertencendo as divisões: Deuteromycota (Fungi Imperfect), classe Blastomycetes, (reprodução assexuada), Ascomycota e Basidiomycota, onde o mecanismo de reprodução é sexuado (Lacaz *et al.*, 1991).

Alguns representantes das leveduras são importantes porque podem causar enfermidades em plantas e animais incluindo o homem (Rose & Harrison, 1970; Lodder, 1970; Kreger-van Rij, 1984); outros refletem importância como agentes biodeterioradores de produtos naturais (frutas, sucos, doces), ou industrializados como papel, medicamentos, vinhos, carnes (Cook, 1958; Frazier, 1976). Em contra partida, a biotecnologia tem utilizado as leveduras nos processos de biodegradação através da indústria de alimentos e medicamentos, assim como nos processos de degradação de materiais e substâncias poluentes do solo e de ambientes aquáticos (Cook, 1958; Rose e Harrison, 1970).

O continente brasileiro que em sua maior parte está situado na região tropical desponta um grande interesse em ampliar os conhecimentos sobre fungos de ambiente marinho no Brasil, uma vez que poucas são as espécies referidas para o nosso país (Pinto *et al.*, 1992).

No Brasil os estudos de leveduras isoladas da água do mar foi iniciado em Florianópolis por Faraco & Faraco (1960) e posteriormente em Recife por Queiroz (1972). Paula *et al.*, (1983), em São Paulo revelaram a possibilidade de espécies de *Candida* serem um novo indicador de poluição em águas de estuários marinhos.

Alguns autores mencionam que a habilidade de certos fungos crescerem a 37°C e de produzirem determinadas enzimas como por exemplo: fosfolipase, protease e outras, pode estar associada a patogenicidade (Hanel, 1988; Samuels *et al.*, 1989).

A fosfolipase expressa, teoricamente, aspectos relacionados com fatores de virulência em espécies de *Candida*. Várias espécies de *Candida* de importância médica

secretam uma proteinase, que é sugerida como fator de virulência; entretanto, esta enzima parece não atuar no fator de virulência específico, porém está envolvida com a propagação

do fungo no hospedeiro, causando consequentemente o processo invasivo, através de degradação da pele ou mucosa (Samaranayake *et al.*, 1984).

As praias de Bairro Novo e Casa Caiada em Olinda – Pernambuco, foram escolhidas para realização desta pesquisa, em virtude de serem praias frequentadas por turistas e banhistas locais. De acordo com a literatura pesquisada, não existe para a cidade de Olinda – Pernambuco, estudos referentes ao isolamento, e caracterização de leveduras do solo e água de áreas das referidas praias.

Considerando a importância de espécies de leveduras como agentes de micoses, justificou-se o isolamento desses microfungos com a caracterização das espécies quanto a fatores de patogenicidade; crescimento a 37°C e produção de enzimas, fosfolipase e protease.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Ocorrência de leveduras em ambientes marinhos**

A ocorrência de leveduras sapróbias e potencialmente patogênicas em diferentes habitats aquáticos ou associadas aos mesmos está se tornando assunto de grande interesse, considerando que estes organismos estão presentes em rios, lagos, mares, águas profundas e relacionados à fauna e flora desses ambientes, bem como em áreas costeiras destinadas ao lazer. Neste sentido, há informações que enfatizam a existência de leveduras importantes na patologia humana e animal (Fell & van Udem, 1963; Volz *et al.*, 1974 e Brisou, 1975).

Fell & van Uden (1963) e Meyers & Ahearn (1974) referem que águas do mar no sul da Flórida, altamente poluídas por resíduos domésticos tem um grande número de espécies de *Candida*, *Trichosporon*, *Torulopsis* e *Rhodotorula*. Por outro lado, Ahearn *et al.*, (1962) e Morris (1968) citam espécies de *Rhodotorula* e *Torulopsis* como usualmente encontradas em todo ambiente marinho.

Ahearn *et al.*, (1968), confirmaram a alta incidência de *Candida* em águas do mar poluídas por esgotos domésticos no sul da Flórida.

Considerando que as leveduras são abundantes em águas costeiras (Cooke *et al.*, 1960; Spencer *et al.*, 1970 e Ahearn, 1973) informaram que este fato pode estar relacionado ao arrasto da terra pelos rios e canais, bem como de resíduos domésticos e industriais que aumentam os nutrientes para água do mar.

A maior parte dos trabalhos em isolamento de leveduras de águas de estuário e locais próximos a costa marinha tem sido feitos na Europa e América do Norte (Fell *et al.*, 1960; Ahearn *et al.*, 1968).

Ahearn *et al.*, 1968, informaram que nas regiões costeiras da Flórida ocorrem principalmente *Rhodotorula*, *Candida* e *Debaryomyces*. A distribuição de leveduras em ambiente marinho parece ser limitada pelas condições do ambiente devido a fatores como: temperatura, pH e baixa concentração de nutrientes.

*Candida albicans* tem sido isolada de água do mar em praias recreacionais no sudeste da Califórnia (U.S.A.) (Dabrowa *et al.*, 1964 e Kishimoto *et al.*, 1969).

Spencer *et al.*, 1970, estudando águas de ambientes marinhos no sul dos U.S.A, argumentaram que o número de leveduras torna-se rapidamente elevado após o despejo

de resíduos domésticos nas águas, fato que pode estar correlacionado com o aumento de coliformes fecais.

Morris (1968, Morris 1975) e Meyers & Ahearn, 1974 postularam que a alta densidade de leveduras em águas costeiras dos U.S.A. é constituída por leveduras de vários gêneros, dentre eles, *Candida*, *Trichosporon*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Hansenula* e *Rhodosporidium*.

Muitas espécies de leveduras são patógenas ao homem e animais (Gentles e La Touche, 1969). Algumas dessas espécies, principalmente *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Trichosporon cutaneum* e *Rhodotorula mucilaginosa* foram encontradas em áreas costeiras na Europa.

*Candida lusitaniae* é frequente no trato digestivo de animais domésticos, sendo detectada em secreções respiratórias e urina humana. Como um sapróbio de vida livre tem sido isolada em águas costeiras na Flórida – U.S.A. (Lodder, 1970).

Várias espécies de leveduras são encontradas em ambientes aquáticos com poluição doméstica, especialmente *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii* e estas espécies são frequentemente isoladas de fontes humana e animal (Gentles & La Touche, 1969; Woollett & Hendrick, 1970).

A habilidade para sobreviver em diferentes habitats é uma característica comum a certas leveduras, como *Candida parapsilosis*, *C. laurentii*, *Pichia kudriavzevi*, *P. guilliermondii*, *Rhodotorula glutinis*, *R. rubra*, *Cryptococcus albidus* e *Hansenula anomala*, podem fazer parte da micobiota transitória do homem, animais e outros habitats. (Stenderup, 1980).

Lodder (1970), informou que *Pichia kudriavzevii*, *P. guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. mambranaefaciens* possuem uma diversidade de habitats, e podem ocorrer em tecido humano e de animais, bem como em fezes, material intestinal de peixes, resíduos industriais e em água do mar no sul da Flórida – U.S.A.

Algumas espécies de leveduras isoladas da água do mar poluída na Europa, são patógenas oportunistas dentre elas: *Candida tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *Torulopsis glabrata* e *Rhodotorula rubra* (Gentles & La Touche, 1969 Lodder, 1970).

A maior parte das leveduras sem levar em conta o habitat do qual foram isoladas é capaz de crescer com concentrações iguais ou superiores as concentrações de cloreto de sódio da água do mar e geralmente crescem com o dobro dessas concentrações. Isto

indica que a alta tolerância ao sal é importante na seleção natural de leveduras de ambiente marinho (Lodder, 1970 e Goto *et al.*, 1972).

Leveduras basidiomicéticas que predominam em água doce e salgada na Flórida como *Rhodotorula* spp., e *Cryptococcus* spp., são encontradas em águas de estuário não poluído e sedimentos no Brasil ( Fell *et al.*, 1960; e Hagler e Ahearn, 1987 e Pagnocca *et al.*, 1989).

Piontelli & Toro (1985) pesquisaram leveduras em zona seca e zona intertidal de uma praia no Chile. A maior parte das espécies isoladas é cosmopolita em sua distribuição. Os resultados sugerem a utilização de espécies de *Candida* como um dos indicadores de contaminação fecal em praias de lazer.

Nunes (1984) e Barbosa (1989) estudando amostras de água do rio Formosa na região sul de Portugal detectaram uma diminuição no número de microrganismos mesofílicos em locais próximos a mar aberto. Esta diminuição pode estar relacionada com diferentes fatores bióticos e abióticos que exercem qualquer efeito negativo, separadamente ou por sinergismo nos microrganismos alóctonos de ambiente marinho (Gauthier, 1980 e Borrego *et al.*, 1983).

Borrego (1984), referiu que a contaminação microbiológica por bactérias e *Candida albicans* em águas do rio Formosa (Portugal) é provocada por despejo de esgotos domésticos.

Microrganismos terrestres são lançados em ambiente aquático principalmente por despejos de esgotos, que são a principal fonte de poluição fecal em ambiente marinho (Borrego e Figueiras, 1997).

Queiroz (1972), isolou leveduras mitospóricas de algas marinhas da praia de Piedade, Pernambuco – Brasil dentre elas, *Candida guilliermondii*, *C. tropicalis*, *Trichosporon* sp., *Torulopsis versatilis*. A levedura ascosporada esteve representada por *Saccharomyces florentinus*. A presença de leveduras ascosporadas foi muito baixa, em relação ao número bem representativo de leveduras assexuadas.

Em águas do mar poluídas do Rio de Janeiro, *Candida* apresentou boa correlação com coliformes fecais, seguindo um padrão de distribuição similar aos coliformes fecais, sendo *Candida* citada como um bom indicador de poluição em ambiente marinho (Hagler, 1978).

Hagler *et al.*,(1979) isolaram espécies de leveduras da água do mar poluída com resíduos domésticos no Rio de Janeiro. As espécies mais frequentemente isoladas foram *Rhodotorula rubra* e *Candida krusei*, enquanto outras espécies de *Candida*,

*Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Hanseniaspora* também foram isoladas.

Paula (1978) isolou com maior frequência em águas do mar poluídas na Baixada Santista-SP, *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *Torulopsis glabrata*, informando que *Cryptococcus* foi o gênero predominante em águas não poluídas.

Hagler & Mendonça – Hagler (1979) estudando espécies de leveduras isoladas de estuário marinho poluído do Rio de Janeiro concluíram que a exigência de vitaminas como fator estimulante do crescimento, aparentemente não interfere na distribuição de leveduras na água do mar poluída. Entretanto, essa exigência como fator essencial, pode ser importante no estabelecimento da poluição de águas marinhas. Em 1981 Hagler e Mendonça-Hagler relataram *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* e *Trichosporon* como gêneros mais freqüentemente isolados em águas de estuário poluído no Rio de Janeiro.

Hagler *et al.*, (1982) estudando sedimento de um estuário poluído no Rio de Janeiro encontraram espécies de *Candida krusei* e *Pichia membranaefaciens* como predominantes nesses sedimentos e *Rhodotorula rubra* sendo encontrada em menor freqüência.

A ocorrência de *Trichosporon* spp. sobretudo *T. cutaneum*, em sedimento de áreas de estuário do Rio de Janeiro pode estar relacionada com a poluição (Hagler & Mendonça – Hagler, 1981). Porém, espécies desse gênero tem sido encontradas em substratos como madeira, solo, areia de praia e água do mar ( Hurley *et al.*, 1987).

Paula *et al.*, (1983) isolaram leveduras de praias da região sul do estado de São Paulo num total de 500 colônias de leveduras, distribuídas em 9 gêneros: *Candida*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Pichia* e *Sporobolomyces*. Os resultados revelaram a possibilidade de *Candida* ser um novo indicador de poluição em águas de estuário, estando corroborados com outros trabalhos ( Fell & van Uden 1963; Ahearn *et al.*, 1968; Meyers & Ahearn 1974, Queiroz, 1972).

As colônias de leveduras em águas poluídas do mar de regiões do Brasil, são tipicamente dominadas por associações com hospedeiros, e as espécies mais importantes são *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. intermedia*, *C. krusei*, *Trichosporon cutaneum*, e *Saccharomyces cerevisiae*, esta, usada na fermentação e indústria de alimentos (Hagler *et al.*, 1986).

## 2.2 Caracterização de leveduras quanto a fatores de patogenicidade

A habilidade dos fungos na produção de enzimas extracelulares vem sendo associada com a patogenicidade e virulência dos mesmos, devido à relação fungo-

hospedeiro. Várias espécies patógenas incluindo *Candida krusei* e *C. tropicalis* fazem parte da densidade populacional de leveduras de ambiente marinho poluído (Hagler e Ahearn, 1987).

A habilidade de *Candida albicans* em produzir enzimas citolíticas como as proteinases (Macdonald, & Odds, 1980; Ruchel *et al.*, 1982) e fosfolipases (Luria *et al.*, 1963; Costa, *et al.*, 1968) pode estar associada com a patogenicidade desses fungos.

Para a determinação da atividade enzimática de diversas enzimas extracelulares, geralmente são utilizadas técnicas de difusão em ágar “cup plate” com uso de meios sólidos sendo os resultados expressados pela formação de halos resultantes da hidrólise dos substratos específicos ou pela mudança de cor do indicador contido no meio de cultura (Hankin e Anagnostakis, 1975; Price *et al.*, 1982).

Entre vários fatores predisponentes extrínsecos ao hospedeiro, existem determinadas características envolvendo fungos, indicativas de patogenicidade. Entre estas podem ser mencionadas crescimento a 37°C e produção de enzimas como urease, protease, fosfolipase e outras. A urease foi previamente estudada em fungos por Hankin e Anagnostakis (1975) sugerindo um meio com uréia para a detecção da atividade enzimática.

O termo produção de enzimas é entendido como síntese e atividade da enzima pelo fungo no meio de produção. Assim, alguns fungos produzem um grande número de enzimas enquanto outros produzem poucas enzimas sob as mesmas condições de teste (Hankin & Anagnostakis, 1975).

A temperatura é um dos parâmetros ambientais mais importantes influenciando todas as atividades de microrganismos (Rose & Harrison, 1987).

Segundo Hanel (1988) e Samuels *et al.*, (1989) a habilidade de certos fungos em produzir enzimas como proteases, fosfolipases, podem estar associadas com a patogenicidade desses fungos. Como consequência ainda dessa relação parasito-hospedeiro, vários estudos têm sido dirigidos relacionando a habilidade dos fungos na produção das enzimas como processo de patogenicidade e virulência (Samaranayake, *et al.*, 1984; Mago, Khuller, 1990).

Fosfolipases são enzimas hidrolíticas que degradam os fosfolipídeos em quatro sítios diferentes, dependendo de ação da enzima sobre o substrato, sendo encontrados fazendo parte da estrutura da membrana celular de animais, plantas e células de microrganismos (Price & Cawson, 1977).

Fosfolipases extracelulares são produzidas por várias bactérias e fungos e estão implicadas na patogenicidade destes por causar danos às membranas do tecido hospedeiro (Rose & Harrison, 1987; Lacaz *et al.*, 1991; Kwon – Chung & Bennet, 1992; Chen *et al.*, 1997).

Entretanto, esta enzima parece não atuar no fator de virulência específico, porém pode estar envolvida com a propagação do fungo no hospedeiro, causando consequentemente invasão, através de degradação da pele ou mucosa (Ruchel *et al.*, 1986, Homma *et al.*, 1992).

A presença da atividade fosfolipásica em *Candida albicans*, foi primeiramente detectada por crescimento do fungo em meio contendo gema de ovo (Werner, 1966; Costa *et al.*, 1967 a) e lecitina (Costa *et al.*, 1967 b).

Pugh e Cawson (1975) demonstraram a localização da atividade fosfolipásica em células de *Candida albicans* em meio de cultura através de um método citoquímico. Posteriormente, a detecção quantitativa da atividade fosfolipásica em *Candida albicans* por um método em placa foi descrita por Price *et al.*, (1982) os quais demonstraram grande variação na atividade fosfolipásica, encontrada em isolados clínicos de *C. albicans*. A fosfolipase secretada por *C. albicans* poderia fazer parte da invasão do tecido do hospedeiro.

Price & Cawson (1977) divulgaram um método que permitiu a determinação quantitativa da atividade fosfolipásica em um grande número de amostras através de meio contendo gema de ovo e cálcio.

Price & Cawson (1977) quando usaram meio com substrato puro de lecitina, revelaram a presença de fosfolipase A e lisofosfolipase, em amostras de *Candida albicans*, entretanto não detectaram fosfolipase B.

Samaranayake *et al.*, (1984) demonstraram que a atividade fosfolipásica secretada por *Candida albicans* pode ser considerada como fator determinante de virulência.

Proteases são enzimas capazes de hidrolisar peptídeos. Estas enzimas consistem de dois grupos: as proteínases e as peptidases (Sumner, 1951).

Lodder e Kreger van Rij (1952) relataram várias espécies de leveduras incluindo *Candida lipolytica* e *C. pseudotropicalis*, que peptonizam o leite. Peptonização do leite tem sido observada também, por *Candida punicea* e *C. curiosa* (Komagata e Nakase, 1965).

Estudos realizados com leveduras de origem aquática (Meyers *et al.*, 1967), indicaram que determinadas espécies em geral produzem uma proteínase extracelular.

A maioria das proteases é normalmente detectada, qualitativamente utilizando-se como substratos meios sólidos contendo caseína, gelatina e outras proteínas. A atividade proteolítica pode ser evidenciada pela observação de halos de hidrólise em torno de colônias do microrganismo (Aunstrup, 1974).

A caseína, em condições habituais, é insolúvel. Quando hidrolisada por uma enzima extracelular, é transformada em produtos solúveis por um processo denominado peptonização. A presença dessa enzima é evidenciada facilmente pela inoculação na superfície de Ágar – leite com o microrganismo em estudo. Nesses casos, observa-se em torno das colônias zonas claras, em contraste com o resto do meio que permanece turvo (Neder, 1992).

Protease é uma enzima sugerida como fator de virulência de muitas amostras de *Candida albicans* de importância médica, porém pode estar mais envolvida com a propagação do fungo no hospedeiro durante o processo invasivo do que na atuação como fator de virulência propriamente dito (Jiménez, 1993).

### **3. DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO**

O município de Olinda está compreendido entre os paralelos  $7^{\circ} 57'30''$  e  $8^{\circ} 02'30''$  de latitude sul e os meridianos  $39^{\circ} 49'41''$  e  $39^{\circ} 55'00''$  de longitude W. Gr, perfazendo cerca de  $40,83\text{ km}^2$ . Limita-se ao norte com o município de Paulista, ao leste com o oceano Atlântico, a oeste e ao sul com a cidade de Recife (Beltrão *et al.*, 1995).

Olinda está geologicamente localizada na Faixa Sedimentar Cretácea – Paleocênica a qual é caracterizada por apresentar, ao norte e ao sul de Recife, comportamento diferente tanto no sentido litológico (tipo de rochas), como no cronológico (idade). Este fato levou os estudiosos da área a subdividir esta faixa em dois domínios distintos, de acordo com os conceitos atuais: a Faixa Vulcano - Sedimentar sul de Pernambuco e a Faixa Sedimentar norte de Pernambuco (Beltrão *et al.*, 1995).

A rede de drenagem que compreende o município de Olinda é parte integrante das bacias Hidrográficas dos rios Beberibe e Paratibe.

O rio Beberibe nasce no município de São Lourenço da Mata e seu curso desenvolve-se numa extensão de aproximadamente 16,5km. Sua bacia de drenagem possui aproximadamente  $78,71\text{ km}^2$  dos quais 17,8% (cerca de  $14\text{ km}^2$ ) pertence ao município de Olinda. Destacando-se na área estudada os afluentes: Canal de Peixinhos, Riacho do Abacaxi (Canal Lava Tripas) e Canal da Malária, possuindo esses últimos nascentes localizados no município de Olinda.

Quanto ao rio Paratibe, ressalta-se que este corpo d'água, cujas nascentes localizam-se nos municípios de Recife, Paulista e São Lourenço percorre uma extensão de 16km e abrange uma área de  $118,54\text{ km}^2$  dos quais 18,6% (cerca de  $22,08\text{ km}^2$ ) está inserida no município de Olinda. Dentre os principais afluentes que cortam o município de Olinda, destacam-se: o rio Fragoso, o Canal do Matadouro (Canal Preto) e Canal do rio Morto (Canal Bultrins/Fragoso), possuindo os dois primeiros, nascentes na Zona Rural de Olinda (Beltrão *et al.*, 1995).

Segundo a classificação geral de Köppen (SUDENE, 1974), o clima que caracteriza o município de Olinda é do tipo AS', ou seja, tropical quente e úmido, com chuvas de outono e inverno, distribuídas de março a agosto, com temperatura do mês mais frio superior a  $18^{\circ}\text{C}$  e temperatura média anual de  $27^{\circ}\text{C}$ .

Os meses de maior incidência de chuvas são os de maio (224,4mm) e junho (453,3mm) totalizando precipitação anual de 1.000 a 2.000mm (Beltrão *et al.*, 1995).

O município de Olinda está situado do ponto de vista fitogeográfico dentro da Zona da Mata. A cobertura vegetal da área originalmente, era constituída pela Floresta Atlântica, do tipo Ombrófila Densa, e seus ecossistemas associados: manguezais e restingas (Beltrão *et al.*, 1995).

## **Características ambientais das Praias de Casa Caiada e Bairro Novo**

### **Praia de Casa Caiada**

A Praia de Casa Caiada, juntamente com a Praia de Rio Doce, compreende o trecho entre a Rua Dr. Manuel Ramos Lima até a foz do rio Paratibe, possuindo extensão aproximada de 4,5km, apresenta praias de areia com alguns trechos que são totalmente imersos pela água durante o período de preamar. No alto da praia, verifica-se a existência da Av. Beira Mar, que se estende até as imediações do Hotel Quatro Rodas. Este trecho é muito utilizado para banho, prática de futebol e esportes de contato (wind – surf, natação, vela, remo, etc), bem como para pesca e captura de moluscos. Seus principais problemas ambientais são: lançamento de águas pluviais á praia, disposição de esgotos domésticos, lançamento de resíduos sólidos (barracas de praia, vendedores ambulantes, população em geral, etc.), ocupação de faixa de areia pelas barracas distribuídas de forma desordenada, além do aspecto indesejável, atentando contra a estética e a paisagem, ocupação da faixa de praia por embarcações de lazer, dificultando utilização pelos banhistas, presença de animais na praia, falta de periodicidade do sistema.

Casa Caiada é uma praia urbana, possui águas calmas e recifes artificiais e juntamente com Bairro Novo são consideradas as praias mais frequentadas de Olinda, e muito procuradas por banhistas e visitantes.

### **Praia de Bairro Novo**

A Praia de Bairro Novo juntamente com a Praia do farol compreende o trecho Rua do Farol com imediações da Rua Dr. Manuel Ramos Lima, com extensão aproximada de 2km, possui obras de proteção ao litoral (cerca de 36 espigões), com

comprimento aproximado de 50m e eqüidistantes de 50m, construídos perpendicularmente à praia, além de enrocamento lançado em todo perímetro para proteção á costa contra a ação das ondas. Ressalta-se que estas praias são bastante freqüentadas por banhistas, em especial, em seu terço inicial. Possui alguns problemas ambientais, tais como: erosão marinha, lançamento de águas pluviais à praia, disposição de esgotos domésticos (residências e bares), lançamento de resíduos sólidos, água imprópria para banhos em alguns trechos e esportes de contato. Pode ser utilizada para turismo, recreação, lazer, pesca artesanal, práticas desportivas (Beltrão *et al.*, 1995) (**Figura 1**).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Coleta do solo

Foram obtidas concomitantemente amostras de solo e água nas praias de Bairro Novo e Casa Caiada, Olinda, Pernambuco, nos meses de dezembro/2000; fevereiro/2001 referentes ao período seco, junho e julho/2001, referentes ao período chuvoso. Foram realizadas 16 coletas de solo e 16 coletas de água. As praias de Casa Caiada e Bairro Novo foram denominadas de ponto-1 e ponto-2, respectivamente.

As coletas tanto do solo, quanto da água, foram procedidas em baixa-mar e preamar. A coleta do solo em cada ponto foi realizada com o auxílio de uma pá de jardinagem, na região do médio litoral a 1m da linha da maré, na superfície e a 20cm de profundidade, as quais foram acondicionadas em sacos plásticos devidamente etiquetadas e mantidas a temperatura ambiente, sendo transportados ao Departamento de Micologia da UFPE para o manuseio.

### 4.2. Coleta da água

A coleta da água em cada ponto foi realizada à superfície e a 1m de profundidade, utilizando-se tubos de ensaio esterilizados e etiquetados. Para tal, no momento da coleta, quando o tubo de ensaio na profundidade de 1m os tampões foram retirados, e retamponados logo em seguida.

As amostras foram mantidas a temperatura ambiente e transportadas ao Departamento de Micologia da UFPE para serem manuseadas.

### **4.3. Meios de cultura utilizados**

#### **Para isolamento e purificação dos fungos.**

- Àgar Sabouraud + 5% de extrato de leveduras + 100 mg de cloranfenicol (SAB + YE + C).

Peptona de carne ( DIFCO).....10g  
Extrato de levedura ( DIFCO).....5g  
Dextrose ( VETEC) .....40g  
Cloranfenicol .....100 mg  
Àgar ( VETEC).....20g  
Água destilada q.s.p.....1.000 ml

pH = 6,5

- Àgar Sabouraud + 5% de extrato de levedura + 100 mg de cloranfenicol + 50 mg de Rosa de Bengala ( SAB + YE + C + RB).

Peptona de carne ( DIFCO).....10g  
Extrato de levedura ( DIFCO).....5g  
Dextrose ( VETEC) .....40g  
Cloranfenicol .....100mg  
Rosa de Bengala ( VETEC) .....50 mg  
Àgar ( VETEC).....20 g  
Água destilada q.s.p.....1.000ml

pH = 6,5

#### **Para identificação**

- Àgar Sabouraud + 0,5% de extrato de levedura ( SAB + YE )

Peptona de carne ( DIFCO).....10g  
Extrato de levedura ( DIFCO).....5g  
Dextrose ( VETEC) .....40g  
Àgar ( VETEC) .....20g  
Água destilada q.s.p. ....1.000 ml

pH = 6,5

- Água bile de boi

Bile de boi ( MICROMED).....20g  
Água destilada q.s.p. ....1.000 ml

- Sabouraud líquido

Peptona de carne ( DIFCO) .....10g  
Extrato de levedura ( DIFCO) .....5g  
Dextrose ( VETEC).....40g  
Água destilada q.s.p. ....1.000 ml

- Meio a base de carbonato de cálcio ( CaCO<sub>3</sub>)

Extrato de levedura ( DIFCO) .....5g  
Dextrose ( VETEC).....50g  
Carbonato de cálcio ( CINÉTICA) .....5g  
Àgar ( VETEC) .....20g  
Água destilada q.s.p. ....1.000 ml

- Meio de Gorodkowa

Peptona de carne ( DIFCO) .....10g  
Extrato de carne ( DIFCO) .....10g  
Cloreto de sódio ( VETEC) .....5g  
Dextrose ( VETEC).....40g  
Àgar .....20g  
Água destilada q.s.p. ....1.000 ml

- Àgar uréia de Christensen

(I) Dextrose ( VETEC).....1g  
Peptona de carne ( DIFCO) .....1g  
Cloreto de sódio ( NaCl) ( VETEC) .....5g  
Fosfato de Potássio monobásico ( KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>)  
(VETEC) ..... 2g  
Vermelho de fenol ( MERCK).....0,012g  
Àgar destilada q.s.p. ....1.000 ml

(II) Uréia ( DIFCO) a 20% .....29g

pH = 6,8

### **Prova de Assimilação de hidratos de carbono e fontes de nitrogênio**

- Meio básico C ( assimilação de fontes de carbono)

Sulfato de amônio  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  (VETEC) ..... 5g

Fosfato de potássio monobásico  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

(VETEC) ..... 1g

Sulfato de magnésio (VETEC) ..... 0,5g

Àgar (VETEC) ..... 20 g

Água destilada q.s.p. ..... 1.000 ml

- Meio básico N ( assimilação de fontes de nitrogênio)

Fosfato de potássio monobásico (  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  )

( VETEC) ..... 1g

Sulfato de magnésio  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( VETEC ) .0,5g

Dextrose ( VETEC) ..... 20g

Àgar ( VETEC) ..... 20g

Água destilada q.s.p. ..... 1.000 ml

### **Prova de fermentação de açúcares**

- Água Peptonada

Peptona de carne ( DIFCO) ..... 2,5g

Extrato de levedura ( DIFCO) ..... 0,5g

Água destilada q.s.p. ..... 100 ml

- Solução de Açúcar

Açúcar ..... 4g

Água peptona a 2,5% ..... 100 ml

Todos os meios foram preparados segundo Lacaz *et al.*, 1991.

### **Para detecção de características de patogenicidade**

- Para crescimento a 37°C
- Àgar – Sabouraud

Peptona de carne ( DIFCO) .....	10g
Dextrose ( VETEC).....	40g
Àgar ( VETEC) .....	20g
Água destilada q.s.p. ....	1.000 ml

#### **Para detecção da atividade fosfolipásica ( Price *et al.*, 1982) – Modificado**

Àgar – Sabouraud + gema de ovo

Dextrose ( VETEC) .....	40g
Peptona ( DIFCO) .....	10g
Gema de ovo (02 gemas).....	20g
Cloreto de sódio ( NaCl) (VETEC) .....	1 M
Cloreto de Cálcio (CaCl <sub>2</sub> ) (VETEC) .....	0,005M
Àgar (VETEC) .....	20g
Água destilada q.s.p. ....	1.000 ml

pH = 6,5

#### **Para detecção da atividade proteásica**

- Meio de caseína ( Lacaz *et al.*, 1991)
  - (1) Leite desnatado ( marca Molico) .....10g  
Água destilada q.s.p. .... 100 ml
  - (2) Àgar ( VETEC) .....

pH = 6,1

- Solução acidificada de cloreto de mercúrio ( Fraizer, 1926)
 

Cloreto de mercúrio (HgCl <sub>2</sub> ) (VETEC) .....	12g
Ácido clorídrico concentrado (HCl)	
( CINÉTICA) .....	16 ml
Água destilada .....	80ml

Todos os meios foram preparados segundo Lacaz *et al.*, (1991) e Price *et al.*, (1982) – modificado, substituindo a lecitina de ovo ( Difco) por duas gemas de ovo natural.

#### **4.4. Isolamento e purificação dos fungos (Pinto *et al.*, 1992)**

De cada amostra do solo foi feita uma suspensão de 50g de solo em 90ml de água destilada esterilizada, onde retirou-se 0,5ml da suspensão para o semeio. Cada amostra foi semeada em triplicata, usando-se pipeta esterilizada de 1ml e placas de Petri de 9cm de diâmetro, contendo o meio Sabouraud dextrose Ágar, extrato de levedura acrescido de cloranfenicol.

Para o isolamento dos fungos da água foi retirado 0,5ml para o semeio, o qual foi feito em triplicata, sendo também semeados em placas de Petri contendo Sabouraud-dextrose Ágar, extrato de levedura acrescido de cloranfenicol. Após o semeio as placas foram incubadas a temperatura ambiente ( $\pm 28^{\circ}\text{C}$ ) e a partir do aparecimento das primeiras colônias, foram as mesmas repicadas para tubos contendo meio Sabouraud-dextrose Ágar, extrato de levedura.

Para a purificação das amostras fúngicas, foram preparadas suspensões em 2ml de água destilada esterilizada ( ADE), contendo 50mg de cloranfenicol /l. De cada suspensão, 0,2ml foram semeadas por esgotamento na superfície de Ágar – Sabouraud, extrato de levedura acrescido de cloranfenicol. As colônias surgidas isoladamente, foram repicadas para tubos de ensaio contendo Sabouraud – destrose Ágar e extrato de levedura.

#### **4.5. Identificação dos fungos do solo e da água**

As identificações dos fungos foram efetuadas através da observação das características macroscópicas (cor, aspecto) e microscópicas, das culturas.

Para a identificação das espécies de leveduras foram utilizados os meios de cultura específicos para as provas fisiológicas e bioquímicas, consultando bibliografias específicas como: Lodder, 1970; Kreger van Rij, 1984; Barnett *et al.*, 1990.

#### **4.6. Parâmetros hidrológicos, pH, temperatura e salinidade da água e dados do solo das praias de Casa Caiada e Bairro Novo, Olinda - PE**

#### **4.6.1. Altura das marés**

As amostras foram coletadas durante as baixa-mares e preamarés de sizigia, baseadas nas tábuas de marés contidas em Brasil (1999), para o porto do Recife (PE).

#### **4.6.2. Salinidade da água**

A salinidade da água foi determinada através de um refrotômetro manual de marca ATAGO.

#### **4.6.3. pH (potencial Hidrogeniônico) do solo e da água**

Para determinação do pH do solo e da água foi empregado o pHmetro digital – Hanna.

#### **4.6.4. Temperatura do solo e da água**

As temperaturas do solo e da água foram registradas através de um termômetro digital - Hanna.

### **4.7. Pluviometria**

Os dados pluviométricos da cidade de Olinda, Pernambuco, foram fornecidos pela Empresa Pernambucana de Pesquisas Agropecuárias (IPA) e Secretaria de Recursos Hídricos de Pernambuco (SRH).

O clima que caracteriza o município de Olinda é do tipo As' ou seja, quente e úmido, com chuvas de outono e inverno, distribuídas de março a agosto, com temperatura do mês mais frio superior a 18°C.

## **4.8. Colimetria da água**

A análise colimétrica da água foi fornecida pela Companhia Pernambucana de Controle da Poluição Ambiental e da Administração dos Recursos Hídricos (CPRH). O parâmetro fornecido foi o número mais provável (NMP) de bactérias coliformes fecais, segundo a classificação regulamentada pela resolução 274/00 do CONAMA.

## **4.9. Detecção de características de patogenicidade**

### **4.9.1. Crescimento a 37°C**

As amostras foram semeadas em Ágar-Sabouraud extrato de levedura em duplicata para cada condição de crescimento, dois tubos foram incubados a 37°C e dois mantidos à temperatura ambiente ( $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ) para controle. O crescimento das culturas foi acompanhado entre 48 e 72h.

### **4.9.2. Detecção de enzimas/fosfolipase**

Os testes para detecção de fosfolipase e protease, em placas, foram realizados da seguinte maneira: o semeio foi realizado com alíquota da colônia de levedura no centro dos referidos meios de cultura contidos em placas de Petri. As placas foram mantidas a temperatura ambiente.

As culturas foram observadas quanto a formação de halos ao redor das colônias, na produção de fosfolipase e protease num período de 07 a 10 dias.

Depois de semeadas no meio para detecção de fosfolipase, as culturas foram observadas quanto ao crescimento e a formação de halos. A atividade foi detectada seguindo o método descrito por Price *et al.*, (1982), modificado, substituindo a lecitina de ovo por gema de ovo natural.

### **4.9.3. Detecção de enzimas/protease**

A atividade enzimática foi testada através da hidrólise de caseína em meio Ágar-leite. Depois de semeadas, as amostras foram observadas quanto ao crescimento e

atividade enzimática, através da formação de halo. Quando positivas para atividade proteásica houve a formação de halo transparente ao redor das colônias. A ausência de halo indicou não produção da protease.

#### **4.10. Freqüência de ocorrência**

A freqüência de ocorrência dos fungos foi calculada pela fórmula a seguir e os resultados são emitidos em porcentagem.

$$\mathbf{Fo = Ta \cdot 100 / TA}$$

onde: **Ta** = número de amostras que o táxon ocorreu.

**TA** = número total de amostras.

O cálculo da freqüência de ocorrência das espécies foi obtido, considerando-se o número de amostras em que o fungo ocorreu em relação ao número total de amostras, segundo o critério abaixo, modificado de Dajoz (1983).

Sendo considerada a seguinte classificação:

< 10% = Rara

10 ≤ 25% = Pouco freqüente

25 < 35% = Freqüente

35 < 50% = Abundante

> 50% = Muito abundante

#### **4.11. Análise de similaridade**

Foi feita uma análise de similaridade baseada na matriz de dados de presença ausência, tendo-se retirado as amostras onde não ocorreram espécies. Utilizou-se o coeficiente de Jaccard (1908) cuja fórmula é:

$$\frac{a}{(a+b+c)}$$

onde,    a = co-ocorrência das espécies nas amostras (análise por coluna) ou das amostras nas espécies (análise por linha).

b = a ocorrência da espécie em uma amostra ou da amostra em uma espécie.

c = a ocorrência na outra amostra ou na outra espécie.

Na análise por coluna se evidencia as amostras que estão associadas entre si, e na análise por linhas as espécies que têm requerimentos ecológicos semelhantes.

O método de ligação da matriz triangular foi o do peso não proporcional (UPGMA) gerando um dendrograma. Foram feitas uma análise cofenética e uma de comparação de matrizes para verificar o bom ajuste dos dados.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1. Isolamento e identificação de leveduras do solo e da água, durante os períodos de verão e inverno nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo.**

Das 32 coletas realizadas do solo e da água durante os meses de dezembro/2000 e fevereiro, junho e julho/2001, em superfície e profundidade, na baixa-mar e preamar nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo, foram isoladas 31 espécies de leveduras. Na praia de Casa Caiada a maioria das espécies pertence a *Candida* com (10) espécies seguido de *Trichosporon*, *Rhodotorula* e *Brettanomyces* com (5), (3) e (3) espécies, respectivamente. Na praia de Bairro Novo foram isoladas 15 espécies. A maioria das espécies também pertence a *Candida* com (12) espécies , seguido de *Rhodotorula* e *Brettanomyces* com (2) e (1) espécie, respectivamente (**Tabelas 1,2,3 e 4**).

*Candida* e *Trichosporon* ocorreram com maior número de espécies, 19 e 5 respectivamente. São também referidas por Fell & van Udem (1963) em ambiente marinho na Flórida. *Trichosporon* ocorreu com maior número de espécies (5) em solo na praia de Casa Caiada. Na Baixada Santista (São Paulo). Paula *et al.*, (1983) relataram a baixa adaptação à água do mar por espécies de *Trichosporon* isoladas de ambiente marinho. *Candida*, *Rhodotorula* e *Trichosporon* ocorreram na praia de Casa Caiada, confirmado o citado por Meyers & Ahearn (1974), Hagler e Mendonça-Hagler (1981) os quais referem, que em águas de ambiente marinho poluídas por esgotos domésticos há grande número de espécies de *Candida*, *Rhodotorula* e *Trichosporon*. *Candida*, *Rhodotorula* e *Brettanomyces* ocorreram na praia de Bairro Novo, este último com maior assinalamento. Piontelli & Toro (1985) referem que este gênero foi isolado com maior freqüência em solo de praia no Chile.

Existe a possibilidade de que as leveduras detectadas nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo, tenham sido carreadas não só pela lixiviação do solo e pelas descargas pluviais, como também pelas descargas fluviais próximas à área e de esgotos domésticos que são lançados ao longo da praia.

Deve-se levar em conta o fluxo e refluxo das marés e a atividade de banhistas locais. A precipitação pluviométrica em ecossistemas terrestre e aquático influencia de maneira significativa na quantidade de fungos isolados, visto que, após um período de chuva, a quantidade de fungos é maior que no período de estiagem. (Pinto *et al.*, 1992). Em Olinda, a precipitação pluviométrica foi de 260,9mm e 206,3mm nos meses de junho e julho respectivamente. A quantidade de isolados no período de verão foi maior do que no inverno, que teve precipitação de 43,25mm e 180,5mm nos meses de dezembro e fevereiro, respectivamente.

O processo das marés faz com que os propágulos de fungos encontrados na água sejam depositados no solo e os do solo sejam dispersados na água (Pinto *et. al.*, 1992). Os resultados obtidos demonstraram ser possível tal afirmativa, visto que a maioria das espécies isoladas foi comum aos dois substratos.

Segundo os resultados de colimetria fornecidos pela Companhia Pernambucana de Controle da Poluição e da Administração dos Recursos Hídricos (CPRH) e contidos na **Tabela 5**, as praias de Casa Caiada e Bairro Novo nos períodos das coletas foram consideradas “próprias” para a balneabilidade, com exceção de Bairro Novo no período de fevereiro que foi considerada “imprópria”. Entretanto, na praia de Bairro Novo onde ocorre despejos de esgoto doméstico o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi inferior ao da praia de Casa Caiada (**Tabela 6**).

As espécies *Brettanomyces bruxellensis* e *Candida fennica* apresentaram maior número de unidades formadoras de colônias ocorrendo em solo nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo, respectivamente.

Morris (1968), Queiroz (1972), Meyers e Ahearn (1974) e Paula *et al.*, (1983) postularam que as grandes densidades de leveduras em águas costeiras são constituídas por vários gêneros; os mais importantes dentre eles, *Candida*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Pichia*, dos quais os três primeiros, foram isolados nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo.

*Candida parapsilosis* possui grande ocorrência em tecido humano, fezes de animais, produtos alimentícios, e bebidas. Seu isolamento no período de inverno sugere uma origem marinha causada por contaminação fecal. Esta espécie é também registrada em diferentes casos clínicos de micoses. (Marrie *et al.*, 1984).

Foi isolada apenas uma amostra de *Candida albicans* na praia de Casa Caiada no período de verão a uma temperatura de 29,4°C. Anderson (1979) relatou que a temperatura é um fator que influencia no crescimento de determinadas espécies de

*Candida* isoladas de ambiente marinho. Esse dado corrobora com os achados de Meyers *et al.*, (1967), Fell e van Uden (1963) e Buck (1977), os quais referem que a temperatura é um fator importante para o isolamento de *Candida albicans* em ambiente marinho.

## **5.2. Parâmetros hidrológicos, pH, temperatura e salinidade da água e dados do solo das praias de Casa Caiada e Bairro Novo.**

De acordo com os dados inseridos na **Tabela 7** a temperatura da água nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo ficou entre 24.3°C e 29.4°C, ocorrendo em dezembro e fevereiro respectivamente. No período de inverno a temperatura da água teve mínima de 25.3°C e máxima de 28.2°C, ambas ocorrendo no mês de julho. A temperatura do solo no período de verão nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo, teve mínima de 25.7°C e máxima de 29.4°C, ocorrendo nos meses de dezembro e fevereiro, respectivamente. A temperatura do solo no período de inverno ficou entre 24.4°C e 28.8°C, ambas ocorrendo no mês de julho.

O pH de todas as amostras foi ligeiramente alcalino, oscilando entre 7.6 a 8.2. A salinidade da água e do solo na praia de Casa Caiada ficou entre 38 ‰ e 39 ‰ nos períodos de verão e inverno, respectivamente. Na praia de Bairro Novo a salinidade da água e do solo ficou entre 40‰ e 20‰ nos períodos de inverno e verão, respectivamente. Em Bairro Novo a salinidade do solo chegou a 15 ‰, na baixa-mar.

## **5.3. Freqüência de ocorrência de leveduras isoladas nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo.**

*Brettanomyces bruxellensis* teve maior freqüência de ocorrência com 43,75% considerada abundante nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo. *Candida fennica*, *C. catenulata* e *Rhodotorula mucilaginosa* tiveram ocorrência de 18,75%, consideradas pouco freqüentes. *Candida rhagii*, *C. melibiosica*, *C. sake*, *C. parapsilosis*, *C. rugopelliculosa* e *trichosporon dulcitum* com 12,75%, consideradas pouco freqüentes. *Candida pseudolambica*, *C. diddensiae*, *C. vaccinii*, *C. palmioleophila*, *C. bombicola*, *C. geochares*, *C. saitoana*, *C. intermedia*, *C. maltosa*, *C. blankii*, *C. milleri*, *C. albicans*, *Rhodotorula ingeniosa*, *R. glutinis*, *R. minuta*, *Trichosporon lutetiae*, *T. beigelli*, *T. adeninovorans*, *T.*

*aquatile*, *Brettanomyces anomalus* e *B. custersianus*, todas com 6,25% de ocorrência rara (**Figura 2**).

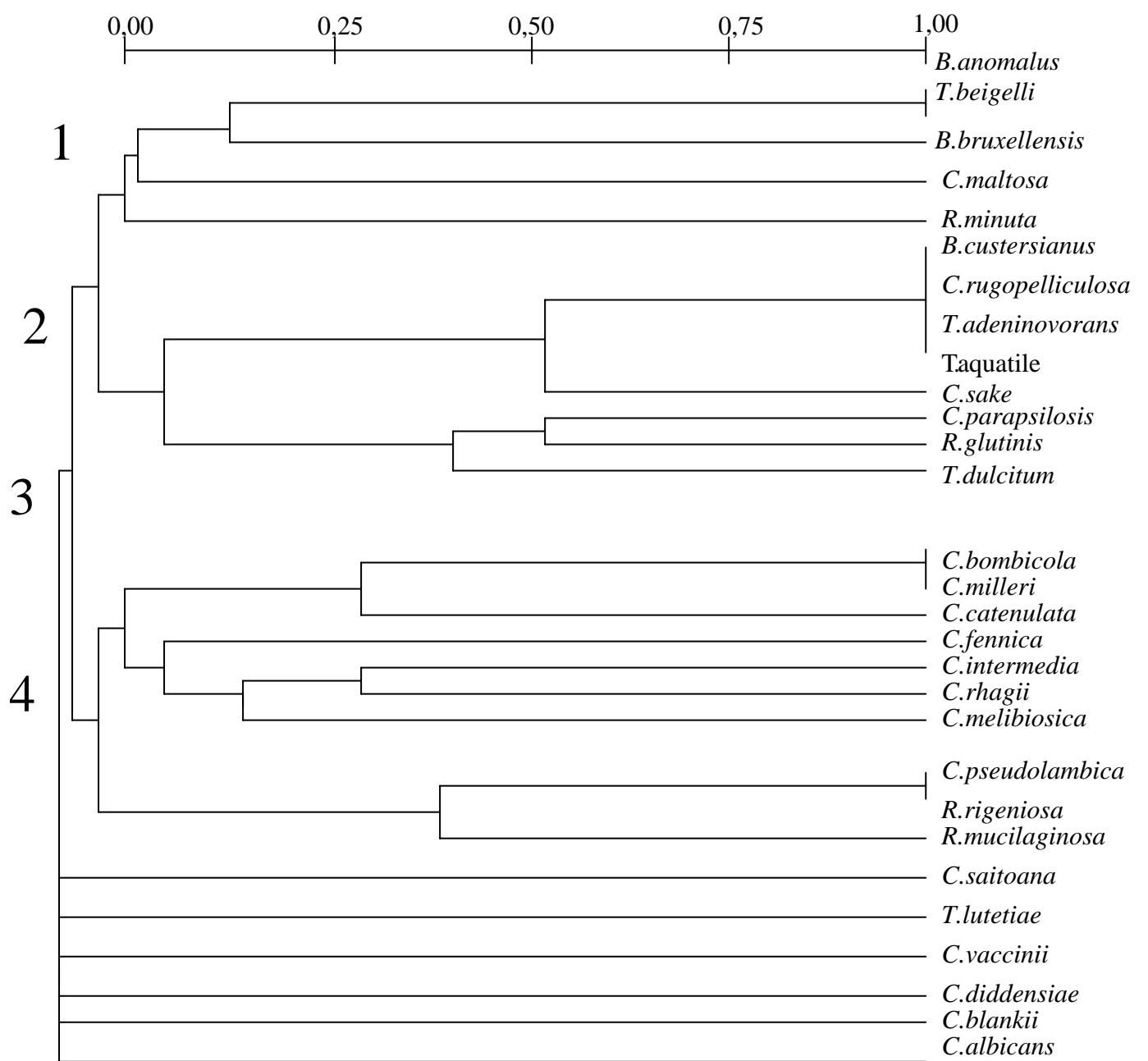
Foram de ocorrência comum as praias de Casa Caiada e Bairro Novo; *Candida catenulata*, *C. fennica*, *C. sake*, *Brettanomyces bruxellensis* e *Rhodotorula mucilaginosa*. O maior número de isolamentos verificou-se tanto no verão como no inverno em solo de superfície nas baixa-marés. Na água a ocorrência foi bem menor do que no solo destacando água em profundidade na preamar nos períodos de verão e inverno ( **Figuras 3 e 4** ) .

## **5.4. Análise de similaridade entre as espécies isoladas**

A análise cofenética da similaridade das espécies apresentou um  $r = 0,96$ , com dados bem ajustados, indicando diferença entre as espécies.

Foram evidenciados 4 grupos de espécies. O grupo 1 associou *Brettanomyces anomalus*, *Thichosporon beigelli*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida maltosa* e *Rhodotorula minuta*. O grupo 2 foi o maior com 8 espécies, associando *Brettanomyces custersianus*, *Candida rugopelliculosa*, *Thichosporon adeninovarans*, *Thichosporon aquatile*, *Candida sake*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula glutinis*, e *Thichosporon dulcitum*. O grupo 3 associou entre as espécies. *Candida bambicola*, *Candida mi lleri*, *Candida catenulata*, *Candida fennica*, *Candida intermedia*, *Candida rhagii* e *Candida melibiosica*. O grupo 4 associou *Candida pseudolambica*, *Rhodotorula ingeniosa* e *Rhodotoryla mucilaginosa* (**Figura 5**).

No grupo 1 foram associadas espécies isoladas na praia de Casa Caiada no período de inverno, com exceção de *Brettanomyces bruxellensis* que ocorreu nos dois períodos, inverno e verão. O grupo 2 associou 8 espécies que ocorreram na praia de Casa Caiada nos períodos de verão e inverno. No grupo 3 foram associadas 7 espécies isoladas nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo nos períodos de verão e inverno. O grupo 4 associou apenas 3 espécies que ocorreram na praia de Bairro Novo no período de verão e inverno. As espécies que não entraram na associação ocorreram uma única vez, sendo retiradas, para não constar alterações no resultado da análise.



**Figura 5 – Dendrograma de similaridade das espécies isoladas nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo, nos períodos de verão e inverno.**

## **5.5. Caracterização quanto a fatores de patogenicidade das amostras de leveduras isoladas nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo.**

Das 58 amostras de leveduras testadas, observou-se que a maioria das amostras cresceu a 37°C. (**Tabela 8**).

Kwon-Chung *et al.*, (1985) e Hanel (1988) referem que o crescimento de espécies de leveduras a 37°C pode estar relacionado a fatores de patogenicidade.

Das amostras testadas, apenas (7) apresentaram atividade fosfolipásica positiva, dentre elas *Candida sake* (1), *Brettanomyces bruxellensis* (2), *B. custersianus* (1), *Rhodotorula ingeniosa* (1), *R. minuta* (1) e *R. mucilaginosa* (1) (**Tabela 8**).

As amostras de *Rhodotorula*, *Brettanomyces* e *Candida* que apresentaram atividade fosfolipásica positiva cresceram a 37°C, com exceção de *R. ingeniosa*. (**Tabela 8** e **Figura 6** ).

Algumas espécies como *Rhodotorula glutinis*, *R. minuta* e *R. mucilaginosa* que apresentam atividade fosfolipásica positiva e crescimento a 37°C, são referidas como patogênicas ao homem por Barnett *et al.*, 1990.

Samaranayake *et. al.*, (1984) não detectaram atividade fosfolipásica em espécies de *Candida tropicalis*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, consideradas espécies patógenas ao homem ( Barnett *et al.*, 1990). *Candida parapsilosis* com ocorrência no solo da praia de Casa Caiada, também não apresentou atividade fosfolipásica.

Peter *et. al.*, (1996) detectaram atividade fosfolipásica em amostras de *Rhodotorula rubra* em meio contendo gema de ovo. Segundo os autores leveduras como agentes oportunistas podem apresentar atividade fosfolipásica positiva.

A fosfolipase é teoricamente, considerada como fator de virulência em espécies de *Candida* segundo Samaranayake *et al.*, (1984).

A atividade proteásica positiva foi detectada em amostras de *Candida* e *Rhodotorula* (**Tabela 8** e **Figura 7** ).

Das amostras testadas apenas *Candida diddensiae* (1), *Rhodotorula ingeniosa* (1) e *R. Glutinis* (1) apresentaram atividade proteásica positiva.

Os resultados estão de acordo com (Meyers *et al.*, 1967, Ahearn *et al.*, (1968); Hagler e Ahearn, (1981) que demonstraram atividade proteásica em algumas espécies isoladas de ambiente marinho.

*Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Pichia* ( Ahearn *et al.*, 1968). Meyers *et al.*, (1967) testaram a atividade proteásica em isolados de ambiente marinho indicando que algumas espécies como *Candida punicea*, *C. pseudotropicalis*, *C. curiosa* e *C. lipolytica* apresentaram atividade proteásica positiva.

Os resultados obtidos quanto a atividade proteásica de *R. glutinis* estão de acordo com Vazquez *et. al.*, (1993) que demonstraram atividade proteásica em espécies de *Rhodotorula rubra* e *R. glutinis* em isolados de peixes.

## 6. CONCLUSÕES

- Espécies de *Candida*, *Rhodotorula*, *Brettanomyces* e *Trichosporon* ocorrem em solo e água de ambiente marinho no Brasil;
- *Candida vaccinii*, é citada pela primeira vez em ambiente marinho no Brasil;
- Maior número de isolamentos ocorre em solo de superfície;
- *Brettanomyces bruxellensis* apresentou maior freqüência de ocorrência em solo nas praias de Casa Caiada e Bairro Novo;
- Leveduras isoladas de ambiente marinho não demonstram resultados satisfatórios para atividade proteásica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHEARN, D.G.; ROTH Jr.; F.J. & MEYERS, S.P. – A comparative study of marine and terrestrial strains of *Rhodotorula*. **Can J. Microbial** v. 8. p. 121 – 132, 1962.

AHEARN, D.G.; ROTH Jr.; F.J. & MEYERS, S.P.; NICHOLS, R. A . Extracellular proteinases of yeast and yeast - like fungi. **Applied. Microbiology** v.16. p. 1370 – 1374, 1968.

AHEARN, D. G; ROTH, F. J. & MEYERS, S.P. – Ecology and characterization of yeasts from aquatic regions of South Florida. **Mar. Biol.**, New York: v.1. p. 291 – 308, 1968.

AHEARN, D. G. – Effects of environmental stress of aquatic yeasts population. In: Bella, W. – **Baruch Symposium in Marine Science: estuarine microbiological ecology**. Columbia, University of South Caroline Press, Columbia. p. 433 – 440, 1973.

ANDERSON J. H. – In vitro survival of human pathogenic fungi in seawater. **Sabouraudia** v.17. p. 1 – 12, 1979.

ANDERSON J. H. – In vitro survival of human pathogenic fungi in seawater. **Sabouraudia** v. 17. p. 13 – 22, 1979.

AUNSTRUP, K. Industrial prodution of roteolytic enzymes. In: Spencer, B. **Industrial aspects of biochemistry**. [ s. l]: Federation of European Biochemical Societes, p. 23-46, 1974.

BARNETT, J. A.; PAINE, R. W.; YARROW, D. **YEASTS: characteristics and Identification**. 4 ed. Cambridge, Cambridge: University Press, 1990, 1002p.

BARBOSA, A.M.B. **Variação espaço - temporal da abundância e biomassa bacteriana no sistema lagunar Ria Formosa** . M. Sc. Theses. University of Algarve, Faro. 1989.

BELTRÃO, A. L., MAIA, J. T. A. , OLIVEIRA, M. L. **Diagnóstico ambiental de Olinda.** Recife: CPRH, 1995. 160p.

BORREGO, J.J., ARRABAL, F., de VICENTE, A. GOMEZ, L. F., and ROMERO, P. Study of microbial inactivation in the marine environment. **J. Water Pollut. Control** Fed. v.55. p. 297-302, 1983.

BORREGO, J.J. and FIGUERAS, M. J. Microbiological quality of natural waters. **Microbiologia SEM** v. 1. p. 169-180, 1997.

BRASIL – Diretoria de Hidrografia e Navegação. **Tábuas de marés para 1999.** Niterói, 1999. 194 p.

BRISOU, J. Les levures et les champignons du milieu marin. **Bull. Soc. Fr. Mycol. Med.** v.4. n. (2), p.159-162, 1975.

BUCK, J.D. *Candida albicans*, Bacterial Indicators, Health hazards Associated with water, ASTMSTP 635. A.W. Hoadley and B. J. Dutka, Eds. **American Society for Testing and Materials.** p. 139 – 147, 1977.

COOK, A. H. **The Chemistry and Biology Yearts.** New York: Academic Press, 1958. 763 p.

COOKE, B.W.; PHAFF, H.J.; MILLER, M.W.; SHIFRINE, M. & KNAFP, E.P. Yeasts in polluted water and sewage. **Mycologia**, v.52. p. 210-220, 1960.

COSTA, A. L. MISEFARI, A. & AMATO, A. 1967 a. Enzymatic activities of mycetes . I. Enzymatic activity of *Candida albicans* in egg yolk – containing media. **Atti XIV Congresso Nazionale di Microbiologia, Messina Taormina.**

COSTA, A. L., MISEFARI, A. & AMATO, A. 1967 b. Enzymatic activities of mycetes II. Phosphatidase activity in *C. albicans* growing in media containing lecithin. **Atti XIV Congresso Nazionale di Microbilogia, Messina Taormina.**

COSTA, A. L., MISEFARI, A. & AMATO, A. On the enzymatic activity of certain fungi, VII. Phosphatidase pathogenic strains of *Candida albicans*. **Atti societa peloritana di scienze fiseche mathematische naturali**, XIV, p. 93 – 101, 1968.

CHEN, S.C.A. *et al.*, Phospholipase activity in *Cryptococcus neoformans*: A new virulence factor **The Journal of Infections Diseases** v. 175. p. 414 – 420, 1997

DABROWA, N; LANDAN, J.W. NEWCOMER, V.D. & PLUNKETT, O. A. survey of tide washed coastal areas of Southern California for fungi potentially pathogenic to man **Mycopathol. et Mycol. Appl.** v.24. p.137 – 150, 1964.

DAJOZ, R. **Ecologia geral**. 41 ed. Petrópolis: Vozes, 1983. 472p.

FARACO, B.F. C. & FARACO, B.A. Poluição hídrica micológica. **Rev. Bras. Med.**, v.33. p. 210-220, 1960.

FELL, J. W. & AHEEARN, S.P., MEXERS, S.P. and ROTH, F. J. Jr. Isolation of yeasts from Biscayne Bay, Florida, and adjacent benthic areas **Limnol. Oceanogr.** v. 5. p. 366-371, 1960.

FELL, J.W. & van UDEN, N.(1963) Yeasts in marine environments. In: Oppenheimer, C.H. -**Symposium on Marine Microbiology**. Springfield, Charles C. Thomas, p. 329-340, 1963.

FRAZIER, W.C. A method for the detection os changes in gelatin due to bacteria. **J. infect. Dis.**, v. 39. p. 302 – 309, 1926.

FRAZIER, W.C. **Microbiologia de los alimentos** 2 ed. Zaragoza, Acribia, 1976 . 522p.

GAUTHIER. M.J. **Poluciones bacterianas em el medio marino**. In LA polucion de las Aguas Marinas, ed. J. Peres, Omega, Barcelona. 1980, p. 127 – 141.

GENTLES, J. C. Et LA TOUCHE, C. J. – **Yeast as human and animal pathogens**. In: ROSE and HARRISON, ed – The yeasts. Vol. I. London Academic Press, 1969, p. 107 – 182.

GOTO. S.; YAMASATO, K.; OKUNO, D. Et Lizuka, H. – Yeasts from the Pacific ocean. **Proc. IV I FS: Ferment. Techonol.** Today, 1972.

HAGLER A. N. **Ecologia e Taxonomia de leveduras em um Estuário e Ambientes Marinhos do Rio de Janeiro** D. Sc Theses, 1978, 400 p. UFRJ. Rio de janeiro.

HAGLER A. N., and S.S. SANTOS; L.C. MENDONÇA – HAGLER. Yeasts of a polluted Brasilian estuary. **Ver. Microbiol.** v.10 n. (1), p. 36-41, 1979 c.

HAGLER A. N., and S.S. SANTOS.; L.C. MENDONÇA – HAGLER. Vitamin requeriments of yearts isolated from seawater in Rio de janeiro. **Ver. Microbiol** v. 10 n. (3), p.88 - 91, 1979 d.

HAGLER A. N., L.C. MENDONÇA – HAGLER, C. A. ROSA, & P.B. MORAIS. Yearts as an example of Microbiol diversity in Brazilian Ecosystems. Estrutura: IN **Decologia Brasileira** Vol. 1. Funcionamento e Manejo de Ecossistemas (F. A. ESTEVES ed. ) UFRJ, Rio de janeiro, p. 225 – 244, 1979.

HAGLER, A . N. and L.C. MENDONÇA-HAGLER. Yeasts from marine anda estuarine waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 41 n. (1), p.173 – 178, 1981.

HAGLER, A. N., and D. G. AHEARN. A rapid DBB method for detection of basidiomycetous yeasts. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v. 31 n. (2), p.204-208, 1981.

HAGLER, A. N., R.B. de OLIVEIRA, and L. C. Mendonça-Hagler. Yeasts in the intertidal sediments of a polluted estuary in Rio de Janeiro, Brasil. Antonie van Leeuwenhoek **J. Microbial.** v. 48. p53-56, 1982.

HAGLER A. N., and S.S. SANTOS.; L.C. MENDONÇA – HAGLER. ; FILHO, J.B.; SANTOS. E. A.; FARAGE. S. SHRANK, A. ; de OLIVEIRA, R. B. Evaluation of Microbial pollution indicators in Brazilian tropical and subtropical marine surface waters. **The Science of the total enviroment.** v. 58. p.151 – 160, 1986.

HAGLER A. N., & AHEARN .D.G. **Aquatic Yeasts** IN ROSE, A. H. HARRISON, J.S. (Eds) *The Yeasts*. 2 ed. London. Academic Press, v. 1. p. 181 – 206, 1987.

HANEL, A. Activity of *Candida albicans* isolated from the intestine of psoriatic patients. **Zentrun Fiir Dermatologie**, Germany, v. 31. p. 451-457, 1988.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzymes production by fungi. **Mycologia**, v. 67, n.(3), p. 597-607, 1975.

HOMMA, MICHIO *et al.*, Detection of intracellular forms of secretory aspartic proteinase in *Candida albicans* **Journal of General Microbiology**. London, v. 138, p. 627 – 633, 1992.

HURLEY, R. , LOUVOIS, J. de, and MULHALL, A. Yeasts as human and animal pathogens. In: **The Yeasts**, 2nd ed., by Rose, A . H. and Harrison, J. S., Academic Press, London, 1987. p. 207 – 281.

JIMÉNEZ, S. M.C. **Enzimas Extracelulares ( Fosfolipase, lipase, Urease e Protease ) em Amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* nas formas Micelial (M) e leveduri forme (Y)**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Colegiado do Curso de Mestrado em Criptogamos, 1993, UFPE. 106p.

KREGER - van RIJ, N. J. W. **The yeast: a taxonomic study**. 3 ed Elsevier Sci. Publi: Amsterdan, 1984. 1091 p.

KISHIMOTO, R. A., BAKER, G.E. Pathogenic and potentially pathogenic fungi isolated from beach sands and selected – soils of oahu, Hawaii. **Micologia** v. 61. p. 537-547, 1969.

KOMAGATA K. & NAKASE. New species of the genus *Candida* isolated from prozeu foods. **J. Gen. Appl. Mierobiol.** v. 11. p. 255 – 267, 1965.

KWON – CHUNG, K. J. *et al.*, Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 49. p. 571-575, 1985.

KWON – CHUNG, K. J. & BENNET, J.E. **Medical Mycology**. – Lea & Febriger. U.S.A, 1992.

LACAZ, C. S.; PORTO, C. ; MARTINS, J.E.C. **Micologia Médica: fungos actinomicetos e algas de interesse médico**, 8<sup>a</sup> ed. São Paulo: Xavier - EDUSP, 1991, 695p.

LODDER, J., & N.J. W. KREGER. van - RIJ. **The yeasts**. North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1952. 713p.

LODDER - J. **The Yeast: a taxonomic study**. Oxford: North Holland Publishing Company, 1970. 1385p.

LOURIA, D.B., BRAYTON, R.G. & FINKEL, G. Studies on the pathogenesis in experimental *Candida albicans* infections in mice. **Sabouraudia**. v.2, p.271-283, 1963.

MACDONALD. F. & ODDS, F. C. Inducible proteinase of *Candida albicans* in diagnostic seology and in the pathogenesis of systemic candidosis. **Journal of Medical Microbiology**, v.13. p.423 – 425, 1980.

MAGO., KHULLER. Subcellular localization of enzymes of phospholiped metabolism in *Candida albicans*. **Journal of medical and Veterinary Mycology**. India. v. 28. p. 353 – 362, 1990.

MARRIE, T.J., COOPER, H.J.; COSTER TON, J. W. Ultrastructure of *Candida parapsilosis* endocarditis **Infection & Immunity** v.45. p. 390-398, 1984.

MEYERS, S.P.D.G. AHEARN, and F.J. ROTH. JR. Mycological investigations of the Black Sea. **Bull. Mar. Sci.** v.17. p. 576-596, 1967.

MEYERS, S.P. AHEARN, D.G.; GRUNKEL, W. & ROTH JR. F.J. Yeasts from the north Sea. **Mar. Biol.**, New York, v.1. p.118 – 123, 1967.

MEYERS, S.P., & AHEARN, D. G., Implications of yeasts and yeast-like fungi in marine Process. **Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven Suppl.**, v.5. p.321-338, 1974.

MORRIS, E. O., Yeasts of marine origin. **Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.**,v.6. p.201-230, 1968.

MORRIS, E.O., Yeasts from the marine environment. **J. Appl. Bacteriol.**, v.38. p. 211-223, 1975.

NEDER, R. N. **Microbiologia: manual de laboratório**. São Paulo, Ed. Nobel, 1992. p. 81, 88, 89, 90, 95, 96, 98.

NUNES. M. C. Ria de Faro-Olhao: Estudo bacteriológico da água. **Cuadernos da Área de Ciencias Mariñas** v.1. p.357-364, 1984.

PAGNOCCA F. C. HAGLER, A. N., and L. C. MENDONÇA-HAGLER. Yeasts associated with the white shrimp *Peneaus schmitti*, sediment, and water of Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brasil. **Yeast**, v.5. p. S479-S483, 1989

PAULA, C. R. **Contribuição ao estudo das leveduras em praias da Baixada Santista (SP)**. Tese de Mestrado, Instituto de Ciências – Biomédicas da Universidade de São Paulo: São Paulo.1978, 86 p.

PAULA, C. R.; PURCHIO, A.; GAMBALE, W. Yeasts from beaches in the Southem Area of São Paulo state. "Baixada Santista", Brasil. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 14 n.(2), p. 136-143,1983.

PETER, M. , SILKE L. , KAI – UWEH., KARL, G. Detection of extracellular phospholipase activity in *Candida albicans* and *Rhodotorula rubra*. **Mycopathologica**

v. 135. p.149 – 155, 1996.

PIONTELLI, E. & TORO, M.A. Yeasts communities in sandy soil (a beach of V Region, Chile) II, **Boletim Micológico**, v. 2. p, 109-118, 1985.

PINTO, I. M. de A.; CAVALCANTI, M. A. Q.; PASSAVANTE, J. Z, de O. Fungos filamentosos do solo e da água da praia de Boa Viagem, Recife-PE. **Boletim Micológico**, v. 7 n.(1-2), p. 39-45, 1992.

PRICE, M.F.: CAWSON, R. A. PHOSPHOLIPASE ACTIVITY. In *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 15. p.179–195, 1977.

PRICE, M.F., WILKINSON, ID.; GENTRY, L.O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20. p. 7-14, 1982.

PUCH, D. & CAWSON, R A. The cytochemical localization of phospholipase A and lysophospholipase in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v.13. p.110–155, 1975.

QUEIROZ, L. E. **Análise Quanti - Qualitativa de leveduras isoladas de algas marinhas**. I - Recife, Instituto de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, publ. 677,1972.

ROSE, A. H. HARRISON, J. S. **The yearts**. New York, Academic Press. v. 3. p. 148–156, 1970.

ROSE, A. H. HARRISON, J.S. **The yearts** 2<sup>a</sup> ed. vols. 1 e 2 ( Caps. 1,2, 3) Academic Press – USA, 1987. 423 p.

RÜCHEL, R.; TEGELEER, R. & TROSTIM. A comparison of secretary proteinases from different strains of *Candida albicans*. **Sabouraudia**, v. 20. p.233 – 244, 1982.

RÜCHEL, R., BONING, BORG, M. Caracterization of a secretory proteinase of *Candida parapsilosis* and evidence for the absence of enzyme during infection in vitro. **Infection and imunity**. v. 56. p. 411 – 419, 1986.

SAMARANAYAKE, L. P.; RAESIDE, J. M ; MACFARLANE, T.W. Factors affecting the phospholipase activity of *Candida* species in vitro. **Sabouraudia**, v. 22. p.201- 207, 1984.

SAMUELS, K. D.Z. ; HEALE, J.B. ; LLEWELLYN, M. Caracteristics relating to the patogenity of *Metarhizium anisopliae* toward *Nilaparvata lugens*. **Jornal of Invertebrate Pathology**, England, v. 53. p. 25-31, 1989.

SPENCER, J.E.T.; GOUN, J. & GARDNER, NR. Yeasts isolated from the South Saskatchewan a polluted river. **Can. J. Microbiol.**, v.16. p.1051-1057, 1970.

STENDERUP. A. Yeast ecology Eds. Preusser: **Medical Mycology**, 2 bl. Bakt. Suppl. v.8. p.75–79, 1980.

SUDENE. **Recursos naturais do nordeste investigação e potencial**. Recife: 1974 . 95p. (Sumário de periódicos).

SUMNER, J.; MYRBACK, K. **The enzymes – Chemistry and Mechanism of Action.** vols. 1 e 2 ( Caps. 1 e 2), 1951 – Academic Press, New York.

VAZQUEZ – JUAREZ R., ASCENCIO F., ANDLID T., GUSTAFSSON L., WADSTRON, T. The expression of potential colonisation factors of yeasts isolated from fish during different growth conditions. **Can. J. Microbiol**, v.39. p. 1135 – 1141, 1993.

VOLZ, P.A.; JERGER, DE ; WURZBURGER, A. J. HISER, J. L. A preliminary survey of yeasts isolated from marine habtats at Abaco Islands, The Bahamas. **Mycopath. Et. Mycol. Appl.** v. 54. p.313-316, 1974.

WERNER, H. Unterserchungen über die lipase aktivitat at bei hefen und hefeahnlichen pilzen. v. 91. p. 351– 355, 1966.

WOOLLETT, L. L. Et HENDRICK, L.R. – Ecology of yeasts in polluted water Antonie van Leenwenhoek, v.36. p. 427– 435, 1970.