

Universidade Federal de Itajubá  
Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos

Brenda Mayra Fernandes de Carvalho

Qualidade hídrica e perfil de resistência de bactérias heterotróficas em  
águas de nascentes sobre diferentes usos do solo, na microbacia do  
ribeirão José Pereira (Itajubá – MG)

Itajubá (MG)

2015

Brenda Mayra Fernandes de Carvalho

Qualidade hídrica e perfil de resistência de bactérias heterotróficas em águas de nascentes sobre diferentes usos do solo, na microbacia do ribeirão José Pereira (Itajubá – MG)

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências em Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Melloni

Itajubá (MG)

2015

Brenda Mayra Fernandes de Carvalho

Qualidade hídrica e perfil de resistência de bactérias heterotróficas em águas de nascentes sobre diferentes usos do solo, na microbacia do ribeirão José Pereira (Itajubá – MG)

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Recursos Hídricos como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências em Meio Ambiente e Recursos Hídricos, sob a orientação do Prof. Dr. Rogério Melloni.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rogério Melloni  
Universidade Federal de Itajubá

Profa. Dra. Ana Lúcia Fonseca  
Universidade Federal de Itajubá

Profa. Dra. Marileia Chaves Andrade  
Faculdade de Medicina de Itajubá

Itajubá (MG)

2015

*À minha família. O que há de mais precioso.*

## Agradecimentos

Indubitavelmente, primeiro a Deus e à Nossa Senhora. Em quem me apego em todos os momentos de dificuldade, e aos quais sempre agradeço nos momentos de alegrias e conquistas.

À mamãe, Efigênia. Que sempre esteve comigo, dando força, exemplo, amor e principalmente, orando sempre por mim.

Ao papai, Pedro. Pela confiança, apoio e incentivo.

À irmã e amiga, Bruna. Não poderia haver outra melhor.

Aos meus sobrinhos, Luís e Clarinha. Como eu poderia imaginar que dois serezinhos ainda tão pequenos pudessem ensinar tanto... Como eu amo vocês!

Ao cunhado, Felipe, que com seus questionamentos me fez olhar sempre mais adiante.

Ao professor e orientador, Rogério Melloni. Pela dedicação, disponibilidade, empenho, confiança e amizade. O senhor foi sempre muito generoso.

Ao amigo e técnico do laboratório de microbiologia, Paulo. Muito obrigada por tamanho auxílio, paciência, disponibilidade e amizade.

Aos amigos Alexandre, Bob, Poeta, João Luís, João Vítor, Oswaldinho, pelo companheirismo, amizade, apoio e enorme disponibilidade em auxiliar na execução do trabalho.

Às queridas, Olívia, Bárbara e Kelly. Muito obrigada por tamanha disponibilidade.

Vocês foram muito gentis e generosas. Obrigada sempre!

Ao amigo, Neto, sempre disposto a ajudar a todos. Muito obrigada!

À amiga Karina. Obrigada pela presença, pela parceria e enorme amizade.

À querida colega, Paulinha Ranzani. Seus conhecimentos e auxílio contribuíram de forma valorosa.

Aos professores do MEMARH. Todos vocês acrescentaram muito. Agradeço, especialmente, aos professores da banca da qualificação, Ana Lúcia e Fabrina, que contribuíram de forma grandiosa.

Ao professor da Faculdade de Medicina, Luís Marcos. O senhor foi muito compreensivo. Enorme gratidão.

Aos colegas da FMIt que, por vezes, foram muito compreensivos e prestativos.

À professora da FMIt, Marilea, pela amizade, apoio e disponibilidade.

Aos colegas Marcel, Ivan e Gustavo, pelo incentivo e amizade.

À CAPES, órgão de fomento que propiciou a execução e desenvolvimento do trabalho.

À Unifei e ao MEMARH, que possibilitaram enorme crescimento pessoal, acadêmico e profissional. Gratidão, alegria e orgulho por ser Unifei.

ÁGUAS,

a poesia canta em verso e prosa:

*“Foi um rio que passou em minha vida”*

(Paulinho da viola)

## RESUMO

A microbacia do Ribeirão José Pereira está totalmente inserida no município de Itajubá, MG. É uma área bastante diversificada e de grande importância, pois é o local onde estão as principais nascentes hídricas que fornecem água para o abastecimento da cidade. A população rural da microbacia faz intenso uso dessas águas para diversos fins, inclusive o nutricional e, por isso, deve haver uma preocupação com a sua qualidade. O objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade hídrica e o perfil de resistência de bactérias heterotróficas em nascentes sobre diferentes usos do solo da microbacia. Para isso, foram realizadas coletas de amostras em 12 nascentes, em duas estações do ano, seca e chuvosa, seguindo-se a determinação de atributos físico (turbidez), químicos (condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, pH, carbono orgânico total, acidez, alcalinidade e dureza) e microbiológicos (densidade total de bactérias heterotróficas, número mais provável de coliformes totais e *Escherichia coli*), incluindo testes de resistência bacteriana frente a 10 antimicrobianos: penicilina, vancomicina, aztreonam, cefalexina, amoxicilina, cefoxitima, cefepime, ciprofloxacino, cloranfenicol e gentamicina. Os dados obtidos foram avaliados por meio da análise de componentes principais. Os resultados mostraram que não foi possível estabelecer uma relação entre a qualidade hídrica e o perfil de resistência bacteriana com as formas de uso e cobertura do solo no entorno das nascentes, entretanto, observou-se melhor qualidade hídrica na estação seca.

Palavras-chave: Antibióticos. Potabilidade hídrica. Resistência bacteriana.

## **ABSTRACT**

Ribeirão José Pereira watershed is fully inserted in the municipality of Itajubá, MG. It's a very diverse and very important area because it is the place where the main water springs supplying water to supply the city. The rural population of the watershed makes heavy use of groundwater for various purposes, including nutrition and, therefore, there must be a concern for quality. The aim of this study was to evaluate the water quality and profile of resistance of heterotrophic bacteria in springs on different land uses of the watershed. For this, samples collections were conducted in 12 springs in two seasons, dry and wet, followed by the determination of physical attributes (turbidity), chemical (electrical conductivity, dissolved oxygen, pH, total organic carbon, acidity, alkalinity and hardness) and microbiological (total density of heterotrophic bacteria, most probable number of coliforms and *Escherichia coli*), including bacterial forward resistance tests to 10 antimicrobial agents: penicillin, vancomycin, aztreonam, cephalexin, amoxicillin, cefoxitima, cefepime, ciprofloxacin, chloramphenicol and gentamicin. The data were evaluated by principal component analysis. The results showed that it was not possible to establish a relationship between water quality and bacterial resistance profile with forms of land use and land cover in the vicinity of springs, however, it was observed better water quality in the dry season.

Key word: Antibiotics. Water potability. Bacterial resistance.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Mecanismos genéticos de evolução e aquisição de resistência bacteriana por meio de conjugação, transdução e transformação. A célula em azul contém plasmídeos e um deles contendo transposon é transferido para outra célula de espécie diferente (rosa), que o incorpora e o transmite para seus descendentes. 25
- Figura 2** – Período de desenvolvimento dos principais antimicrobianos. 28
- Figura 3** - Possíveis rotas de fármacos no ambiente. 31
- Figura 4** - Fluxograma das principais etapas do estudo. 34
- Figura 5** - Mapa da cobertura do solo e da hidrografia da microbacia do ribeirão José Pereira. Áreas de mata (roxo), áreas de pastagem (verde), núcleo urbano (cinza), áreas de cultivo (vermelho), áreas de degradação do solo (laranja). 36
- Figura 6** - Amostras hídricas coletadas em três repetições. 38
- Figura 7** - Imagens do ponto de coleta 1 localizado à 22°25'13,4" (S) e 45°24'03,5" (O) no município de Itajubá (MG). Nascente (A), cobertura do solo na área da nascente (B). 39
- Figura 8** - Imagens do ponto de coleta 2, localizado à 22°25'08,1" (S) 45°23'35,1" (O) no município de Itajubá (MG). 39
- Figura 9** - Imagens do ponto de coleta 3 localizado à 22°24'50,1" (S) e 45°23'13,6" (O), no município de Itajubá (MG). Cobertura do solo (A), nascente (B). 40
- Figura 10** - Imagens do ponto de coleta 4 localizado à 22°26'11,0" (S) e 45°24'04,4" (O), no município de Itajubá (MG). Cobertura do solo (A), recurso hídrico (B). 40
- Figura 11** - Imagens do ponto de coleta 5 localizado à 22°26'00,6" (S) e 45°24'49,4" (O), no município de Itajubá (MG). Recurso hídrico (A), cobertura do solo (B). 41
- Figura 12** - Imagens do ponto de coleta 6 localizado à 22°23'47,2" (S) e 45°26'35,0" (O), município de Itajubá (MG). Cobertura do solo (A), nascente (B). 42
- Figura 13** - Imagens do ponto de coleta 7 localizado à 22°23'45,0" (S) e 45°26'41,4" (O), município de Itajubá (MG). Cobertura do solo (A), nascente (B). 42

- Figura 14** - Imagens do ponto de coleta 8, localizado à 22°24'40,2' (S) e 45°26'39,5'4" (O), município de Itajubá(MG). Cobertura do solo (A), nascente (B). 43
- Figura 15** - Imagens do ponto de coleta 9 localizado à 22°25'04,4' (S) e 45°26'08,9" (O), no município de Itajubá(MG). Cobertura do solo (A) e (B), recurso hídrico (c). 43
- Figura 16** - Imagens do ponto de coleta 10 localizado à 22°23'54,1'(S) e 45°25'12,8"(O), no município de Itajubá(MG). Cobertura do solo (A) e (C), nascente (B). 44
- Figura 17** - Imagens do ponto de coleta 11, localizado à 22°25'45,9'(S) e 45°22'06,7"(O), no município de Itajubá(MG). Nascente (a), cobertura do solo (b). 44
- Figura 18** - Imagens do ponto de coleta 12, localizado à 22°25'6,11'(S) e 45°22'2,98"(O),município de Itajubá(MG) . Nascente (A), cobertura do solo (B). 45
- Figura 19** - Placas de Petri com as unidades formadoras de colônia. Determinação da densidade total de bactérias heterotróficas nas amostras hídricas. 46
- Figura 20** - Determinação do número mais provável de bactérias do grupo coliformes totais e *Escherichia coli* pelo método Colilert. Preparo das amostras hídricas (A), cartela quanti Tray (B). 46
- Figura 21** - Método volumétrico de neutralização para determinação de atributos físicos e químicos das amostras hídricas. 48
- Figura 22** - Análise fenotípica das colônias e isolamento das mesmas em tubos inclinados. 48
- Figura 23** - Antibiograma. Placas de Petri com discos de antibióticos (A), mensuração do diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano com paquímetro digital (B). 50
- Figura 24** - Esquema das análises microbiológicas e do antibiograma. 50
- Figura 25** – Percentual de resistência, sensibilidade e perfil intermediário de isolados de bactérias heterotróficas identificados nas amostras de água coletadas nas estações seca e chuvosa em todas as nascentes. 63

**Figura 26** – Percentual de cepas de bactérias heterotróficas resistentes aos antimicrobianos testados, em amostras de água das nascentes, nas estações seca e chuvosa. 64

**Figura 27** – Percentual de resistência, sensibilidade e sensibilidade intermediária das cepas isoladas na estação seca (à esquerda) e na estação chuvosa (à direita), frente aos antimicrobianos testados, observado em cada uma das doze nascentes estudadas. 66

**Figura 28** - Dendrograma de similaridade entre as colônias selecionadas na estação seca, construído por meio de suas características fenotípica-culturais. A linha tracejada indica a separação dos grandes grupos com 70% de similaridade. 68

**Figura 29** – Dendrograma de similaridade entre as colônias selecionadas na estação chuvosa, construído por meio de suas características fenotípica-culturais. A linha tracejada indica a separação dos grandes grupos com 70% de similaridade. 69

**Figura 30** - Componentes principais CP1 x CP2 (a) e CP1 x CP3 (b) das médias dos atributos químicos, físicos e microbiológicos e do percentual de resistência bacteriana frente a 10 antimicrobianos das amostras hídricas referentes às doze nascentes (▲), coletadas na estação chuvosa. 71

**Figura 31** - Componentes principais CP1 x CP2 (a) e CP1 x CP3 (b) das médias dos atributos químicos, físicos e microbiológicos e do percentual de resistência bacteriana frente a 10 antimicrobianos, das amostras hídricas referentes às doze nascentes (▲), coletadas na estação seca. 72

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Principais classes de antimicrobianos, com seus respectivos mecanismos de ação e alguns seus representantes. 29
- Quadro 2** - Coordenadas das nascentes de estudo com as respectivas formas de uso do solo. 35
- Quadro 3** - Antibióticos usados no antibiograma com suas respectivas classes e valores de referência para a classificação quanto à sensibilidade. 49
- Quadro 4** - Resultado da análise gráfica das componentes principais feita para as amostras hídricas das nascentes estudadas em suas respectivas áreas nas estações seca e chuvosa. 75

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Média dos atributos físicos e químicos das amostras de água coletadas na estação seca (S) e chuvosa (C). 53
- Tabela 2** – Resultados da avaliação da densidade de bactérias heterotróficas obtidos para as doze nascentes nas estações seca (esquerda) e chuvosa (direita).58
- Tabela 3** - Valores médios do número mais provável de bactérias do grupo dos coliformes totais e *Escherichia coli* por 100 mL de amostra hídrica, referentes aos doze pontos de coleta nas estações seca e chuvosa. 61
- Tabela 4** - Escores dos atributos físicos, químicos e microbiológicos determinados em amostras de água de doze nascentes, na estação seca, nos três componentes principais. 73
- Tabela 5** – Escores dos atributos físicos, químicos e microbiológicos determinados em amostras de água de doze nascentes, na estação chuvosa, nos três componentes principais. 74

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. OBJETIVOS .....	18
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
3.1. Qualidade da água para consumo humano .....	19
3.1.1. Indicadores microbiológicos da qualidade da água .....	21
3.2. Resistência bacteriana .....	23
3.3. Antibióticos .....	27
3.3.1. Antibióticos no ambiente.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1. Caracterização da área de estudo.....	33
4.2. Metodologia .....	33
4.2.1. Mapeamento das nascentes e caracterização da área de estudo .....	34
4.2.2. Coleta das amostras hídricas .....	37
4.2.3. Determinação da densidade total de bactérias heterotróficas e contagem do número mais provável de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> ..	45
4.2.4. Análises físicas e químicas.....	47
4.2.5. Isolamento e análise fenotípica das colônias.....	48
4.2.6. Antibiograma.....	49
4.2.7. Análise estatística .....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	52
5.1. Análises físicas e químicas .....	52
5.2. Análises microbiológicas .....	56
5.3. Teste de resistência aos antimicrobianos .....	63
5.4. Análise de agrupamento dos isolados bacterianos em função de seus aspectos morfoculturais .....	67
5.5. Análise de componentes principais.....	70
6. CONCLUSÕES .....	77
REFERÊNCIAS	
ANEXOS	

# 1 INTRODUÇÃO

É frequente o aumento de microrganismos resistentes a antibióticos, que podem causar infecções muito graves e, até mesmo, não tratáveis, nos ambientes naturais.

A preocupação com tais microrganismos é uma questão de saúde pública global, pois existem indícios de que espécimes resistentes poderão causar vastos efeitos na medicina e nas sociedades em decorrência da falta de antibióticos capazes de combatê-los.

A elevada prevalência desses microrganismos no ambiente, que há pouco tempo se restringia à área hospitalar, é uma consequência das atividades humanas relacionadas, principalmente, ao descarte inadequado de resíduos, ao desmatamento, à degradação dos solos, além da utilização indiscriminada de antimicrobianos nas medicinas humana e veterinária.

A contaminação dos recursos hídricos, em consequência dessas atividades, é de especial importância, devido à necessidade da água para a manutenção da vida. Em algumas regiões, águas advindas de fontes naturais, como as nascentes, são a única opção para as populações que fazem o seu uso, na maioria das vezes, sem nenhum tratamento prévio..

Sabe-se que a qualidade das águas naturais está diretamente relacionada às condições do ambiente, por isso a preservação dos solos e da cobertura vegetal é tão indispensável para a sua manutenção. Existe um frágil equilíbrio entre todos os componentes ambientais e a qualidade da água, portanto, qualquer alteração em um ou mais desses componentes pode ocasionar sua deterioração.

Para se avaliar a qualidade da água utilizada para consumo humano são feitos testes físicos, químicos e microbiológicos, por meio dos quais, avaliam-se atributos estabelecidos pela Portaria 2914/11 do Ministério da Saúde, a qual estabelece os critérios de potabilidade e de vigilância sanitária das águas destinadas ao consumo humano. A qualidade microbiológica, por exemplo, é determinada por meio da pesquisa de grupos específicos de microrganismos, que são referenciados como indicadores da qualidade hídrica, dentre os quais se destacam as bactérias heterotróficas e a *Escherichia coli*.

Bactérias heterotróficas não são patógenos potenciais, entretanto em elevadas concentrações podem ocasionar doenças oportunistas, especialmente em grupos de maior susceptibilidade, como crianças e idosos. A existência de bactérias heterotróficas, com alto grau de resistência nos recursos hídricos indica intenso processo de degradação ambiental e oferece risco ainda maior aqueles que fazem uso desses recursos.

A *Escherichia coli*, uma das principais representantes do grupo coliforme total, está presente em grande quantidade nas fezes de mamíferos e, por isso, também é utilizada como indicador de qualidade hídrica. A sua presença na água pode ser relacionada à contaminação fecal, que a torna o recurso hídrico contaminado uma fonte de doenças infecciosas, pois os principais agentes causadores destas doenças são patógenos fecais, transmitidos por meio da rota oral-fecal.

Entre diversos outros ensaios, a avaliação do perfil de resistência de espécimes presentes na água, frente a antimicrobianos específicos, não tem sido realizada, apesar de já ter sido sugerida. Essa avaliação, mais minuciosa, é de simples execução e, apesar disso, e de sua importância para a saúde humana, não é estabelecida como critério de controle da qualidade hídrica destinada ao consumo humano.

Devido à preocupação com a utilização das águas de nascentes pela população da microbacia do ribeirão José Pereira e visando estabelecer uma relação entre a qualidade da água, o perfil de resistência das bactérias heterotróficas nela presentes e as formas de uso do solo no entorno das nascentes, desenvolveu-se o presente trabalho.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a qualidade de águas de nascentes da microbacia do Ribeirão José Pereira, Itajubá (MG), quanto aos aspectos físicos, químicos e microbiológicos, incluindo o perfil de resistência de bactérias heterotróficas a dez antimicrobianos, e associá-lo às formas de uso do solo no entorno das nascentes.

### 2.2 Objetivos específicos

- Mapear as principais nascentes da microbacia do ribeirão José Pereira quanto a cobertura e uso do solo;
- Analisar os atributos físico (turbidez), químicos (condutividade elétrica, oxigênio dissolvido, pH, carbono orgânico total, acidez, alcalinidade e dureza) e microbiológicos (contagem de coliformes totais, *Escherichia coli* e densidade de bactérias heterotróficas) das amostras hídricas, separadamente, e concluir sobre a qualidade;
- Definir as relações entre os atributos físicos, químicos, microbiológicos e o perfil de resistência na determinação da qualidade hídrica das águas, por meio da análise de componentes principais e associar a qualidade das águas às formas de uso do solo;
- Analisar fenotipicamente os isolados bacterianos (cor, formato, aspecto da borda, brilho e goma) de forma a possibilitar o agrupamento de grupos dominantes nas águas;
- Analisar a influência da estação na qualidade das águas.

## **3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **3.1 Qualidade da água para consumo humano**

A água, como se sabe, é um recurso natural e um bem essencial à sobrevivência humana e de todos os seres vivos, além de ser indispensável ao exercício de suas atividades. Apesar de sua importância, a sua utilização mantém uma relação ambígua com o ambiente, pois ao utilizá-la, o homem tem degradado este recurso e a área onde está inserido, por meio da poluição e devastação dos mesmos (HELLER; PÁDUA, 2006).

Somado à crescente deterioração deste recurso e ao aumento do seu consumo, existe também o problema da distribuição irregular da água nas diversas regiões do planeta. Existem áreas onde ocorre real escassez, senão ausência dela (CAVALCANTI, 2014).

Em decorrência desses fatores que dificultam o acesso à água de qualidade muitas populações fazem uso de fontes alternativas para o seu abastecimento. Isto ocorre especialmente nas zonas rurais, onde se utilizam muito frequentemente, águas de nascentes e outras fontes naturais, muitas vezes com qualidade duvidosa (PERDOMO et al., 2006).

A utilização de água advinda de fontes alternativas é bastante expressiva, por isso, e pela sabida importância do consumo de água com qualidade, para a manutenção e preservação da saúde humana, o controle da qualidade da mesma, independentemente da fonte, deve ser um objetivo primordial nas sociedades (PERDOMO et al., 2006).

No trabalho realizado por Amaral et al. (2003), foram avaliadas 180 amostras hídricas utilizadas para consumo humano advindas de fontes localizadas em 30 propriedades rurais, situadas na região Nordeste do Estado de São Paulo. Destas, 96,7 % foram consideradas fora dos padrões microbiológicos de potabilidade, concluindo-se assim, que a água consumida a partir de fontes naturais sem tratamento prévio é considerada um importante fator de risco para a ocorrência de doenças por veiculação hídrica.

Para se estabelecer a qualidade hídrica, a portaria 2914/2011 do Ministério da Saúde (MS) dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da água, independentemente da sua origem, além de estabelecer os padrões de potabilidade, por meio de valores de referência para atributos físicos, químicos e microbiológicos. Assim, a água para consumo humano em toda e qualquer situação, incluindo fontes individuais como poços, minas, nascentes, entre outras, deve ser livre de bactérias do grupo coliforme total e *Escherichia coli* em 100 mL de amostra e não deve exceder a contagem de bactérias heterotróficas acima de 500 UFC/mL (BRASIL, 2011).

Nos artigos 2º e 4º do capítulo I da portaria 2914/11 do MS ficam estabelecidos que:

Art. 2º.

Esta Portaria se aplica à água destinada ao consumo humano proveniente de sistema e solução alternativa de abastecimento de água.

Art. 4º.

Toda água destinada ao consumo humano proveniente de solução alternativa individual de abastecimento de água, independentemente da forma de acesso da população, está sujeita à vigilância da qualidade da água.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2004), as águas naturais, como são as de nascentes, são definidas como aquelas obtidas diretamente de fontes naturais ou captadas de fontes subterrâneas por extração, com conteúdo de sais minerais e oligoelementos em quantidade inferior ao mínimo estabelecido para serem classificadas como água mineral natural. Estas águas possuem, naturalmente, uma flora bacteriana em sua composição, definida como microbiota autóctone (DIAS, 2008). Ainda, segundo esse autor, podem também estar presentes microrganismos alóctones, que são aqueles que estão presentes por contaminação e não são próprios da fonte.

Conforme Amaral (2007), a população microbiana aquática reflete as condições do ambiente terrestre circundante e as atividades exercidas nele. Atividades humanas, agrícolas e pecuárias mal exercidas têm causado impactos nos ecossistemas aquáticos, com conseqüentes alterações em suas comunidades e na qualidade hídrica.

### 3.1.1 Indicadores microbiológicos da qualidade da água

Diversos são os patógenos que podem ser veiculados pelos recursos hídricos, dentre os quais, vírus, fungos, protozoários e bactérias. Para avaliá-los são feitas análises microbiológicas em amostras de água, entretanto, devido aos custos, não é viável que se analisem um número muito grande de microrganismos, por isso, priorizam-se grupos que contêm agentes, potencialmente, causadores de doenças (HIRAI, 2013).

A pesquisa de tais agentes é muito importante, pois conforme dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), anualmente, mais de 800 mil pessoas morrem em todo o mundo em virtude de doenças transmitidas pela água contaminada com microrganismos variados, o que torna estas doenças uma das causas mais importantes de mortes mundialmente (WHO, 2014).

Os principais indicadores usados para a avaliação da qualidade microbiológica da água, citados na Portaria 2914/11 do MS, são as bactérias do grupo coliforme, sendo a *Escherichia coli* a principal, e as bactérias heterotróficas.

De acordo com Tortora et al. (2012, p. 781) coliformes são definidos como bactérias aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, Gram negativas, não formadoras de esporos e fermentadoras de lactose com formação de gás após 48 horas de incubação a 35 °C em caldo lactosado. Ainda, segundo os autores, nem todos os microrganismos pertencentes a este grupo são exclusivamente entéricos, muitos estão presentes no solo, em plantas e na água. Conforme Duarte (2011) as principais bactérias deste grupo pertencem aos gêneros *Escherichia*, *Aerobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiela* e outros que quase nunca estão presentes em fezes, como a *Serratia*. Segundo a portaria do MS, águas destinadas ao consumo humano devem estar livres de coliformes totais em 100 mL de amostra.

O subgrupo coliforme fecal, também conhecido como termotolerante por conter bactérias capazes de fermentar a lactose em temperaturas superiores a 40 °C, também é utilizado para se estabelecer a qualidade microbiológica da água, e assim como no grupo dos coliformes, os microrganismos deste subgrupo também não são exclusivos do trato intestinal, porém se relacionam mais diretamente à contaminação por material fecal, quando presentes. A bactéria *Escherichia coli* é o principal microrganismo deste subgrupo e está presente em fezes humanas e de animais homeotérmicos, por isso é o principal indicador da qualidade da água

potável e balneária, indicando, quando presente, contaminação fecal das mesmas (CETESB, 2007). Conforme a portaria do MS, águas destinadas ao consumo humano devem estar livres de *Escherichia coli* em 100 mL de amostra.

Bactérias heterotróficas formam um grupo amplo, composto por bactérias que utilizam carbono orgânico como fonte nutricional. A contagem destes microrganismos fornece informações sobre a qualidade microbiológica de forma ampla e só representam riscos se estiverem presentes em altas concentrações, mas ainda assim são utilizadas como indicadores, pois refletem a ação antrópica no ambiente (AMARAL, 2007).

Segundo Domingues et al. (2007) a presença de bactérias heterotróficas em águas destinadas ao consumo humano acima do limite estabelecido pela Portaria do MS (500 UFC por 1 mL de amostra) também favorece o desenvolvimento de doenças oportunistas que acometem, especialmente, crianças e idosos. Além do que, o aumento dessas bactérias pode interferir com a contagem de bactérias do grupo coliforme, resultando em valores subestimados, podendo também, interferir com as qualidades físicas, químicas e organolépticas da água.

De acordo com Rocha (2007) o fator limitante para o crescimento de bactérias heterotróficas nos ecossistemas aquáticos é a matéria orgânica biodegradável, que em águas naturais, apresenta-se em baixas concentrações. Essa matéria orgânica pode ser medida por meio da dosagem de carbono orgânico assimilável (AOC) que contempla uma fração de 0,1 a 9 % do carbono orgânico total (TOC), correspondendo à porção mais facilmente degradável, com compostos de baixo peso molecular. Conforme o autor, existe uma significativa relação entre o AOC e a densidade de bactérias heterotróficas presentes na água. Van der Kooij (1992 apud ROCHA, 2007) demonstrou que as bactérias heterotróficas não aumentam quando a concentração de AOC é inferior a 10 µg/L. Ainda, segundo Kaplan et al. (1993 apud ROCHA, 2007) a concentração de AOC pode ser considerada uma medida da estabilidade biológica da água para crescimento de microrganismos heterotróficos, sendo que as águas são consideradas estáveis quando possuem valores de 10 a 50 µg de AOC/L.

Segundo Ribeiro (2012) legislação brasileira, ainda é bastante insuficiente quanto aos indicadores e às exigências de medidas sanitárias para o controle da qualidade hídrica, quando comparada às de outros países. Os próprios padrões utilizados como referências não são nacionais, mas tomados de outras localidades

que apresentam realidades distintas, com diferentes condições climáticas e socioeconômicas. Ainda, conforme o mesmo autor, lamenta-se que na atual legislação não tenha sido introduzida uma avaliação quantitativa de risco microbiológico de forma mais abrangente, como utilizada em outras normativas internacionais, o que permitiria uma regulamentação focada no processo de tratamento e remoção de patógenos e não apenas em critérios de qualidade por meio da utilização de indicadores de contaminação, que são muito frágeis.

Dentre outros testes e ensaios que não são realizados, a avaliação do perfil de resistência bacteriana também é outro, que apesar de importante e de simples execução não é priorizado. Em seus trabalhos Lupo et al. (2012), Baquero et al. (2008), Lobova et al. (2002) sugerem a pesquisa de tais microrganismos como mecanismo de controle da qualidade hídrica, pois a presença de cepas resistentes na água em elevadas concentrações oferece periculosidade às populações que as utiliza, especialmente as que possuem atividade imunológica deprimida.

### **3.2 Resistência bacteriana**

A resistência bacteriana, segundo Santana (2006), pode ser definida como a capacidade que algumas bactérias possuem de resistir à ação de um ou mais antimicrobianos. Esta resistência pode ser natural, sendo uma característica inata de determinados espécimes ou pode ainda, ser adquirida, quando um microrganismo previamente sensível à ação de um antibiótico torna-se resistente a ele.

A resistência natural (intrínseca) é resultado de um processo evolutivo e representa uma característica fisiológica ou bioquímica de um organismo, enquanto a resistência adquirida ocorre, geralmente, por um processo de recombinação genética (ROWE-MAGNUS; MAZEL, 1999; SALYERS et al., 2004), ou ainda, menos frequentemente, por um processo de mutação, por meio de alterações aleatórias que permanecem no genoma do microrganismo e são transferidas aos seus descendentes (KÜMMERER, 2009). As mutações muitas vezes são ocasionadas por fatores antropogênicos, relacionados à presença de agentes químicos diversos em contato com os microrganismos (BAQUERO et al., 2008; LUPO et al., 2012).

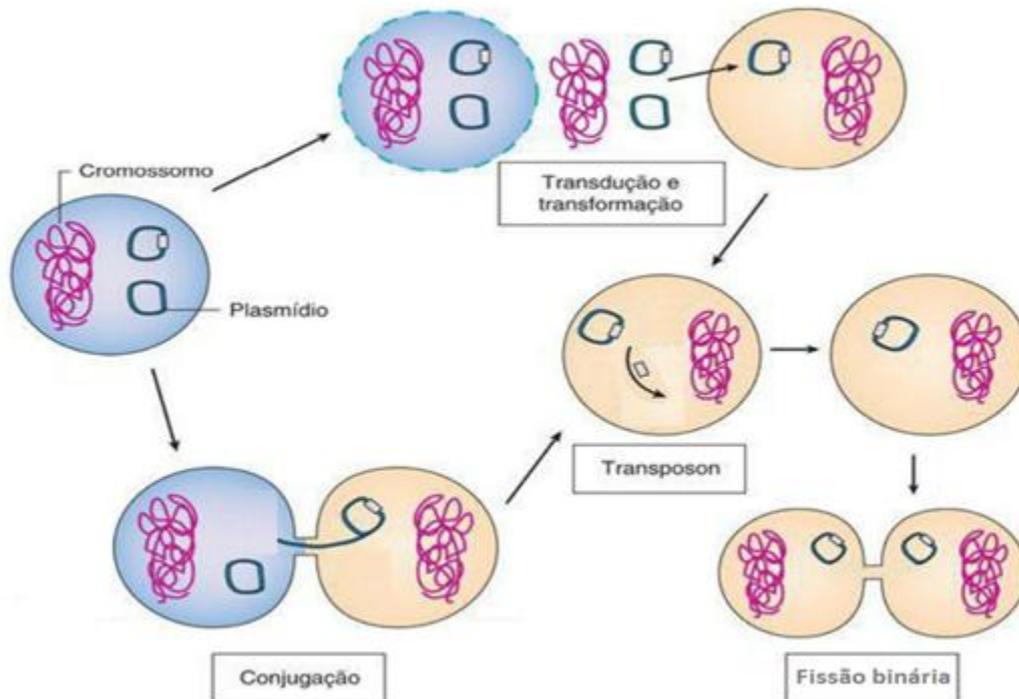
Caumo et al. (2010) afirmam que o grande problema associado ao desenvolvimento da resistência bacteriana é a ineficiência da ação dos antibióticos, que poderá resultar na incapacidade do tratamento de doenças causadas por bactérias resistentes. Nesse sentido, segundo esses autores, diz-se que a resistência bacteriana poderá devolver o mundo para a era pré-antibiótica.

As bactérias, segundo Tortora et al. (2012, p. 574) podem resistir à ação do fármaco por meio de quatro mecanismos distintos: bloqueio da entrada da droga na célula; destruição ou inativação enzimática da droga; alteração nos sítios-alvo da droga e efluxo do antibiótico. Quaisquer desses mecanismos podem ser desenvolvidos por microrganismos que contenham genes (intrinsecamente, ou adquiridos) no cromossomo, em plasmídeos e/ou em transposons, capazes de expressá-los.

Plasmídeos correspondem a fragmentos de DNA circular, extra e independentes, que podem ser transferidos de um microrganismo para outro de diversas formas. Geralmente, os genes que determinam a resistência estão localizados nesses segmentos de material genético (SCHWARTZ et al., 2002). Transposons, por sua vez, são fragmentos móveis de DNA capazes de migrar do cromossomo bacteriano para os plasmídeos, ou mesmo para outras porções do cromossomo, podendo também ser transferidos de um microrganismo para outro carreando, da mesma forma, genes de resistência para outros espécimes (TORTORA et al., 2012, p. 237).

Segundo Murray et al. (2009, p. 135) a troca de material genético, que pode ocorrer inter e intraespécies, configura a principal forma de aquisição e disseminação de genes de resistência bacteriana, refletindo no aumento do número de espécimes resistentes.

Ainda, segundo os autores supracitados, essa troca de material genético entre as células bacterianas pode ocorrer por meio de três mecanismos: conjugação; transformação e transdução. A conjugação ocorre por meio do contato entre as células; a transformação, por meio da aquisição de material genético exógeno, que é absorvido do meio pela célula bacteriana; e a transdução, por meio da transferência de conteúdo genético de uma bactéria para outra através de um bacteriófago. A aquisição de resistência bacteriana pelos mecanismos citados está exemplificada na figura 1.



**Figura 1** - Mecanismos genéticos de evolução e aquisição de resistência bacteriana por meio de conjugação, transdução e transformação. A célula em azul contém plasmídeos e um deles contendo transposon é transferido para outra célula de espécie diferente (rosa), que o incorpora e o transmite para seus descendentes. Adaptado de Murray (2010).

Os mecanismos de aquisição de genes de resistência anteriormente mencionados ocorrem em diversos meios como por exemplos, águas, solos, e animais (BAQUERO et al., 2008). Ainda, conforme esses autores, podem-se distinguir quatro principais locais onde a resistência se desenvolve com frequência: (i) na microbiota contida na pele e no trato intestinal de animais e humanos, onde estão presentes mais de 500 espécies bacterianas, que ao serem expostas a antimicrobianos e agentes químicos diversos, podem sofrer mutação e seleção; (ii) na microbiota presente em hospitais e em locais de criação/tratamento de animais, onde estão presentes bactérias patogênicas, e contra as quais se utilizam um arsenal imenso de antibióticos, promovendo uma intensa seleção de cepas resistentes; (iii) na microbiota presente em águas residuais, advindas de fontes diversas como agricultura, hospitais, residências, indústrias, contaminadas com as mais variadas substâncias com efeito mutagênico e seletor sobre os microrganismos; (iv) nos microrganismos do solo, águas superficiais e subterrâneas, nos quais as bactérias autóctones estão sujeitas a interação com bactérias alóctones advindas dos locais i, ii e iii.

Os genes que conferem a resistência aos antimicrobianos são considerados poluentes ambientais, pois uma vez que são introduzidos no ambiente, dificilmente poderão ser retirados (PRUDEN et al., 2006; ZHANG et al., 2009). Por esse motivo, a resistência de bactérias a antimicrobianos é uma das propriedades bacterianas que pode ser usada para avaliar o impacto antropogênico nos diversos compartimentos ambientais (GONI-URRIZA et al., 2000). Ainda, segundo Pruden et al. (2006) a presença de genes de resistência e de microrganismos resistentes na água é maior em ambientes impactados por atividades agrícolas e humanas.

Nesse sentido, segundo Lupo et al. (2012) e Baquero et al. (2008), devem-se fomentar práticas de detecção de resistência a agentes antimicrobianos como parâmetro para se avaliar a qualidade da água, além de se incentivar o desenvolvimento de novos métodos para a eliminação eficaz de antimicrobianos dos efluentes e água nas estações onde são tratados.

Trata-se de um problema de saúde global, pois existem bactérias resistentes espalhadas em todo o planeta (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2014). Ainda segundo a WHO, as práticas de contenção do desenvolvimento de resistência são muito escassas, mal definidas e os gastos em saúde, em decorrência do desenvolvimento de microrganismos resistentes são muito elevados. Conforme a WHO, a era pós-antibiótica, em que infecções comuns podem matar, longe de ser uma fantasia apocalíptica, é uma possibilidade muito real para o século 21, em que existem poucas novas opções para o combate a estes agentes, e o futuro para novas drogas ainda é obscuro.

No trabalho realizado por Loba et al. (2002), avaliou-se a presença de bactérias heterotróficas no lago Shira, na República Khakasia, Rússia, nas diferentes estações do ano. Os pesquisadores identificaram grande quantidade de espécimes resistentes, especialmente no verão, quando a população tinha contato recreacional com as águas do lago e o impacto antropogênico era maior, causando a contaminação das águas do lago com uma flora bacteriana alóctone. Com base nos resultados obtidos, os pesquisadores sugeriram que o grau de impacto ambiental e o monitoramento dos ecossistemas aquáticos fossem realizados por meio da avaliação da proporção de bactérias resistentes a antibióticos em diversos períodos de coleta. Dessa forma, as propriedades bacterianas que se desenvolvem em resposta ao impacto humano, como a resistência a antibióticos, podem ser utilizadas como indicadores de monitorização ecológica.

### 3.3 Antibióticos

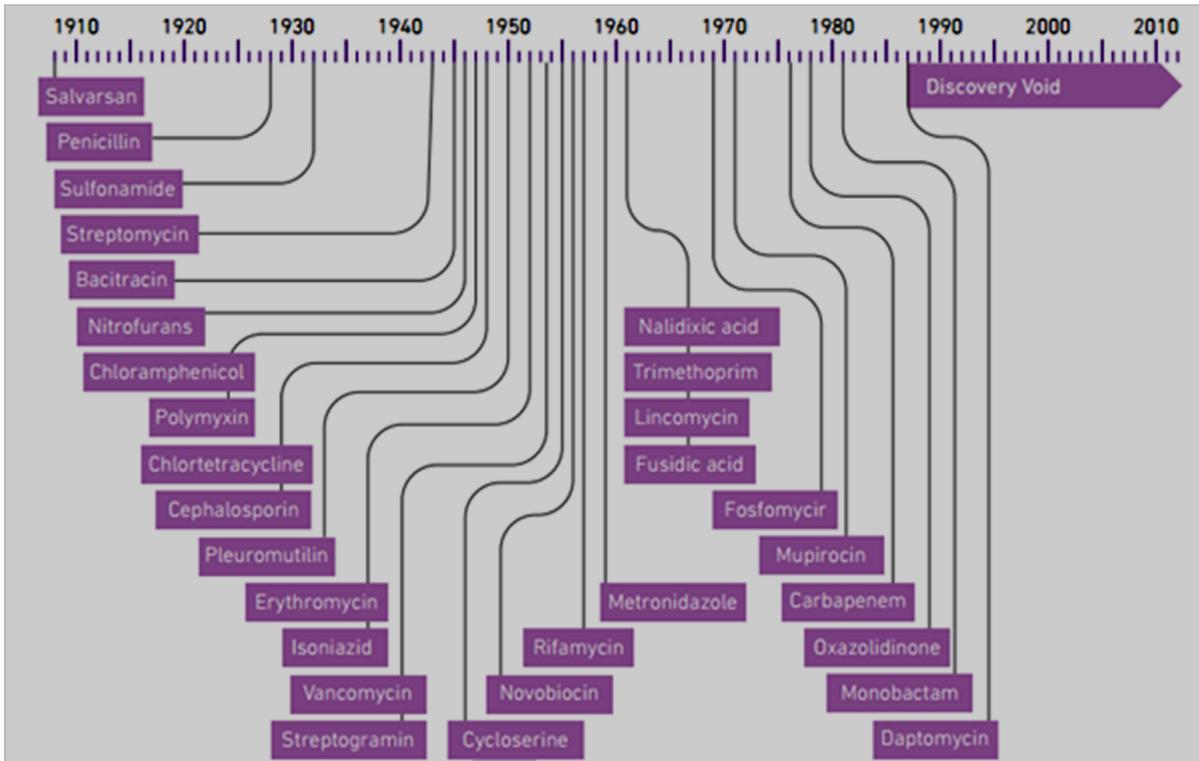
Segundo Tavares (2001, p.10) o termo antibiótico foi usado por Vuillemin no final do século XIX, em alusão à antibiose, processo natural de seleção, por meio do qual um ser vivo destrói o outro para assegurar a sua sobrevivência. Segundo Vuillemin, antibióticos teriam o poder de neutralizar a ação de microrganismos causadores de doenças.

Segundo Brunton et al. (2007), moléculas capazes de suprimir o crescimento de microrganismos são conhecidas há muitos anos, entretanto somente no final da década de 1930, com a comprovação da eficácia da penicilina, droga natural, descoberta em 1929 por Alexander Fleming, elas passaram a ser produzidas e utilizadas em larga escala.

Segundo os autores, no entanto, o próprio Alexander Fleming, tão logo descobriu a penicilina, constatou também o fenômeno da resistência bacteriana à droga, pois notara que a mesma não exercia efeito sobre uma pequena população de microrganismos de uma mesma espécie.

Kirby (1960 apud TAVARES, 2000) observou, em 1944, que algumas cepas de *Staphylococcus aureus*, naturalmente sensíveis à penicilina, apresentavam resistência à ela. A partir disso, com a disseminação do uso da droga, essas observações foram crescentes. Em 1946, aproximadamente 5 % das cepas de *S. aureus* isoladas em pacientes em tratamento, nos Estados Unidos, eram resistentes à penicilina. Em 1949 esse número subiu para 29 % e, atualmente, mais de 80 % das cepas não respondem à ação da droga.

As décadas entre 1920 e 1980 foram bastante promissoras para a descoberta e o desenvolvimento de antibióticos, representando o auge do período de síntese das principais moléculas com ação antimicrobiana, como pode ser observado na figura 2. Nos anos subsequentes, entretanto, não se observam grandes descobertas de novas moléculas com ação antibacteriana, por esse motivo, o arsenal terapêutico contra doenças infecciosas tem se tornado limitado, especialmente no que se refere às bactérias resistentes.



**Figura 2** – Período de desenvolvimento dos principais antimicrobianos.  
Fonte: OMS (2014).

Segundo Tavares (2001, p. 11) a grande totalidade das novas substâncias antimicrobianas preparadas não têm utilidade prática, entretanto, elas revelam que a pesquisa por tais substâncias é expressiva, especialmente por se buscarem drogas capazes de combater os microrganismos resistentes aos antimicrobianos mais antigos. O quadro 1 apresenta as principais drogas utilizadas no combate aos microrganismos patogênicos, com os seus respectivos mecanismos de ação e classificações.

**Quadro 1** - Principais classes de antimicrobianos, com seus respectivos mecanismos de ação e alguns seus representantes.

CLASSES	SUBCLASSES		AÇÃO	REPRESENTANTES
β lactâmicos	Penicilinas	Benzilpenicilinas	Bactericidas: Interferem com a síntese da parede bacteriana	Penicilina* Pen. G Procáina Pen. Benzatina
		Aminopenicilinas		Ampicilina Amoxicilina*
		P. R. penicilinases		Oxacilina
		P. de amplo espectro		Carboxipenicilinas
	Cefalosporinas	1ª Geração		Cefalexina* Cefalotina
		2ª Geração		Cefoxitina* Cefaclor
		3ª Geração		Ceftriaxona
		4ª Geração		Cefepima*
	Carbapenens			Imipenem Meropenem
Monobactams		Aztreonam*		
Quinolonas	Quinolonas (anos 60)		Bactericidas: Inibição da DNA girasse bacteriana	Ác. Nalidíxico
	Fluoroquinolonas (anos 80)			Ciprofloxacina*
Glicopeptídeos			Inibição de síntese proteica, de RNA m, alteração da permeabilidade MP	Vancomicina* Teicoplanina
Oxazolidinonas			Inibição da síntese proteica	Linezolida
Aminoglicosídeos			Síntese de proteínas anômalas	Gentamicina* Estreptomicina Amicacina
Macrolídeos			Inibição de síntese proteica	Eritromicina Claritromicina Azitromicina
Licosaminas			Inibição de síntese proteica	Lincomicina
Nitroimidazólicos			Inativação do DNA	Metronidazol
Cloranfenicol			Inibição de síntese proteica	Cloranfenicol*
Sulfonamidas			Inibe a síntese de ácidos nucleicos (ácido fólico)	Sulfanilamida Sulfametoxazol
Tetraciclins			Inibição da síntese proteica	Tetraciclina Doxiciclina

FONTE: Adaptado de Anvisa (2007).

\* Antimicrobianos utilizados para avaliação do perfil de resistência das cepas estudadas.

No início de janeiro de 2015, um artigo publicado pela revista Nature, intitulado *A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance* apresentou o estudo desenvolvido por cientistas da universidade Northeastern de Boston, liderados pelo professor Kim Lewis. Trata-se da recente descoberta de um novo antibiótico, produzido por microrganismos do solo, cuja molécula denominada teixobactin foi capaz de combater microrganismos resistentes a diversos antimicrobianos. Segundo os cientistas, os microrganismos, dificilmente, desenvolverão resistência à ela devido ao seu mecanismo de ação que não atua contra as proteínas bacterianas, altamente capazes de sofrerem mutação. A nova droga, primeira descoberta dos últimos 30 anos, em algumas décadas será comercializada e poderá ser a esperança para o combate das cepas resistentes dispersas em todo o planeta (SAMPLE, 2015).

Diversas razões justificam a necessidade do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, especialmente porque as doenças infecciosas são ainda uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo, além disso, as taxas de resistência microbiana têm se elevado substancialmente, ao passo que o número total de novos agentes antimicrobianos aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) tem sido muito escasso. A necessidade de drogas que atuem por mecanismos de ação diferentes daqueles associados aos fármacos em uso também é outro importante fator que justifica a necessidade de novos antimicrobianos como arsenal terapêutico (COATES; HU, 2007).

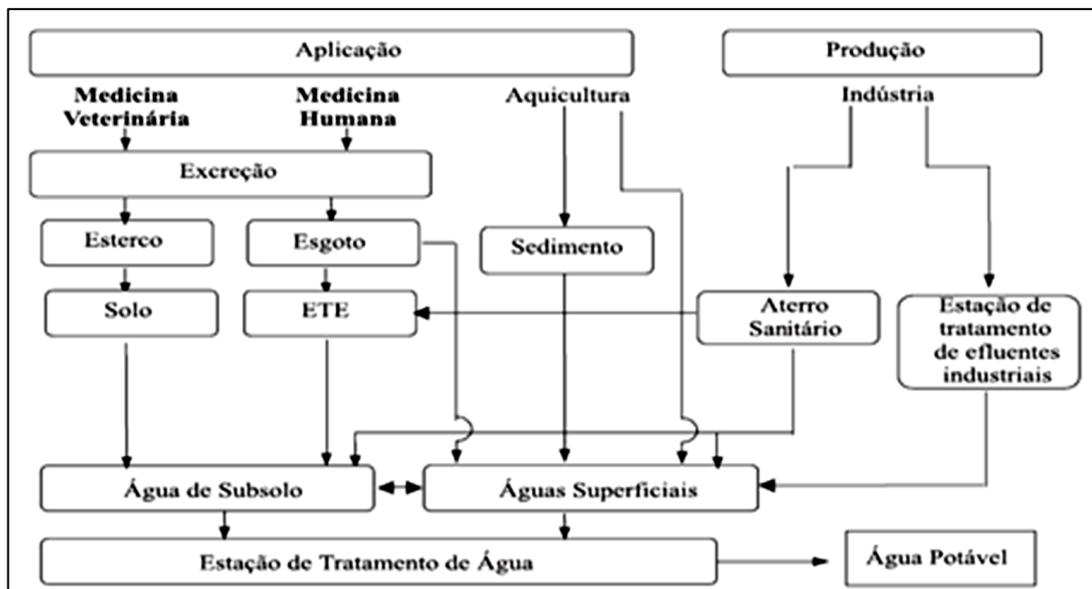
### **3.3.1 Antibióticos no ambiente**

Diversos antibióticos estão naturalmente presentes no ambiente devido à produção por organismos vivos como bactérias, plantas e outros seres. Os principais antimicrobianos encontrados pertencem às classes dos  $\beta$ -lactâmicos e dos aminoglicosídeos, e são detectados especialmente, nos solos (KÜMMERER, 2009). A detecção ambiental de tais substâncias, entretanto, tem sido crescente devido à contaminação por drogas produzidas industrialmente. Atualmente, são produzidas cerca de 100000 toneladas de antimicrobianos por processos de quimiossíntese (NIKAIDO, 2010), das quais, um percentual significativo é introduzido, direta ou

indiretamente, nos compartimentos ambientais, dentre os quais o compartimento hídrico é o principal.

Segundo Berto et al. (2009), os processos convencionais de tratamento de águas residuais não são capazes de eliminar os resíduos de antimicrobianos nelas presentes, sendo que, somente processos avançados, como aqueles que utilizam oxidação, podem fazê-lo. Por isso, conforme Baquero et al. (2008), as águas superficiais se encontram bastante poluídas por estes compostos.

Paralelamente à contaminação dos recursos hídricos, os antimicrobianos também são disseminados no solo e em sedimentos (KÜMMERER, 2009). Segundo o autor supracitado, a contaminação por meio da excreção humana lidera dentre as formas de contaminação ambiental devido ao expressivo consumo, entretanto outras formas de disseminação contribuem para o aumento da concentração de antimicrobianos no ambiente, como ilustrado na Figura 3.



**Figura 3** - Possíveis rotas de fármacos no ambiente.  
FONTE: Billa e Dezoti (2003).

O descarte de efluentes nos cursos d'água, contendo resíduos de antimicrobianos, é um fator importante relacionado ao desenvolvimento de resistência bacteriana. Esses fármacos em baixas concentrações favorecem a seleção de cepas resistentes no ambiente, propiciando a sua reprodução e o aumento populacional (ALVARENGA; NICOLETTI, 2010). Segundo Kümmerner

(2003), antimicrobianos têm sido identificados em quantidade da ordem de microgramas por litro em diversos compartimentos, como nas estações de tratamento de esgoto, águas superficiais e águas subterrâneas. Esses autores reforçam, portanto, que o uso inadvertido desses fármacos promove dois graves problemas ambientais: a contaminação dos recursos hídricos e o desenvolvimento de resistência bacteriana.

No trabalho realizado por Watinkson et al. (2008), analisaram-se amostras de água de bacias do sudeste da Austrália, por meio de cromatografia líquida, para se investigar a presença de 28 tipos de antimicrobianos. As águas analisadas foram coletadas de quatro fontes diferentes, dentre as quais: efluentes hospitalares, águas residuais de estações de tratamento, águas superficiais de rios e águas potáveis. Em 90 % das amostras analisadas foram identificados, pelo menos, um tipo de antibiótico, exceto nas amostras de água potável, nas quais eles não foram identificados. Os autores questionaram esse registro, pois as amostras de água potável advêm das águas superficiais, em que se identificaram várias moléculas de antimicrobianos.

Tendo em vista a preocupação com a qualidade da água natural consumida nos diversos contextos socioeconômicos e culturais e a relação da mesma com as condições ambientais, além da possível disseminação de microrganismos resistentes por via aquática, o estudo desenvolvido objetiva alertar sobre a importância da preservação ambiental para a manutenção da qualidade hídrica e da saúde da população.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Caracterização da Área de Estudo

A área de estudo está localizada na área rural do município de Itajubá (MG), dentro da microbacia hidrográfica do ribeirão José Pereira, afluente do rio Sapucaí na sua região média, localizada entre os meridianos 45° 27' 31" e 45° 20' 57" W e os paralelos 22° 23' 18" e 22° 26' 57" S. A área tem, aproximadamente, 40 km<sup>2</sup> e é delimitada ao sul pela Serra da Pedra Amarela, a leste pela Serra da Água Limpa, a norte pelas serras do Juru e dos Toledos, e a oeste por pequenos divisores que a separam da bacia do rio Sapucaí (LIMA et al., 2013).

A altitude varia entre 840 e 1760 m, sendo que a porção oeste da microbacia apresenta as menores altitudes, local de ocorrência das planícies fluviais e do núcleo urbano. As maiores elevações são observadas a leste, onde estão presentes a Serra do Juru e a Serra dos Toledos. O relevo dominante é do tipo Forte Ondulado, com declividades entre 15 e 45° (FLAUZINO, 2012).

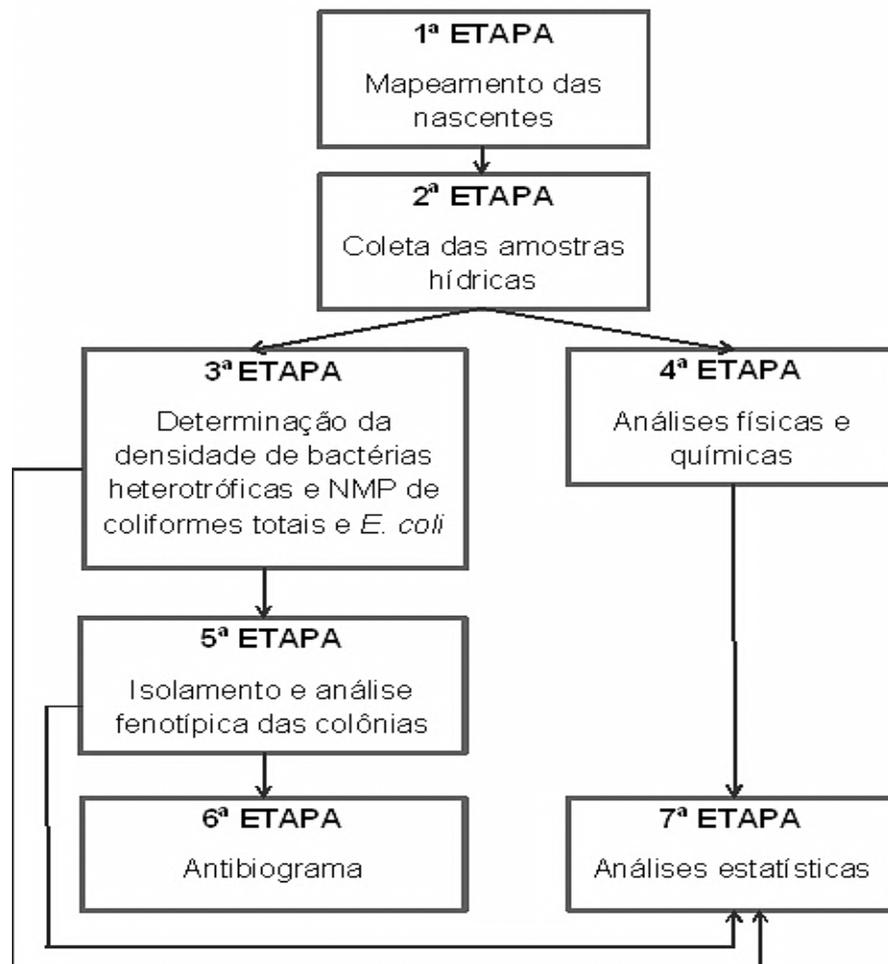
Conforme a classificação climática de Köppen-Geiger, a microbacia apresenta duas variações do Clima Tropical de Altitude, o tipo Cwa, que predomina em quase toda a área da bacia, e o tipo Cwb, restrito a uma pequena porção a noroeste da bacia. O clima pode assim, ser definido como mesotérmico (C), em que a temperatura média do mês mais frio permanece entre 3 °C e 18 °C, apresentando chuvas de verão (w) e verões quentes no tipo Cwa, em que o mês mais quente possui média de temperatura igual ou superior a 22 °C, e brando no tipo Cwb, com temperatura média no mês mais quente inferior a 22 °C (KÖPPEN; GEIGER, 1928).

A pluviosidade média é de 1490,5 mm durante o ano, com os maiores índices entre novembro a março, caracterizando a estação chuvosa. Entre abril e agosto ocorrem os menores índices de precipitação, isto caracteriza a estação seca.

### 4.2 Metodologia

As atividades desenvolvidas no estudo foram divididas em sete etapas: (I) mapeamento das nascentes da microbacia hidrográfica do ribeirão José Pereira; (II) coleta das amostras hídricas nas nascentes selecionadas para o estudo; (III) análise microbiológica da densidade total de bactérias heterotróficas e determinação do

número mais provável de bactérias do grupo coliformes totais e *Escherichia coli*); (IV) análises físicas (temperatura e turbidez) e químicas (pH, acidez, alcalinidade, oxigênio dissolvido, carbono orgânico, dureza e condutividade); (V) análise fenotípica das colônias; (VI) realização do antibiograma; (VII) análises estatísticas e integração dos resultados. As etapas podem ser visualizadas na figura 4.



**Figura 4** - Fluxograma das principais etapas do estudo.

#### 4.2.1 Mapeamento das nascentes e caracterização da área de estudo

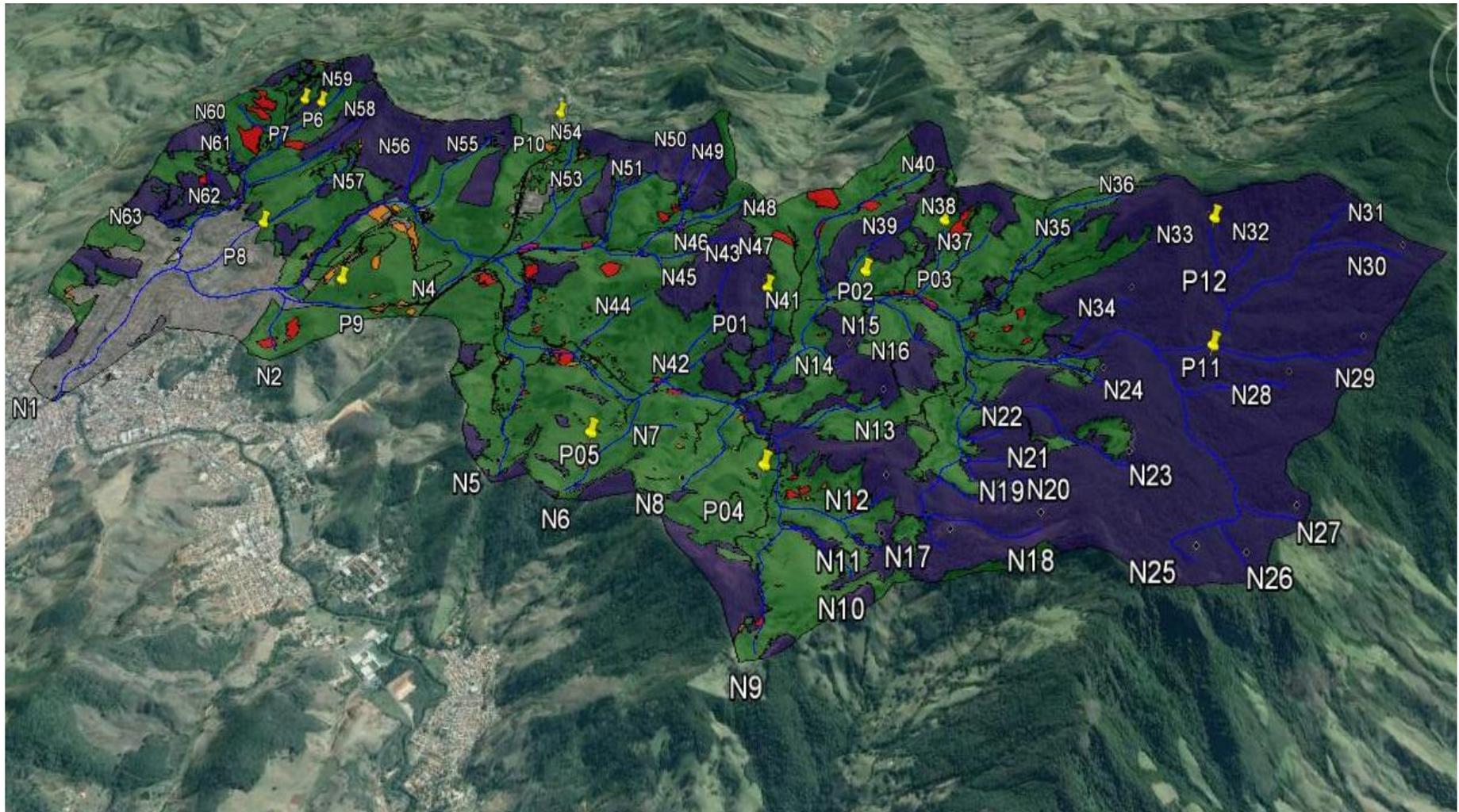
A primeira etapa da metodologia consistiu do mapeamento das 63 principais nascentes localizadas na microbacia do ribeirão José Pereira. Para isto, plotou-se um *layer* (tipo vetor) referente à hidrografia presente no interior da microbacia, disponibilizado pela Universidade Federal de Itajubá, a partir do trabalho realizado por Flauzino (2012), pelo Instituto de Recursos Naturais, IRN.

Posteriormente, o arquivo vetorial foi plotado sobre uma imagem de satélite (World View) obtida no ano de 2011, obtendo-se, assim, uma imagem que possibilitasse a visualização do tipo de uso do solo no entorno das nascentes. Selecionaram-se, a partir da imagem obtida, doze nascentes para as coletas.

No ato das coletas foram anotadas as coordenadas geográficas, a fim de permitir a plotagem em mapa. De posse das coordenadas reais, foi feito um ajuste das coordenadas iniciais, sendo estas corrigidas com os valores obtidos pelo GPS (Global Positioning System), para tal utilizou-se o software *Google Earth*. As coordenadas de latitude e longitude das nascentes selecionadas com as respectivas formas de uso do solo são listadas no quadro 2. A imagem da microbacia com as nascentes pode ser visualizada na figura 5.

**Quadro 2-** Coordenadas das nascentes de estudo com as respectivas formas de uso do solo.

Ponto	Latitude (S)	Longitude (O)	Cobertura do solo	Uso da água
1	22°25'13,4'	45°24'03,5"	Transição mata/pasto com gado	Dessedentação de animais
2	22°25'08,1'	45°23'35,1"	Mata sem gado	Consumo humano
3	22°24'50,1'	45°23'13,6"	Mata sem gado	Produção de energia
4	22°26'11,0'	45°24'04,4"	Pasto degradado com gado	Dessedentação de animais
5	22°26'00,6'	45°24'49,4"	Pasto/cultura, áreas de erosão do solo e gado	Consumo humano
6	22°23'47,2'	45°26'35,0"	Pasto, solo degradado com gado	Dessedentação de animais
7	22°23'45,0'	45°26'41,4"	Transição mata/pasto sem gado	-
8	22°24'40,2'	45°26'39,5"	Área urbana, pasto com gado	-
9	22°25'04,4'	45°26'08,9"	Pasto sem gado	Consumo humano/ animal
10	22°23'54,1'	45°25'12,8"	Margem da rodovia sem gado	Consumo humano
11	22°25'45,9'	45°22'06,7"	Transição mata/pasto com gado	Consumo humano
12	22°25'6,11'	45°22'2,98"	Reserva Biológica da Serra dos Toledos, com possível presença de gado	-



**Figura 5** – Mapa da cobertura do solo e da hidrografia da microbacia do ribeirão José Pereira. Áreas de mata (roxo), áreas de pastagem (verde), núcleo urbano (cinza), áreas de cultivo (vermelho), áreas de degradação do solo (laranja).

Segundo o mapeamento referente às formas de cobertura do solo realizado por Flauzino (2012), as pastagens e campos representam a forma dominante de uso do solo na micro bacia do Ribeirão José Pereira, responsáveis por, aproximadamente 50 % do uso. Conforme se identificou por meio das campanhas de campo, estas áreas de pastagem são, geralmente, utilizadas para a criação de gado, em pequena escala, por meio de técnicas inadequadas, que não protegem os solos da erosão.

Ainda, segundo o mapeamento anteriormente citado, as áreas de mata correspondem a 41 %, sendo metade remanescente da Mata Atlântica. A reserva biológica serra dos Toledos representa a maior área coberta por esta vegetação.

Existem também algumas pequenas áreas de cultura de alimentos, que foram identificadas, especialmente, no entorno da nascente de número 5, onde se constatou a utilização de agrotóxicos e fertilizantes.

Outras áreas correspondem ao solo descoberto e àquelas ocupadas pelo núcleo urbano, estradas e pela rodovia estadual MGC-383 que corta a micro bacia. Segundo Flauzino (2012) não são observadas práticas de manejo conservacionistas do solo, o que contribui para a degradação do ambiente e contaminação dos recursos hídricos.

Durante as campanhas de campo foram obtidas fotos e informações, com a população residente próximo às nascentes, por meio de conversas informais, para que pudessem auxiliar na interpretação dos resultados.

#### **4.2.2 Coleta das amostras hídricas**

A segunda etapa consistiu na coleta das amostras hídricas. Foram realizadas coletas nas estações chuvosa e seca. A coleta na estação chuvosa foi realizada nos dias 05, 09 e 16 de dezembro de 2013, e a coleta na estação seca, nos dias 24, 27 e 30 de junho de 2014. No mês de dezembro de 2013, de acordo com informações do Boletim Meteorológico Ciências Atmosféricas-Unifei (2014a), foram registrados aproximadamente 192,4 mm de precipitação no município de Itajubá, e no mês de junho de 2014, conforme dados do Boletim Meteorológico Ciências Atmosféricas-Unifei (2014b), 30,2 mm, o que configuram, respectivamente, típicas estações chuvosa e seca.

Para cada uma das doze nascentes, foram retiradas três repetições de amostras de água (Figura 6), sendo, no total, obtidas 36 amostras de água em cada estação. As amostras foram coletadas em frascos estéreis com capacidade para 500 mL e analisadas separadamente, nas respectivas estações.



**Figura 6** - Amostras hídricas coletadas em três repetições.

Após as coletas, as amostras foram, devidamente, acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo e transportadas para os laboratórios de Microbiologia e de Físico-química da Universidade Federal de Itajubá, onde foram processadas em até 5 horas após a coleta.

As figuras 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18 representam imagens dos doze pontos de estudo e os tipos de cobertura do solo, no entorno das mesmas.

O ponto 1 (Figura 7) está localizado nas coordenadas 22°25'13,4" (S) e 45°24'03,5" (O), e correspondente a uma nascente situada em uma área de declive e de transição entre mata e pastagem. A cobertura do solo predominante é do tipo braquiária com alguns arbustos, sendo que nas proximidades da nascente essa cobertura vegetal é mais densa, com a presença de árvores e arbustos maiores. A água corre até a porção mais baixa do terreno, onde os animais têm acesso, e muito provavelmente, utilizam-na para dessedentação. Nos dias de coleta não foram visualizados animais, entretanto, encontrou-se estrume na porção mais alta e na porção mais baixa, próxima do curso de água. Aparentemente, não se observaram alterações na área entre os períodos de coleta.



**Figura 7** - Imagens do ponto de coleta 1 localizado à 22°25'13,4" (S) e 45°24'03,5"(O) no município de Itajubá (MG). Nascente (A), cobertura do solo ao redor área da nascente (B).

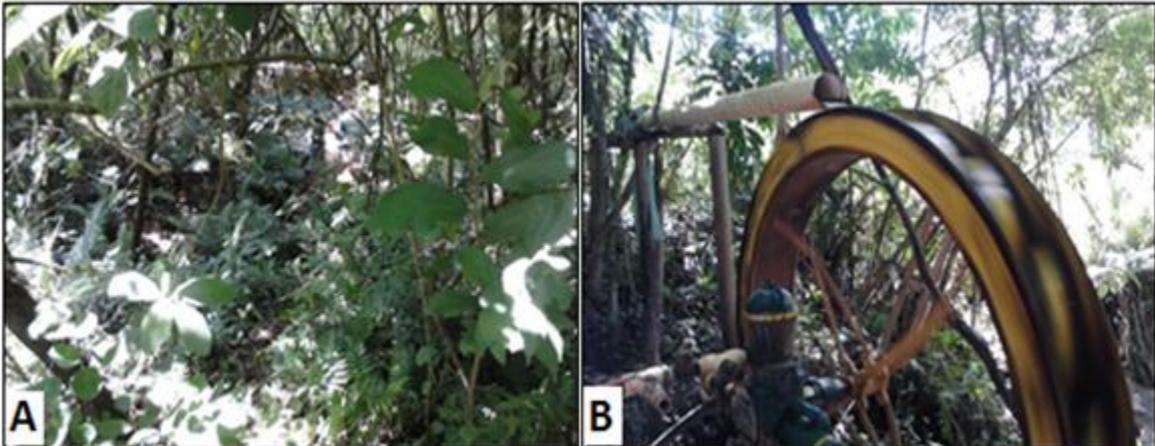
O ponto 2 (Figura 8), 22°25'08,1' (S) 45°23'35,1"(O), corresponde a uma gruta localizada em uma propriedade particular, da qual jorra um pequeno filete de água que é consumida pela população dos arredores. Não se obteve acesso direto à nascente, mas conforme informações do proprietário, a água nasce numa região imediatamente acima da gruta em um fragmento de mata. Segundo ele, não existem animais próximos da nascente e a água é de excelente qualidade. Observou-se, a olho nu, maior presença de sedimento na água na estação seca, período em que o volume de água observado também foi menor.



**Figura 8** - Imagens do ponto de coleta 2, localizado à 22°25'08,1' (S) 45°23'35,1"(O) no município de Itajubá (MG).

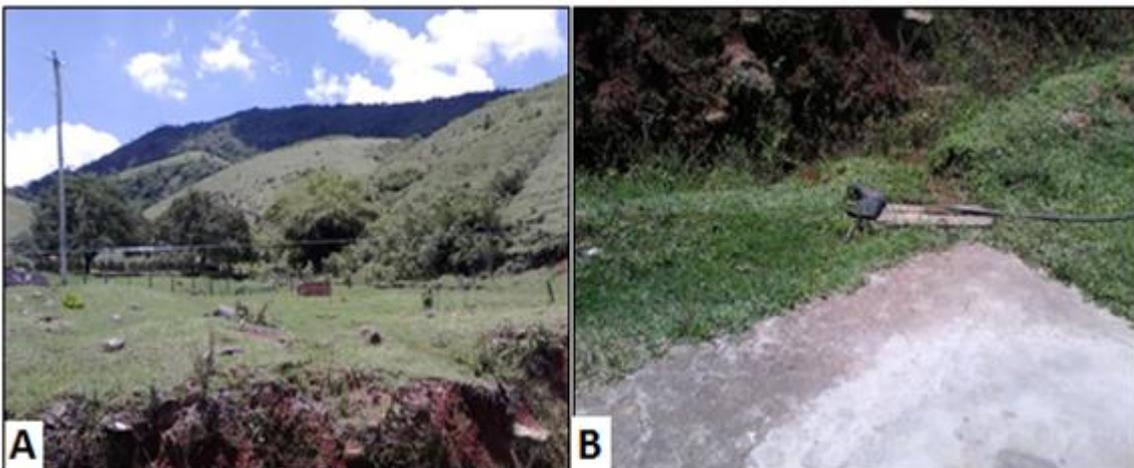
O ponto 3 (Figura 9), 22°24'50,1'(S) e 45°23'13,6"(O), localiza-se dentro de uma propriedade particular, em uma área com cobertura vegetal densa, e bastante preservada. Segundo o proprietário não existem animais nos arredores da

nascente, e a água, devido à queda que possui, e ao fluxo mais intenso, é utilizada para mover uma pequena roda que gera energia na propriedade. A água não é utilizada para consumo humano e apresentou-se com bastante sedimento nas coletas de verão e inverno.



**Figura 9** - Imagens do ponto de coleta 3 localizado à 22°24'50,1'(S) e 45°23'13,6''(O), no município de Itajubá (MG) . Cobertura do solo (A), nascente (B).

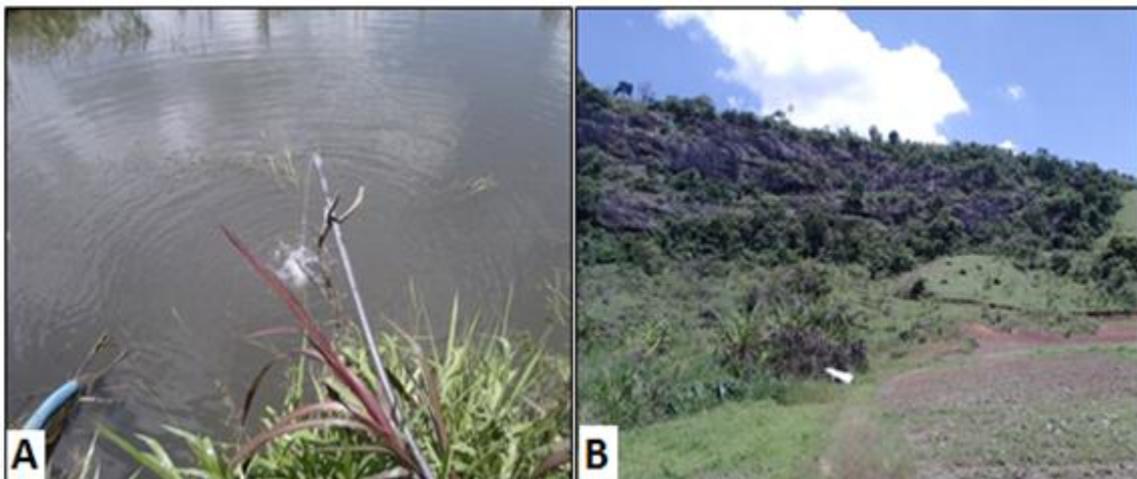
O ponto 4 (Figura 10), 22°26'11,0'(S) e 45°24'04,4''(O), localiza-se em uma propriedade particular. A nascente se situa numa área de pastagem, onde o solo se encontra visivelmente erodido, e onde existem animais que utilizam a água para consumo. Na propriedade a água não é consumida pelas pessoas. Não se observaram alterações na área entre os períodos de coleta.



**Figura 10** - Imagens do ponto de coleta 4 localizado à 22°26'11,0'(S) e 45°24'04,4''(O), no município de Itajubá (MG). Cobertura do solo (A), recurso hídrico (B).

O ponto 5 (Figura 11), 22°26'00,6' (S) e 45°24'49,4'' (O), está localizado em uma área particular. A nascente se situa nas proximidades de uma pedreira,

onde estão presentes arbustos e uma pastagem do tipo braquiária. Segundo a proprietária, os moradores do sítio utilizam a água com finalidade nutricional, apesar de não protegerem adequadamente a nascente. Observou-se uma área de cultivo de verduras e legumes muito próxima da nascente e também se visualizou grande quantidade de estrume pelo pasto nas proximidades do curso d'água. Foi informado que, eventualmente, o gado criado na propriedade tem acesso à nascente. Na coleta de inverno, observou-se intensa modificação da área, com diversos focos de erosão do solo. Também se constatou que o volume hídrico, era visivelmente menor que aquele observado na estação chuvosa. A proprietária informou, à época da segunda coleta, que havia deixado de fazer uso nutricional da água.



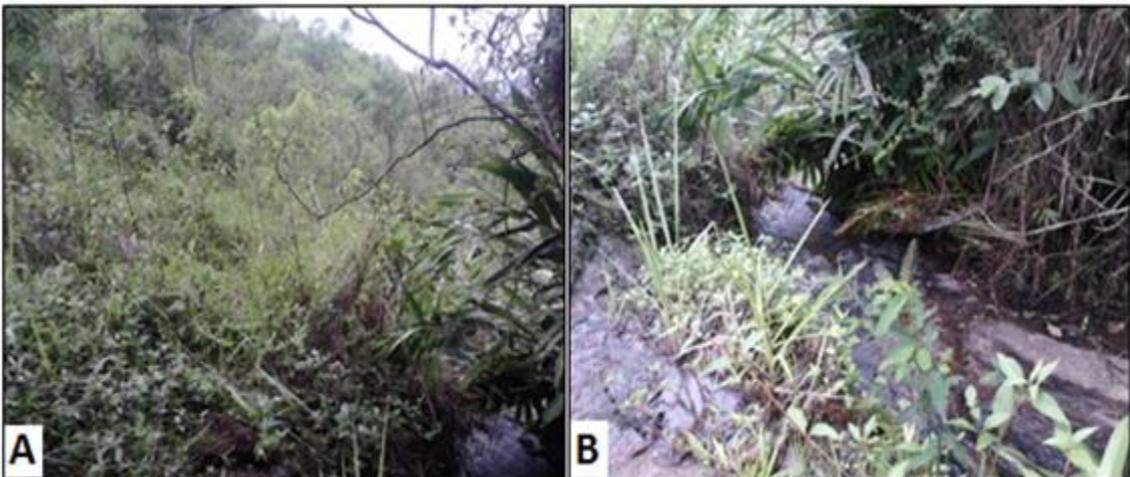
**Figura 11** - Imagens do ponto de coleta 5 localizado à 22°26'00,6' (S) e 45°24'49,4'' (O), no município de Itajubá (MG). Recurso hídrico (A), cobertura do solo (B).

O ponto 6 (Figura 12), 22°23'47,2'(S) e 45°26'35,0''(O), está localizado em uma área de declive coberta por pastagem, onde se observou a presença de focos de erosão dos solos, e se pode visualizar a presença de animais ruminantes em contato com os recursos hídricos. Não se observaram alterações na área nas diferentes estações de coleta das amostras.



**Figura 12** - Imagens do ponto de coleta 6 localizado à 22°23'47,2'(S) e 45°26'35,0''(O), no município de Itajubá (MG). Cobertura do solo (A), nascente (B).

O ponto 7 (Figura 13), 22°23'45,0'(S) e 45°26'41,4''(O), está localizado em uma área de transição entre mata e pastagem, onde se visualizaram arbustos e gramíneas mais densas, predominantemente braquiária. Não foram visualizados animais no local, nos dias de coleta.



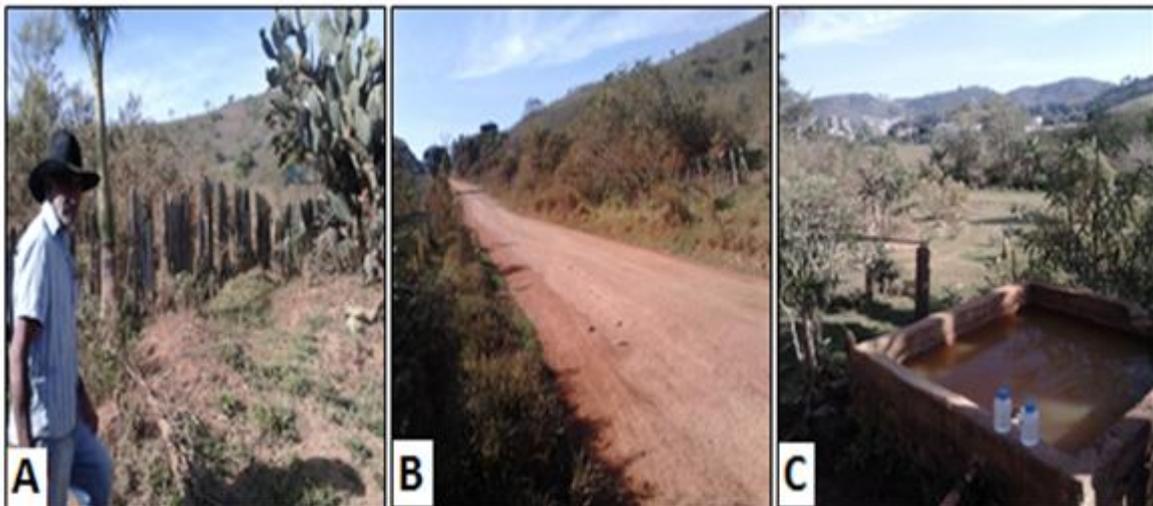
**Figura 13** - Imagens do ponto de coleta 7 localizado à 22°23'45,0'(S) e 45°26'41,4''(O), no município de Itajubá (MG). Cobertura do solo (A), nascente (B).

O ponto 8 (Figura 14) se situa na zona urbana à 22°24'40,2' (S) 45°26'39,5'' (O), nas imediações do santuário de Nossa Senhora da Agonia. A cobertura do solo no entorno da nascente é do tipo pastagem, com predomínio de braquiária, onde se visualizaram diversos animais ruminantes, em ambas as estações de coleta. A nascente, no entanto, estava bem protegida por uma caixa de alvenaria.



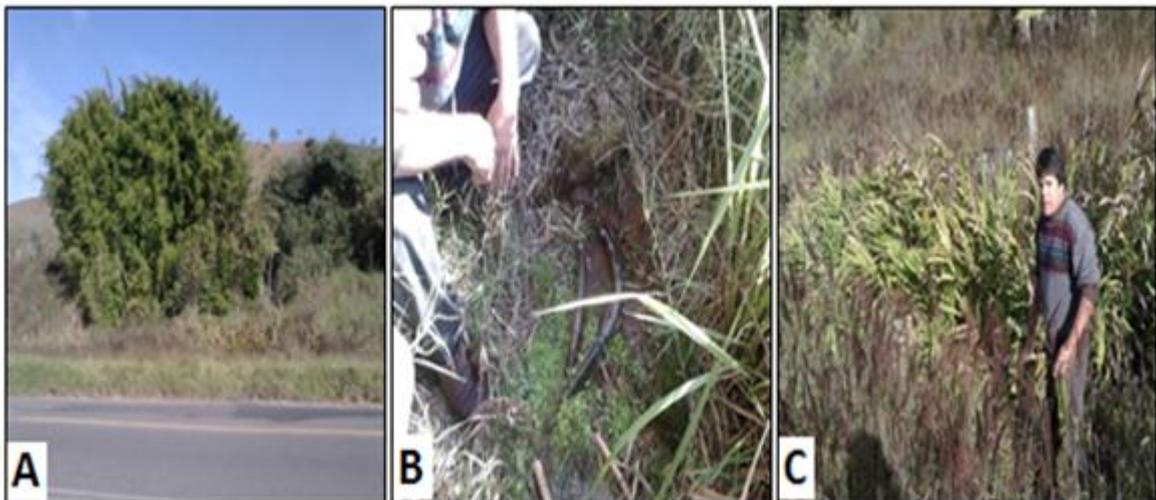
**Figura 14** - Imagens do ponto de coleta 8, localizado à  $22^{\circ}24'40,2'$  (S) e  $45^{\circ}26'39,5''$  (O), no município de Itajubá (MG). Cobertura do solo (A), nascente (B).

O ponto 9 (Figura 15),  $22^{\circ}25'04,4'$  (S) e  $45^{\circ}26'08,9''$ (O), está localizado na zona rural, próximo a uma estrada. A cobertura vegetal na área da nascente é do tipo braquiária e, segundo o proprietário, a nascente é bastante preservada e não há animais nas proximidades. A água é utilizada para consumo humano e para dessedentação de animais há muitos anos.



**Figura 15** - Imagens do ponto de coleta 9 localizado à  $22^{\circ}25'04,4'$  (S) e  $45^{\circ}26'08,9''$ (O), no município de Itajubá(MG). Cobertura do solo (A) e (B), recurso hídrico (C).

O ponto 10 (Figura 16),  $22^{\circ}23'54,1'$ (S) e  $45^{\circ}25'12,8''$ (O) localiza-se às margens da rodovia Itajubá-Maria da Fé (MGC-383). A água, segundo o proprietário, é de boa qualidade e utilizada para consumo. Observou-se que a nascente estava mais protegida na estação seca. Na estação chuvosa, havia água acumulada no entorno do ponto de captação.



**Figura 16** - Imagens do ponto de coleta 10 localizado à  $22^{\circ}23'54,1''(S)$  e  $45^{\circ}25'12,8''(O)$ , no município de Itajubá (MG). Cobertura do solo (A) e (C), nascente (B).

O ponto 11 (Figura 17),  $22^{\circ}25'45,9''(S)$  e  $45^{\circ}22'06,7''(O)$  está localizado na porção leste da microbacia do ribeirão José Pereira, próximo à reserva da Serra dos Toledos. É uma área de transição entre pastagem e mata, onde estão presentes animais ruminantes. A água é, normalmente, consumida por visitantes.



**Figura 17** - Imagens do ponto de coleta 11, localizado à  $22^{\circ}25'45,9''(S)$  e  $45^{\circ}22'06,7''(O)$ , no município de Itajubá (MG). Nascente (A), cobertura do solo (B).

O ponto 12 (Figura 18),  $22^{\circ}25'6,11''(S)$  e  $45^{\circ}22'2,98''(O)$  está localizado no interior da reserva natural da Serra dos Toledos, área de densa cobertura vegetal, onde não foram visualizados animais ruminantes, mas puderam-se observar vestígios da presença (estrume) e, segundo informações dos moradores da região, caçadores adentram, clandestinamente, à reserva, montados a cavalo para caçar pequenos animais.

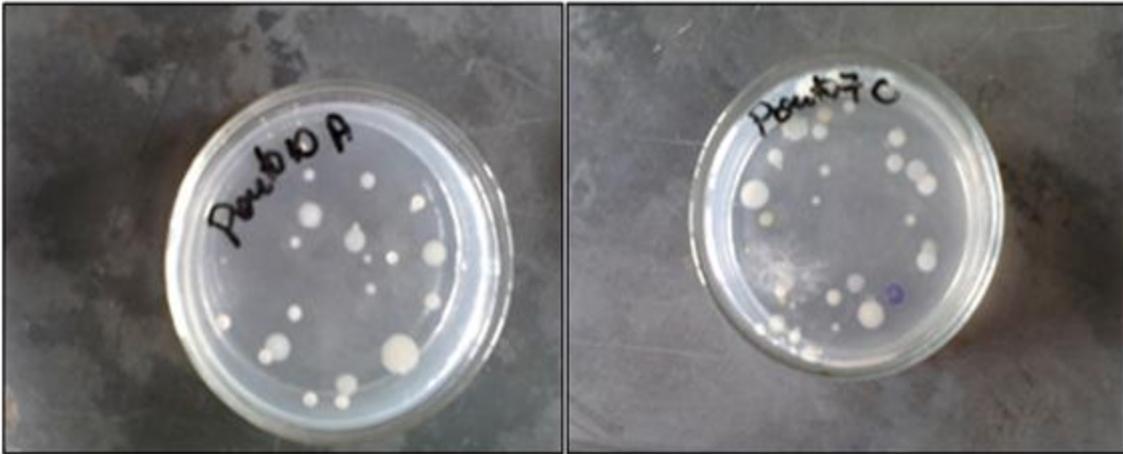


**Figura 18** - Imagens do ponto de coleta 12, localizado à 22°25'6,11'(S) e 45°22'2,98''(O), no município de Itajubá (MG). Nascente (A), cobertura do solo (B).

#### **4.2.3 Determinação da densidade total de bactérias heterotróficas e contagem do número mais provável de coliformes totais e *Escherichia coli***

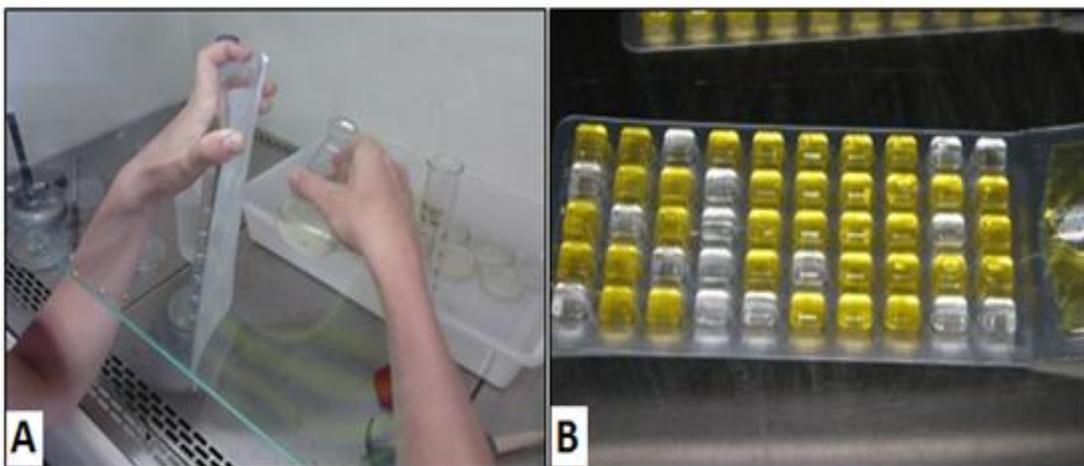
A terceira etapa consistiu na determinação da densidade total de bactérias heterotróficas e na contagem do número mais provável (NMP) de coliformes totais e *Escherichia coli* nas amostras hídricas coletadas. Para a avaliação da densidade de bactérias heterotróficas, foi transferida uma alíquota de 0,1 mL de amostra, sem diluição, para placas de Petri contendo meio de cultura Plate Count Agar, por meio do método de cultivo de semeadura ou esgotamento em placa (APHA, 1999).

Os procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica por  $48 \pm 3$  horas a  $35 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (CETESB, 2006). Após o período de incubação, realizou-se a contagem do total de colônias formadas nas placas (Figura 19), a fim de se obter uma média do número de unidades formadoras de colônia de bactérias heterotróficas por mL de amostra hídrica, para cada ponto de coleta.



**Figura 19** - Placas de Petri com as unidades formadoras de colônia. Determinação da densidade total de bactérias heterotróficas nas amostras hídricas.

Na sequência, a contagem de bactérias do grupo coliforme foi feita pelo método Colilert<sup>®</sup> (Figura 20). Para isso, dissolveu-se o conteúdo de reagente Colilert<sup>®</sup> em 100 mL de cada amostra, transferindo-os, em seguida, individualmente, para a cartela Quanti-Tray, que foi selada e incubada em estufa bacteriológica por  $48 \pm 3$  horas a  $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  (CETESB, 2006). Após o período de incubação, realizou-se a leitura para determinação do número mais provável (NMP) de bactérias do grupo coliforme (coliformes totais e *E. coli*) em cada uma das três cartelas referentes a cada ponto de coleta e se calculou a média aritmética para cada nascente.



**Figura 20** - Determinação do número mais provável de bactérias do grupo coliformes totais e *Escherichia coli* pelo método Colilert<sup>®</sup>. Preparo das amostras hídricas (A), cartela Quanti-Tray (B).

#### 4.2.4 Análises físicas e químicas

A quarta etapa do experimento consistiu na realização das análises físicas e químicas, que foram feitas, imediatamente, após a realização da terceira etapa, descrita anteriormente. As análises foram realizadas no laboratório de Físico-química da Universidade Federal de Itajubá, onde se avaliaram os seguintes atributos: potencial hidrogeniônico (pH); condutividade ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ); oxigênio dissolvido ( $\text{mg mL}^{-1}$ ); turbidez (NTU- Nephelometric Turbidity Units); acidez ( $\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$ ) alcalinidade ( $\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$ ); dureza ( $\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$ ) e carbono orgânico total ( $\text{mg L}^{-1}$ ). Foram realizados testes para cada amostra hídrica e, ao final, com os dados das três repetições por nascente, calculou-se a média de cada atributo analisado, para cada uma das doze nascentes.

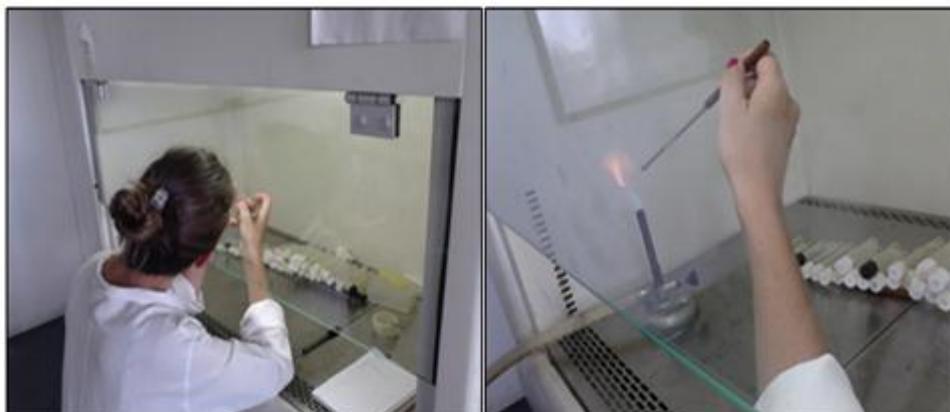
Os três primeiros atributos foram quantificados por meio do aparelho multi parâmetros da marca Inolab. O potencial hidrogeniônico foi analisado pelo método da potenciometria direta, por meio de um pHmetro acoplado a um eletrodo de vidro; a condutividade pelo método condutométrico, também por meio da utilização de eletrodos de vidro. A turbidez foi avaliada pelo método nefelométrico, utilizando turbidímetro da marca Inolab. A acidez, alcalinidade e dureza foram avaliadas por método volumétrico de neutralização (Figura 21), por meio da titulação das amostras de água com soluções padrão de NaOH (acidez), HCl (alcalinidade) e EDTA (dureza), sendo que os resultados das análises foram expressos em  $\text{mg L}^{-1} \text{CaCO}_3$ . O carbono orgânico foi quantificado por meio do aparelho analisador de carbono orgânico total (TOC) da marca Analytikjena. Estes atributos medidos constam nas análises recomendadas pela resolução CONAMA 357/05 e pela Portaria 2914/11 do MS, com exceção do carbono orgânico, que foi analisado como complemento dos dados e pela possibilidade de relação com bactérias heterotróficas nas águas das nascentes.



**Figura 21** - Método volumétrico de neutralização para determinação de atributos químicos das amostras hídricas.

#### 4.2.5 Isolamento e análise fenotípica das colônias

A quinta etapa correspondeu ao isolamento das colônias a serem testadas frente aos antibióticos e à caracterização fenotípica das mesmas (Figura 22). Esta caracterização foi feita para posterior classificação e estudo da diversidade dos isolados. Foram selecionadas quatro colônias de cada uma das placas, em que se fez a determinação da densidade total de bactérias heterotróficas. As colônias selecionadas foram analisadas quanto ao formato, cor, presença ou não de brilho e goma. Cada uma dessas colônias foi repicada em tubos individuais, contendo o meio Plate Count Agar, e submetidas ao crescimento em estufa bacteriológica por  $48 \pm 3$  horas a  $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  para isolamento (CETESB, 2006). No total, foram obtidas 144 cepas referentes à estação chuvosa, sendo 12 pertencentes a cada ponto de coleta, e 98 cepas referentes à estação seca. Não foi possível isolar 12 colônias de cada ponto nesta estação, devido ao menor crescimento bacteriano obtido.



**Figura 22** - Análise fenotípica das colônias e isolamento das mesmas em tubos inclinados.

#### 4.2.6 Antibiograma

A sexta etapa consistiu na realização do antibiograma, por meio da técnica do disco de difusão, também conhecida como método de Kirby-Bauer (BAUER, 1966), recomendado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003). Foram testados 10 tipos de antibióticos, selecionados em função da representação das diversas classes de antimicrobianos, priorizando aqueles mais utilizados na clínica médica. Os antibióticos escolhidos com os respectivos valores de referência para os halos de inibição estão apresentados no quadro 3.

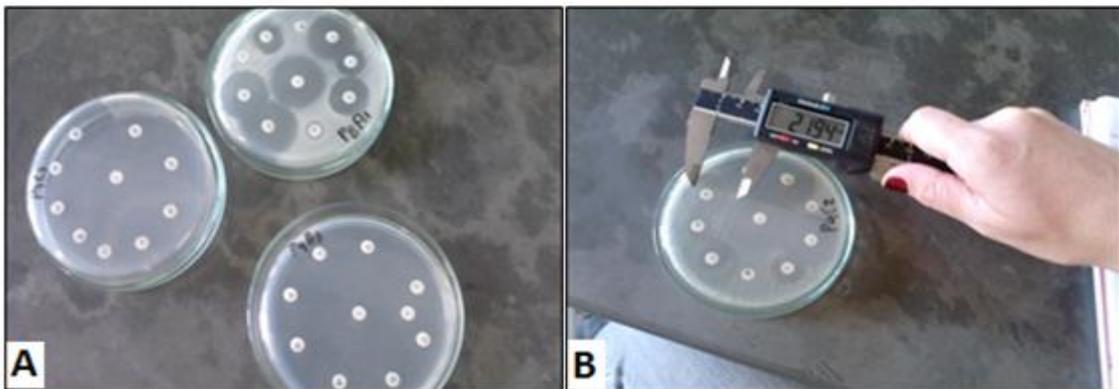
Para a realização do antibiograma, as cepas isoladas nos tubos inclinados foram previamente ressuspensas, uma a uma, em tubos contendo 10 mL de água estéril, com o auxílio de uma alça de platina também estéril. Utilizou-se inóculo na quantidade suficiente para se atingir o grau de turvação 0,5, comparativamente ao tubo padronizado de acordo com a escala de McFarland (BIER, 1994). Após esse processo, com o auxílio de um swab, espalhou-se o inóculo em placas de Petri contendo o meio de cultura Plate Count Agar (APHA, 1999). Após este processo, os 10 discos de antimicrobianos foram distribuídos, uniformemente, nas placas com auxílio de uma pinça. As placas foram, novamente, incubadas a  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$  por  $48 \pm 3$  horas em estufa bacteriológica (CETESB, 2006). Todos os procedimentos foram realizados em câmara de segurança biológica, no laboratório de Microbiologia, da Unifei.

**Quadro 3** - Antibióticos usados no antibiograma com suas respectivas classificações e valores de referência para a determinação da sensibilidade.

<b>Antimicrobiano</b>	<b>Classificação</b>	<b>Resistente (R)</b>	<b>Intermediário (I)</b>	<b>Sensível (S)</b>
Amoxicilina AMO 10 µg	Penicilina*	≤ 13	14-16	≥ 17
Aztreonam ATM 30 µg	Monobactam*	≤ 17	18-20	≥ 21
Cefalexina CFE 30 µg	Cefalosporina* 1ª G	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefepime CPM 30 µg	Cefalosporina* 4ª G	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefoxitina CFO 30 µg	Cefalosporina* 2ª G	≤ 14	15-17	≥ 18
Ciprofloxacina CIP 5 µg	Quinolonas	≤ 15	16-20	≥ 21
Cloranfenicol CLO 30 µg	Cloranfenicol	≤ 12	13-17	≥ 18
Gentamicina GEN 10 µg	Aminoglicosídeo	≤ 12	13-14	≥ 15
Penicilina G PEN 10 UI	Penicilina*	≤ 14	-	≥ 15
Vancomicina VAN 30 µg	Glicopeptídeo	≤ 14	15-16	≥ 17

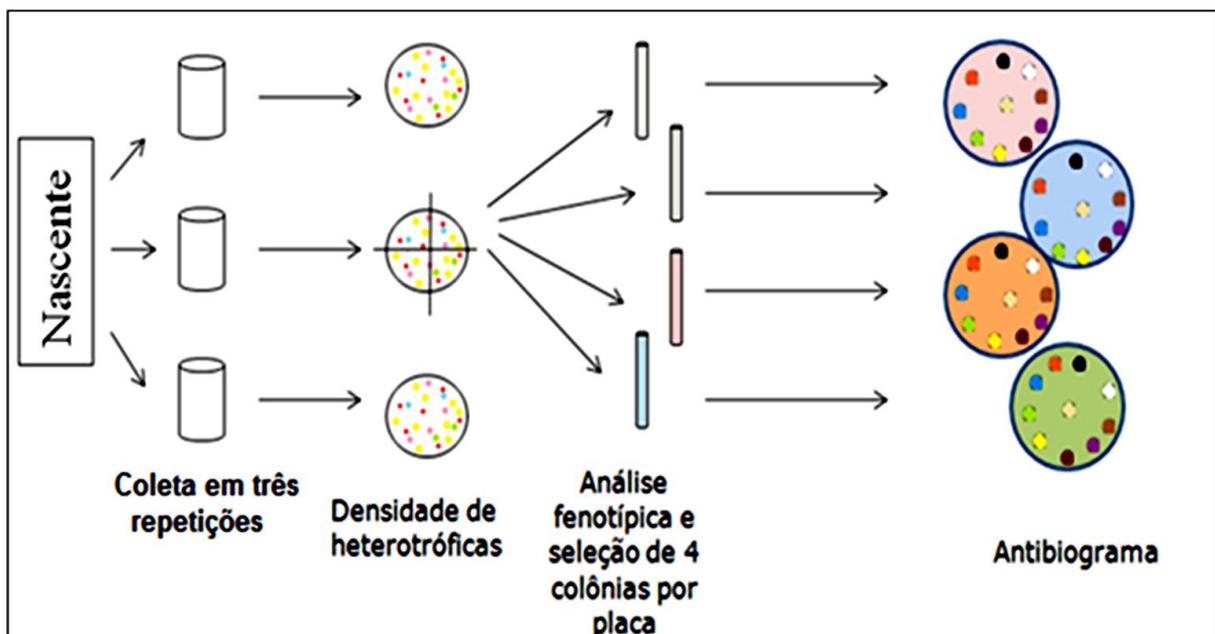
FONTE: Adaptado de CECON (2012). \*Classe dos β lactâmicos

Após o período de incubação, fez-se a medição da variável halo de inibição formado ao redor de cada disco (mm), com o auxílio de um paquímetro digital (Figura 23). Os diâmetros obtidos foram comparados aos diâmetros de referência, contidos em uma tabela fornecida pelo fabricante (CECON) dos discos de antibióticos (Quadro 3). Dessa forma, definiu-se o perfil de resistência de cada cepa diante dos 10 antimicrobianos testados, utilizando-se o seguinte código: sensível (S), intermediária (I) ou resistente (R).



**Figura 23** - Antibiograma. Placas de Petri com discos de antibióticos (A), mensuração do diâmetro do halo de inibição do crescimento bacteriano com paquímetro digital (B).

Para facilitar o entendimento, as análises microbiológicas, incluindo a fase de realização do antibiograma, estão representadas na figura 24.



**Figura 24** - Esquema das análises microbiológicas e do antibiograma.

#### 4.2.7 Análise estatística

Os atributos físico, químicos, microbiológicos e o perfil de resistência bacteriano das amostras de água das nascentes estudadas foram submetidos à análise estatística descritiva, calculando-se a média aritmética e suas respectivas amplitudes, desvios padrão e variâncias. Utilizou-se a análise multivariada por meio da técnica de componentes principais, pelo *software* PC-ORD<sup>®</sup> (Mc CUNNE; MEFFORD, 1997), de forma a melhor evidenciar as relações entre os pontos de coleta (e uso do solo) e os atributos estudados.

A análise dos componentes principais possibilita uma análise conjunta de todos os atributos medidos, permitindo que se estabeleça uma relação entre eles e a qualidade da água. Por meio desta análise é possível que se extraia o máximo de informações de todas as variáveis medidas, pois ela explica a estrutura de variância e covariância dos dados originais (JOLLIFFE, 1973).

Com a descrição morfológica das colônias das bactérias heterotróficas isoladas nas estações seca e chuvosa, os dados fenotípicos (item 4.2.5) foram transformados em números e submetidos à análise de agrupamento por similaridade por meio do *software* STATISTICA (STASOFT, 2005).

Os números correspondentes às características morfológicas, de forma a incorporar no agrupamento, foram:

Formato: Circular (1); oval (2); em cometa (3); estrelada (4); puntiforme (5); meia lua (6); disco voador (7); filamentosa (8).

Cor: Amarelo queimado (1); incolor (2); salmão (3); leitosa (4); branca (5); amarelo (6); creme (7); rosada (8); caramelo (9); pink (10); laranja (11); amarelo claro (12); amarelo fluorescente (13); castanha (14); roxa (15).

Brilho: Presença (1), ausência (2).

Goma: Presença (1), ausência (2).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Análises físicas e químicas

Os resultados das médias aritméticas das variáveis físicas e químicas, referentes às amostras hídricas dos diferentes pontos de coleta medidos nas estações seca (S) e chuvosa (C) estão apresentados nas tabela 1. Os pontos de coleta 2, 5, 9, 10 e 11, destacados em cinza, apresentam águas que são utilizadas com finalidade nutricional.

A condutividade está relacionada à capacidade de condução de eletricidade pela água. Ela representa uma medida indireta da presença de poluentes, sendo que valores próximos ou superiores a  $100 \mu\text{S cm}^{-1}$  podem estar associados a impactos ambientais expressivos (CETESB). As amostras com maiores valores médios de condutividade, em ambas as estações, são aquelas referentes ao ponto de coleta 5, e as amostras que apresentaram menores valores correspondem ao ponto 12, na estação seca, e aos pontos 2 e 12, na estação chuvosa. Entretanto, não foi possível estabelecer uma influência do período de coleta, pois alguns pontos apresentaram valores maiores na estação seca e outros, valores maiores na estação chuvosa.

O ponto 5, onde se registrou maior condutividade média entre as estações ( $84,0 \mu\text{S cm}^{-1}$ ), corresponde a uma área de pastagem, com solo bastante degradado (Quadro 2), o que associado à não proteção da nascente, como relatado pela proprietária, pode ter influenciado no resultado, haja vista que valores elevados de condutividade em corpos hídricos se relacionam a presença de poluentes. O ligeiro aumento da condutividade média registrado na estação seca ( $86,43 \mu\text{S cm}^{-1}$ ), quando comparado ao valor obtido na estação chuvosa ( $81,57 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) pode ser consequência da grande mudança observada na área na estação de inverno, pois conforme citado anteriormente, o solo neste período apresentou-se visualmente, mais erodido.

**Tabea1** – Média dos atributos físicos e químicos das amostras de água coletadas na estação seca (S) e chuvosa (C).

Ponto	Condutividade ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )		Oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ )		pH		Turbidez (NTU)		Acidez ( $\text{mgL}^{-1} \text{CaCO}_3$ )		Alcalinidade ( $\text{mgL}^{-1} \text{CaCO}_3$ )		Dureza ( $\text{mgL}^{-1} \text{CaCO}_3$ )		TOC ( $\text{mg L}^{-1}$ )	
	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C
<b>N1</b>	26,23	38,87	8,38	7,69	7,12	7,05	2,14	5,9	5,33	13,33	8,00	25,33	19,97	18,43	5,06	0
<b>N2</b>	27,90	12,75	7,87	7,66	7,05	7,75	16,34	2,9	5,33	8,00	5,33	6,67	26,11	13,82	5,52	0,37
<b>N3</b>	53,43	64,80	9,47	7,28	6,98	7,61	52,76	362,67	6,67	9,33	14,67	41,33	41,47	27,65	3,80	0
<b>N4</b>	37,73	34,70	9,65	6,96	7,64	7,41	2,02	3,93	4,00	6,67	6,67	22,67	32,26	15,36	3,44	0,53
<b>N5</b>	86,43	81,57	9,47	6,34	7,48	6,13	2,37	0,46	8,00	18,67	14,67	49,33	56,83	35,33	2,21	0
<b>N6</b>	42,73	35,70	7,04	8,32	6,99	7,02	0,36	1,77	4,00	10,67	9,33	26,67	12,29	16,90	3,76	0
<b>N7</b>	36,47	46,20	6,90	8,45	7,48	7,62	1,35	1,57	5,33	10,67	8,00	33,33	18,43	19,97	3,87	0
<b>N8</b>	53,83	70,17	5,88	8,18	7,10	6,71	4,08	4,33	5,33	18,67	12,00	38,67	24,58	26,11	0	0
<b>N9</b>	64,50	36,77	5,57	8,13	6,23	6,45	1,35	5,83	10,67	20,00	13,33	25,33	18,43	35,33	2,12	0
<b>N10</b>	49,37	50,40	6,21	8,20	6,18	7,08	1,89	3,53	8,00	10,67	9,33	29,33	39,94	29,18	2,86	0
<b>N11</b>	32,60	42,43	6,72	7,64	7,53	7,65	4,12	6,00	4,00	9,33	9,33	29,33	18,43	16,90	0,91	1,47
<b>N12</b>	15,72	15,05	6,80	7,50	7,61	6,86	2,87	3,93	5,33	10,67	4,00	12,00	19,97	6,14	0,78	4,51

\* Colunas em cinza indicam as pontos em que as águas são utilizadas como fonte nutricional por seres humanos.

O ponto 12, onde se registrou a menor condutividade média entre as estações ( $15,4 \mu\text{S cm}^{-1}$ ), corresponde à nascente no interior da reserva Serra dos Toledos. A área é, aparentemente, preservada (apesar de indícios da presença de animais de grande porte dentro da reserva devido à presença de estrume), portanto o resultado obtido é supostamente coerente com este estado de maior preservação, haja vista que menores índices de condutância na água indicam menores impactos no ambiente (CETESB, 2008). O ponto 2, que se refere a uma fonte de expressiva utilização nutricional por seres humanos, também apresentou um baixo valor médio de condutividade entre as estações ( $20,3 \mu\text{S cm}^{-1}$ ). Foi relatado pelo proprietário que a nascente sempre foi bem protegida por meio da manutenção da vegetação nativa ao redor e de cercas para prevenir o contato com animais. A Portaria n. 2.914 e a Resolução Conama n. 357 não estabelecem limites para a condutividade elétrica em águas destinadas ao consumo humano.

A determinação do oxigênio dissolvido na água é importante para se avaliar as condições hídricas e identificar possíveis impactos ambientais como eutrofização e poluição orgânica. Baixos teores de oxigênio dissolvido indicam decomposição de matéria orgânica por microrganismos aeróbios. Além disso, o oxigênio dissolvido é indicativo da preservação da vida aquática, e segundo a Resolução CONAMA 357/05, o valor mínimo de oxigênio para propiciar essa preservação é de  $5,0 \text{ mg/L}$ . Em condições normais, a água contém oxigênio dissolvido, cuja concentração depende da altitude e temperatura (CETESB). Todas as amostras analisadas apresentaram boas concentrações de oxigênio dissolvido, acima do valor mínimo estabelecido pela resolução CONAMA 357/05 de  $5,0 \text{ mg/L}$ , entretanto, não se observou influência da estação nos valores medidos para este atributo, apesar de se saber que temperaturas menores favorecem a dissolução de gases na água. O ponto 3 apresentou o maior valor médio de oxigênio dissolvido na água entre as estações ( $8,38 \text{ mg/L}$ ), o que pode estar associado ao maior fluxo e queda d'água desta nascente, que e por esse motivo, era utilizada para mover uma roda para geração de energia elétrica na propriedade. Esses fatores, conforme descrito por Kubitzka (1998) podem favorecer a incorporação de oxigênio. Ainda, segundo Fiorucci e Filho (2005), outros fatores interferem com a solubilização dos gases na água, como a altitude, já mencionada, e a salinidade que, em baixas concentrações, favorece a dissolução do oxigênio nos ambientes aquáticos.

O potencial hidrogeniônico (pH) representa, em escala antilogarítmica, a concentração de íons hidrogênio presentes em solução. Este atributo não oferece grande importância para o consumo humano nem para os organismos aquáticos, exceto se os valores estiverem extremamente elevados ou reduzidos, pois assim podem causar irritação e queimadura na pele e em órgãos internos. Valores entre 6 e 9 são compatíveis com o equilíbrio e a vida aquática (CETESB). Valores muito afastados da neutralidade podem afetar a biologia dos sistemas hidrológicos, interferindo com a vida de peixes, e até mesmo de microrganismos. Nenhuma das amostras analisadas apresentou valor discrepante, todas apresentaram valores de pH dentro da faixa desejável, em ambas as estações e também não se observou interferência do período de coleta com os valores deste atributo.

A turbidez indica a presença de partículas em suspensão na água que oferecem dificuldade à passagem de luz no líquido e é um atributo de aspecto estético que condiciona a aceitação ou rejeição da água para finalidades diversas. O valor máximo permitido para água com finalidade nutricional, segundo a portaria 2419/11 do MS é de 5,0 NTU. Como se pode observar na tabela 1, a estação chuvosa apresentou maior valor médio de turbidez para as amostras analisadas (33,57 NTU) que a estação seca (7,64 NTU). Esta constatação está relacionada ao período de coleta, pois a maior precipitação, registrada nesta estação, proporciona maior lixiviação, com aumento de sedimentos nos corpos aquáticos (CETESB). A maior erosão dos solos pelas chuvas ocorre devido ao mau uso dos mesmos e a retirada da cobertura vegetal, que dificulta a fixação dos seus componentes pelas raízes das plantas (CETESB). A amostra (Figura 6) da nascente de número 3 apresentou o maior valor de turbidez nas duas estações, o que pode ser consequência da maior declividade da área, associada à perda de solo no local (Figura 12). As águas dos pontos 2 (estação seca), 9 e 11 (estação chuvosa), utilizadas para consumo nutricional humano, excederam o valor máximo permitido de turbidez (5,0 NTU) estabelecido pela portaria 2914/11 do MS. Outras águas, entretanto, que não são utilizadas com esta finalidade apresentaram valores suficientemente bons de turbidez, entretanto, isto não é suficiente para caracterizar a água como potável.

A dureza, segundo Richter (2009 apud RUBILAR; UEDA, 2013) é a medida da capacidade da água em precipitar sabões, por meio da combinação desses compostos com sais de cálcio e magnésio, principalmente, formando

complexos insolúveis em água. Ainda segundo o autor, águas muito duras podem ocasionar cálculos renais, além de problemas cardíacos. De acordo com a portaria 2914/11 do MS, águas destinadas para consumo humano não devem exceder 500 mg/L  $\text{CaCO}_3$ . Todas as amostras hídricas coletadas apresentaram baixos valores para este atributo, e podem ser classificadas como águas brandas ou moles, conforme o mesmo autor. Observou-se, para este atributo, que a estação de coleta não influenciou nos resultados, pois algumas amostras apresentaram maiores valores na estação seca e outras, maiores valores na estação chuvosa, além disso, os valores médios de dureza, entre os períodos de coleta, foram próximos, sendo 19,20 mg/L  $\text{CaCO}_3$  na estação chuvosa e 22,27 mg/L  $\text{CaCO}_3$  na estação seca. As amostras analisadas não ultrapassaram o valor máximo permitido pela Portaria n. 2.914/2011 do Ministério da Saúde que é de 500 mg/L de  $\text{CaCO}_3$ , mesmo valor também estabelecido pela Resolução Conama n. 357.

O carbono orgânico total, como citado anteriormente, está relacionado por meio da sua fração assimilável (AOC), com a concentração de microrganismos heterotróficos nos sistemas aquáticos (ROCHA, 2007). Para se demonstrar esta relação, determinou-se a concentração de carbono orgânico total (TOC), por meio do analisador de carbono da marca Analytikjena. Como se pode observar na Tabela 1, a estação seca apresentou a maior concentração média de carbono orgânico nas águas analisadas (2,86 mg/L) que a estação chuvosa (0,57 mg/L), que pode ter ocorrido como consequência da diminuição do volume hídrico em decorrência da baixa precipitação (30,2 mm) registrada no período de estiagem, causando uma concentração desse componente.

A relação entre a qualidade hídrica e todos estes atributos analisados, com suas interações e influências uns sobre os outros, poderão ser melhor demonstrados por meio da análise de componentes principais, já que essa técnica é suficiente, capaz e eficiente em analisar todos os atributos de uma só vez, evidenciando a relação entre eles com a variância dos componentes.

## 5.2 Análises microbiológicas

O resultado dos atributos microbiológicos, com seus valores de amplitude, desvio padrão e variância, referentes às estações seca e chuvosa, estão apresentados na tabela 2. Novamente, os pontos de coleta 2, 5, 9, 10 e 11 apresentam águas que são utilizadas com finalidade nutricional e, por isto, foram destacados em cinza na tabela.

A avaliação da densidade total de bactérias heterotróficas, conforme já citado, é um dos itens estabelecidos pela Portaria 2914/2011 do MS para se determinar a qualidade microbiológica de águas destinadas ao consumo humano. Conforme Domingues et al. (2007) a contagem inclui a detecção inespecífica de bactérias e esporos, que requerem carbono orgânico como fonte de energia, que podem ser pertencentes à flora natural aquática ou ao material fecal, e neste último caso, podem ser potencialmente patogênicos. Microrganismos como *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp*, *Pseudomonas sp*. pertencem ao grupo das bactérias heterotróficas e são conhecidos por causarem infecções nos tratos respiratório, urinário e intestinal. Bactérias pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas* e *Klebsiella* estão naturalmente presentes nos solos e água e podem ser patógenos oportunistas, especialmente quando em elevadas concentrações nesses ambientes (ALLEN et al., 2004).

Conforme a Portaria 2914/2011, a densidade de bactérias heterotróficas deve ser inferior a 500 UFC/mL de amostra hídrica. Com base nesse valor estabelecido, as águas utilizadas para consumo humano, das nascentes 2, 9 e 10, referentes à estação seca, e as águas das nascentes 9, 10 e 11, referentes à estação chuvosa, estão dentro dos limites estabelecidos, sendo que as nascentes 9 e 10 foram as únicas que mantiveram os valores dentro dos limites nas duas estações.

**Tabela 2** - Resultados da avaliação da densidade de bactérias heterotróficas obtidos para as doze nascentes nas estações seca (esquerda) e chuvosa (direita).

P.	SECA				CHUVOSA			
	DMH (UFCmL <sup>-1</sup> )	Amplit. (UFC mL <sup>-1</sup> )	Desvio padrão	Variân	DMH (UFCmL <sup>-1</sup> )	Amplit. (UFC mL <sup>-1</sup> )	Desvio padrão	Variân
1	27	60	31	933	397	930	523	273633
2	73	210	118	14033	13510	19920	15253	232668300
3	90	50	26	700	15557	39080	21771	473997233
4	60	30	17	300	16150	24350	12719	161777500
5	520	230	118	13900	32097	23850	13767	189528033
6	290	80	44	1900	2237	5620	3191	10184233
7	517	30	15	233	953	1300	734	538533
8	43	30	15	233	673	1060	538	289433
9	10	20	10	100	107	70	38	1433
10	40	40	20	400	193	110	57	3233
11	1060	290	145	21100	383	250	131	17033
12	807	310	176	31033	237	320	162	26133

\* Linhas em cinza indicam os pontos em que as águas são utilizadas como fonte nutricional por seres humanos. DMH (Densidade média de bactérias heterotróficas).

Na tabela 2 os valores destacados em verde representam as nascentes utilizadas para consumo humano em que se observaram os menores índices de bactérias heterotróficas. As águas destas nascentes estão em conformidade com o estabelecido pela portaria do ministério da saúde, apresentando bactérias heterotróficas abaixo de 500 UFC/mL de amostra hídrica. Em vermelho estão destacadas as nascentes utilizadas para consumo humano que apresentaram contagem de bactérias heterotróficas muito acima do valor estabelecido pela portaria. Observam-se que outras nascentes, não utilizadas para consumo humano, apresentaram valores de bactérias heterotróficas dentro do limite estabelecido pela portaria, entretanto, somente este atributo não é suficiente para classificar uma água como potável.

De modo geral, observou-se maior valor médio de densidade de bactérias heterotróficas na estação chuvosa (6874,45 UFC/mL) e menor valor médio, na estação seca (294,75 UFC/mL). Com exceção dos valores obtidos para os pontos 11 e 12 (limite e dentro da reserva, respectivamente), que apresentaram maior valor médio na estação seca os demais pontos apresentaram maiores densidades de

bactérias heterotróficas na estação de chuvas. Para esses dois pontos, possivelmente, em virtude da proximidade da reserva, as condições climáticas não variam muito entre seca e chuvosa. No trabalho realizado por Amaral (2003) resultado semelhante referente à contagem de bactérias heterotróficas em diferentes períodos de coleta foi encontrado. O autor avaliou 180 amostras de águas naturais de 30 propriedades rurais situadas na região Nordeste de São Paulo, nas estações seca e chuvosa e constatou que o valor médio de bactérias heterotróficas foi maior nas amostras da estação chuvosa. O autor argumenta que esses dados demonstram a susceptibilidade à contaminação que as fontes naturais estão expostas, especialmente no período de chuvas, em que os microrganismos do solo atingem rapidamente os recursos hídricos devido à percolação da água. Para o autor, esses resultados evidenciam o risco que as fontes naturais podem representar, caso não se apliquem medidas que visem a preservação da qualidade hídrica.

Conforme a tabela 2, pode-se constatar que o ponto de coleta de número 5 apresentou a maior média de densidade de bactérias heterotróficas observada entre as duas estações (16308,35 UFC/mL) e o ponto 9 apresentou a menor média (58,33 UFC/mL). O ponto 5 refere-se a uma área de pastagem, em que se observaram focos de erosão dos solos, além de se constatar que a nascente não era protegida, pois se cultivavam alimentos no entorno, e havia contato de animais ruminantes com a mesma. O ponto 9 apresentou a menor densidade média de bactérias heterotróficas entre as duas coletas (58,33 UFC/mL) e, conforme se constatou, neste ponto a nascente era bem preservada e mantida fora do contato com animais. Contrariando o que se é conhecido sobre a relação entre bactérias heterotróficas e a concentração de carbono orgânico dissolvido na água, relatada por Amaral (2007), a maior densidade de bactérias heterotróficas não foi observada nas amostras de inverno (seca), as quais apresentaram maiores concentrações de carbono orgânico total. A redução na densidade de bactérias heterotróficas, neste período de coleta, pode ter outras influências, como por exemplo, as baixas temperaturas registradas nesta estação, que reduzem o metabolismo bacteriano, e, conseqüentemente, inibem o seu crescimento. De acordo com Rocha (2007) a atividade bacteriana aumenta em 100 % quando a temperatura se eleva em 10 °C. Não se pode afirmar ao certo qual fator exerce maior influência na concentração bacteriana entre as diferentes estações. Se por um lado as temperaturas mais

elevadas e a lixiviação favorecem a maior concentração de bactérias heterotróficas na estação chuvosa, por outro, a redução do volume hídrico na estação seca também poderia promover uma concentração das bactérias na água, assim como, o maior volume hídrico na estação chuvosa, poderia promover uma diluição das mesmas. Esta análise será esclarecida por meio da análise de componentes principais.

Pode-se observar também, que outras nascentes, que não são utilizadas como fonte nutricional (nascentes 1, 3, 4 e 8, na estação seca e nascentes 1 e 12 na estação chuvosa), apresentaram bons valores de densidade de bactérias heterotróficas, entretanto, este atributo não é suficiente para que a água seja considerada potável.

A maior variabilidade obtida nos dados (Tabela 2) se deve à dinâmica hídrica existente nos ambientes aquáticos, que sofre influência de diversos fatores. No trabalho realizado por França e Melloni (2013), no qual se avaliou a densidade de bactérias heterotróficas em águas de cachoeiras no sul do estado de Minas Gerais, resultado semelhante foi obtido com relação à maior dispersão dos dados.

A contagem de coliformes totais, também prevista na Portaria 2914/11 do MS, faz-se necessária, pois apesar de nem todos os representantes deste grupo estarem relacionados à contaminação fecal, muitos deles fazem parte dos ecossistemas naturais, e são patógenos potenciais. Como a detecção de microrganismos patogênicos na água não é feita rotineiramente, pesquisam-se, de maneira mais viável, grupos de microrganismos específicos, que englobam os principais patógenos potencialmente presentes na água, como é o caso dos coliformes totais (CETESB, 2007).

De acordo com os resultados apresentados na tabela 3, a estação chuvosa apresentou valor médio de coliformes totais acima de 2419,2 UFC/mL, valor superior aquele observado na estação seca. Novamente, este resultado pode ser reflexo do maior índice de precipitação na estação chuvosa, que provoca contaminação dos recursos hídricos. Os maiores valores médios obtidos entre as estações se referem aos pontos 6 (área de pastagem com presença de gado e focos de erosão no solo), 7 (transição entre mata e pasto, sem a presença de gado), 11 (transição entre mata e pasto com a presença de gado nos arredores) e 12 (reserva biológica da serra dos Toledos, com possível presença de gado-estrupe presente), com valores médios superiores a 2419,2 UFC/mL e o menor valor médio entre as

estações corresponde ao ponto 9 (área de pastagem com gado presente) com média de 720,97 UFC/mL de bactérias pertencentes ao grupo dos coliformes totais. Na estação seca, época em que se observaram os menores índices de coliformes totais nas amostras hídricas, os pontos 2 (mata sem gado) e 10 (margem da rodovia sem gado) se apresentaram com contagem inferior a 50 UFC/mL de coliformes totais. Conforme estabelecido pela Portaria 2419/11 do MS, águas destinadas ao consumo humano devem ser isentas de bactérias do grupo coliforme total em 100 mL de amostra, portanto, conforme este atributo, nenhuma das fontes estudadas apresentou-se adequada para tal uso.

**Tabela 3** – Valores médios do número mais provável de bactérias do grupo dos coliformes totais e *Escherichia coli* por 100 mL de amostra hídrica, referentes aos doze pontos de coleta nas estações seca e chuvosa.

PONTO	Coliformes totais (NMP/100mL)		E. coli (NMP/100mL)	
	Estação Seca	Estação Chuvosa	Estação Seca	Estação Chuvosa
1	129,8	>2419,2	7,40	2,77
2	19,2	>2419,2	11,00	99,03
3	165,2	>2419,2	6,10	127,80
4	165,2	>2419,2	29,50	151,40
5	165,2	>2419,2	35,90	7,97
6	> 2419,2	>2419,2	2,00	>200,5
7	> 2419,2	>2419,2	11,10	149,57
8	866,4	>2419,2	0,00	44,57
9	104,30	1337,63	0,00	7,27
10	49,50	1986,08	0,00	31,87
11	> 2419,2	>2419,2	83,1	> 200,5
12	> 2419,2	>2419,2	129,80	122,93

\* Colunas em cinza indicam as nascentes em que as águas são utilizadas como fonte nutricional por seres humanos.

Na tabela 3 foram destacadas em verde as nascentes utilizadas para consumo humano que apresentaram os menores índices de Coliformes totais e *E.*

*coli*, e em vermelho as que apresentaram maiores valores para estes atributos microbiológicos.

A determinação de *Escherichia coli*, conforme já mencionado, é importante, pois este é o principal microrganismo associado à presença de material fecal na água. De acordo com a Portaria 2914/11 do MS, a água destinada ao consumo humano deve estar ausente de *E. coli* em 100 mL de amostra. Conforme os resultados obtidos, apenas as águas das nascentes 8 (pasto com gado localizado em área urbana), 9 (área de pastagem sem gado) e 10 (pasto à margem da rodovia MGC-383, sem a presença de gado), referentes à estação seca, atendem ao padrão estabelecido pela portaria do MS. A nascente de número 8 (pasto com gado localizado em área urbana), entretanto, não é utilizada com finalidade nutricional, e as nascentes de número 2 (área de mata sem gado presente), 5 (área de pastagem com gado, com focos de erosão dos solos e pequena área de cultura de verduras) e 11 (área de transição entre mata e pasto com presença de gado), que são utilizadas, não apresentaram conformidade com os valores estabelecidos pela portaria. Maiores valores médios também foram registrados na estação chuvosa.

Nogueira et al. (2003) estudaram a qualidade de águas naturais de propriedades rurais no Estado do Paraná e constataram que a qualidade microbiológica era comprometida em períodos quentes e úmidos, devido ao aumento da contaminação pelas chuvas. Amaral (2003) também encontrou resultado semelhante com relação à qualidade das águas naturais e a influência da estação. No estudo realizado na região Nordeste do Estado de São Paulo, constatou-se que 90 % das nascentes analisadas na estação chuvosa se apresentaram fora dos padrões microbiológicos estabelecidos, ao passo que para a estação seca, 83,3 % das nascentes não estavam em conformidade. O autor observou maiores valores médios de bactérias heterotróficas, bactérias do grupo coliforme total e *Escherichia coli* na estação chuvosa.

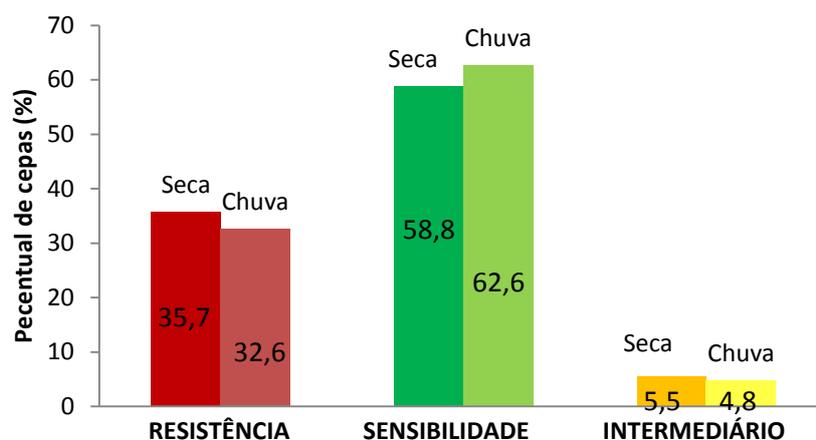
Pode-se observar que realmente houve influência sazonal sobre a qualidade hídrica das amostras das áreas de estudo, especialmente sobre os indicadores microbiológicos, mostrando que o estudo da qualidade em diferentes épocas tem sido recomendado (DONADIO et al., 2005).

Quanto aos atributos microbiológicos: Nascentes 9 e 10 apresentaram a melhor qualidade na estação seca e a nascente 9 a melhor qualidade na estação

chuvosa. Nascentes 11 e 12 apresentaram pior qualidade microbiológica na estação seca e as Nascente 6 e 11 a pior qualidade microbiológica na estação chuvosa.

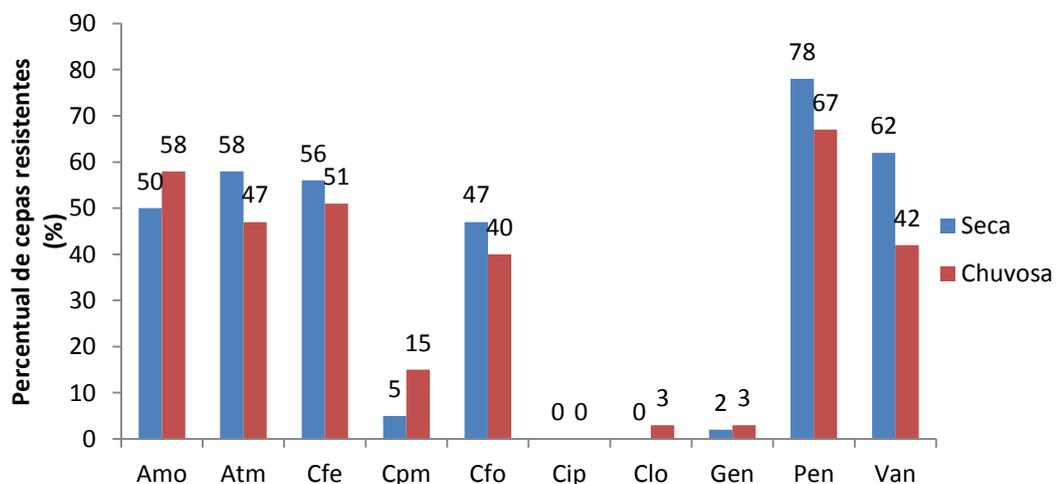
### 5.3 Teste de resistência aos antimicrobianos

Para a avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foram isoladas 98 cepas das amostras hídricas coletadas na estação seca, sendo quatro referentes ao ponto 1, sete ao ponto 2, doze ao ponto 3, seis ao ponto 4, nove ao ponto 5, doze ao ponto 6, dez ao ponto 7, dois ao ponto 8, zero ao ponto 9 e doze aos pontos 10, 11 e 12. Na estação chuvosa, isolaram-se 144 cepas, doze referentes a cada ponto. Cada uma das cepas foi testada frente a dez antimicrobianos (Quadro 3). Os resultados obtidos demonstraram que houve baixa variação no percentual de cepas resistentes, sensíveis e com perfil intermediário nas diferentes estações (Figura 25), além de uma uniformidade da ação dos antibióticos nos isolados entre as estações (Figura 26). Penicilina, vancomicina, aztreonam, cefalexina, amoxicilina e cefoxitima apresentaram maiores percentuais de cepas resistentes nas estações seca e chuvosa, enquanto cefepime, ciprofloxacino, gentamicina e cloranfenicol apresentaram baixos percentuais de cepas resistentes em ambas as estações de coleta.



**Figura 25** – Percentual de resistência, sensibilidade e de perfil intermediário de isolados de bactérias heterotróficas identificados nas amostras de água coletadas nas estações seca e chuvosa em todas as nascentes.

Entre os antibióticos testados, a penicilina foi o que apresentou maior percentual de resistência (Figura 26) o que se deve à intensa e indiscriminada utilização do mesmo, que promoveu uma seleção rápida de cepas resistentes nos diversos ambientes (BRUNTON et al., 2007). Por outro lado, todos os isolados bacterianos obtidos (242) foram sensíveis ao antimicrobiano ciprofloxacino, em ambas as estações. Segundo Neu (1987 apud LOPES et al., 1998) este antimicrobiano foi introduzido na prática clínica na década de 80 quando se mostrou muito eficiente, inclusive contra diversas bactérias resistentes a outros antimicrobianos. No entanto, conforme o mesmo autor, atualmente, já se tem observado um crescimento de espécimes resistentes a esta droga. Todas as 98 cepas isoladas na estação seca foram sensíveis ao antibiótico cloranfenicol e apenas 3 % das cepas da estação chuvosa apresentaram resistência a este antimicrobiano. O cloranfenicol apresenta amplo espectro de atividade e fácil penetração na célula bacteriana, tais características permitem que o mesmo seja utilizado, inclusive contra algumas cepas resistentes a outras drogas. Gentamicina também apresentou baixo percentual de resistência, 2 % apenas, na estação seca e 3 % na estação chuvosa. Essa droga, segundo Virto et al. (2002), pertence à classe dos aminoglicosídeos e apresenta amplo espectro de atividade além de baixa taxa de resistência patogênica. Cefepime também apresentou baixa resistência na estação seca (5 %), contra valor mais elevado na estação chuvosa (15 %). Os demais antimicrobianos apresentaram maiores percentuais de cepas resistentes a eles.

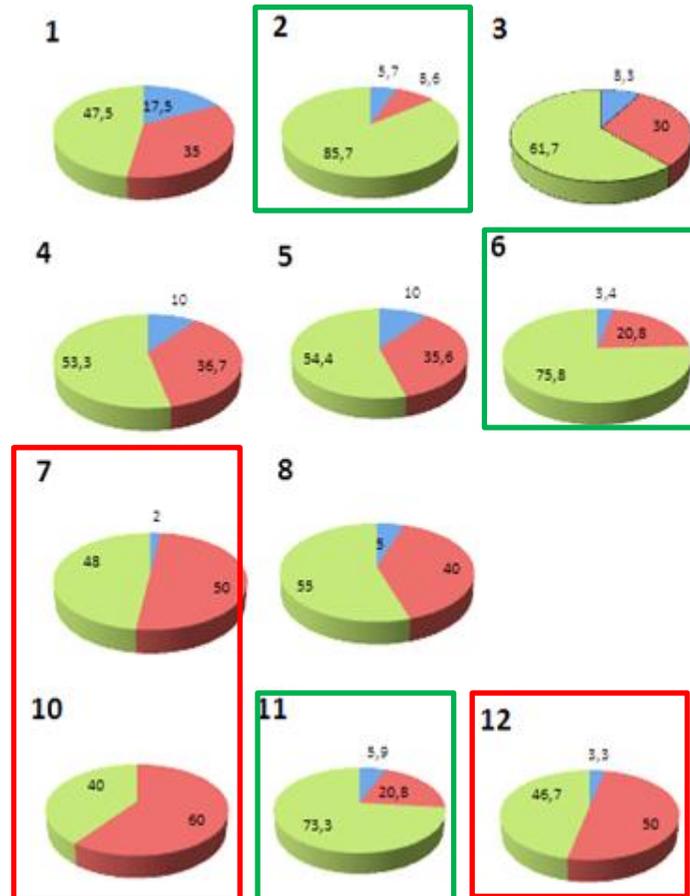


**Figura 26** – Percentual de cepas de bactérias heterotróficas resistentes aos antimicrobianos testados, em amostras de água das nascentes, nas estações seca e chuvosa.

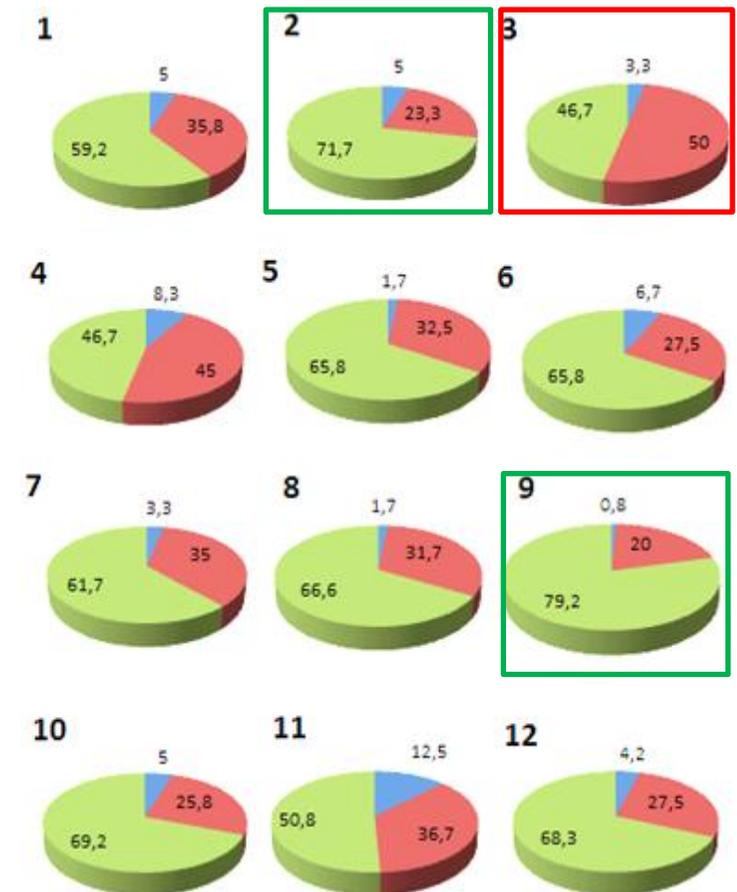
A figura 27 ilustra os percentuais de resistência para os isolados obtidos em cada uma das doze nascentes, nas coletas da estação seca (esquerda) e chuvosa (direita). Observa-se que, na estação seca, nos pontos 7 (transição entre mata e pasto, sem a presença de gado), 10 (pasto com gado localizado em área urbana) e 12 (reserva biológica da serra dos Toledos, com possível presença de gado-esterco presente), destacados em vermelho, foram obtidos isolados com maiores percentuais de resistência, todos com valores iguais ou superiores a 50 %. Os pontos 2 (área de mata sem gado presente), 6 (área de pastagem com presença de gado e focos de erosão no solo) e 11 (área de transição entre mata e pasto com presença de gado), destacados em verde, ao contrário, apresentaram cepas de elevados percentuais de sensibilidade, com valores superiores a 70 %, o que indica que o consumo destas águas, na estação seca, pode ser considerado mais seguro quanto à presença de microrganismos resistentes potencialmente danosos à saúde humana. Na estação chuvosa, apenas o ponto de coleta de número 3 (área de mata sem gado presente), destacado em vermelho, apresentou isolados com percentual de resistência igual a 50 %, os demais pontos apresentaram valores inferiores, sendo que os pontos 2 (área de mata sem gado presente) e 9 (área de pastagem sem gado), destacados em verde, apresentaram percentuais de sensibilidade superiores a 70 %, indicando também que na estação chuvosa as águas destes dois pontos ofereceram menores riscos quanto à presença de microrganismos resistentes.

Não se observou relação entre a estação de coleta e o percentual de resistência bacteriana, ou seja, os períodos chuvoso ou seco não interferiram na qualidade da água em termos de percentual de resistência apresentado pelas cepas isoladas frente aos antimicrobianos testados.

## SECA



## CHUVOSA



■ Intermediárias ■ Resistentes ■ Sensíveis

**Figura 27**– Percentual de resistência, sensibilidade e sensibilidade intermediária das cepas isoladas na estação seca (à esquerda) e na estação chuvosa (à direita), frente aos antimicrobianos testados, observado em cada uma das doze nascentes estudadas.

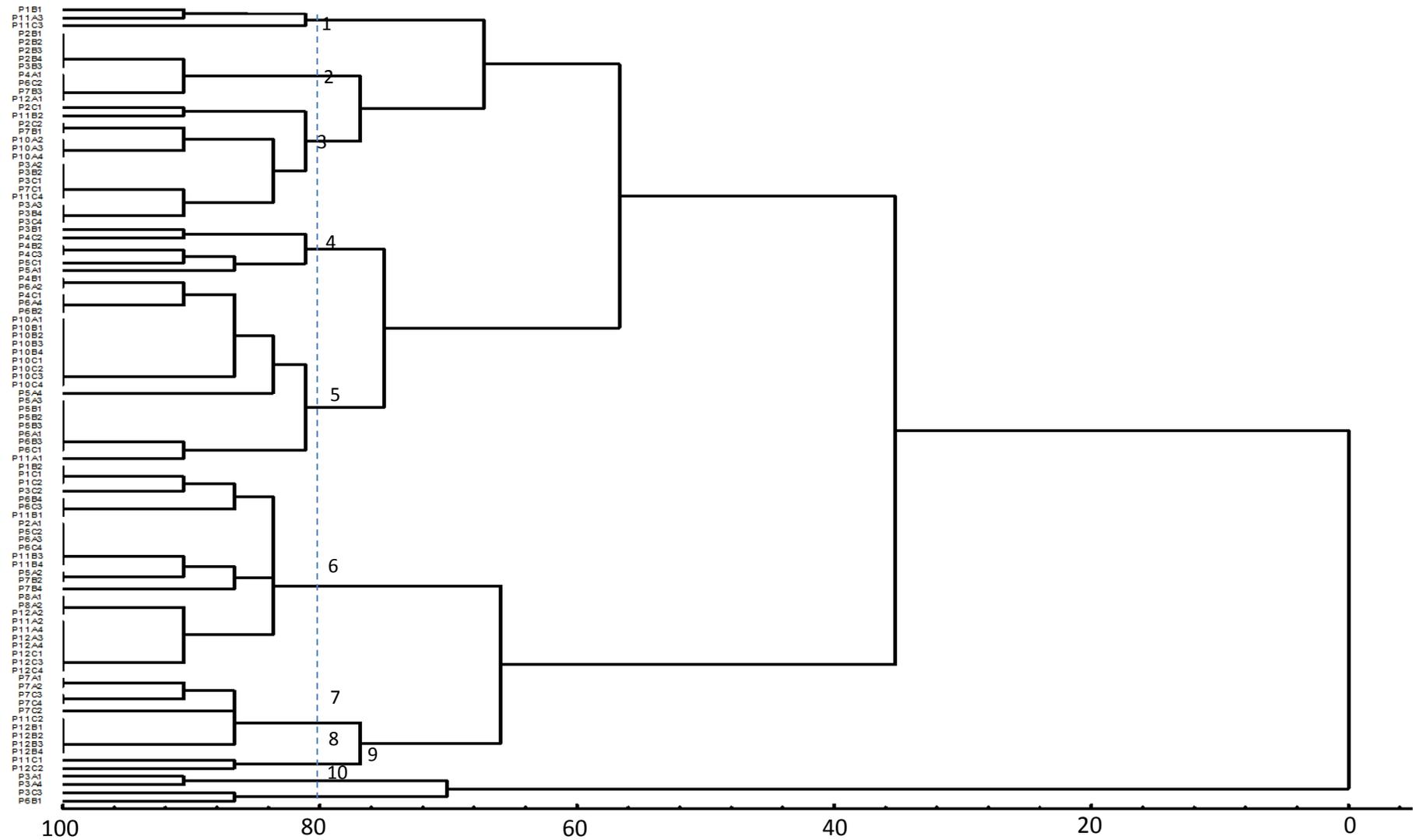
#### **5.4 Análise de agrupamento dos isolados bacterianos em função de seus aspectos morfoculturais**

As características morfoculturais dos isolados de bactérias heterotróficas das amostras hídricas dos diferentes pontos de coleta referentes às estações seca e chuvosa estão apresentadas, respectivamente, nos anexos III e IV. O resultado do agrupamento dos isolados estão nas figuras 29 e 30, respectivamente para as épocas seca e chuvosa.

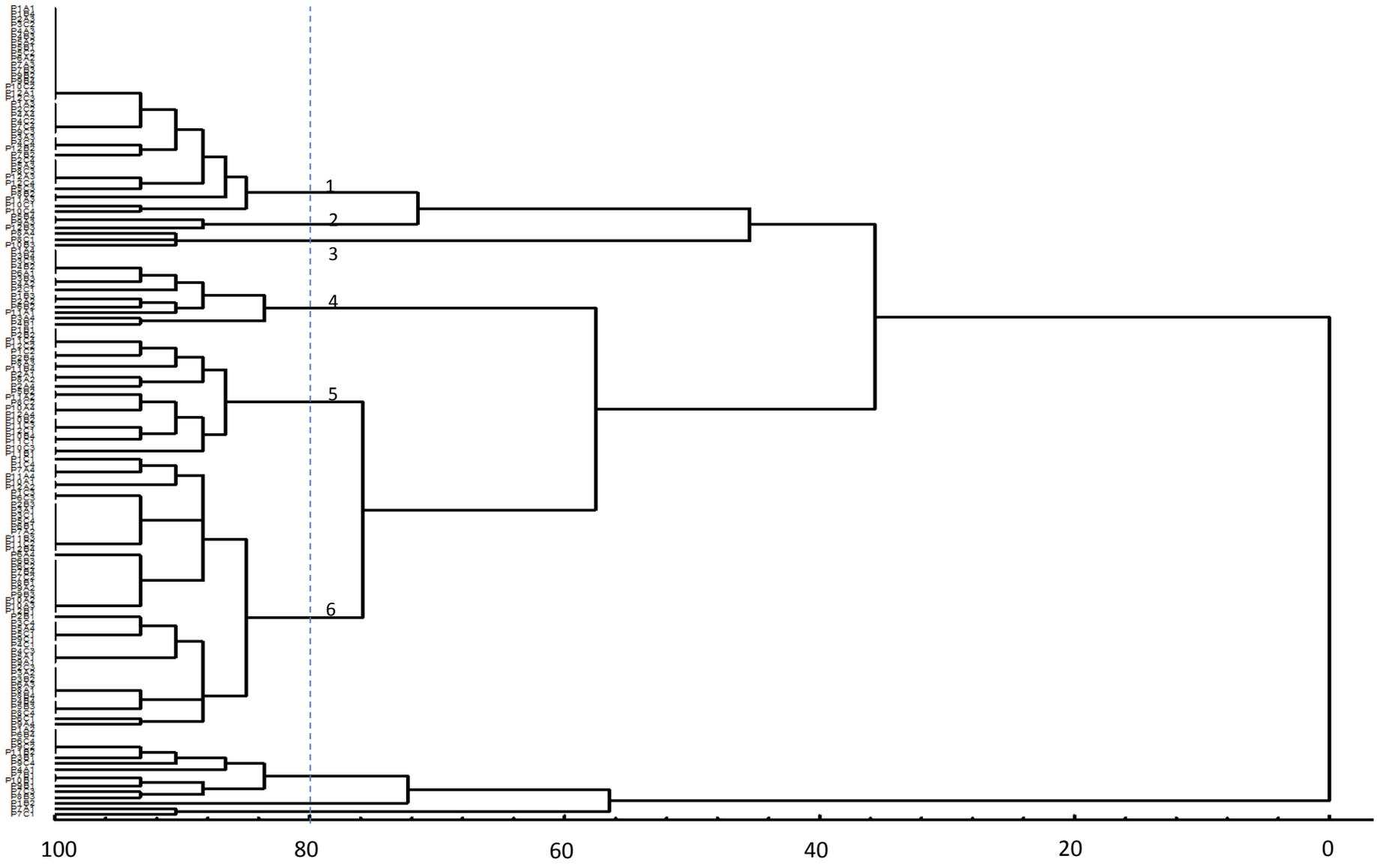
Constata-se que a 80 % de similaridade (Figura 28) puderam se identificar 10 grandes grupos fenotípico-culturais representantes das bactérias presentes nas águas das doze nascentes avaliadas na microbacia do ribeirão José Pereira na estação seca e 9 grandes grupos na estação chuvosa (Figura 29).

Para a estação seca pode se considerar o grupo 6 como o representante fenotípico cultural da estação, devido ao maior número de representantes bacterianos deste grande grupo (26 representantes). Para a estação chuvosa destaca-se esse mesmo grupo, com 48 representantes.

Verifica-se que os isolados bacterianos apresentaram grande similaridade (superior a 80 %) quanto às características morfoculturais, tanto na época seca (Figura 28) quanto na chuvosa (Figura 29). Tal resultado mostra que, do ponto de vista de crescimento em meio de cultura, os isolados são fenotipicamente muito semelhantes entre si, independentemente da época de estudo. Esse método, entretanto, não substitui os métodos moleculares de estudo da diversidade, mas pode ser indicado como uma medida de seleção de isolados que serão submetidos àqueles métodos para fins de análise da diversidade genética (MELLONI et al., 2004).



**Figura 28** - Dendrograma de similaridade entre as colônias selecionadas na estação seca, construído por meio de suas características fenotípica-culturais. A linha tracejada indica a separação dos grandes grupos com 80% de similaridade.



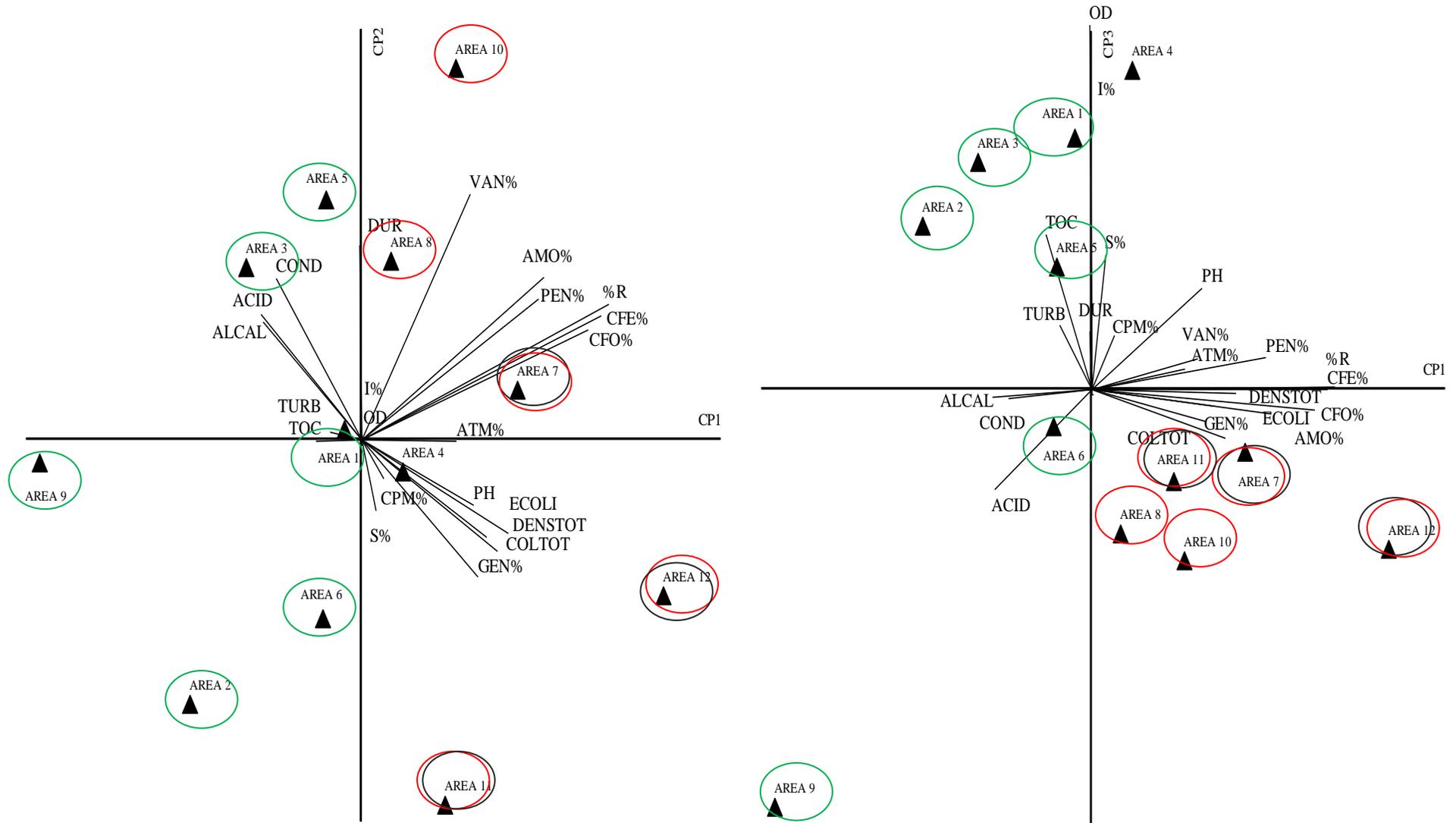
**Figura 29** - Dendrograma de similaridade entre as colônias selecionadas na estação chuvosa, construído por meio de suas características fenotípica-culturais. A linha tracejada indica a separação dos grandes grupos com 80% de similaridade.

## 5.5 Análise de componentes principais

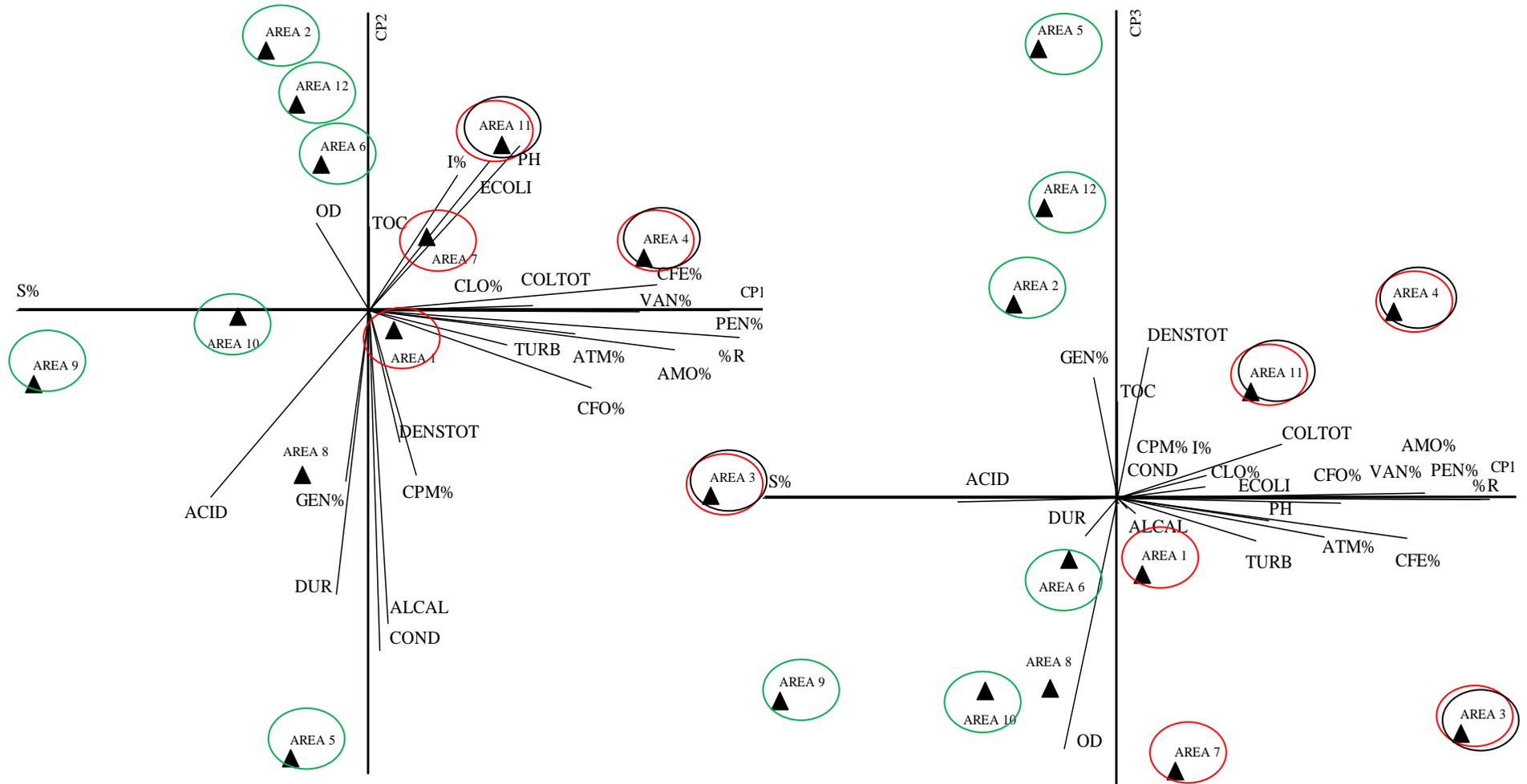
Dos componentes principais que explicaram 72,4 % da variância total para os atributos da coleta na estação chuvosa, o primeiro (CP1) explicou 39,1 %, o segundo (CP2), 24,2 % e o terceiro (CP3) 9,1 %. Para a estação seca, a variância total de 68,5 % foi explicada pelo primeiro (30,1 %), segundo (20,3 %) e terceiro (18,1 %) componente principal.

Para a estação seca pode-se observar (Figura 30) que maior resistência aos antibióticos testados foi apresentada pelos isolados bacterianos das amostras de água referentes às áreas 7, 8, 10, 11 e 12. As áreas 1, 2, 3, 5, 6 e 9, ao contrário, apresentaram pequena relação com a presença de bactérias resistentes advindas das águas de suas respectivas nascentes, além de terem apresentado melhores qualidades em termos microbiológicos, pois apresentaram pequena relação com a presença de bactérias heterotróficas, coliformes totais e *Escherichia coli* (Figura 30). Contrariamente, as amostras hídricas referentes às áreas 7, 11 e 12 foram as que apresentaram maior relação com a resistência bacteriana, presença de bactérias heterotróficas, coliformes totais e *Escherichia coli*. Observa-se, também, que não houve relação entre o atributo químico carbono orgânico total (TOC) e a densidade de bactérias heterotróficas, contrariando o resultado encontrado por Silva et al. (2006). No trabalho realizado por esses autores, avaliou-se a correlação entre índices de TOC e contagens de bactérias heterotróficas em amostras hídricas de uso laboratorial, e concluíram que elevadas concentrações bacterianas estiveram relacionadas a concentrações acima de 0,7 mg/L de carbono orgânico total (TOC).

Para a estação chuvosa, observa-se que maior resistência bacteriana foi encontrada nos espécimes bacterianos isolados das amostras hídricas referentes aos pontos 1, 3, 4, 7 e 11 (Figura 31). Resistência bacteriana, bactérias heterotróficas, *Escherichia coli* e coliformes totais estiveram mais relacionados com as amostras dos pontos 11 (igual para a estação seca), 3 e 4, e portanto foram classificadas de modo geral com baixa qualidade hídrica. As águas de melhor qualidade se referem às nascentes dos pontos 2, 5, 6, 9, 10 e 12, pois não estiveram fortemente relacionadas com resistência bacteriana, nem com bactérias heterotróficas, coliformes totais e *E. coli*.



**Figura 30** - Componentes principais CP1 x CP2 (a) e CP1 x CP3 (b) das médias dos atributos químicos, físicos e microbiológicos e do percentual de resistência bacteriana frente a 10 antimicrobianos das amostras hídricas referentes às doze nascentes (▲), coletadas na estação seca.



**Figura 31** - Componentes principais CP1 x CP2 (a) e CP1 x CP3 (b) das médias dos atributos químicos, físicos e microbiológicos e do percentual de resistência bacteriana frente a 10 antimicrobianos das amostras hídricas referentes às doze nascentes (▲), coletadas na estação chuvosa.

Os escores para os atributos analisados nos seus respectivos componentes principais encontram-se nas tabelas 4 e 5, respectivamente, para a estação seca e chuvosa. Sublinhando os escores iguais ou acima do valor em módulo 0,2000, simplesmente para facilitar a análise, verifica-se que há variação da relação entre escores e os componentes principais dos diferentes atributos, nas estações seca e chuvosa.

**Tabela 4** – Escores dos atributos físicos, químicos e microbiológicos determinados em amostras de água de 12 nascentes, na estação seca, nos três componentes principais.

<b>ATRIBUTOS</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Condutividade</b>	-0,1918	<u>0,2736</u>	-0,0754
<b>Oxigênio dissolvido</b>	-0,0295	0,0487	<u>0,4811</u>
<b>Ph</b>	<u>0,2202</u>	-0,1738	<u>0,2551</u>
<b>Turbidez</b>	-0,1181	0,0599	<u>0,2045</u>
<b>TOC</b>	-0,1419	-0,0287	<u>0,3142</u>
<b>Acidez</b>	<u>-0,2069</u>	<u>0,2350</u>	<u>-0,2526</u>
<b>Alcalinidade</b>	<u>-0,2098</u>	<u>0,2415</u>	-0,0687
<b>Dureza</b>	-0,0342	<u>0,3013</u>	0,1954
<b>Densidade de heterotróficas</b>	<u>0,2322</u>	<u>-0,2124</u>	-0,1023
<b>Coliformes totais</b>	<u>0,2418</u>	<u>-0,2286</u>	-0,1750
<b><i>Escherichia coli</i></b>	<u>0,2517</u>	<u>-0,2083</u>	-0,0557
<b>% Amoxicilina</b>	<u>0,2803</u>	<u>0,2753</u>	-0,1262
<b>% Aztreonam</b>	<u>0,2032</u>	-0,0227	0,1170
<b>% Cfe</b>	<u>0,3205</u>	<u>0,2400</u>	-0,0158
<b>% Com</b>	0,0992	-0,1344	0,1870
<b>% Cfo</b>	<u>0,3120</u>	<u>0,2263</u>	-0,1147
<b>% Gentamicina</b>	<u>0,2239</u>	<u>-0,2528</u>	-0,1421
<b>% Penicilina</b>	<u>0,2766</u>	<u>0,2562</u>	0,1417
<b>% Vancomicina</b>	<u>0,2161</u>	<u>0,3377</u>	0,1397
<b>% Total de Resistência</b>	<u>0,3263</u>	<u>0,2513</u>	0,0414
<b>% Total de Sensibilidade</b>	0,0782	-0,1821	<u>0,2941</u>
<b>% Total Intermediária</b>	-0,0184	-0,0046	<u>0,4246</u>

**Tabela 5** – Escores dos atributos físicos, químicos e microbiológicos determinados em amostras de água de 12 nascentes, na estação chuvosa, nos três componentes principais.

<b>ATRIBUTOS</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Condutividade</b>	0,0565	<u>-0,3718</u>	-0,1111
<b>Oxigênio dissolvido</b>	-0,1233	0,1890	<u>-0,5155</u>
<b>Ph</b>	<u>0,2067</u>	<u>0,2594</u>	-0,1522
<b>Turbidez</b>	0,1976	-0,1204	<u>-0,2128</u>
<b>TOC</b>	-0,0028	0,1862	<u>0,3221</u>
<b>Acidez</b>	<u>-0,2121</u>	<u>-0,2764</u>	-0,0637
<b>Alcalinidade</b>	0,0744	<u>-0,3568</u>	-0,1333
<b>Dureza</b>	-0,0982	<u>-0,3402</u>	<u>-0,2026</u>
<b>Densidade de heterotróficas</b>	0,0936	<u>-0,2319</u>	<u>0,4009</u>
<b>Coliformes totais</b>	<u>0,2150</u>	0,0486	<u>0,2396</u>
<b><i>Escherichia coli</i></b>	0,1845	<u>0,2463</u>	0,0318
<b>% Amoxicilina</b>	<u>0,2941</u>	-0,1270	0,0773
<b>% Aztreonam</b>	<u>0,2413</u>	-0,0967	<u>-0,2041</u>
<b>% Cfe</b>	<u>0,2848</u>	0,1045	<u>-0,2081</u>
<b>% Com</b>	0,1168	<u>-0,2596</u>	0,0011
<b>% Cfo</b>	<u>0,2513</u>	-0,1777	-0,0812
<b>% Cloranfenicol</b>	0,1582	0,0306	0,1160
<b>% Gentamicina</b>	-0,0809	<u>-0,2641</u>	<u>0,3594</u>
<b>% Penicilina</b>	<u>0,3193</u>	0,0131	-0,0353
<b>% Vancomicina</b>	<u>0,2762</u>	-0,0273	0,0287
<b>% Resistência</b>	<u>0,3235</u>	-0,1051	-0,0361
<b>% Sensibilidade</b>	<u>-0,3290</u>	0,0152	-0,0183
<b>% Intermediária</b>	0,1592	<u>0,2349</u>	0,1542

Para a seca, o atributo físico turbidez e os atributos químicos oxigênio dissolvido, pH, TOC e acidez apresentaram maior relação com o componente principal 3, enquanto os demais atributos, de modo geral, apresentaram forte relação aos componentes principais 1 e/ou 2.

Para a chuvosa, o atributo físico turbidez, e os atributos químicos oxigênio dissolvido, TOC e dureza apresentaram maior relação com o componente principal 3, enquanto os demais atributos, de modo geral, apresentaram forte relação aos componentes principais 1 e/ou 2, assim como observado para a seca. Tal resultado evidencia que há efeito da estação na mudança da qualidade da água analisada, com variação observada em todos os atributos físico, químicos e microbiológicos

analisados, exceto para as características morfoculturais dos isolados de bactérias heterotróficas (Tabelas 1, 2, 3).

De posse das figuras 30 e 31, os resultados foram compilados e apresentados de uma forma que evidenciasse a resistência das bactérias aos antimicrobianos e a qualidade microbiológica das amostras de água, nas duas épocas de estudo (Quadro 4).

**Quadro 4** – Resultados da análise gráfica das componentes principais feita para as amostras hídricas das nascentes estudadas em suas respectivas áreas, nas estações seca e chuvosa.

Característica	Estação seca		Estação chuvosa	
	Área	Cobertura do solo	Área	Cobertura do solo
<b>Maior resistência a antimicrobianos</b>	A7	Mata/ pasto sem gado	A1	Mata/pasto gado
	A8	Área urbana, pasto com gado	A3	Mata sem gado
	A10	Margem da rodovia sem gado	A4	Pasto degradado com gado
	A11	Transição mata/pasto com gado	A7	Mata/ pasto sem gado
	A12	Reserva Biológica da Serra dos Toledos, com possível presença de gado	A11	Transição mata/pasto com gado
<b>Melhor qualidade geral</b>	A1	Mata/pasto gado	A2	Mata sem gado
	A2	Mata sem gado	A5	Pasto/cultura, áreas de erosão do solo e gado
	A3	Mata sem gado	A6	Pasto, solo degradado com gado
	A5	Pasto/cultura, áreas de erosão do solo e gado	A9	Pasto sem gado
	A6	Pasto, solo degradado com gado	A10	Margem da rodovia sem gado
	A9	Pasto sem gado	A12	Reserva Biológica da Serra dos Toledos, com possível presença de gado
<b>Pior qualidade geral</b>	A7	Mata/ pasto sem gado	A3	Mata sem gado
	A11	Transição mata/pasto com gado	A11	Transição mata/pasto com gado
	A12	Reserva Biológica da Serra dos Toledos, com possível presença de gado	A4	Pasto degradado com gado

\*Qualidade das nascentes das áreas marcadas em cinza se repetiu nas duas estações (seca e chuvosa).

Observa-se que, no presente estudo, não se pôde estabelecer relação entre as formas de cobertura/uso dos solos com a qualidade hídrica, especialmente no que se refere ao perfil de resistência das cepas isoladas frente aos antimicrobianos testados. Nota-se que áreas com distintas formas de ocupação/uso do solo apresentaram resultados semelhantes para a qualidade hídrica geral, como ocorreu (Quadro 4), por exemplo, entre a área 5, que apresentava uso inadequado do solo (pasto com áreas degradadas e presença de gado em contato com a nascente), e a área 2, com bom uso/cobertura do solo (mata sem contato de gado com a nascente) do solo. Ambas apresentaram qualidade hídrica geral semelhante. O mesmo ocorreu para o índice de resistência bacteriana, o qual se apresentou fortemente relacionado a nascentes de áreas com distintas formas de uso/cobertura dos solos, como o observado para as áreas 12 (Reserva Biológica da Serra dos Toledo, com possível presença de gado) e 4 (Pasto degradado com gado).

Apesar de se ter avaliado um grande número de atributos (11 atributos) e se ter realizado o estudo das amostras hídricas mediante três repetições, isso não foi suficiente para detectar diferenças entre a qualidade microbiológica das áreas, mostrando que a incorporação de novos atributos como velocidade da água, profundidade do curso hídrico, tipo de solo, distâncias entre o curso d'água e as potenciais fontes de contaminação são recomendados para ampliar o entendimento dessas relações (DELPLA et al., 2011)

Pode-se observar, também, que a análise de componentes principais forneceu resultado diferente daquele obtido por meio das análises individuais dos atributos físico e químicos, microbiológicos e do perfil de resistência bacteriana (Itens 5.1, 5.2 e 5.3). Isso ocorre, pois a análise de componentes principais é uma técnica de análise estatística que avalia conjuntamente todos os atributos, considerando as influências que uns exercem sobre outros, o que possibilita o agrupamento de áreas com características semelhantes (Figuras 30 e 31).

## CONCLUSÕES

- ✓ Observou-se influência da estação sobre os atributos físico e químicos: turbidez e acidez (maiores índices na estação chuvosa), TOC (com maiores índices na seca);
- ✓ Maior densidade média de bactérias heterotróficas e *Escherichia coli* foi observada na estação chuvosa;
- ✓ As águas utilizadas para consumo humano não atenderam, simultaneamente aos critérios de potabilidade avaliados;
- ✓ Não se observou forte influência da estação no percentual de resistência das cepas aos antimicrobianos testados;
- ✓ Maior percentual de cepas resistentes à penicilina, nas duas estações, e menor percentual para ciprofloxacino, cloranfenicol e gentamicina;
- ✓ Observou-se pequena variabilidade morfocultural das cepas bacterianas isoladas das amostras hídricas, em ambas as estações;
- ✓ Os resultados sobre a qualidade hídrica obtidos para as análises microbiológicas, físicas e químicas, realizadas individualmente, foram diferentes daquele obtido por meio da análise de componentes principais;
- ✓ Não se pode relacionar a qualidade hídrica, por meio da avaliação dos atributos estudados, às formas de uso e ocupação do solo no entorno das nascentes estudadas.

## REFERÊNCIAS

ALLEN, M. J., EDBERG, S. C., REASONER, D. J. Heterotrophic plate count bacteria – what is their significance in drinking water? **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, p.265-274, 2004.

ALVARENGA, L. S.V.; NICOLETTI, M. A. Descarte doméstico de medicamentos e algumas considerações sobre o impacto ambiental decorrente. **Revista Saúde**, Guarulhos, v.4, n.3, p. 34-39, 2010.

AMARAL, L. A.; FILHO, N. F.; JUNIOR, O. D. R.; FERREIRA, F. L. A.; BARROS, L. S. S. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. **Saúde pública**, Jaboticabal, v. 37, n. 4, p.510-514, 2003.

AMARAL, A. L. P. **Microrganismos indicadores de qualidade de água**. 2007. 37 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG), 2007.

ANVISA. Consulta pública nº 67 de 27 de janeiro de 2004. Dispõe sobre o regulamento técnico de boas práticas de fabricação para estabelecimentos industrializadores de água mineral natural e água natural e a lista de verificação das boas práticas. **DOU** de 28/10/2004. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2004.

APHA, American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 20th.ed. APHA, AWWA, WEF, 1999. 1120p.

BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J. L.; CANTÓN, R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, p.260-265, 2008.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIES, J.C.; TURK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p.493-496, 1966.

BERTO, J.; ROCHENBACH, G. C.; BARREIROS, M. A. B.; CORRÊA, A. X. R.; SILVA, S. P.; RADETSKI, C. M. Physico-chemical, microbiological and ecotoxicological evaluation of a septic tank/Fenton reaction combination for the treatment of hospital wastewaters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1076–1081, 2009.

BIER, O. **Microbiologia e Imunologia**. 3. ed. São Paulo: Melhoramentos, 1994.

BOLETIM METEOROLÓGICO CIÊNCIAS ATMOSFÉRICAS-UNIFEI. Itajubá, jan. 2014. Disponível em: <[http://cat-unifei.blogspot.com.br/2014\\_01\\_01\\_archive.html](http://cat-unifei.blogspot.com.br/2014_01_01_archive.html)>. Acesso em: 01 abr. 2014.

BOLETIM METEOROLÓGICO CIÊNCIAS ATMOSFÉRICAS-UNIFEI. Itajubá, jul. 2014. Disponível em: <[http://cat-unifei.blogspot.com.br/2014\\_07\\_01\\_archive.html](http://cat-unifei.blogspot.com.br/2014_07_01_archive.html)>. Acesso em: 01 set. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **DOU**. nº 239, de 14 de dezembro de 2011, Seção 1, p. 39. Ministério da Saúde. 2011.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. CONAMA-Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Ministério do Meio Ambiente, 2005.

BRUNTON, L. L., LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007. 1821 p.

CAUMO, K.; DUARTE, M.; CARGNIN, S. T.; RIBEIRO, V. B. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 11, n.16, p.89-188, 2010.

CAVALCANTI, E. Água e cidadania: a privatização dos recursos hídricos e os atores sociais. **Revista Jurídica**, Curitiba, v. 3, n. 36, p.84-102, 2014.

CETESB. Norma técnica L5 201, de janeiro de 2006. Contagem de bactérias heterotróficas: método de ensaio. São Paulo, p. 14, 2006.

CETESB. Norma técnica L5 214, de agosto de 2007. Coliformes totais-determinação pela técnica de membrana filtrante: método de ensaio. São Paulo, p. 3, 2007.

CETESB. Variáveis de qualidade das águas. Disponível em : <<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/%C3%81guas-Superficiais/34-Vari%C3%A1veis-de-Qualidade-das-%C3%81guas>> Acesso em: 18 fev. 2015.

COATES, A. R. M.; HU, Y. Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, p.1147-1154, 2007.

DELPLA, I.; JUNG, A. V.; BAURES, E.; CLEMENT, M.; THOMAS, O. Impactos da mudança climática na qualidade da água de superfície em relação à produção da água de beber. **Revista InterfaceHS**, v. 6, n. 2, p. 85-107, 2011.

DIAS, M. F. F. **Qualidade microbiológica de águas minerais em garrafas individuais comercializadas em Araraquara-SP**. 2008. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de alimentos e nutrição) - Universidade estadual Paulista, Araraquara (SP), 2008.

DOMINGUES, V. O.; TAVARES, G. D.; STÜKEN, F.; MICHELOT, T. M.; REETZ, L. G. B.; BERTONCHELI, C. M.; HÖMER, R. Contagem de bactérias heterotróficas na água para consumo humano: comparação entre duas metodologias. **Saúde**, Santa Maria, v. 33, n.1, p.15-19, 2007.

DOANADIO, N. M. M.; GALBIATTI, J. A.; PAULA, R. C. Qualidade da água de nascentes com diferentes usos do solo na bacia hidrográfica do córrego Rico, São Paulo, Brasil. **Engenharia agrícola**, Jaboticabal, v. 25, n. 1, p. 115-125, 2005.

- DUARTE, P. B. **Microrganismos indicadores de poluição fecal em recursos hídricos**. 2011. 51p. Monografia (Pós graduação em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (MG), 2011.
- FIORUCCI, A. R.; FILHO, E. B. A importância do oxigênio dissolvido em ambientes aquáticos. **Química nova na escola**, n. 22, p.10-16, 2005.
- FLAUZINO, B. K. **Degradação do solo pela erosão hídrica e capacidade de uso em sub-bacia hidrográfica piloto no sul de Minas Gerais**. 2012. 91p. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos) – Universidade Federal de Itajubá, Itajubá (MG), 2012.
- FRANÇA, P. T. R; MELLONI, R. Avaliação microbiológica de águas de recreação por meio da análise de resistência de bactérias heterotróficas a antibióticos. **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v. 19, n. 4, p. 107-113, 2014.
- GONI-URRIZA, M.; CAPDEPUY, M.; ARPIN, C.; RAYMOND, N.; CAUMETTE, C.; QUENTIN, C. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine Enterobacteriaceae and *Aeromonas* spp. **Applied Environmental Microbiology**, v. 1, p.125-132, 2000.
- HELLER, L.; PÁDUA, V. L. **Abastecimento de água para consumo humano**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2006. 859 p.
- HIRAÍ, C. K. Indicadores microbiológicos da qualidade microbiológica da água. **Analytica**, n. 66, p. 8, 2013.
- JOLLIFFE, I.T. Discarding variables in a principal component analysis: II. Real data. **Journal of the Royal Statistical Society Applied Statistics.**, Série C, London, v.22, p.21-31, 1973.
- KÖPPEN, W.; GEIGER, R. *Klimate der Erde*. Gotha: Verlag Justus Perthes. 1928.
- KUBITZA, F. Qualidade da água na produção de peixes. **Panorama da aquicultura**, v. 8, n. 47, p.35-43, maio/junho,1998.
- KÜMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. **Journal of antimicrobial and chemotherapy**, v. 52, n. 1, p.5-7, 2003.
- KÜMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment, **Chemosphere**, v. 75, p. 417-434, jan. 2009.
- LIMA, O.; MELLONI, R.; MELLONI, E. G. P. Antropização da zona de amortecimento da reserva biológica serra dos toledos (Itajubá – MG) e seu efeito na qualidade do solo. **Cerne**, Lavras, v. 19, n.3, p.373-381, jul./set. 2013.
- LOBOVA, T.I.; BARKHATOV, Y.V.; POPOVA, L.Ye. Antibiotic resistance of heterotrophic bacteria in Shira LAke: natural and anthropogenic impacts. **Aquatic Microbiology and Ecology**, v. 30, p.11-18, 2002.
- LOPES, A. A.; SALGADO, K.; MARTINELLI, R.; ROCHA, H. Aumento da frequência de resistência à norfloxacin e ciprofloxacina em bactérias isoladas em uroculturas. **Associação médica brasileira**, v. 44, n.3, p. 196-200,1998.

- LUPO, A.; COYNE, S.; BERENDONK, T. U. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. **Frontiers in Microbiology**, v.3, n. 18, jan. 2012.
- McCUNE, B.; MEFFORD, M.J. **Multivariate analysis of ecological data**. Version 3.12. Gleneden Beach: MjM Software, 1997.
- MELLONI, R.; NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Densidade e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas endofíticas em solos de mineração de bauxita, em reabilitação. **Revista Brasileira Ciências do Solo**, Viçosa, v. 28, n. 1, p. 85-93, 2004.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A.; tradução: TABORDA, C. P. et al. **Microbiologia médica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.
- NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard** - 8.ed., v.23, n.1, NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
- NIKAIDO, H. Multidrug Resistance in Bacteria. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 119-146, 2009.
- NOGUEIRA, G.; NAKAMURA, C. V.; TOGNIM, M. C. B.; FILHO, B. A. A.; FILHO, B. P. D. Microbiological quality of drinking water of urban and rural communities. **Revista Saúde Pública**, v. 37, n. 2, p. 232-236, 2003.
- PERDOMO, D. M. X.; DURIGON, V.; TAVARES, G. M. D.; MEDEIROS, J. T. de. Avaliação da qualidade da água consumida na zona rural da região centro do estado do Rio Grande do Sul. **Infarma**, Brasília, v. 18, n. 9/10, p.3-6, 2006.
- PRUDEN, A; PEI, R.; STORTEBOOM, H.; CARLSON, K. H. Antibiotic resistance genes emerging contaminants: studies in Northern Colorado. **Environmental Science Technology**, v. 40, n. 23, p. 7445-7450, 2006.
- RIBEIRO, M. C. M. Nova portaria de potabilidade de água: busca de consenso para viabilizar a melhoria da qualidade de água potável distribuída no Brasil. **Revista DAE**, São Paulo, mai/ago. 2012. Disponível em: <<http://revistadae.com.br/downloads/edicoes/Revista-DAE-189.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2014.
- ROCHA, V. S. **Determinação de carbono orgânico assimilável em amostras de água. Estudo de comparação do método de determinação da concentração de ATP com o método clássico de contagem de colônias**. 2007, 96 f. Dissertação (Mestrado em engenharia biológica)-Universidade Técnica de Lisboa, Portugal, 2007.
- ROWE-MAGNUS, D. A.; MAZEL, D. Resistance gene capture. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 483-488, 1999.
- RUBILAR, C. S; UEDA, A. C. Análise físico-química de águas do município de Apucarana, Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GESTÃO AMBIENTAL, 4., 2013. **Anais...** Salvador: Instituto Brasileiro de Estudos Ambientais, 2013.

SALYERS, A. A.; GUPTA, A.; WANG, Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. **Trends in Microbiology**, v. 12, p. 412–416, 2004.

SAMPLE, I. New class of antibiotic could turn the tables in battle against superbugs. **The Guardian**, United Kingdom, 8 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.theguardian.com/science/2015/jan/07/antibiotic-drug-resistance-teixobactin>>. Acesso em: 20 jan. 2015.

SANTANA, V. C. O papel dos antibióticos na resistência bacteriana. **Revista Cesumar-Ciências humanas e sociais aplicadas**, v. 11, n.1, p.129-138, jan./jun.2006.

SCHWARTZ, T.; KOHNEN, W.; JANSEN, B.; OBST, U. Detection of antibiotic resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. **FEMS Microbiology Ecology**, v.43, p.325-335, 2002.

SILVA, C. H. P. M.; LINS, P.; CRUZ, C. S. O.; GREENBERG, W.; STEWART, T. Caracterização dos biofilmes formados em filtros de carvão ativado de sistemas de purificação de água em laboratórios clínicos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n. 4, p. 243-253, 2006.

STASOFT. Statistica 7.0 Software. Tucksá, USA, 2005.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 33, n. 3, 2000.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L; tradução: SILVA, A. M. et al. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VIRTO, M. R.; FRUTOS, P.; TORRADO, S.; FRUTOS, G. Gentamicin release from modified acrylic bone cements with lactose and hydroxypropylmethylcellulose. **Biomaterials**, v. 24, p.79-87, 2003.

ZHANG, X.; ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Antibiotic resistance genes in water environment. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 82, p. 397-414, 2009.

WATKINSON, A. J.; MURBY, E. J.; KOLPIN, D. W.; COSTANZO, S. D. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water. **Science of the total environment**, Austrália, v. 407, n. 2009, p.2711-2723, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Burden of disease and cost-effectiveness estimates. Water sanitation health. 2014. Disponível em: <[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/diseases/burden/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/burden/en/)>. Acesso em: 20 jan. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Antimicrobial Resistance: global report on surveillance. Jun. 2014. Disponível em:

<[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1)>. Acesso em: 22 jan. 2015.

**Anexo I** - Média, amplitude, desvio padrão e variância dos atributos físicos e químicos das amostras de água coletadas na estação chuvosa. (continua).

	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Ponto 9	Ponto 10	Ponto 11	Ponto 12
<b>Condutivi. (<math>\mu\text{S cm}^{-1}</math>)</b>	38,87	12,75	64,80	34,70	81,57	35,70	46,20	70,17	36,77	50,40	42,43	15,05
<b>Amplitude</b>	0,80	0,14	0,50	1,20	0,40	0,20	45,30	2,80	0,30	5,10	0,40	1,69
<b>Desvio padrão</b>	0,42	0,08	0,26	0,63	0,21	0,10	1,39	1,42	0,15	2,94	0,23	0,93
<b>Variância</b>	0,17	0,01	0,07	0,39	0,04	0,01	1,93	2,01	0,02	8,67	0,05	0,87
<b>O<sub>2</sub> disolvi. (<math>\text{mg L}^{-1}</math>)</b>	7,69	7,66	7,28	6,96	6,34	8,32	8,45	8,18	8,13	8,20	7,64	7,50
<b>Amplitude</b>	0,28	0,39	0,24	0,20	0,17	0,10	0,28	0,05	0,34	0,65	0,10	0,12
<b>Desvio padrão</b>	0,14	0,19	0,12	0,11	0,09	0,06	0,16	0,03	0,19	0,36	0,05	0,06
<b>Variância</b>	0,02	0,04	0,02	0,01	0,01	0,00	0,02	0,00	0,03	0,13	0,00	0,00
<b>pH</b>	7,05	7,75	7,61	7,41	6,13	7,02	7,62	6,71	6,45	7,08	7,65	6,86
<b>Amplitude</b>	0,26	0,38	0,16	0,19	0,06	0,48	0,05	0,09	0,17	0,03	0,19	0,13
<b>Desvio padrão</b>	0,13	0,19	0,09	0,09	0,03	0,25	0,03	0,05	0,09	0,02	0,09	0,07
<b>Variância</b>	0,02	0,04	0,01	0,01	0,01	0,06	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00
<b>Turbidez (NTU)</b>	5,90	2,90	362,67	3,93	0,46	1,77	1,57	4,33	5,83	3,53	6,00	3,93
<b>Amplitude</b>	1,90	0,40	66,99	0,30	0,07	0,70	0,40	0,70	0,50	2,20	0,30	0,70
<b>Desvio padrão</b>	0,98	0,20	33,49	0,15	0,04	0,38	0,21	0,38	0,25	1,12	0,17	0,35
<b>Variância</b>	0,97	0,04	1121,99	0,02	0,00	0,14	0,04	0,14	0,06	1,26	0,03	0,12

\* Colunas em cinza indicam as nascentes em que as águas são utilizadas como fonte nutricional por seres humanos.

**Anexo I** - Média, amplitude, desvio padrão e variância dos atributos físicos e químicos das amostras de água coletadas na estação chuvosa. (conclusão).

	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4	Ponto 5	Ponto 6	Ponto 7	Ponto 8	Ponto 9	Ponto 10	Ponto 11	Ponto 12
<b>Acidez (mg L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>)</b>	13,33	8,00	9,33	6,67	18,67	10,67	10,67	18,67	20,00	10,67	9,33	10,67
<b>Amplitude</b>	4,00	0,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	0,00	4,00	4,00	4,00
<b>Desvio padrão</b>	2,31	0,00	2,31	2,31	2,31	2,31	2,31	2,31	0,00	2,31	2,31	2,31
<b>Variância</b>	5,33	0,00	5,33	5,33	5,33	5,33	5,33	5,33	0,00	5,33	5,33	5,33
<b>Alcalinidade (mg L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>)</b>	25,33	6,67	41,33	22,67	49,33	26,67	33,33	38,67	25,33	29,33	29,33	12,00
<b>Amplitude</b>	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	12,00	4,00	4,00	8,00
<b>Desvio padrão</b>	2,31	2,31	2,31	2,31	2,31	2,31	2,31	2,31	6,11	2,31	2,31	4,00
<b>Variância</b>	5,33	5,33	5,33	5,33	5,33	5,33	5,33	5,33	37,33	5,33	5,33	16,00
<b>Dureza (mg L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>)</b>	18,43	13,82	27,65	15,36	35,33	16,90	19,97	26,11	35,33	29,18	16,90	6,14
<b>Amplitude</b>	9,22	9,22	9,22	4,61	4,61	4,61	4,61	4,61	18,43	4,61	4,61	4,61
<b>Desvio padrão</b>	4,61	4,61	4,61	2,66	2,66	2,66	2,66	2,66	9,59	2,66	2,66	2,66
<b>Variância</b>	21,23	21,23	21,23	7,08	7,08	7,08	7,08	7,08	92,01	7,08	7,08	7,08
<b>TOC (mg L<sup>-1</sup>)</b>	0,00	0,37	0,00	0,53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,47	4,51
<b>Amplitude</b>	0,00	1,10	0,00	1,60	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	4,41	11,69
<b>Desvio padrão</b>	0,00	0,64	0,00	0,92	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,55	6,29
<b>Variância</b>	0,00	0,40	0,00	0,85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,48	39,51

\* Colunas em cinza indicam as nascentes em que as águas são utilizadas como fonte nutricional por seres humanos.

**Anexo II - Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos das amostras de água da estação seca. (continua)**

<b>Caracterização fenotípica das colônias selecionadas na estação seca</b>					
<b>Isolado</b>	<b>Formato</b>	<b>Cor</b>	<b>Brilho</b>	<b>Goma</b>	<b>Borda</b>
P1B1	Cometa	Leitosa	+	-	Irregular
P1B2	Circular	Amarelo queimado	+	+	Regular
P1C1	Circular	Amarelo queimado	+	+	Regular
P1C2	Circular	Amarelo queimado	+	+	Regular
P2A1	Circular	Incolor	+	-	Regular
P2B1	Circular	Salmão	+	-	Irregular
P2B2	Circular	Salmão	+	-	Irregular
P2B3	Circular	Salmão	+	-	Irregular
P2B4	Circular	Salmão	+	-	Irregular
P2C1	Circular	Branco	+	+	Irregular
P2C2	Circular	Branco	-	-	Irregular
P3A1	Circular	Rosada	+	-	Regular
P3A2	Circular	Leitosa	+	-	Regular
P3A3	Circular	Branco	+	-	Regular
P3A4	Circular	Caramelo	+	-	Regular
P3B1	Cometa	Amarelo	+	+	Irregular
P3B2	Circular	Leitosa	+	-	Regular
P3B3	Circular	Salmão	+	-	Irregular
P3B4	Circular	Branco	+	-	Regular
P3C1	Circular	Leitosa	+	-	Regular
P3C2	Circular	Incolor	+	+	Regular
P3C3	Circular	Pink	+	-	Regular
P3C4	Circular	Branco	+	-	Regular
P4A1	Circular	Leitosa	+	-	Irregular
P4B1	Circular	Amarelo	+	+	Regular
P4B2	Cometa	Amarelo	+	-	Regular
P4C1	Circular	Amarelo	+	-	Regular
P4C2	Cometa	Creme	+	+	Irregular
P4C3	Cometa	Amarelo	+	-	Regular
P5A1	Oval	Amarelo	+	-	Irregular
P5A2	Oval	Incolor	+	-	Regular
P5A3	Circular	Creme	+	-	Regular
P5A4	Circular	Creme	-	+	Regular
P5B1	Circular	Creme	+	-	Regular
P5B2	Circular	Creme	+	-	Regular
P5B3	Circular	Creme	+	-	Regular
P5C1	Oval	Amarelo	+	-	Regular
P5C2	Circular	Incolor	+	-	Regular
P6A1	Circular	Creme	+	-	Regular

**Anexo II - Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos das amostras de água da estação seca. (continuação)**

<b>Caracterização fenotípica das colônias selecionadas na estação seca</b>					
<b>Isolado</b>	<b>Formato</b>	<b>Cor</b>	<b>Brilho</b>	<b>Goma</b>	<b>Borda</b>
P6A2	Circular	Amarelo	+	+	Regular
P6A3	Circular	Incolor	+	-	Regular
P6A4	Circular	Amarelo	+	-	Regular
P6B1	Circular	Alaranjado	-	-	Regular
P6B2	Circular	Amarelo	+	-	Regular
P6B3	Circular	Creme	+	-	Regular
P6B4	Circular	Amarelo queimado	+	-	Regular
P6C1	Circular	Creme	+	-	Regular
P6C2	Circular	Leitosa	+	-	Irregular
P6C3	Circular	Amarelo queimado	+	-	Regular
P6C4	Circular	Incolor	+	-	Regular
P7A1	Cometa	Incolor	+	+	Irregular
P7A2	Cometa	Incolor	+	+	Irregular
P7B1	Circular	Branco	-	-	Irregular
P7B2	Oval	Incolor	+	-	Regular
P7B3	Circular	Leitosa	+	-	Irregular
P7B4	Circular	Incolor	-	-	Regular
P7C1	Circular	Leitosa	+	-	Regular
P7C2	Cometa	Incolor	-	-	Irregular
P7C3	Cometa	Incolor	+	-	Irregular
P7C4	Cometa	Incolor	+	-	Irregular
P8A1	Circular	Incolor	+	+	Irregular
P8A2	Circular	Incolor	+	+	Irregular
P10A1	Oval	Amarelo	+	+	Regular
P10A2	Circular	Branco	-	-	Regular
P10A3	Circular	Branco	-	-	Regular
P10A4	Circular	Branco	-	-	Regular
P10B1	Oval	Amarelo	+	+	Regular
P10B2	Oval	Amarelo	+	+	Regular
P10B3	Oval	Amarelo	+	+	Regular
P10B4	Oval	Amarelo	+	+	Regular
P10C1	Oval	Amarelo	+	+	Regular
P10C2	Oval	Amarelo	+	+	Regular
P10C3	Oval	Amarelo	+	+	Regular
P10C4	Oval	Amarelo	+	+	Regular
P11A1	Circular	Creme	+	-	Irregular
P11A2	Circular	Incolor	+	-	Irregular
P11A3	Oval	Leitosa	+	-	Irregular
P11A4	Circular	Incolor	+	-	Irregular

**Anexo II - Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos das amostras de água da estação seca. (conclusão)**

<b>Caracterização fenotípica das colônias selecionadas na estação seca</b>					
<b>Isolado</b>	<b>Formato</b>	<b>Cor</b>	<b>Brilho</b>	<b>Goma</b>	<b>Borda</b>
<b>P11B1</b>	Circular	Amarelo queimado	+	-	Regular
<b>P11B2</b>	Oval	Branco	+	+	Irregular
<b>P11B3</b>	Circular	Incolor	+	-	Regular
<b>P11B4</b>	Circular	Incolor	+	-	Regular
<b>P11C1</b>	Estrelada	Amarelo queimado	+	+	Irregular
<b>P11C2</b>	Oval	Incolor	+	-	Irregular
<b>P11C3</b>	Estrelada	Leitosa	+	-	Irregular
<b>P11C4</b>	Circular	Leitosa	+	-	Regular
<b>P12A1</b>	Circular	Leitosa	+	-	Irregular
<b>P12A2</b>	Circular	Incolor	+	+	Irregular
<b>P12A3</b>	Circular	Incolor	+	-	Irregular
<b>P12A4</b>	Circular	Incolor	+	-	Irregular
<b>P12B1</b>	Oval	Incolor	+	-	Irregular
<b>P12B2</b>	Oval	Incolor	+	-	Irregular
<b>P12B3</b>	Oval	Incolor	+	-	Irregular
<b>P12B4</b>	Oval	Incolor	+	-	Irregular
<b>P12C1</b>	Circular	Incolor	+	-	Irregular
<b>P12C2</b>	Estrelada	Incolor	+	-	Irregular
<b>P12C3</b>	Circular	Incolor	+	-	Irregular
<b>P12C4</b>	Circular	Incolor	+	-	Irregular

FONTE: Autor

**Anexo III - Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos das amostras de água da estação seca. (continua)**

<b>Caracterização fenotípica das colônias selecionadas na estação seca</b>					
<b>Isolado</b>	<b>Formato</b>	<b>Cor</b>	<b>Brilho</b>	<b>Goma</b>	<b>Borda</b>
<b>P1A1</b>	Circular	Incolor	+	-	Regular
<b>P1A2</b>	Circular	Amarelo claro	+	-	Regular
<b>P1A3</b>	Circular	Incolor	+	-	Irregular
<b>P1A4</b>	Oval	Caramelo	+	-	Regular
<b>P1B1</b>	Oval	Amarelo	+	-	Regular
<b>P1B2</b>	Circular	Roxa	+	-	Irregular
<b>P1B3</b>	Circular	Rosada	+	-	Regular
<b>P1B4</b>	Circular	Incolor	+	-	Regular
<b>P1C1</b>	Oval	Branco	+	+	Regular
<b>P1C2</b>	Circular	Amarelo	+	-	Regular
<b>P1C3</b>	Circular	Branco	-	-	Regular
<b>P1C4</b>	Oval	Branco	+	-	Regular
<b>P2A1</b>	Circular	Amarelo	+	+	Irregular
<b>P2A2</b>	Circular	Rosada	+	-	Regular
<b>P2A3</b>	Circular	Incolor	+	-	Regular
<b>P2A4</b>	Oval	Amarelo	+	+	Irregular
<b>P2B1</b>	Oval	Branco	+	-	Irregular
<b>P2B2</b>	Oval	Amarelo	+	-	Regular
<b>P2B3</b>	Circular	Branco	+	-	Regular
<b>P2B4</b>	Circular	Amarelo	+	-	Regular
<b>P2C1</b>	Circular	Caramelo	+	-	Irregular
<b>P2C2</b>	Circular	Incolor	+	-	Irregular
<b>P2C3</b>	Circular	Leitosa	+	-	Irregular
<b>P2C4</b>	Circular	Incolor	-	-	Irregular
<b>P3A1</b>	Circular	Branco	+	-	Regular
<b>P3A2</b>	Circular	Leitosa	+	-	Irregular
<b>P3A3</b>	Oval	Incolor	+	-	Irregular
<b>P3A4</b>	Circular	Caramelo	+	+	Regular
<b>P3B1</b>	Circular	Alaranjado	+	-	Regular
<b>P3B2</b>	Circular	Leitosa	+	-	Irregular
<b>P3B3</b>	Oval	Caramelo	+	-	Irregular
<b>P3B4</b>	Oval	Caramelo	+	-	Regular
<b>P3C1</b>	Circular	Branco	+	-	Regular
<b>P3C2</b>	Circular	Incolor	+	-	Regular
<b>P3C3</b>	Oval	Caramelo	+	-	Regular
<b>P3C4</b>	Oval	Leitosa	+	-	Irregular
<b>P4A1</b>	Circular	Alaranjado	+	+	Irregular
<b>P4A2</b>	Oval	Caramelo	+	-	Irregular
<b>P4A3</b>	Circular	Incolor	+	-	Regular

**Anexo III - Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos das amostras de água da estação seca. (continuação)**

<b>Caracterização fenotípica das colônias selecionadas na estação seca</b>					
<b>Isolado</b>	<b>Formato</b>	<b>Cor</b>	<b>Brilho</b>	<b>Goma</b>	<b>Borda</b>
<b>P4A4</b>	Circular	Incolor	+	-	Irregular
<b>P4B1</b>	Circular	Pink	+	+	Regular
<b>P4B2</b>	Oval	Caramelo	+	-	Regular
<b>P4B3</b>	Circular	Incolor	+	-	Regular
<b>P4B4</b>	Circular	Leitosa	-	-	Irregular
<b>P4C1</b>	Oval	Leitosa	+	+	Irregular
<b>P4C2</b>	Circular	Incolor	+	-	Irregular
<b>P4C3</b>	Oval	Leitosa	+	+	Irregular
<b>P4C4</b>	Oval	Incolor	+	-	Irregular
<b>P5A1</b>	Oval	Leitosa	+	+	Irregular
<b>P5A2</b>	Circular	Incolor	+	-	Regular
<b>P5A3</b>	Circular	Incolor	-	-	Irregular
<b>P5A4</b>	Oval	Leitosa	+	-	Irregular
<b>P5B1</b>	Circular	Incolor	+	-	Regular
<b>P5B2</b>	Oval	Creme	+	-	Regular
<b>P5B3</b>	Circular	Leitosa	-	-	Irregular
<b>P5B4</b>	Puntiforme	Incolor	+	-	Regular
<b>P5C1</b>	Oval	Leitosa	+	-	Irregular
<b>P5C2</b>	Circular	Incolor	+	-	Regular
<b>P5C3</b>	Oval	Incolor	-	-	Irregular
<b>P5C4</b>	Circular	Branco	+	-	Regular
<b>P6A1</b>	Oval	Caramelo	+	-	Regular
<b>P6A2</b>	Circular	Incolor	+	-	Regular
<b>P6A3</b>	Circular	Leitosa	+	-	Irregular
<b>P6A4</b>	Circular	Leitosa	+	+	Regular
<b>P6B1</b>	Circular	Branco	+	-	Regular
<b>P6B2</b>	Circular	Caramelo	+	-	Regular
<b>P6B3</b>	Circular	Leitosa	+	-	Regular
<b>P6B4</b>	Circular	Amarelo claro	+	-	Regular
<b>P6C1</b>	Oval	Leitosa	-	-	Irregular
<b>P6C2</b>	Circular	Leitosa	+	-	Regular
<b>P6C3</b>	Circular	Branco	-	-	Regular
<b>P6C4</b>	Circular	Amarelo claro	+	-	Regular
<b>P7A1</b>	Meia lua	Castanho	+	-	Regular
<b>P7A2</b>	Circular	Branco	+	-	Regular
<b>P7A3</b>	Circular	Incolor	+	-	Regular
<b>P7A4</b>	Oval	Branco	+	-	Regular
<b>P7B1</b>	Circular	Amarelo fluorescente	+	-	Regular
<b>P7B2</b>	Oval	Incolor	+	-	Regular

**Anexo III - Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos das amostras de água da estação seca. (continuação)**

<b>Caracterização fenotípica das colônias selecionadas na estação seca</b>					
<b>Isolado</b>	<b>Formato</b>	<b>Cor</b>	<b>Brilho</b>	<b>Goma</b>	<b>Borda</b>
<b>P7B3</b>	Circular	Incolor	+	-	Regular
<b>P7B4</b>	Circular	Leitosa	+	-	Regular
<b>P7C1</b>	Meia lua	Roxa	+	-	Irregular
<b>P7C2</b>	Circular	Leitosa	+	-	Regular
<b>P7C3</b>	Oval	Amarelo fluorescente	+	-	Irregular
<b>P7C4</b>	Circular	Incolor	+	-	Irregular
<b>P8A1</b>	Circular	Leitosa	+	-	Irregular
<b>P8A2</b>	Circular	Amarelo	+	+	Irregular
<b>P8A3</b>	Oval	Amarelo	+	-	Irregular
<b>P8A4</b>	Disco voador	Branco	-	-	Irregular
<b>P8B1</b>	Circular	Leitosa	+	-	Regular
<b>P8B2</b>	Circular	Amarelo queimado	+	-	Regular
<b>P8B3</b>	Oval	Amarelo claro	+	-	Irregular
<b>P8B4</b>	Circular	Leitosa	+	-	Irregular
<b>P8C1</b>	Filamentosa	Leitosa	-	-	Irregular
<b>P8C2</b>	Oval	Creme	+	-	Irregular
<b>P8C3</b>	Circular	Incolor	-	-	Irregular
<b>P8C4</b>	Circular	Leitosa	-	-	Irregular
<b>P9A1</b>	Oval	Leitosa	+	+	Irregular
<b>P9A2</b>	Circular	Leitosa	+	-	Regular
<b>P9A3</b>	Puntiforme	Incolor	+	-	Regular
<b>P9A4</b>	Oval	Branco	-	-	Irregular
<b>P9B1</b>	Circular	Amarelo fluorescente	+	-	Irregular
<b>P9B2</b>	Circular	Incolor	+	-	Regular
<b>P9B3</b>	Circular	Leitosa	+	-	Regular
<b>P9B4</b>	Circular	Incolor	+	-	Regular
<b>P9C1</b>	Oval	Leitosa	+	-	Irregular
<b>P9C2</b>	Circular	Amarelo claro	+	-	Regular
<b>P9C3</b>	Circular	Incolor	+	-	Irregular
<b>P9C4</b>	Oval	Amarelo claro	+	-	Regular
<b>P10A1</b>	Oval	Leitosa	+	-	Regular
<b>P10A2</b>	Circular	Leitosa	+	-	Regular
<b>P10A3</b>	Circular	Leitosa	+	-	Regular
<b>P10A4</b>	Oval	Creme	+	-	Irregular
<b>P10B1</b>	Circular	Amarelo fluorescente	+	-	Regular
<b>P10B2</b>	Circular	Creme	+	-	Regular
<b>P10B3</b>	Filamentosa	Branco	-	-	Regular
<b>P10B4</b>	Circular	Creme	+	-	Irregular
<b>P10C1</b>	Circular	Salmão	+	+	Regular

**Anexo III - Caracterização fenotípica dos isolados bacterianos das amostras de água da estação seca. (conclusão)**

<b>Caracterização fenotípica das colônias selecionadas na estação seca</b>					
<b>Isolado</b>	<b>Formato</b>	<b>Cor</b>	<b>Brilho</b>	<b>Goma</b>	<b>Borda</b>
<b>P10C2</b>	Circular	Incolor	+	-	Regular
<b>P10C3</b>	Circular	Creme	+	+	Regular
<b>P10C4</b>	Circular	Incolor	+	+	Regular
<b>P11A1</b>	Oval	Rosada	+	-	Regular
<b>P11A2</b>	Oval	Creme	+	-	Regular
<b>P11A3</b>	Circular	Amarelo queimado	+	-	Regular
<b>P11A4</b>	Oval	Branco	+	-	Regular
<b>P11B1</b>	Circular	Creme	+	+	Regular
<b>P11B2</b>	Circular	Amarelo claro	+	-	Regular
<b>P11B3</b>	Circular	Branco	+	-	Regular
<b>P11B4</b>	Oval	Amarelo	+	-	Irregular
<b>P11C1</b>	Circular	Creme	+	-	Irregular
<b>P11C2</b>	Circular	Branco	+	-	Regular
<b>P11C3</b>	Circular	Creme	+	-	Regular
<b>P11C4</b>	Oval	Amarelo	+	-	Regular
<b>P12A1</b>	Circular	Incolor	+	-	Regular
<b>P12A2</b>	Oval	Leitosa	+	-	Regular
<b>P12A3</b>	Circular	Incolor	-	-	Irregular
<b>P12A4</b>	Oval	Creme	+	-	Irregular
<b>P12B1</b>	Circular	Leitosa	+	-	Regular
<b>P12B2</b>	Oval	Incolor	+	-	Irregular
<b>P12B3</b>	Estrelada	Amarelo queimado	+	-	Irregular
<b>P12B4</b>	Circular	Branco	+	-	Regular
<b>P12C1</b>	Circular	Creme	+	-	Regular
<b>P12C2</b>	Oval	Amarelo	+	-	Regular
<b>P12C3</b>	Circular	Incolor	+	-	Regular
<b>P12C4</b>	Circular	Incolor	-	-	Irregular

FONTE: Autor