PATRICIA BARBOSA RODRIGUES SILVA

OCORRÊNCIA DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM ÁGUA E EM BIOFILME DE RESERVATÓRIOS DE ÁGUA POTÁVEL

RECIFE

FEVEREIRO DE 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

OCORRÊNCIA DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM ÁGUA E EM BIOFILME DE RESERVATÓRIOS DE ÁGUA POTÁVEL

NOME: PATRICIA BARBOSA RODRIGUES SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre (a) em Biologia de Fungos.

Área de concentração: Fungos de Interesse Industrial

Orientador: Norma Buarque de Gusmão

Co-orientador: Nelson Manuel Viana. Lima

RECIFE

FEVEREIRO DE 2013

Catalogação na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Patrícia Barbosa Rodrigues

Ocorrência de fungos filamentosos em água e em biofilme de reservatórios de água potável / Patrícia Barbosa Rodrigues Silva- Recife: O Autor, 2013.

60 folhas: il., fig., tab.
Orientadora: Norma Buarque de Gusmão
Coorientador: Nelson Manuel Viana Lima
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2013.
Inclui referências e anexos

1. Fungos filamentosos 2. Biofilme 3. Água potável- contaminação I. Gusmão, Norma Buarque de (orientadora) II. Lima, Nelson Manuel Viana (coorientador) III. Título

579.5 CDD (22.ed.) UFPE/CB-2017-257

OCORRÊNCIA DE FUNGOS FILAMENTOSOS EM ÁGUA E EM BIOFILME DE RESERVATORIOS DE ÁGUA POTÁVEL

PATRICIA BARBOSA RODRIGUES SILVA

Dissertação defendida e aprovada em 26 de fevereiro de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES:

_____

Drª Norma Buarque de Gusmão (orientadora) Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

_____

Dr Cledir Rodrigues Santos

IBB/Centro de Engenharia Biológica - Universidade do Minho

_____

Drª. Virginia Medeiros de Siqueira

Universidade de Campinas – Unicamp

AGRADECIMENTOS

A Deus por me suster e prover todo o necessário à minha vida, mesmo eu não sendo merecedora;

Ao meu pai, minha mãe e meus irmãos por me cercarem de amor, por se preocuparem comigo, pelo incentivo e pelo apoio incondicional;

Ao meu esposo querido por estar sempre ao meu lado, por me incentivar, por acreditar em mim quando nem eu mesmo acreditava, me ajudando a crescer, tornando-me assim uma pessoa cada vez melhor;

À minha orientadora, professora Norma Gusmão, pela amizade e por toda a bondade e paciência em ensinar-me tanto conhecimentos científicos e práticos como experiências de vida;

Ao meu coorientador professor Nelson Lima por dedicar-me parcelas de seu tempo para transmitir-me conhecimentos que foram extremamente importantes para meu crescimento profissional;

À Helena Oliveira por pacientemente ensinar-me de maneira delicada todo conhecimento prático de laboratório necessário ao desenvolvimento do meu estudo;

À Doutora Virginia Medeiros por contribuir com parte do meu experimento, sendo esta parte de extrema relevância;

Ao Doutor Cledir Santos pelo apoio e incentivo;

À minha querida amiga Doutora Paula Vieira, por me ajudar com parte do meu experimento, mais principalmente pelo companheirismo e amizade gratuitos, que com certeza foi e sempre será de grande valor;

Ao Sr. Epitácio que gentilmente me proporcionou apoio técnico durante a realização das coletas;

A todos os amigos do laboratório pelo apoio e companheirismo e por toda ajuda, em especial Erick Jonh, Flávia Virginia, Diana Duarte e Pérsio Alexandre;

À Julia Brederode por toda ajuda que pode me dar sendo extremamente solicita;

À minha querida amiga Maria Divina Fagundes, que caminhou comigo esta etapa da minha vida, mostrando-me que distancia não é fator relevante quando se existe amizade sincera;

Aos professores da Pós- Graduação em Biologia de Fungos por toda paciência em transmitir conhecimento;

À COMPESA, em especifico a ETA Alto do Céu, por permitir a realização desse

trabalho; A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho;

Meu sincero agradecimento.

“No principio era o Verbo, e o Verbo estava com Deus, e o Verbo era Deus. Ele estava no princípio com Deus. Todas as coisas foram feitas por intermédio dEle, e, sem Ele, nada do que foi feito se fez. (...)”

João 1:1-4

RESUMO

Em algumas regiões do Brasil, principalmente nas regiões onde há escassez de água, costuma-se armazenar água potável em reservatórios, prática que proporciona aos usuários conforto e salubridade, em relação a facilidade de disponibilidade de água. Contudo, essa prática é suscetível ao desenvolvimento de micro-organismos livres e formadores de biofilmes, considerando que estes podem ser nocivos a saúde humana. Assim, o presente estudo analisou in situ, os fungos filamentosos livres e em biofilmes encontrados em reservatórios de água potável na rede de distribuição Alto do Céu situada na cidade de Recife - Pernambuco, Brasil. Foram realizadas cinco coletas em dois pontos distintos. Os fungos filamentosos foram quantificados por filtração em membrana de porosidade 0,45 μm, em quantidade de 100ml de água. Analisou-se 30 amostras, e estas contabilizaram 1136 unidades formadoras de colônia. As amostras isoladas foram cultivadas à 30°C por 48 h em placas de Petri contendo meio PGRBA. Os fungos coparticipantes dos biofilmes foram coletados de amostradores constituído por placas de polietileno, previamente instaladas nos reservatórios. Em seguida estes amostradores foram transferidos para placas de Petri e submetidos as mesmas condições de isolamento dos fungos livres na água. Para a detecção dos fungos nos biofilmes utilizou-se a técnica de coloração com Calcofluor White e microscopia de epifluorescência. Estes procedimentos evidenciaram filamentos fúngicos formando biofilmes na rede de distribuição em questão. Associando os resultados obtidos à legislação brasileira, que não estabelece limites para presença de fungos em água potável, e considerando o potencial de contaminação apresentado por estes micro-organismos, os registros obtidos neste trabalho contribuem para elaborar futuros parâmetros quantitativos e qualitativos quanto a presença de fungos nas redes de água potável no Brasil.

Palavras chaves: biofilmes água potável reservatórios de água

ABSTRACT

In some regions of Brazil, especially in regions where there is water scarcity, it is customary to store drinking water in reservoirs, a practice that gives users comfort and salubrity in relation to the ease of availability of water. However, this practice is susceptible to the development of free micro-organisms and biofilm formers, whereas these can be harmful to human health. Thus, the present study examined in situ, free and filamentous fungi in biofilms found in drinking water reservoirs in the distribution network of Alto do Céu in the city of Recife - Pernambuco, Brazil. Five collections were conducted in two distinct points. Filamentous fungi were quantitated by filtration membrane of porosity 0.45 µm, in an amount of 100 ml of water. Were analyzed 30 samples, and these accounted for 1136 colony-forming units. All strains were cultured at 30 °C for 48 hours in Petri dishes containing medium PGRBA. Fungi co participants of biofilms were collected from samplers consisting of polyethylene plates, previously installed in the reservoirs. Then these samplers were transferred to Petri dishes and subjected to the same conditions of isolation of fungi in free water. For the detection of fungi in biofilms were used the technique of staining with Calcofluor White and epifluorescence microscopy. These procedures showed fungal filaments forming biofilms in the distribution network in question. Associating the results to the Brazilian legislation, which sets no limits on the presence of fungi in drinking water, and considering the potential for contamination presented by these micro-organisms, the records obtained in this study contribute to develop future quantitative and qualitative parameters for the presence of fungi in drinking water networks in Brazil.

Key words: biofilms, drinking water, water reservoirs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação de um biofilme. 30
Figura 2. Modelo proposto por Harding e colaboradores (2009) para a formação de biofilme por bactérias, Candida albicans e fungos. 31
Figura 3. Esquema de uma estação de tratamento e distribuição de água. 32
Figura 4. Esquema de um reservatório doméstico de água potável. 36
Figura 5- esquema de um amostrador 37
Figura 6. Variação de pH obtida nos "pontos 1" (p1) e "ponto 2" (p2). 42
Figura 7. Variação de temperatura obtida nos "pontos 1" (p1) e "ponto 2" (p2). 43
Figura 8. Variação de cloro residual livre obtida nos "pontos 1" (p1) e "ponto 2" (p2). 43
Figura 9. Incidência de Fungos filamentosos livres na água localizados nos "pontos 1" (p1) e "ponto 2" (p2). 45
Figura 10. Incidência de Fungos filamentosos agregados aos amostradores nos "pontos 1" (p1) e "ponto 2" (p2). 46
Figuras 11-14. Microscopia de epifluorescência de filamentos fúngicos corados com CW nos biofilmes formados sobre placas de polietileno dos amostradores, exibindo auto-fluorecência. 48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros de qualidade da água adotados pelo IQA, e seus respectivos pesos (CETESB, 2009) 21
Tabela 2. Médias dos valores físico-químicos referentes a IQA 39
Tabela 3. Espécies fúngicas determinadas nos experimentos 50

LISTA DE ABREVIATURAS

ANA	Agência Nacional das Águas
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
COMPESA	Companhia Pernambucana de Saneamento
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CW	Calcofluor White
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
EPS	Extracellular Polymeric Substances (Substância Poliméricas Extracelulares).
ETA	Estação de Tratamento de Água
IQA	Índice de Qualidade da Água
MEA	Agar Extrato de Malte
MS	Ministério da Saúde
OD	Oxigênio Dissolvido
OMS	Organização Mundial da Saúde
PGRBA	Peptona Glicose Rosa Bengala Agar
pH	Potencial Hidrogeniônico ou Potencial de Hidrogênio
SRH	Superintendência de Planejamento de Recursos Hídricos
TDS	Total de Sólidos Dissolvidos
UFC/L	Unidades Formadoras de Colônias por Litro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15

1.1. OBJETIVOS 17

1.1.1. Gerais 17

1.1.2. Específicos 17

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 19

2.1. Propriedades das águas naturais 19

2.1.1. Características físicas 19

2.1.2. Características químicas 19

2.2. Controle e vigilância da qualidade da água 20

2.3. Microbiologia da água 22

2.3.1. Bactérias indicadoras de contaminação da água 23

2.4. Presença de fungos em água potável 24

2.5. Doenças causadas por fungos 26

2.5.1. Dermatofitoses 27

2.5.2. Hialohifomicose 27

2.5.3 Doenças causadas por fungos demácios 27

2.5.4. Feohifomicoses 27

2.5.5. Cromomicoses 28

2.5.6. Micetoma 28

2.6. Biofilmes 28

2.6.1 Calcofluor White na detecção de fungos em biofilmes 32

2.7. Caracterização de uma ETA 33

2.7.1. Captação 33

2.7.2. Processos de tratamento da água 35

2.7.3. Distribuição 36

2.8. Reservatórios de água domésticos 36

2.8.1. Tipos de reservatórios de água 37

3. MATERIAIS E MÉTODOS 38

3.1. Coleta do material 38

3.2. Parâmetros físico-químicos da água dos reservatórios 39

3.3. Isolamentos dos fungos 39

3.3.1. Fungos filamentosos livres 39

3.3.2. Fungos dos amostradores 39

3.4. Biofilmes 39

3.5. Identificação dos fungos 40

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 40
4.1. Análise de parâmetros físico-químicos 40
4.1.1. Oxigênio dissolvido 41
4.1.2. Condutividade elétrica 41
4.1.3. Turbidez 41
4.1.4. Potencial de oxiredução 42
4.1.5. Total de sólidos dissolvidos 42
4.1.6. pH 42
4.1.7. Temperatura 43
4.1.8. Cloro residual livre 44
4.2. Fungos filamentosos livres na água 45
4.3 Fungos filamentosos isolados dos amostradores 47
4.4. Detecção dos biofilmes nos amostradores 48
4.5. Identificação dos fungos 50
4.5.1. Tratamento estatístico 52

5. CONCLUSÃO 53

REFERÊNCIAS 54

1. INTRODUÇÃO

A água é um recurso essencial à sobrevivência de todos os seres vivos e o seu fornecimento em quantidade e qualidade é fundamental para a manutenção da vida. Com o aumento da população e a revolução industrial os mananciais utilizados para armazenamento e distribuição de água foram poluídos com diferentes substâncias xenobióticas e/ou recalcitrantes. Assim, para melhorar a qualidade da água foram desenvolvidas técnicas de tratamento, distribuição e armazenamento de água potável, garantindo desta forma conforto e salubridade aos usuários.

Uma das maneiras mais comuns de armazenamento de água potável é a utilização de reservatório de diversos materiais, capacidades e formas. Entre os modelos mais populares estão os fabricados em polietileno e fibra de vidro, porém seus materiais constituintes são suscetíveis ao desenvolvimento de micro-organismos como os fungos; estes acarretam diversos fatores negativos na água, tais como: aroma e odor desagradáveis, pigmentos, produção de toxinas e formação de biofilmes.

Biofilmes são comunidades de micro-organismos imobilizados conjuntamente numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares de origem microbiana (Xavier et al., 2003). Os biofilmes apresentam importância quanto à estabilidade mecânica proporcionada pela matriz de exopolissacarídeos bacteriana e a resistência nos processos de desinfecção desinfetantes, que pode ser duas ou três vezes maior que a das células livres (Flemming, 2002), tornando-se assim um problema para as estação de tratamento e distribuição de água potável.

No passado os fungos eram raramente considerados quando se tratava de micro-organismos patogênicos na água, possivelmente pela centralização nas bactérias e vírus como agentes contaminantes e causadores de doenças (HAGESKAL et al., 2009). No entanto, os fungos são cosmopolitas e ocupam quase todos os nichos e ambientes (ar, solo e água); são facilmente encontrados em água não tratada, nos reservatórios e nos sistemas de distribuição (GRABINSKA-LONIEWSKA et al., 2007, HUSSAIN et al., 2010).

A presença de fungos na água potável e em biofilmes (alojados nos sistemas de distribuição de água) têm recebido atenção limitada. Isto se deve em parte ao fato de que a relação entre a ocorrência de fungos e a qualidade da água ainda é pouco esclarecida (DOGGET et al., 2000). A legislação brasileira, assim como de outros países, não incentiva as pesquisas sobre espécies fúngicas que ocasionam problemas à saúde, especialmente aqueles encontrados em

água potável; tampouco estabelecem limites quantitativos da presença deles na água de consumo. Esses fatores tornam necessário estudos com maior diligência nessa temática.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Gerais

Isolar, identificar e determinar a diversidade de fungos filamentosos livres e em biofilmes presentes nos reservatórios de água potável na cidade de Recife, PE.

1.1.2. Específicos

- Isolar e identificar, utilizando características macroscópicas e microscópicas, os fungos filamentosos livres na água e nos amostradores.
- Detectar fungos participantes de biofilmes a partir do uso de corantes fluorescentes específicos, i.e., Calcofluor White.
- Estabelecer estatisticamente a relação entre fungos filamentosos livres e os isolados dos amostradores nos reservatórios.
- Avaliar, através da literatura, se os fungos identificados proporcionam potenciais danos na qualidade da água e promovem doenças.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Propriedades das águas naturais

Entre as peculiaridades da água, encontra-se a de ser uma substância atuante nos estados sólido, liquido e gasoso. Suas características físicas e químicas procedem de uma série de interações que ocorrem no corpo hídrico em decorrência de seu potencial de dissolução e de uma grande quantidade de substâncias transportadas pelo escoamento superficial e subterrâneo.

2.1.1. Características físicas

As características físicas mais comumente mensuráveis da água são: temperatura, condutividade elétrica, turbidez, odor e sabor.

- Temperatura

A temperatura da água possui direta relação com a sua densidade. Esta interação torna a água ímpar quando comparada com outras substâncias, visto que ela é menos densa no estado sólido. A temperatura também influencia na velocidade das reações químicas e na solubilidade das substâncias. (LIBÂNIO, 2008). A variação da temperatura das águas naturais decorre principalmente da insolação, salvo em casos onde há a interferência antrópica.

- Condutividade elétrica

Outra propriedade física que varia com a temperatura é a condutividade elétrica; esta refere-se à capacidade que a água possui em transmitir corrente elétrica por meio de íons provenientes de substâncias dissolvidas na própria água.

- Turbidez

Uma água de boa qualidade apresenta-se incolor (turbidez límpida). A presença de cor na água é produzida pela reflexão da luz em minúsculas partículas de substância dissolvidas, e denominadas coloides. Estas substâncias podem ou não ser prejudiciais à saúde. A importância da cor como padrão de qualidade, adquiriu maior importância na década de 1970 após a confirmação de produtos presentes na água potencialmente carcinogênicos.

Grande parte das águas de rios brasileiros são naturalmente turvas em decorrência das características geológicas das bacias de drenagem, quantidade de material orgânico dissolvido, índices pluviométricos e atividades agrícolas (LIBÂNIO, 2008). A aplicação da

turbidez como parâmetro indicativo na eficácia do tratamento da água encontra respaldo em trabalhos recentes que associam a remoção desta característica. Considera-se ainda o fato de que a presença de cistos e oocistos de protozoários, bactérias e leveduras provocam um aumento na turvação, o que torna este parâmetro um excelente indicador da presença de micro-organismos na água.

- Odor e Sabor

A água destinada ao consumo humano também não deve apresentar sabor ou odor perceptíveis. A presença de matéria orgânica, principal causadora da mudança de sabor e odor, auxilia ainda na formação de subprodutos que interferem na remoção de ferro e manganês, o que propicia condições para o recrudescimento de micro-organismos na rede de distribuição (LIBÂNIO, 2008).

2.1.2. Características químicas

Os parâmetros químicos são imprescindíveis para caracterizar a qualidade da água, tais como: pH, oxigênio dissolvido, sólidos, salinidade e demanda bioquímica de oxigênio.

- pH

Águas naturais de superfície apresentam um pH variando de 6,0 a 8,5. De maneira geral as alterações naturais do pH têm origem: na decomposição de rochas em contato com a água, absorção de gases da atmosfera, oxidação de matéria orgânica, fotossíntese e, introdução de despejos domésticos e industriais. Porém, o padrão de potabilidade estabelece amplo intervalo para o pH de água tratada (6,0 a 9,5), objetivando minimizar as perspectivas de corrosão (para valores muito baixos) ou incrustação (para valores mais elevados) nas redes de distribuição (LIBÂNIO, 2008).

- Oxigênio dissolvido

O agente oxidante mais importante em águas naturais é o oxigênio molecular dissolvido (OD) (BAIRD, 2002). Esta variante, geralmente expressa em parte por milhão (ppm), trata da quantidade do oxigênio atmosférico dissolvido na água por conta da pressão atmosférica; nesta análise considera-se a temperatura.

Há também a produção de oxigênio dissolvido por organismos fotossintéticos e pela introdução de aeração artificial. Assim, este parâmetro auxilia na determinação da capacidade de um corpo de água em manter a vida aquática; e nas estações de tratamento, o OD define a

eficiência dos processos de desinfecção da água. Vale ressaltar ainda que o oxigênio dissolvido é o principal padrão para determinar os resultados da poluição por lançamentos de dejetos orgânicos.

- Total de Sólidos Dissolvidos

Outro parâmetro químico bastante utilizado é o "Total de Sólidos Dissolvidos" (TDS), e consiste no conjunto de todas as substâncias orgânicas e inorgânicas contidas num líquido sob a forma molecular, ionizada ou micro-granular. Quando a água possui uma grande quantidade de sólidos dissolvidos a sua utilidade torna-se limitada. Uma água que contem 500 ppm de sólidos dissolvidos, geralmente pode ser viável para o uso doméstico, no entanto, torna-se inadequada para a utilização em muitos processos industriais. Quando a água possui o teor de sólidos acima de 1.000 ppm, ela é considerada inadequada para o consumo humano, e comumente apresenta característica abrasiva e corrosiva.

- Salinidade

A salinidade refere-se a quantidade de sais minerais presentes na água, e pode ser determinada como total de sais dissolvidos. As análises de salinidade são expressas em unidades de concentração (mg/L) ou condutividade elétrica (μmhos/cm). O tratamento da água para reduzir o nível de salinidade podem ser feitos através de sistema de membranas, como por exemplo, a osmose reversa; no entanto, estes procedimentos são de elevado custo.

- Demanda bioquímica de oxigênio

O parâmetro, "Demanda Bioquímica de Oxigênio" (DBO), expressa a presença de matéria orgânica e representa um importante indicador de qualidade da água. Este parâmetro indica a relevância do consumo de oxigênio pelas bactérias na estabilização da matéria orgânica. Um elevado valor da DBO pode indicar um incremento da microflora e interferir no equilíbrio da vida aquática, além de produzir sabores e odores desagradáveis; podendo ainda obstruir os filtros de areia utilizados nas estações de tratamento de água.

2.2. Controle e vigilância da qualidade da água

Como anteriormente descrito, a qualidade das águas é representada por um conjunto de características químicas, físicas e biológicas. Sendo um recurso comum a todos, foi necessário para a proteção dos corpos de água instituir normas legais de uso, com o objetivo de manter as

suas características mais próximas possíveis das originais e, em certos casos, dentro de limites aceitáveis.

A Agência Nacional de Águas (ANA), conforme as atribuições, tem a responsabilidade de elaborar "planos de recursos hídricos" para subsidiar a aplicação de recursos financeiros da União em obras e serviços de regularização de cursos, alocação e distribuição de água e, de controle da poluição hídrica (ANA, 2005).

Neste contexto, cabe à Superintendência de Planejamento de Recursos Hídricos (SRH) elaborar e manter atualizado o diagnóstico de oferta, demanda, quantidade e qualidade dos recursos hídricos do país (ANA, 2005).

Em 1970 foi criado pela Nacional Sanitation Foundation, dos Estados Unidos o IQA (Índice de Qualidade das Águas); e a partir de 1975 começou a ser utilizado pela CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) do estado de São Paulo. Nos anos seguintes outros Estados brasileiros também passaram a utiliza-lo, sendo hoje o principal índice de qualidade da água utilizado no Brasil.

O IQA objetiva avaliar a qualidade da água não tratada e o seu uso para abastecimento público após o tratamento. Os parâmetros utilizados nesse índice tem, em maior parte, indicadores de contaminação causado pelo lançamento de esgotos domésticos. Contudo, a avaliação da qualidade da água obtida pelo IQA apresenta limitações, visto que não analisa várias variantes importantes para o abastecimento público, tais como: substâncias tóxicas (ex: metais pesados, pesticidas, compostos orgânicos), substâncias que interferem nas propriedades organolépticas da água e protozoários patogênicos.

O IQA é composto por nove parâmetros com seus respectivos pesos (w), que foram fixados em função da sua importância para a conformação global da qualidade da água (tabela a seguir). (CETESB, 2009)

PARÂMETROS IQA	Peso (W)
Oxigênio dissolvido	0,17
Coliformes termotolerantes	0,15
Potencial hidrogeniônico - pH	0,12

Demanda bioquímica de oxigênio - DBO	0,10
Temperatura da água	0,10
Nitrogênio total	0,10
Fósforo total	0,10
Turbidez	0,08
Resíduo total	0,08

Tabela 1. Parâmetros de qualidade da água adotados pelo IQA, e seus respectivos pesos. (CETESB, 2009)

A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou o guia para qualidade da água auxiliando os países de todos os níveis de desenvolvimento a estabelecerem avaliações da água que sejam efetivas na proteção da saúde (WHO, 2003).

Igualmente, a resolução CONAMA nº 357 do Ministério do Meio Ambiente do Brasil estabelece a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento; determina também as condições e padrões de lançamento de efluentes, entre outras providências. A portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde do Brasil estabelece os mecanismos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Esta norma apresenta vários parâmetros relacionados a substâncias químicas, orgânicas e inorgânicas, agrotóxicos, cianotoxinas, desinfetantes e produtos secundários da desinfecção. Também são determinados os parâmetros físico-químicos e de radioatividade. Os parâmetros microbiológicos dessa portaria baseia-se nos indicadores de bactérias coliformes totais, coliformes termotolerantes, Escherichia coli e ainda bactérias heterotróficas. Nela, a pesquisa de patogênicos, enterovirus, cistos de Giardia spp. e oocistos de Cryptosporidium sp. consta como recomendação, e portanto não tem caráter obrigatório.

Promover o acesso ao abastecimento de água potável de melhor qualidade, que limite o risco a saúde é cumprir um direito básico e implica em fazer um melhor uso dos recursos limitados para estas prioridades (BARTRAM e HOWARD, 2003).

2.3. Microbiologia da água23

A água possui propriedades que auxiliam na presença e nos processos bioquímicos dos micro-organismos que nela habitam, entre elas: nutrientes, pH, salinidade, temperatura e turbidez. Sua característica de estado líquido em um amplo intervalo de temperatura e pressão, é necessária para a vida como a conhecemos, pois os organismos vivos dependem da fluidez da água.

Além de apresentarem extrema diversidade nas águas naturais, os micro-organismos são fundamentais na reciclagem de nutrientes em ecossistemas por agirem como decompositores, entre outras atividades necessárias. No entanto, presente em água para suprimento podem causar distúrbios organolépticos e agir como patógenos para a saúde humana e de animais.

De acordo com os níveis de nutrientes e populações microbianas, as águas superficiais podem ser classificadas como: oligotróficas, mesotróficas ou eutróficas, significando respectivamente baixo, médio ou elevado teor de nutrientes e microrganismos (ANA, 2009).

A água pode ser um importante meio de transmissão de doenças. Fatos históricos demonstram que algumas das mais generalizadas e graves epidemias que já infligiram as populações humanas, com exceção da peste bubônica, tiveram sua origem em sistemas de distribuição de água (BRANCO, 1999).

Na análise ou monitoramento de qualidade de água são empregados indicadores biológicos específicos. Os coliformes, bastonetes gram-negativos da família Enterobacteraceae, são os indicadores biológicos mais comumente empregados no estudo da qualidade de água (SILVA, 1999). E, amplamente distribuídos na natureza por se propagarem com maior frequência na água, especialmente, os coliformes fecais; estes têm recebido grande atenção da saúde pública por estarem associados a um elevado número de patologias e são ainda virtualmente suspeitos da maioria das infecções intestinais humanas conhecidas. Além de promoverem infecções intestinais, os coliformes podem estar envolvidos ou ter participação em diversas outras patologias, como meningites, infecções urinárias e pneumonias nosocomiais (KONEMAN et al., 2001).

2.3.1. Bactérias indicadoras de contaminação da água

As condições bacteriológicas das águas são fundamentais do ponto de vista sanitário. As normas de qualidade estabelece que a água deve estar isenta de patógenos de origem intestinal e parasitário intestinal, que são os responsáveis pela transmissão de enfermidades como: salmonelosis, shigelosis, amebiasis e cólera.

Os micro-organismos indicadores de contaminação devem cumprir os seguintes requisitos: facilidade de isolamento, crescimento in vitro; ser relativamente inofensíveis para homens e animais. Três grupos de bactérias estão qualificadas para este propósito: coliformes fecais (indicam contaminação fecal); aeróbias mesófilas (determinam efetividade do tratamento de águas), e Pseudomonas (sinalam deterioração na qualidade da água). A grande sensibilidade dessas bactérias aos agentes de cloração as define como indicadores da eficácia do tratamento da água.

A importância de conhecer espécies presentes nos sistemas aquosos naturais e o comportamento no seu ambiente resulta na possibilidade de desenvolver novas técnicas que auxiliarão em sua eliminação ou controle.

2.4. Presença de fungos em água potável

A presença de fungos em água potável têm ganhado mais atenção nos últimos anos e estudos a respeito estão sendo agora desenvolvidos (HAGESKAL, 2009). Os problemas que estão associados a estes micro-organismos em água potável estão relacionados à deterioração das características organolépticas da água, à obstrução de canos do sistema de distribuição, e a fungos patógenos e micotoxinas.

Os fungos são organismos eucarióticos que crescem por absorção de nutrientes heterotróficos e estão presentes em grandes quantidades no ambiente. São micro-organismos de caráter ubiquitário, sobrevivendo em faixas de pH e temperatura extremas, e podendo constituir um risco para a população humana, especialmente para aquela imunologicamente comprometida.

Particularmente, os grupos de fungos considerados predominantes em água são Oomycetes e Hyphomycetes (ALEXOPOULOS et al., 1996) no entanto, existe a presença significativa de fungos dos generos Aspergillus, Penicilium, Clasdosporium, Curvularia ou Fusarium, que estão relacionados à patogenias humanas e animais. Os Oomycetes e Hyphomycetes não estão associados diretamente com os problemas de saúde, mas pela mudança de odor e aroma desagradáveis quando crescem exacerbadamente.

Um dos problemas mais importantes para o estudo de fungos em água é o uso de meios de isolamento, que tendem a variar entre os investigadores. O uso de diferentes meios de cultura pode resultar na seletividade de alguns fungos e perda de outros. Embora se sabe que sempre haverá fungos que não serão detectados, Kinsey e colaboradores (1999) recomendam uma combinação de meios pobre e ricos nutricionalmente, para obter-se a completa seção

transversal de fungos presentes em água. A temperatura de incubação é também importante para que as espécies fúngicas sejam obtidas, essas temperaturas variam de 20- 37°C e, consequentemente, irá resultar na recuperação de diferentes gêneros e espécies. Não existe um método padrão internacionalmente descrito nos procedimentos de isolamento para a análise de fungos em água potável. No entanto, técnicas de filtragem de membrana tem sido amplamente empregadas, aplicando-se volumes de 10-1000 ml de água (KANZLER et al., 2007; VARO et al., 2007).

O problema de fungos na água potável parece ter sido notado nos anos 1960 e 1970, quando as análises de água, devido a problemas como mau gosto e odor, e episódios de problemas de saúde causado por água contaminada foram relatados (BAYS et al., 1970; BURMAN 1965; METZGER et al., 1976). Em primeiro lugar, estas análises foram destinadas a investigar a presença de actinomicetos ou cianobactérias, as quais já se tinha conhecimento por serem capazes de causar problemas na água potável. No entanto, quantidades significativas de microfungos também foram recuperados a partir das amostras de água, levando à especulação de que os fungos poderiam estar causando os problemas existentes. Durante as décadas de 1980 e 1990, mais casos de problemas de saúde causados por fungos através de água contaminada foram notificados na Finlândia e Suécia (ASLUND 1984;. MUITTARI et al.,1980).

Na última década, vários estudos resultaram em aumento do conhecimento sobre a ocorrência de fungos na água potável (ANAISSIE et al., 2001, 2002, 2003; ARVANITIDOU et al., 2000.; GONÇALVES et al., 2006; GÖTTLICH et al., 2002; HAGESKAL et al., 2006, 2007, 2008; HAPCIOGLU et al., 2005; KANZLER et al., 2007; KELLEY et al., 2003; KENNEDY & WILLIAMS 2007; PATERSON, 2007; PANAGOPOULOU et al., 2002; PIRES-GONÇALVES et al., 2008; VARO et al., 2007; WARRIS et al., 2001, 2002, LIMA, 2007; SIQUEIRA, 2009, 2011, 2012).

Uma grande diversidade de espécies de fungo foi isolado a partir de água potável. Entre estes, estão fungos potencialmente patogênicos, alergênico e espécies toxigênicas. Por exemplo, Aspergillus fumigatus foi recuperado a partir de 49% das torneiras investigadas no Hospital Universitário Rikshospitalet, em Oslo, em um estudo realizado por Warris e colaboradores (2001). A. fumigatus constitui-se em um dos mais importantes fungos patogênicos que causam infecções em pacientes imunocomprometidos em hospitais, e as taxas de infecção estão a aumentar (MARR et al., 2002;. BRANCO, 2005). Devido à frequência crescente de pacientes imunodeprimidos, os hospitais estão enfrentando um maior desafio com respeito a

infecções fúngicas oportunistas (DENNING, 2006). Os resultados indicam que águas de hospitais podem conter uma grande diversidade de fungos, incluindo os potencialmente patógenos. A hipótese é que os fungos presentes na água podem tornar-se aerossois para o ar, quando a água passa por instalações, tais como torneiras e chuveiros, e assim introduzida a pacientes gravemente imunocomprometidos, com um elevado risco de infecções fúngicas. (ANAISSIE et al., 2002b; WARRIS et al., 2001).

No futuro, o monitoramento dos sistemas de água para a ocorrência de fungos pode ser necessária, especialmente em sistemas de água de hospitais. São necessários mais estudos, tanto no que diz respeito ao estabelecimento de métodos precisos de investigação quanto os efeitos do tratamento da água em relação aos fungos. Além disso, os fornecedores de água precisam ser informados sobre quaisquer aspectos diferentes. Estudos epidemiológicos também devem ser realizados para determinar a significância da contaminação fúngica para a saúde. Deve-se estar atento aos níveis elevados de propágulos fungicos na água pois, assim como pode causar alterações deletérias na qualidade do ar, também poderá reduzir a qualidade da água potável e constituir um risco potencial à saúde. (HAGESKAL et al., 2009).

2.5. Doenças causadas por fungos

Infecções causadas por fungos constituem um importante problema de saúde pública e uma das principais causas de morte em todo o mundo. Os principais fungos de importância médica, causadores de micoses sistêmicas, apresentam várias características micológicas e ecológicas em comum como: dimorfismo (forma filamentosa em condições saprofíticas e leveduriforme na condição patogênica), distribuição geográfica restrita, limitada às chamadas áreas endêmicas, ocorrência saprofítica em microhábitats com produção de propágulos infectantes, que penetram no hospedeiro principalmente pelo trato respiratório (HAWKSWORTH, 2001; CHAKRABARTI, 2005).

Muitos tipos de fungos ao se instalarem no corpo humano podem provocar doenças. As mais comuns são aquelas que afetam a pele, as unhas e os cabelos. As doenças causadas por fungos são conhecidas como micoses. Os fungos que causam as micoses, são parasitas. Essas doenças são difíceis de classificar, pois um mesmo tipo de doença pode ser causada por vários agentes etiológicos. A seguir estão descritos alguns tipos de doenças provocadas por fungos e seus principais agentes etiológicos.

2.5.1. Dermatofitoses

Os dermatófitos são um grupo de fungos taxonomicamente relacionados que tem a capacidade de invadir os tecidos queratinizados humanos e animais produzindo infecções denominadas dermatofitoses. Três gêneros (Microsporum, Tricophyton e Epidermophyton) compõem esse grupo. A dermatofitose é de caráter contagioso e a transmissão da enfermidade é mediada por esporos cuja formação depende da fonte de infecção, que é geralmente cutânea e restrita às camadas cornificadas devido à inabilidade do fungo de penetrar nas camadas mais internas dos tecidos. Seu tratamento deve ser encarado de maneira séria, com a utilização de derivados imidazólicos, tanto de uso tópico quanto sistêmico (DEALCANFREITAS, 2005).

2.5.2. Hialohifomicose

É um termo empregado para designar as infecções por fungos de etiologia variada que nos tecidos do hospedeiro apresentam-se como hifas, hialinas, septadas e ramificadas. A hialohifomicose inclui infecções como beauveriose, causada por Beauveria bassiana; fusariose, infecções causadas por membros do gênero Fusarium; pecilomicoses, infecções causadas por fungos do gênero Peacilomyces; peniciliose, causada por membros do gênero Penicillium, etc. (NEUFELD, 1999).

2.5.3 Doenças causadas por fungos demácios

Fungos demácios são encontrados na natureza e possuem como característica a presença de melanina, responsável pela pigmentação escurecida de seus esporos e conídios e que parece se comportar como um fator de virulência. Mais de cem espécies e sessenta gêneros destes fungos estão implicados em um amplo espectro de infecções humanas. (REVANKAR, 2007) As principais formas clínicas de apresentação das infecções por demácios incluem as feohifomicoses (cutânea, subcutânea e sistêmica), que acometem tanto indivíduos imunocompetentes como imunodeprimidos; cromoblastomicose, micetomas, sinusite e infecções da corrente sanguínea. Dentre essas, cromoblastomicose e micetomas são consideradas doenças ocupacionais (SILVEIRA 2001).

2.5.4. Feohifomicoses

Os fungos demácios são definidos como sendo aqueles que apresentam em suas paredes celulares pigmentos do tipo melanina. Esses fungos produzem uma variedade de síndromes humanas incluindo micetoma, cromomicose, queratomicose, otomicose, entre outros.

O termo feohifomicose é empregado para designar todas as infecções de natureza cutânea, subcutânea e sistêmicas causada por fungos que se desenvolvem no tecido do hospedeiros sob

a forma de elementos miceliais, septados, células de levedura e pseudo-hifas de coloração escura, isto é, demáceos.

Os principais fungos envolvidos são: Alternaria spp, Aureobasidium pululans, Bipolares spp, Cladosporium spp, Curvularia spp, Dreschlera spp, Exophiala spp, Phialophara spp, Phoma spp entre outros (NEUFELD, 1999).

2.5.5. Cromomicoses

É uma micose crônica do tecido cutâneo e subcutâneo de aspecto polimórfico, com envolvimento dos membros inferiores caracterizada principalmente pela presença de lesões tumorais, nodulares, e verrucosas, que em geral ulceram. A doença é causada por fungos demaceos que apresentam em sua parede celular pigmentos melanoides. Ao contrario da feohifomicose, os agente etiológicos da cromomicose se desenvolvem na forma de elementos esféricos ou ovoides de coloração marrom, isolados em cachos, com ou sem septação em mais de um plano. A cromomicose é causada por fungos demaceos como por exemplo: Cladosporium carrione, Fonsecae compacta, F. pedrosoi, Phialophara verrucosa e Rhinocladiella aquaspersa, que são identificados em sua forma tecidual. A identificação especifica só poderá ser procedida pelo isolamento em cultura (NEUFELD, 1999).

2.5.6. Micetoma

Os micetomas podem ser definidos como micoses granulomatosas com três características: aumento do volume na região comprometida (tumor), fistulização múltipla, supuração, trazendo em si o elemento diagnostico fundamental da infecção (grão de micetoma). O micetoma é uma síndrome clinica indolente, localizada, tumefeita e deformante que envolve tecidos cultaneos e subcultaneos, faciais, músculos e ossos. A doença resulta da implantação traumática de organismos do solo nos tecidos. Os agentes etiológicos são representados por fungos saprófitos do solo e vegetais como: Acremonium spp, Aspergillus nidulans, Curvularia spp, Exophiala jeanselmei, Fusarium spp, Madurela spp e vários Ascomycetes e por uma grande variedade de bactérias, especialmente Actinomycetes (NEUFELD, 1999).

2.6. Biofilmes

A microbiologia tradicional caracterizou durante muitos anos as células encontradas em suspensões como planctônicas, e algumas delas tinham a capacidade de se aderir em superfícies, formando colônias, conhecidas por biofilmes. Inicialmente, as observações de

biofilmes foram realizadas por Antonie Van Leuwenhoek que, estudando amostras de dente em seu microscópio, notou mais fragmentos de células agregadas do que soltas (livres).

Em 1964 Mitchell e Kevin Marshall observaram as fazes iniciais da formação de biofilmes por bactérias e a diferenciação da adesão que pode ser reversível ou irreversível, sendo que esta ultima constituí a primeira fase da formação do biofilme (COSTERTON, 1999; NAVIA et al., 2010).

Os biofilmes consistem em comunidades de micro-organismos protegidos por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) polianiônicas fixadas em uma superfície (CHMIELEWSKI et al., 2003).

Estas substâncias poliméricas são constituídas por aglomerações de polímero geralmente compostos de DNA extracelular, fosfolipídios, proteínas e polissacarídeos. Mesmo microcolônias (cerca de 50 células) podem constituir uma associação de várias espécies (MANZ et al., 1993); e trocas de plasmídeos podem ocorrer dentro dos biofilmes (LISLE & ROSE, 1995).

Dependendo do tipo de célula envolvida no biofilme, as microcolônias podem estar compostas por 10 a 25 % de células e 75 a 90% de matriz EPS. É importante considerar a formação de biofilmes visto que durante as últimas décadas tem-se observado a presença destas comunidades em diversos setores industriais (GARRET et al., 2008).

O mecanismo de adesão das células ao substrato pode ser ativo ou passivo, dependendo da mobilidade das células. Uma adesão passiva ocorre pela gravidade e pela difusão de dinâmica de fluidos. Em uma adesão ativa a superfície da célula bacteriana facilita o processo (CHMIELEWSKI et al., 2003). Mediante à esses processos as células começam o seu estado de formação de biofilme, tendo o exopolissacarídeo como principal agente agregador.

No processo de adesão inicial das células existe um estado reversível seguido por um irreversível. A fase reversível envolve forças físicas, tais como eletrostáticas, de van der Waals e interações hidrofóbicas. Se as forças de repulsão são maiores do que a atração, a bactéria é separada da superfície, o que, provavelmente, pode ocorrer antes de condicionamento do substrato (GARRET et al., 2008).

Na segunda fase, uma quantidade de células aderidas reversivelmente se aderem irreversivelmente e permanecem imobilizadas por apêndices físicos de bactérias que excedem as forças de repulsão naturais. Além disso, o contato dos apêndices estimula reações químicas

de oxidação e hidratação permitindo a ligação à superfície, o que ocasiona maior esforço para remover as bactérias na colônia (HALL-STOODLEY et al., 2002). A presença de cátions bivalentes também permite uma forte interação entre as células (GARRET et al.,, 2008). Essas adesões são tão intensas que evitam a remoção até mesmo da própria colônia de seu local. Assim, os meios para remove-las requerem tratamentos químicos agressivos, como a aplicação de enzimas, detergentes, desinfetantes, agentes tensoativos e/ou condições de calor extremas.

Na fase seguinte, que é a fase estacionária, as células se dividem (divisão binária), e as células filha cobrem o exterior e o interior do ponto de colagem para formar um grupo (HALL-STOODLEY et al., 2002). Tais interações de crescimento no biofilme formam uma estrutura semelhante à de um cogumelo. Esta estrutura permite a passagem de nutrientes para as bactérias no interior do biofilme. Depois de iniciar a fase de adaptação, o biofilme revela um aumento exponencial de crescimento da população (GARRET et al.,, 2008).

Uma das técnicas utilizadas para observar e medir a aderência do biofilme é o background, e é realizada através da criação de uma superfície de vidro em uma câmara fechada, seguida de uma a contagem com auxílio de um microscópio (SHAHEEN et al., 2010). Posteriormente, a câmara é girada no sentido inverso, assim as células não aderentes são "eliminadas" e as células que permanecem aderidas são recontadas (SHAHEEN et al., 2010).

O procedimento comumente usado para medição é contagem em placa, no qual as células ressuspendidas e dispersadas do biofilme são plaqueadas sobre um meio sólido, incubadas e contadas. Algumas técnicas utilizam a força mecânica, como agitação em vortex, ultra-som, para então proceder à análise e medição. Antissoros fluorescentes e sondas de hibridização in situ permitem identificar organismos específicos dentro de uma comunidade mista de um biofilme (DONLAN, 2002).

Recentemente a medida de adesão de bactérias foi aprimorada por tecnologias de micromanipulação, microscopia de força atômica e pinças ópticas (BOYD et al., 2002). Nestas técnicas utiliza-se equipamentos como microscópio eletrônico de varredura (SEM) e microscopia confocal a laser que permitem a aquisição de imagens com elevada resolução (GARCÍA-ALMENDÁREZ et al., 2008; CHAVANT et al., 2007). A microscopia óptica e eletrônica de varredura são puramente observacional e não medem diretamente a adesão da população bacteriana (LIU et al., 2002).

Vários modelos têm sido propostos para explicar o desenvolvimento de um biofilme. A teoria atual esta baseada principalmente nas provas apresentadas pelo microscópio confocal de varredura a laser. Este instrumento permitiu visualizar uma estrutura semelhante a um cogumelo com estruturas aéreas (denominadas torres), pedestais e canais de água, como mostra a figura 1. Este modelo propõe que o crescimento celular é rápido na periferia e lento no interior. As torres ou partes mais elevadas podem quebrar-se e repovoar em outro lugar. Tem sido demonstrado que a gama de porosidade de biofilmes maduros na parte superior é de 89% e 5% na camada inferior (ZHANG et al., 1994; NAVIA et al., 2010).

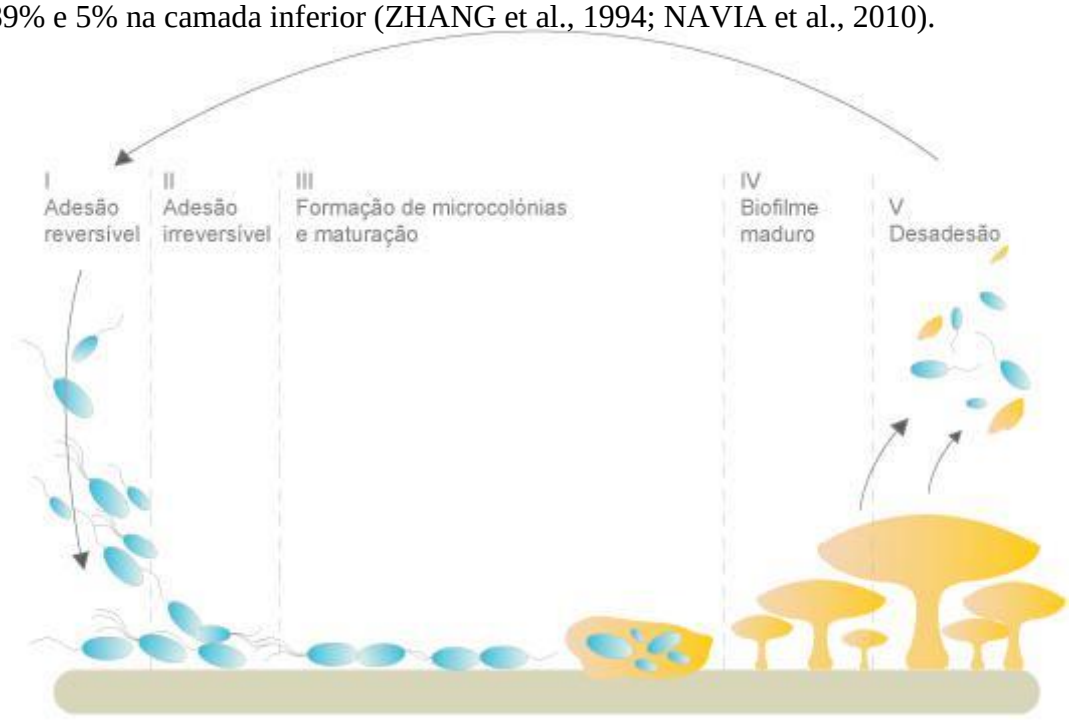


Figura 1. Formação de um biofilme. (fonte: http://www.e_escola.pt).

O crescimento de qualquer biofilme é limitado pela disponibilidade de nutrientes no ambiente circundante e pela sua propagação das células localizadas no interior do biofilme. Fatores como o pH, difusão de oxigênio, fonte de carbono e osmolaridade controlam também a maturação do biofilme. Quando completamente maduro, o biofilme funciona como um consórcio funcional de células, com padrões de crescimento alterados, cooperação fisiológica e eficiência metabólica. Nesta fase, as células localizadas em regiões diferentes do biofilme exibem diferentes padrões de expressão genética.

É importante ressaltar que biofilmes microbianos são produzidos por culturas puras de bactérias e por consórcios de microrganismos, que podem incluir fungos, protozoários e algas. (SCHNEIDER, 2007). Harding et al., (2009), após analisarem vários artigos, recolheram relatos de estruturas, difusão de sinais e reguladores, de comunicação celular dependentes da densidade populacional, análogos ao “quorum sensing,” os quais são indicativos da formação

de biofilmes por fungos filamentosos. Os autores propõem um modelo para biofilmes fúngicos e concluem que as evidências por eles apontadas suportam a hipótese de que os fungos filamentosos formam biofilmes.

O modelo proposto por Harding et al., (2009) de desenvolvimento de biofilmes em bactérias, leveduras e fungos filamentosos encontram-se na figura 2.

Em bactérias (a) e Candida albicans (b), cinco estágios são geralmente definidos: (i) adsorção, (ii) adesão, (iii) formação de micro colônia, (iv) biofilme maduro, e (v) dispersão. O modelo em fungos filamentos para desenvolvimento de biofilme (c) inclui os seguintes estágios: (i) adsorção, (ii) adesão ativa, (iii) micro colônia I (germinação e/ou monocamada), (iv) micro colônia II (desenvolvimento micelial, camada de hifa, agregação), (v) desenvolvimento de um biofilme maduro, e (vi) dispersão ou fase planctônica; (modificado de Stoodley et al., reproduzido com permissão da Annual Rewiew of Microbiology, volume 56_2002 pela Annual Rewiews, www.annualrewiews.org. Trends in Microbiology, vol. 17 nº 11, 477).

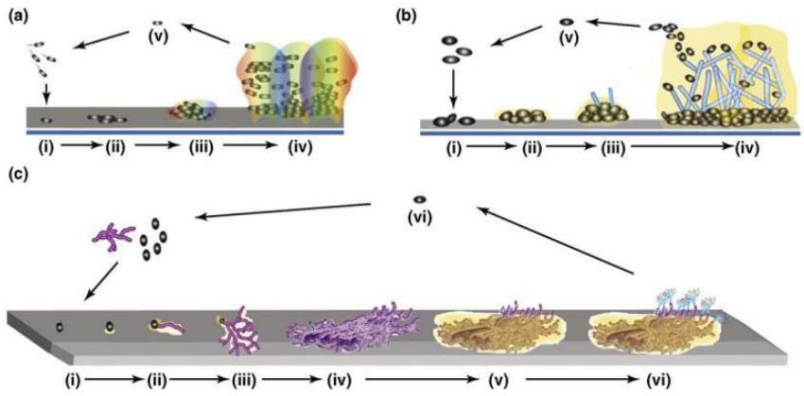


Figura 2. Modelo proposto por Harding e colaboradores (2009) para a formação de biofilme por bactérias, Candida albicans e fungos.

2.6.1 Calcofluor White na detecção de fungos em biofilmes

O envolvimento de fungos em biofilmes tem sido pouco estudado. Eles podem ser responsáveis por produção de sabores, odores e micotoxinas na água, e a detecção de modo rápido é importante. A detecção de fungos filamentosos em biofilmes por métodos convencionais é complexa, demorada e indireta. Para superar estes problemas técnicas de fluorescência para a detecção direta tem sido testadas, sendo uma delas a coloração com Calcofluor White (CW) (Gonçalves et al., 2005).

Molécula simétrica com dois anéis de triazol e duas funções primárias de álcool em ambos os lados de uma ponte de etileno. CW é uma sonda fluorescente capaz de fazer ligações de hidrogénio com polissacarídeos β- (1 → 4) e β- (1 → 3). O fluoróforo mostra uma elevada afinidade por quitina formando pontes de hidrogênio com grupos hidroxilas livres corando as paredes celulares fúngicas de azul. Em seguida as amostras de biofilme em lamina são observadas sob um microscópio de epifluorescência, utilizando luz UV. (Gonçalves et al., 2005).

2.7. Caracterização de uma ETA

A "Estação de Tratamento de Água" (ETA) defini-se como o local onde há condições de captação de água em quantidade capaz de atender o consumo; e qualidade a ponto de dispensar o tratamento ou necessitá-lo o mínimo possível (gerando o menor impacto ambiental possível às áreas circunvizinhas).

Da captação até a distribuição, a água passa por etapas para garantir a qualidade, o que consequentemente reduz os possíveis efeitos deletérios para a saúde do consumidor. A

Figura 3. Esquema de uma estação de tratamento e distribuição de água. (fonte: SABESP).

2.7.1. Captação

A captação tem por finalidade estabelecer condições para que a água seja retirada da fonte abastecedora em condições sanitárias adequadas e oferecer vazão suficiente para atender a demanda.

Ao escolher o manancial abastecedor deve levar em consideração a quantidade de água consumida pela comunidade, bem como a previsão de crescimento desta comunidade. Todo e qualquer sistema é projetado para servir durante um período de tempo pré-determinado denominado tempo de projeto.

Encontra-se a disposição do homem dois tipos de fontes para abastecimento de água: águas superficiais (rios, lagos, canais e etc.) e subterrânea (lençóis subterrâneos).

- Águas Superficiais

As águas superficiais são as mais facilmente captáveis, por isso são mais utilizadas que as de lençóis subterrâneos, sem mencionar que nem toda a água armazenada no subsolo pode ser retirada em condições economicamente viáveis. Em contrapartida, águas superficiais estão sempre sujeitas a possíveis processos de poluição e contaminação (como aquelas ocasionadas pela proliferação de algas que podem lhe conferir odor e sabor desagradáveis e toxinas). Por sua vez, as camadas mais profundas apresentam maior quantidade de sedimentos em suspensão, o que conferem característica turva a água e, consequentemente, dificultando ou encarecendo o processo de melhoramento da turbidez. Ademais, nessas camadas há a formação de uma massa biológica chamada bênton, tornando a água imprópria para o uso.

Águas superficiais que são utilizadas em sistemas de abastecimento frequentemente são provenientes de um curso de água natural. Outra opção, embora menos frequente, é a captação de lagos naturais ou do mar.

- Águas Subterrâneas

Os reservatórios de água subterrâneas estão disponíveis de duas maneiras, lençóis freáticos e lençóis cativos. Define-se como lençol freático a massa de água que esta assentada sobre uma camada impermeável do subsolo e submetida a pressão atmosférica local.

A captação em lençol freático pode ser feita através de galerias filtrantes, drenos, fontes ou poços freáticos. Estes arranjos em geral são tubos perfurados, que convergem para um poço de reunião de onde a água é retirada em geral por bombeamento ou por outras técnicas mais rudimentares. O lençol cativo caracteriza-se por está confinado entre duas camadas impermeáveis de crosta terrestre submetidos a uma pressão superior à atmosférica. A captação de lençóis cativos geralmente é estabelecida por meio de perfurações de porcos artesianos e menos frequentemente por fontes de encosta.

Ao conjunto de encanamentos , peças especiais e obras destinadas a promover o transporte da água entre a capitação e o seu destino final chama-se adução. A adução esta classificada de acordo com: a energia de movimentação do líquido (gravidade, recalque e mista); escoamento do liquido (livre, forçada e mista); e natureza da água (bruta ou tratada).

2.7.2. Processos de tratamento da água

O tratamento da água consiste de uma sequência de operações que em conjunto versam melhorar suas características organolépticas, físicas, químicas e bacteriológicas afim de que se torne adequada ao consumo.

O tratamento da água varia conforme sua captação. Se for obtida de lençóis subterrâneos geralmente dispensa tratamento, pois essas águas já foram naturalmente filtradas pelo solo, necessitando frequentemente apenas de desinfecção microbiológica e, com menos, frequência, correção de sais que estando presentes, comprometem as características organolépticas. Já para as águas captadas de superfície, precisam de uma serie de tratamentos para garantir o padrão de consumo. Essa série de tratamentos possui as seguintes etapas: coagulação, floculação, decantação, filtração e desinfecção.

- Coagulação

Consiste essencialmente na desestabilização das partículas coloidais e suspensas realizada pela conjunção de ações físicas e reações químicas, com duração de poucos segundos, entre o coagulante, a água e as impurezas presentes (LIBÂNIO 2008). O principal objetivo da coagulação consiste em elevar significativamente a velocidade de sedimentação de aglomerados de partículas eliminando ou reduzindo as forças eletrostáticas que as mantém separadas e em suspensão. Os coagulantes mais utilizados são o sulfato de alumínio e o cloreto férrico, sais que, em solução, liberam espécies químicas de alumínio ou ferro com alta densidade de cargas elétricas, de sinal contrário às manifestadas pelas partículas presentes na água bruta.

- Floculação e Decantação

Tem por finalidade reduzir o número de partículas suspensas e coloidais através de agitação mecânica entre as partículas anteriormente desestabilizadas pela ação do coagulante (responsável pela formação dos flocos a serem posteriormente removidos por sedimentação nas estações de filtração). A água é movimentada para que os flocos ganhem peso e consistência. O processo de floculação se dá em tanques abertos com pás motorizadas que

promovem o giro da água de forma muito lenta propiciando que as partículas se unam formando os flocos de impurezas. A formação desses flocos é essencial para o processo de decantação, pois as partículas se tornaram mais densas que os outros componentes do efluente. Os processos de coagulação, floculação e decantação, precedidos de pré-cloração, permitem a redução das bactérias na água e reduzem a turbidez.

- Filtração

Tem por finalidade remover as partículas responsáveis pela cor e turbidez. Essas partículas também dificultam a desinfecção na inativação dos micro-organismos patogênicos. No geral, a filtração é um processo pela qual a água atravessa um leito filtrante, comumente de areia, ou, areia e carvão, de modo que as partículas sejam retidas. Nas estações de tratamento convencionais, a filtração é a etapa mais importante por corrigir possíveis falhas das etapas anteriores.

- Desinfecção

Depois da filtração a água passa por uma correção de pH e então é-lhe adiciona cloro para o processo de desinfecção. O processo de desinfecção tem por finalidade a destruição ou inativação de micro-organismos patogênicos ou de outros organismos indesejáveis. A cloração é o método mais eficiente e barato aplicável aos sistemas públicos. Ao ser aplicado, o cloro reage produzindo vários compostos com capacidade diferentes de desinfecção e inclusive, composto não ativos. Geralmente verifica-se o pH para indicar quais compostos que estão sendo formados durante o processo.

2.7.3. Distribuição

Ao passar pelo processo de tratamento, a água é armazenada para manter a regularidade do abastecimento e atender as demandas extraordinárias, como por exemplo, em período de escassez. Para chegar às casas a água passa por sistemas de encanamentos subterrâneos que são chamados de rede de distribuição. E para que ela funcione satisfatoriamente é necessário haver pressão adequada em todos os seus pontos. Onde a pressão é menor, faz-se necessário a instalação de bombas, para que a água possa chegar em locais mais altos.

2.8. Reservatórios de água domésticos

Os reservatório doméstico de água potável (tratadas pelas ETAs) possuem duas finalidades: diminuir a pressão da água que chega ao imóvel (evitando sobrecarga nas tubulações), e

garantir a continuidade do abastecimento quando ocorrer interrupções temporárias no fornecimento pela ETA.

Geralmente um reservatório doméstico opera com um dispositivo que pode funcionar por gravidade, ou, com uma bomba que extrai água dos canos do sistema de distribuição ou de uma cisterna). A figura 4 mostra um esquema da estrutura de um reservatório de água potável.

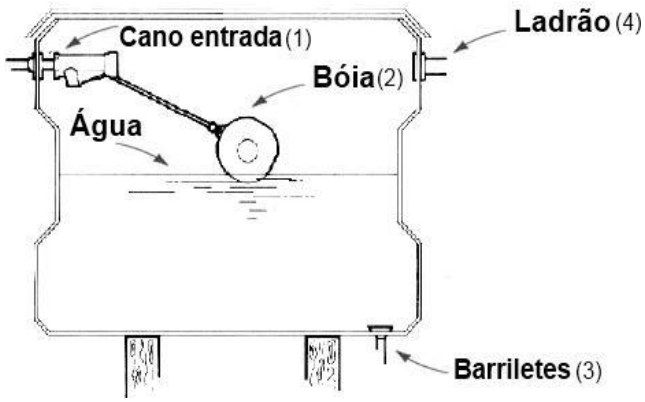


Figura 4. Esquema de um reservatório doméstico de água potável. (1) cano por onde se da a entrada da água; (2) boia que regula o nível em determinada altura, nunca alto a ponto de transbordar, nem baixo a ponto de faltar água; (3) saída de água (barriletes) na parte de baixo que levará ao imóvel; (4) extravasor, chamado popularmente de ladrão, orifício por onde sai o excesso de água.

2.8.1. Tipos de reservatórios de água

- Reservatório de polietileno

Costumam ser extremamente leves, flexíveis e empilháveis, além de resistentes e fáceis de limpar. Possuem sistema de fechamento da tampa que impede a entrada de luz, objetos ou animais. Bastante difundida no Brasil, nos domicílios são comumente encontrados as de 300, 500 e 1000 litros.

- Reservatório de fibra de vidro

Comportam maiores capacidades quando comparada com a de polietileno. Com opções de até 25.000 litros. A tampa é pressa por parafusos.

- Reservatório metálico

Suportam capacidades entre 5.000 a 500.000 litros. Normalmente são confeccionadas com chapas USI SAC 300, sendo produzidas de acordo com a especificação e necessidade de cada usuário.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta do material

O material avaliado foi coletado de reservatórios de água potável ligados à rede de distribuição do sistema de tratamento de água do Alto do Céu, localizadas no bairro do Fundão na cidade de Recife, pertencente a Companhia Pernambucana de Saneamento - COMPESA.

Foram estabelecidos dois pontos de coleta, um deles localizado na própria estação de tratamento (reservatório da guarita de entrada, "ponto 1"), e o outro situado no bairro de Água Fria (tambem na cidade de Recife) ("ponto 2"), a dois quilômetro de distância do referido sistema de tratamento.

As amostras de água foram coletadas em triplicata, com o auxílio de recipientes plásticos de 1.000 mL previamente esterilizados contendo uma solução de tiosulfato a 1% (para a neutralização do cloro residual livre).

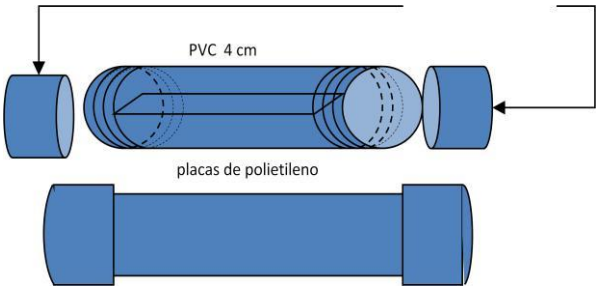


Figura 5- esquema de um amostrador

Para a análise dos biofilmes, amostradores (suporte físico para a formação de biofilmes, figura 4) foram otimizados segundo Oliveira, 2010. Os amostradores usados eram compostos de placas de polietileno (mesmo material dos reservatórios utilizados no estudo) inseridas em nipeis, que por sua vez foram depositados nos reservatórios de água. A cada coleta foram retirados um amostrador do "ponto 1" e "ponto 2", e analizados na universidade do Minho em

Braga- Portugal. As placas de polietileno também foram utilizadas para o isolamento de fungos filamentosos, que possivelmente estavam participando na formação dos biofilmes.

As coletas foram realizadas em triplicata, nos meses 8, 9, 10, 11 de 2011 e no mês 6 de 2012. Todas as amostras, ao serem transportadas para o laboratório, foram acondicionadas em caixas de isopor contendo gelo rígido e processadas em até 24 horas.

3.2. Parâmetros físico-químicos da água dos reservatórios

No momento da coleta foram analisados o seguintes parâmetros: temperatura, pH, potencial de oxiredução, condutividade, turbidez, oxigênio dissolvido e, total de sólidos dissolvidos. Todos estes parâmetros foram medidos utilizando o medidor de qualidade de água horiba, serie U-50. Também foi determinado a concentração de cloro residual livre por comparação visual em kit DPD Hach modelo CN-70, conforme instrução do fabricante.

3.3. Isolamentos dos fungos

3.3.1. Fungos filamentosos livres

Os fungos filamentosos livres foram quantificados por filtração em funis de polipropileno (MIHAWG072) esterilizados com capacidade para 100 mL, e filtros de membrana de nitrato de celulose com porosidade de 0,45μm; ambos submetidos a sucção por uma bomba a vácuo. As amostras isoladas foram cultivadas em placas de Petri contendo meio PGRBA (peptona, glicose, rosa bengala, Agar) e incubadas a 30°C por um período mínimo de 48h. Quantificou-se a ocorrência dos isolados em unidades formadoras de colônias por 100 ml (UFC/100 ml). As colônias crescidas em membrana sobre PGRBA foram transferidas para placas de Petri contendo Agar extrato de malte- MEA para isolamento.

3.3.2. Fungos dos amostradores

Para o isolamento de fungos contidos nos amostradores, as placas de polietileno inseridas nos nipeis foram retiradas e lavadas com água de diluição (constituída por cloreto de magnésio; fosfato de potássio monobásico e água destilada) e em seguida depositadas nos mesmos meios usados no isolamento de fungos filamentosos.

3.4. Biofilmes

Os amostradores de polietileno contendo, ou não, biofilmes foram analizados na universidade do Minho - Braga, Portugal, e submetidos a técnica de coloração com Calcofluor White M2R

(CW). Após a coloração com CW, as amostras foram observadas sob microscopia de epifluorescência (Microscópio Olympus BX51; camera Zeiss AxioCam HRc; software CellB®) (GONÇALVES et al., 2006).

3.5. Identificação dos fungos

A identificação dos fungos foi feita observando-se as características macroscópicas das colônias (cor, aspecto, consistência, presença de pigmento) e características microscópicas (morfologia de estruturas vegetativas e reprodutivas), utilizando literatura específica e meios apropriados para esta finalidade, como por exemplo: Agar Extrato de Malte, Czapek dox, Agar Batata Dextrose.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise de parâmetros físico-químicos

No Brasil a Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano, aprovada na portaria n° 518/2004 do Ministério da Saúde, define os valores máximos permissíveis para as características físicas e químicas da água (BRASIL, 2004). Esta portaria recomenda, entre outros parâmetros que no sistema de distribuição, o pH da água seja mantido na faixa de 6,0 a 9,5 e que o teor máximo de cloro residual livre, em qualquer ponto do sistema de abastecimento, seja de 2,0 mg/L. Recomenda também que a turbidez deve ser abaixo de 5 UT e o "Total de Sólidos Dissolvidos" abaixo de 1000 mg/L.

Deste modo, foram selecionados sete parâmetros físico-químicos para determinação do IQA: temperatura, pH, potencial de oxiredução, condutividade, turbidez, oxigênio dissolvido, total de sólidos dissolvidos. A tabela 2 mostra os valores obtidos.

.

Tabela 2. Médias dos valores físico-químicos referentes a IQA

Parâmetros:	Ponto 1	Ponto 2
Potencial de oxiredução (mV)	726	755
Condutividade elétrica (mS/cm)	0,07	0,06
Turbidez (UT)	0,68	1,1
Oxigênio dissolvido (mg/L)	11,8	12,34
Total de sólidos dissolvidos (g/L)	0,034	0,036

4.1.1. Oxigênio dissolvido

As águas poluídas por esgotos apresentam baixa concentração de oxigênio dissolvido pois o mesmo é consumido no processo de decomposição da matéria orgânica. Por outro lado as águas limpas apresentam concentrações de oxigênio dissolvido mais elevadas, geralmente superiores a 5mg/L, exceto se houverem condições naturais que causem baixos valores deste parâmetro. O oxigênio e um gás pouco solúvel em água e a sua solubilidade depende da pressão (altitude), temperatura e sais dissolvidos (ARAUJO, 2007).

Neste estudo, a concentração de oxigênio dissolvido no "ponto 1" variou de 7,4 a 13,8 e no "ponto 2" entre 9,0 a 14,6. Em um trabalho realizado por Araujo et al., (2011), as medidas de oxigênio dissolvido encontradas em um reservatório de água foram de 8,3 mg/L, no mesmo estudo o oxigênio dissolvido também foi mensurado em uma torneira de residência e em uma fonte e os valores encontrados foram de 8,2 mg/L e 7,5mg/L respectivamente.

4.1.2. Condutividade elétrica

A condutividade elétrica está relacionada com a presença de íons dissolvidos na água, e quanto maior a quantidade de íons dissolvidos, maior será o seu potencial de condutividade elétrica, ressaltando que este valor varia com a temperatura e o pH. Os valores de condutividade elétrica obtidos foram de 0,05 a 0,098 mS/cm no "ponto 1", e de 0,06 a 0,94 mS/cm no "ponto 2".

4.1.3. Turbidez

A turbidez indica o grau de atenuação que um feixe de luz sofre ao atravessar a água. Esta atenuação ocorre pela absorção e espalhamento da luz causada pelos sólidos em suspensão

(silte, areia, argila, algas, detritos, etc.). O aumento da turbidez faz com que uma quantidade maior de produtos químicos (ex: coagulantes) sejam utilizados nas estações de tratamento de águas, aumentando os custos de tratamento (ANA 2009). Os valores de turbidez encontrados nas análises foram de 0,68 a 1,1 UT, e estão de acordo com os estabelecidos pelo Ministério da Saúde do Brasil.

4.1.4. Potencial de oxiredução

O potencial de oxiredução (ORP) é uma medida da tendência da espécies químicas de adquirir elétrons e portanto de serem reduzidas; e o valor é expresso em volts (V) ou milivolts (mV). Cada espécie possui um potencial redox intrínseco, quanto mais positivo for esse valor maior a tendência da espécie para adquirir elétrons e ser reduzida. E nos experimentos as médias obtidas de ORP foram de 726 mV para o "ponto 1" e 755 mV para o "ponto 2".

4.1.5. Total de sólidos dissolvidos

O resíduo total é a matéria que permanece após a evaporação, secagem ou calcinação da amostra de água durante um determinado tempo e temperatura. (ANA, 2009). Como já mencionado o Ministério da Saúde recomenda que o total de sólidos dissolvidos não ultrapasse 1000 mg/L. E as amostras avaliadas neste estudo apresentaram valores entre 34 x 10-6 e 36 x 10-6 mg/L, demonstrando padrão aceitável de acordo com os indicados pelo MS.

4.1.6. pH

Os fungos são capazes de se desenvolverem nas mais extremas faixas de pH (KANAVAGH, 2005). Eles preferem ambientes ácidos com pH entre 4,0 - 6,0, e se desenvolvem na faixa de pH 2,5 - 9,0 sendo favorecidos em pH < 6,5 (CÔRTE-REAL, et al., 2010). E a variação de pH obtida (figura 6) revelou-se, como esperado, propicia ao crescimento de fungos.

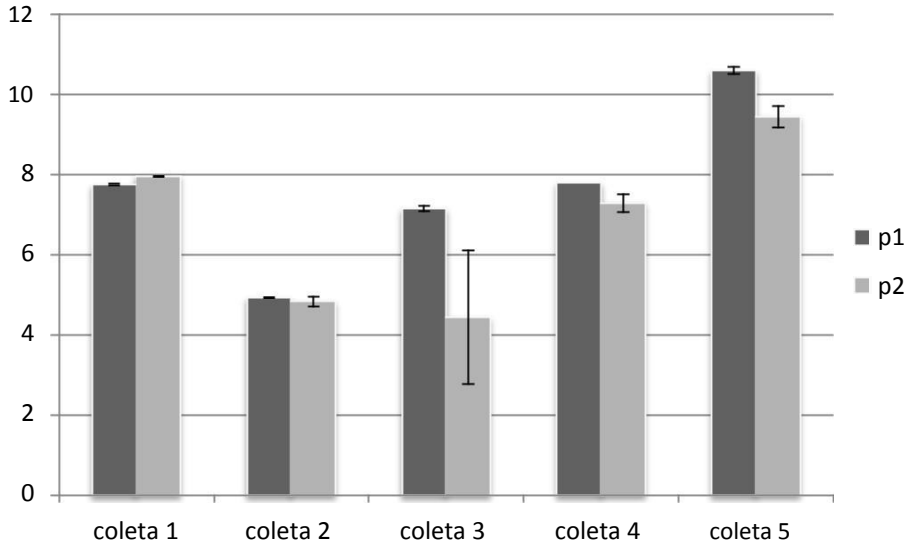


Figura 6. Variação de pH obtida nos "pontos 1" (p1) e "ponto 2" (p2).

Deve-se observar ainda que o pH influencia também na cloração, uma vez que as formas ativas de cloro são predominantes em pH abaixo da neutralidade (MORATO et al., 2003).

4.1.7. Temperatura

Sabe-se que a temperatura, assim como o pH, influencia no processo de desinfecção por cloro, quanto maior a temperatura maior a atuação de desinfecção. Sendo que os bioensaios estiveram submetidos entre temperaturas de 22 a 28 °C, nota-se a priori que a esta faixa de temperatura não influenciou de forma significativa quanto a eliminação de micro-organismos ou auxiliou de maneira relevante a atuação do cloro. Deve-se observar ainda que, os microrganismos mesófilos estão favorecidos para o desenvolvimento, uma vez que a sua temperatura ótima de crescimento está em torno de 20-45 ºC (CÔRTE-REAL et al., 2010). A figura 7 mostra as variações de temperatura ocorridas no decorrer das coletas.

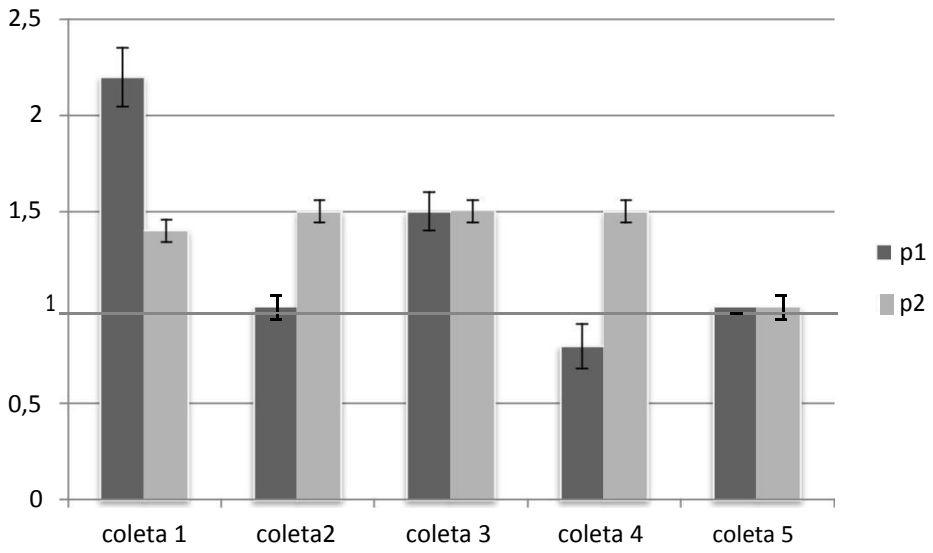
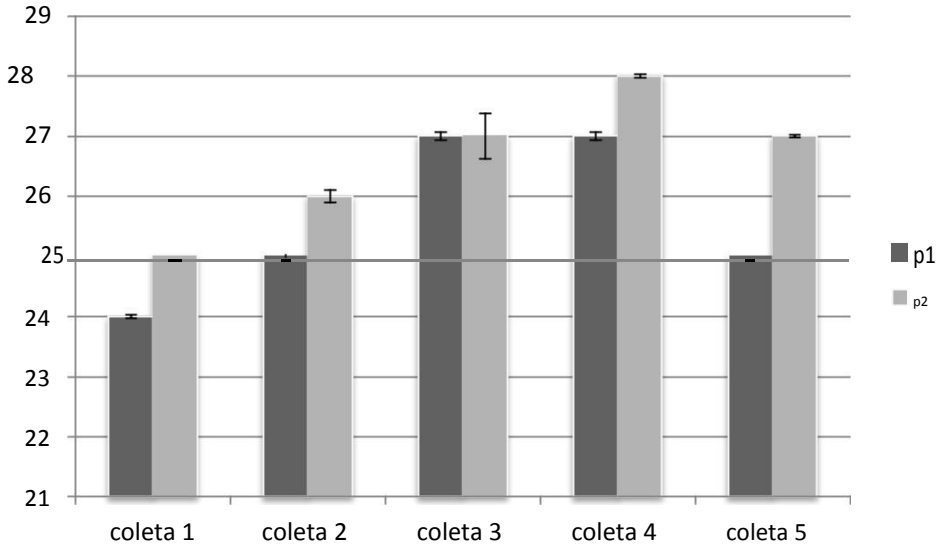


Figura 7. Variação de temperatura obtida nos "pontos 1" (p1) e "ponto 2" (p2).

4.1.8. Cloro residual livre

A portaria 518/2004 MS (Brasil, 2004), recomenda a utilização de desinfetantes que mantenham resíduos de seus principais compostos, de maneira duradoura, para que estes possam continuar atuando na rede de distribuição; pois considera-se que na rede de distribuição a água poderá sofrer novas contaminações devido a vazamentos, sistemas de canos danificados, etc. A taxa de cloro residual livre deve ser no máximo de 2,0 mg/L em qualquer ponto do sistema de abastecimento (BRASIL, 2004). As análises revelaram que a medida de cloro residual variou entre 0,8 mg/L a 2,2 mg/L, como mostra a figura 8, observando-se que quando o cloro atingiu 0,8 mg/L, na coleta 4, houve ocorrência de grande quantidade de micro-organismos.

Figura 8. Variação de cloro residual livre obtida nos "pontos 1" (p1) e "ponto 2" (p2).



A ação desinfetante do cloro é controlada pelo ácido hipocloroso. Em pH acima de 4 e menor que 6 predomina HOCl, em pH < 4 a reação se desloca para formar Cl2 e em pH < 2 predomina Cl2 (MEYER, 1994).

Para alcançar o objetivo de desinfetar a água, deve-se remover ou diminuir a concentração das substâncias que consomem cloro. Essas substâncias podem ser matéria orgânica em excesso, sais entre outros. A ação dos desinfetantes na destruição ou inativação de micro-organismos não é instantânea, em geral o processo se desenvolve de maneira gradativa, ocorrendo etapas físicas, químicas e bioquímicas (MEYER, 1994).

Esse consumo de cloro é denominado demanda de cloro (DANIEL, 2008). A quantidade de HOCl e OCl- em equilíbrio depende do pH e é chamada de cloro residual livre disponível. (DANIEL 2008).

4.2. Fungos filamentosos livres na água

Quantificou-se a ocorrência dos isolados em unidades formadoras de colônias por 100ml (UFC/100ml). Analisou-se trinta amostras e estas contabilizaram 1136 unidades formadoras de colônia, que resultaram em 245 isolados. Observou-se que os fungos filamentosos ocorreram de maneira variável e relevante, como os resultados já relatados por Hageskal et al., 2009, Sammon et al., 2010 e Oliveira, 2010. Em todas as amostras, as formas variaram entre os pontos e as coletas; havendo ocorrência de UFC/100ml de leveduras na maioria delas, no entanto, em número significativamente menor em relação aos fungos filamentosos.

Observando-se a figura 9 pode-se perceber que o "ponto 1" apresentou maiores incidências de micro-organismos em relação ao "ponto 2", com destaque para a "coleta 5", atingindo 248 UFC/100ml. Fato relacionado, também, ao pH 10 identificado na ocasião (lembrando que o cloro ativo tem pouco ou nenhum efeito em pH muito básico). A "coleta 4" do "ponto 1", também apresentou grande presença de UFC/100mL, nessa situação o cloro residual encontrava-se em torno de 0,8 mg/L (menor medida de residual de cloro durante as análises).

Embora o "ponto 1" estivesse situado mais próximo à ETA, este revelou maiores quantidades de UFC/100mL. Uma explicação plausível para isso, seria o tempo de exposição da água ao cloro, visto que o "ponto 2", por estar mais distante da estação de tratamento retém uma água mais exposta ao cloro residual. De acordo com Meyer (1994), a ação dos desinfetantes na destruição ou inativação de micro-organismos não é instantânea, mas gradativa.

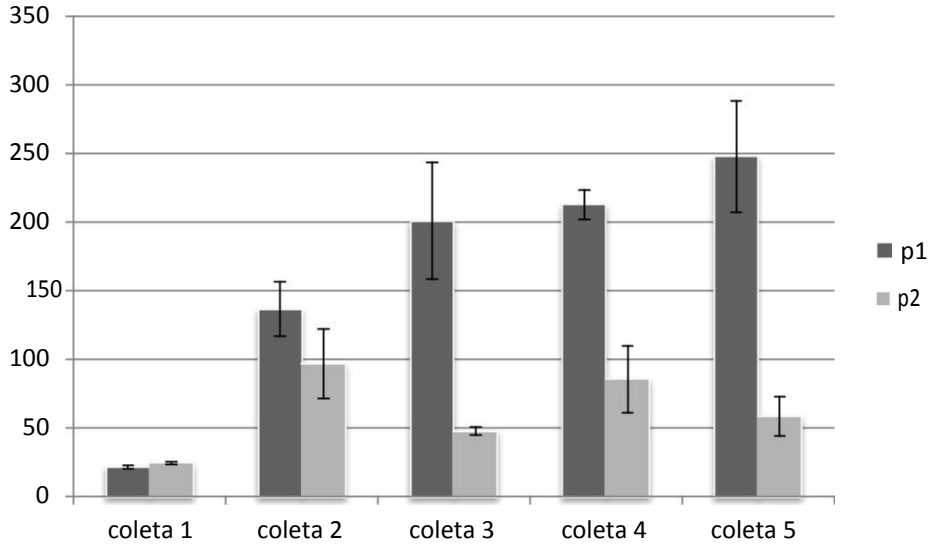


Figura 9. Incidência de Fungos filamentosos livres na água localizados nos "pontos 1" (p1) e "ponto 2" (p2).

Os resultados obtidos estão de acordo com àqueles encontrados por Oliveira (2010), que estudando essa mesma rede de distribuição de água quantificou vários gêneros de fungos filamentosos, inclusive gêneros descritos neste trabalho.

Evidências sugerem que os fungos sobrevivem e se multiplicam nos sistemas de distribuição em biofilmes e nos sedimentos, particularmente em temperaturas mais quentes, ou onde o fluxo é restrito (Kinsey et al., 2003). Vários estudos apontam a ocorrência destes microorganismos em diversas fontes de água potável.

Hageskal et al., (2009), apontaram ocorrência de fungos em água potável com grande variação nas amostras (entre 7,5 e 89%) ao longo do sistema de distribuição.

Varo et al., (2007) analisaram fungos na água utilizada por uma clínica de hemodiálise no interior de São Paulo, Brasil, e relatam que os gêneros mais abundantes foram Trichoderma, Cladosporium, Aspergillus e Fusarium. Na Noruega, Hageskal et al., (2006) isolaram 24 espécies de fungos no sistema abastecido por água subterrânea e 89 espécies num sistema suprido por água superficial onde a micobiota dominante consistiu de Penicillium, Aspergillus e Trichoderma.

Estudando a microbiota de um sistema público na Alemanha suprido por água subterrânea Göttlich et al., (2002), encontraram baixos números de fungos na água não tratada (5,1 %), números um pouco maiores nas águas de tubos recém-instalados e nas instalações hidráulicas

já existentes (9,1 % e 8,4 %, respectivamente) e logo após o hidrômetro (4,3 %) apresentam-se ligeiramente menor que na rede doméstica (7,1 %).

Investigando um sistema de produção de águas engarrafadas, Ribeiro et al., (2006) encontraram contaminação fúngica na fonte de água e em várias etapas do processo de engarrafamento, incluindo o produto final.

Hussain et al., (2010) investigaram a incidência de fungos em diversas fontes de água no vale Samahni, no Paquistão, e isolaram 21 espécies.

Sammon et al., (2010) isolaram fungos da água não tratada, da rede de distribuição e nos reservatórios de água tratada de um sistema municipal de abastecimento de água, na Austrália sub-tropical.

4.3 Fungos filamentosos isolados dos amostradores

A partir da "coleta 2", pode-se observar a ocorrência de fungos aderidos aos amostradores. Dos 24 amostradores utilizados, foram obtidos 56 UFC/100mL, que por seu turno totalizaram 26 isolados. Os fungos filamentosos identificados provavelmente participaram como formadores de biofilmes. Observando a figura 10, pode-se perceber que na "coleta 1" não houve ocorrência de isolados e o fator tempo é a causa para este fato.

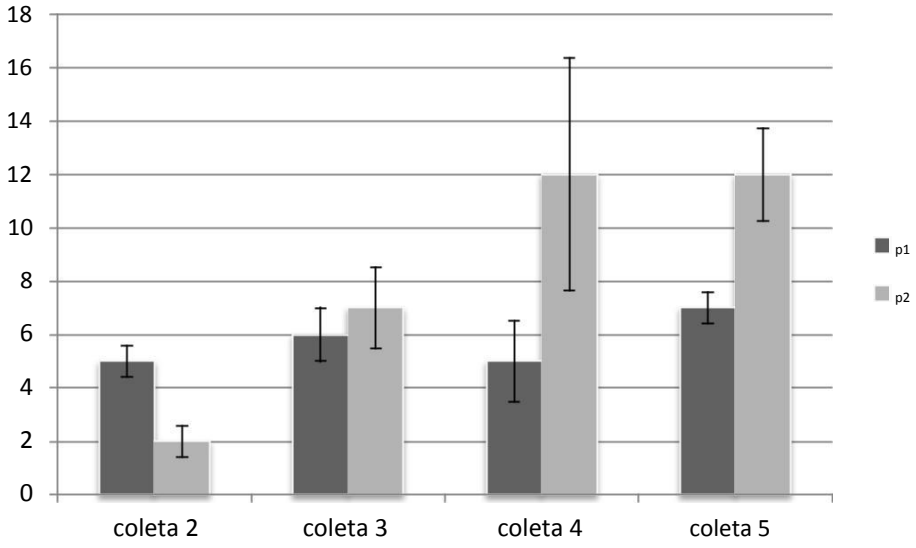


Figura 10. Incidência de Fungos filamentosos agregados aos amostradores nos "pontos 1" (p1) e "ponto 2" (p2).

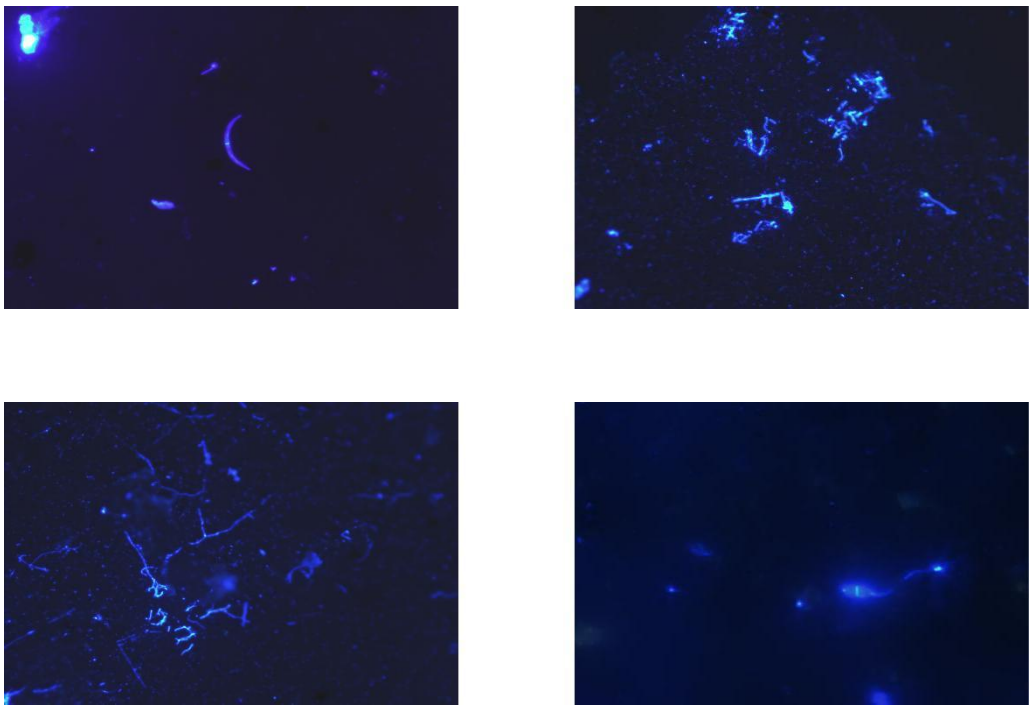
4.4. Detecção dos biofilmes nos amostradores

A detecção de fungos filamentosos pelos métodos tradicionais é complexa, indireta e demorada. Além disso, ao se fazer remoção do biofilme toda a sua estrutura é destruída. Fazendo-se necessário o uso de técnicas não invasivas, sensíveis e específicas para o estudo dos biofilmes. Métodos não dependentes de cultivo combinam corantes fluorescentes e microscopia de epifluorescência, para estudos in situ de populações microbianas (Gonçalves et al., 2006; Donlan e Costerton, 2002; Kator e Rodhes, 2003; Amann, 2001; Lima, 2007).

O trabalho realizado por Siqueira e Lima (2009), mostra que Calcofluor White é de fácil execução para detecção rápida de fungos em biofilme, por coloração da parede celular.

As placas de polietileno, após 30 dias de instalação dos amostradores, apresentaram formação de biofilmes em desenvolvimento que foram identificados por coloração de CW e microscopia de epifluorescência. Estes resultados são corroborados por Oliveira (2010) e Gonçalves et al., (2006). Doggett (2000), também caracterizou biofilmes num sistema de distribuição municipal de água a partir de secções longitudinais dos canos e encontrou 39 espécies de fungos. Os fungos filamentosos são excelentes colonizadores de superfícies, formando biofilmes em sistemas de distribuição de água potável e estão diretamente ligados a problemas de controle de qualidade e de saúde pública (Siqueira e Lima, 2009).

Isto demonstra, in situ, a habilidade fúngica em aderir a biofilmes e, assim, aumentar a sua capacidade de sobrevivência, disseminação e consequentemente contaminação do meio. Harding et al., (2009) chamam atenção para o fato que, de modo geral, a formação de biofilmes é tratada como uma habilidade das bactérias e de leveduras, sem levar em conta a possibilidade de fungos filamentosos participarem do processo. Sabe-se que os fungos são conhecidos por produzirem proteínas denominadas hidrofobinas que localizam-se na superfície exterior das células e estão envolvidos em várias funções no crescimento e desenvolvimento de fungos.verificou-se que os biofilmes possuem hifas hidrofóbicas específicas, que pode estar envolvida em funções ecológicas dos fungos (Siqueira e Lima, 2011).



Figuras 11-14. Microscopia de epifluorescência de filamentos fúngicos corados com CW nos biofilmes formados sobre placas de polietileno dos amostradores, exibindo auto-fluorecência.

A interação dos agentes patogênicos com outros microrganismos do biofilme tem sido uma preocupação em redes de distribuição. Biofilmes formados em condutores e recipientes de água potável pode conter sistemas bacterianos patógenos, como a Legionella pneumophila e coliformes intestinais e não intestinal (WHO, 2013; WINGENDER, 2011).Protozoários, que são comumente patogênicos, podem associar-se em biofilmes presentes em água tratada (potável); os biofilmes são para alguns, nichos "acolhedores" (SHARMA et al., 2003).

A presença de biofilmes em sistemas de distribuição de água causa problemas operacionais como corrosão das canalizações e deterioração da qualidade da água (Hu, et al., 2005).

Os resultados obtidos mostram que o material constituinte do reservatório de água são suscetíveis ao crescimento de biofilmes com a participação de fungos filamentosos.

4.5. Identificação dos fungos

A maioria dos fungos são inconspícuos e extremófilos, podendo se desenvolver em quase todos os ambientes, até mesmo em água potável que é considerada oligotrófica .

Sabe-se que os fungos filamentosos são capazes de produzir toxinas que são nocíveis principalmente para imunocomprometidos (Paterson 2007).

Pontara et al., (2011) estudando água mineral observaram que todas as amostras de água analisadas apresentaram crescimento de fungos. Este resultado confirmam a capacidade de o fungo crescer em ambientes oligotroficos, como o ocorrido neste trabalho. Os dois gêneros mais abundantes de fungos filamentosas encontrados nos estudos de Pontara et al., (2011) foram Penicillium spp. (31,2%) e Cladosporium spp. (18,7%). A tabela 3 apresenta as espécies que ocorreram neste estudo indicando o ponto de coleta e o percentual em que foram isoladas.

Tabela 3. Espécies fúngicas determinadas nos experimentos.

	Número de isolados livres na água		Número de isolados dos Amostradores		Percentual total dos isolados
	"Ponto 1"	"Ponto 2"	P1	P2	
Acremonium kiliense	9	2	-	1	5,3 %
Aspergillus spp.	8	4	5	4	4,8 %
Aspergillus carbonarius	4	1	-	-	2 %
A. flavus	3	-	-	-	1,2 %
A. japonicus	5	-	-	-	2 %
A. niger	1	-	-	-	0,2 %
A. phoenicis	8	4	-	-	4,8 %
Cladosporium spp.	-	1	-	1	0,8 %
Curvularia lunata	2	1	-	1	1,6 %
Fusarium lateritium	2	1	-	-	1,2 %
Paecilomyces varioti	12	10	3	-	10 %
Penicillium spp.	19	15	6	6	13,8 %
Penicillium decumbens	15	12	-	-	6,1%
P. glabrum	3	5	-	-	3,2 %
P. oxalicum	3	-	-	-	1,2%
Pestalotiopsis maculans	12	3	-	1	2,8 %
Trichoderma spp.	2	2	1	-	2%
Micelia sterilia	44	30	4	1	32,2 %

Ao comparar os fungos isolados da água (formas livres) com os fungos isolados dos amostradores, nota-se que as espécies Acremonium kilienses, Aspergillus spp.,Cladosporium spp, Curvularia lunata, Paecilomyces variote, Penicilium spp, Pestalotiopsis maculans e Trichoderma spp. desenvolveram-se em ambos os casos, o que revela a capacidade que o micro-organismo possui de se adaptar a ambientes e condições diferenciadas podendo aumentar o seu potencial de disseminação.

Os gêneros que ocorreram com maior frequência foram Penicillium seguidos de Aspergillus. Estes gêneros podem ser encontrados em qualquer amostra ambiental (solo, água, rizosfera, ar, e alimentos) e são aptos para produzir esporos viáveis e xerofílicos. De acordo com Varo et al., (2007), são frequentemente identificados em águas de abastecimento. Estes organismos

causam deterioração de alimentos ao crescerem sobre cereais, pão, sementes, defumados etc. (WEBSTER, 2007). Sabe-se que entre esses gêneros encontram-se potenciais produtores de micotoxinas e agentes que podem provocar danos a saúde de homem e animais, como por exemplo Aspegilus flavus, através da aflatoxinas, substância tóxica para mamíferos quando consumidos (AGRIOS, 2005). Aspegilus flavus também é um patógeno humano oportunista que causa aspergilose em indivíduos imunocomprometidos (AMAIKE et al., 2011).

Schwab & Straus (2004) relatam ainda espécies de Penicillium e Aspergillus como importantes causadores de doenças respiratórias, tais como a alveolite e asma alérgica, provocadas tanto pelos esporos como pelas toxinas dos fungos.

Pontara et al., 2011, estudando água mineral observaram que todas as amostras de água analisadas apresentaram crescimento de fungos. Este resultado confirmam a capacidade de o fungo crescer em ambientes oligotroficos, como o ocorrido no estudo presente. Os dois gêneros mais abundantes de fungos filamentosas encontrados neste estudo foram Penicillium spp. (31,2%) e Cladosporium spp. (18,7%).

As ocorrências, neste trabalho, dos gêneros Curvularia, Cladosporium e Trichoderma em água potável, também são relatadas nos estudos de Hussain et al., (2010) e Sammon et al., (2010). Para Hageskal et al.,(2009), o surgimento de fungos filamentosos em águas de abastecimento ainda divide opiniões, com relação a se de fato a contaminação por fungos tem importante implicação pra saúde. Autores associam fungos veiculados por água ao risco potencial de infecções, alergias e toxicoses principalmente para imunocrompometidos (HUSSAIN, et al.,2010). A real contribuição dos fungos veiculados pela água para problemas de saúde e para qualidade da água, ainda não está completamente esclarecida (PATERSON et al., 2009).

4.5.1. Tratamento estatístico

Os valores obtidos de "total de isolados" entre as coletas nos dois pontos foram comparados estatisticamente utilizando-se o T-Teste pelo programa Statistica v. 8 (Stat Soft Inc.); e não houve diferença estatística entre os dois pontos, pois o "p" foi menos que 0,05; sendo o "ponto 1" = 0,0115, e o "ponto 2" = 0,026.

5. CONCLUSÃO

Confirmando a hipótese, os fungos tiveram êxito no seu desenvolvimento nos reservatórios de água potável ligados à rede de tratamento e distribuição da COMPESA.

Apesar do conhecimento da presença de fungos na água, tem sido dada pouca atenção a estes microrganismos, no que confere ao tratamento de água para consumo, não sendo considerados nas diretrizes internacionais que definem a qualidade da água. (PEREIRA et. al., 2009).

Pode-se perceber que a concentração de cloro residual livre, utilizado pra a desinfecção da água, não foi o suficiente para eliminar os fungos livres e muito menos os presentes nos biofilmes. O trabalho realizado por Nunzio e Yamaguchi (2010), sugere que a cloração da água consiste em uma ferramenta ineficaz na eliminação do fungos.

Ficou evidente o desenvolvimento dos biofilmes nos amostradores e a participação de fungos nestes.

O estabelecimento de fungos em biofilme pode conferir-lhes relativa proteção aos métodos de tratamento de água, permitindo-lhes a sobrevivência (HAGESKAL et.al, 2009).

Vários autores reportaram a presença de leveduras e fungos filamentosos no ambiente aquático, sendo os últimos encontrados em maior número (GONÇALVES et. al. 2006).

No que diz respeito à saúde humana, alguns fungos são importantes para a manutenção da vida, na sua utilização, como antimicrobianos e quimioterápicos, enquanto outros representam os principais patógenos oportunistas (LACAZ et al., 2002) podendo infectar os humanos e causar micoses invasivas, alcançando o posto de principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com enfermidades críticas (MÉAN et al., 2008).

Considerando a capacidade da água em disseminar doenças e o potencial de toxicidade proporcionada pelos fungos, estes registros contribuem para que se crie parâmetros aceitáveis quanto a presença destes micro-organismos nas redes de água potável.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G. N. (2005). Plant Pathology, 5.ª ed., Elsevier Academic Press, p. 922.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. (1996). Introductory Mycology, 4.ª ed., New York: Wiley.

AMANN, R.; FUCHS, B.M.; BEHRENS, S. (2001). "The Identification of Microorganisms by Fluorescence in situ Hybridization". In: Biotechnology, 12: 231-236.

ANAISSIE, E. J.; COSTA, S. F. (2001). "Nosocomial aspergillosis is Waterborne". In: Clinical Infectious Diseases, 33:1546-1548.

ANAISSIE, E. J.; PENZAK, S. R.; DIGNANI, M. C. (2002). "The Hospital Water Supply as a Source of Nosocomial Infections". In: Archives of Internal Medicine, 162:1483-1492.

ANAISSIE, E. J. et al. (2003). "Pathogenic Molds (including Aspergillus species) in Hospital Water Distribution Systems". In: Blood, 101:2542-2546.

AMAIKE, S.; NANCY, P. K. (2011). "Aspergillus flavus". In: The Annual Review of Phytopathology, 49:107-133.

ASLUND, P. (1984). "Skin Irritations Cause by Moulds (in Swedish)". In: VarFoda, 36:327-336.

ARVANITIDOU, M. et al. (2000). "High Level of Recovery of Fungi from Water and Dialysate in Haemodialysis Units". In: Journal of Hospital Infection, 45:225-230.

BARTRAM, J.; HOWARD, G. (2003). "Drinking-Water Standards for the Developing World". In: MARA, D.; HORAN, N. (eds) Handbook of Water and Wastewater Microbiology, Academic Press, p. 221-240.

BAYS, L. R.; BURMAN, N. P.; LEWIS, W. M. (1970). "Taste and Odour in Water Supplies in Great Britain". In: Water Treatment and Examination, 19:136-160.

BOYD R. et al. (2002). "Use of the Atomic Force Microscope to Determine the Effect of Substratum Surface Topography on Bacterial Adhesion". In: Langmuir, 18:2343-2346.

BRANCO, S. M. (1999). Água, Meio Ambiente e Saúde: Águas Doces no Brasil. São Paulo: Escrituras Editora, p.227, 248.

BRASIL. (2005). Ministério da Integração Nacional - Secretaria de Políticas de Desenvolvimento Regional, cartilha: Nova Delimitação do Semi-Árido Brasileiro. Disponível em: http://www.integracao.gov.br/desenvolvimentoregional/publicacoes/delimitacao. Acesso em: 23 de outubro de 2012.

BRASIL. (2005). Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental, portaria MS nº 518/2004, Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental, Brasília: Editora do Ministério da Saúde, p. 28.

BRASIL. (2005). Ministério do Meio Ambiente - Conselho Nacional do meio Ambiente, resolução n.º 357. Disponível em: http://www.mma.gov.br. Acessado em: 20 de outubro de 2010.

BRASIL. (2009). Ministério do Meio Ambiente - Agência Nacional das Águas, Conjuntura Nacional dos Recursos Hídricos no Brasil. Disponível em: http://www.ana.gov.br. Acessado em: 25 outubro 2010.

BURMAN, N. P. (1965). "Taste and Odour Due to Stagnation and Local Warming in Long Lengths of Piping". In: Society of Water Treatment Examination, 14:125-131.

CHAKRABARTI, A. (2005). "Microbiology of Systemical Fungal Infections". In: Journal Postgrad. Med., vol. 51, supl. 1, p. 16-20.

CHAVANT, P. et al. (2007). "A New Device for Rapid Evaluation of Biofilm Formation Potential by Bacteria". In: Journal Microbiology Meth., 68:605-612.

COMPESA - Companhia Pernambucana de Saneamento. (2010). Disponível em: https://www.compesa.com.br. Acessado em: 16 outubro 2012.

CÔRTE-REAL, M.; JOHANSSON, B.; SARAIVA, L. (2010). "Nutrição e Crescimento Microbiano". In: FERREIRA, W. F. C.; SOUSA, J. C. F; LIMA, N. (eds) Microbiologia, Lidel Edições Ténicas Ltda, p. 166-195.

COSTERTON, J. (1999). "Introduction to Biofilm". In: Intitute J. Antimicrob. Ag., 11:217-221.

CHMIELEWSKI, R.; FRANK, J. (2003). "Biofilm Formation and Control in food Processing Facilities". In: Rev. Food Science Food Saf., 2:22-32.

DENNING, D. W. (2006). Aspergillosis, Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ.

DOGGETT, M. S. (2000). "Characterization of Fungal Biofilms Within a Municipal Water Distribution System". In: Applied and Environmental Microbiology, 66:1249-1251.

DONLAN, R.; COSTERTON, J. W. (2002). "Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms". In: Clinical Microbiology Rev., 15:167-193.

GARCÍA-ALMENDÁREZ, B. et al. (2008). "Effect of Lacto-Coccus Lactis UQ2 and its Bacteriocin on Listeria Monocytogenes Biofilms". In: Food Control., 19:670-680.

GARRETT, T.; BHAKOO, M.; ZHANG, Z. (2008). "Bacterial Adhesion and Biofilms on Surfaces". In: Review Prog. Nat. Sci., 18:1049-1056.

GONÇALVES, A. B. et. al. (2006). "Survay and Significance of Filamentous Fungi from Tap Water". In: International Journal of Higiene and Environmental Health, 209:257-264.

GOTTLICH, E. et al. (2002). "Fungal Flora in Groundwater Derived Public Drinking Water". In: International Journal of Hygiene and Environmental Health, 205:269-279.

GRABINSKA-LONIEWSKA, A. et al. (2007). "Occurrence of Fungi in Water Distribution System". In: Polish Journal of Environmental Studies, 16(4):539-547.

HARDING, M. W.; MARQUES, L. L. R.; HOWARD, R. J.; OLSON, M. E. (2009) "Filamentous Fungi Form Biofilms". In: Trends in Microbiology, 17(11):475-480.

HAGESKAL, G. et. al. (2006). "Diversity and Significance of Mold Species in Norwegian Drinking Water". In: Applied and Environmental Microbiology, 72:7586-7593.

HAGESKAL, G.; GAUSTAD, P.; HEIER, B. T.; SKAAR, I. (2007). "Occurrence of Moulds in Drinking Water". In: Journal of Applied Microbiology, 102:774-780.

HAGESKAL, G. et al. (2008). "Exploring the Species Diversity of Trichoderma in Norwegian Drinking Water Systems by DNA Barcoding". In: Molecular Ecology Resources, 8:1178-1188.

HAGESKAL, G.; LIMA, N.; SKAAR, I. (2009). "The Study of Fungi in Drinking Water". In: Mycological research, 113:165-172.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. (2004). "Bacterial Biofilms: From the Natural Environment to Infectious Diseases". In: Nature Reviews Microbiology 2(2): 95-108.

HAPCIOGLU, B. et al. (2005). "Heterotrophic Bacteria and Filamentous Fungi Isolated from a Hospital Distribution System". In: Indoor and Built Environment, 14:487-493.

HAWKSWORTH, D. (2001). "The Magnitude of Fungal Diversity the 1.5 Million Species Estimate Revisited". In: Mycol. Res., vol. 105, p. 1422-1432.

HU, J. Y. et al. (2005). "Investigation into Biofilms in a Local Drinking Water Distribution System". In: Biofilms, 2:19-25.

HUSSAIN, T. et al. (2010). "Incidence of Fungi in Water Springs of Samahni Valley, District Bhiimber, Azad Kashmir, Parkistan." In: International Journal of Biology, 2:94-101.

KATOR, H.; RHODES, M. (2003). "Detection, Enumeration and Identification of Environmental Microorganisms of Public Health Significance". In: MARA, D., HORAN, N. (eds). Handbook of Water and Wastewater Microbiology, Academic Press, p. 113-144.

KAVANAGH, K. (2005). Fungi: Biology and Applications. Ireland: Wiley.

KELLEY, J. (1997). "Identification, Significance and Control of Fungi in Water Distribution Systems". In: Water Quality technology Conference Proceedings, Denver, CO: Public American Water Works Association, p. 1-20.

KENNEDY, H.; WILLIAMS, C. (2007). "Infection Risk for Filamentous Fungi in Water in a Paediatric Haematology/Oncology Ward". In: International Journal of Antimicrobial Agents, 29:485.

KINSEY, G. C.; PATERSON, R. R.; KELLEY, J. (1999). "Methods for the Determination of Filamentous Fungi in Treated and Untreated Waters". In: Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement, 85:214S-224S.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN Jr., W. C. (2001). Diagnóstico Microbiológico. 5.ª ed., Rio de Janeiro: MEDSI, p. 1465.

LACAZ, C. S. et al. (2002). Tratado de Micologia Médica Lacaz, São Paulo: Sarvier.

LIBANIO, M. (2008). Fundamentos de Qualidade e Tratamento da Água, 2.ª ed.

LIMA, N. (2007). "FISH and Staining Techniques for in situ Detection of Fungi in Water Biofilms". In: Drinking Water, Environmental and Foodstuff Analyses, (abstracts), [Riga Technical University, 2007]. p. 32-33.

LIU, W. et al. (2002). "Development and Use of a Micro-Manipulation Technique for Measuring the Force Required to Disrupt and Remove Fouling Deposits". In: Food Bioprod Process, 80:286-291.

MARR, K. A. et al. (2002). "Epidemiology and Outcome of Mould Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients". In: Clinical Infectious Diseases, 37:909-917.

METZGER, W. J. et al. (1976). "Sauna-Takers Disease: hypersensitivity due to contaminated water in a home sauna". In: Journal of the American Medical Association, 236: 2209-2211.

MEYER, S. T. (1994). "O Uso de Cloro na Desinfecção de Águas: A Formação de Trihalometanos e os Riscos Potenciais à Saúde Pública". In: Cadernos de Saúde Pública 10 (1):99-110.

MORATÓ, J. et. al. (2003). "Microbial Response to Desinfectants". In: MARA, D.; HORAN, N. Handbook of Water and Wastewater Microbiology, Academic Press, p. 657-693.

MUITTARI, A. et al. (1980). "An Epidemic of Extrinsic Allergic Alveolitis Caused by Tap Water". In: Clinical Allergy, 10:77-90.

NAVIA, D. P.; VILLADA, H. S.; MOSQUERA, S. A.; (2010). Las Biopelículas em la Industria de Alimentos, Facultad de Ciencias Agropecuarias, vol. 08, n.º. 02, julio-diciembre.

NELFELD, P. M. (1999). Manual de Micologia Médica: Técnicas Básicas de Diagnóstico, Rio de Janeiro, p. 107-187.

NUNZIO, B.; YAMAGUCHI, M. U. (2010). "Prevalência de Fungos em Água para Consumo Humano de Asilos e Creches em Maringá-PR". In: Revista em Agronegócios e Meio Ambiente, vol. 03, n.º 02, p. 113-134 (ISSN 1981-9951).

OLIVEIRA, H. M. B. et al., (2008). 1st International Workshop on Biotechnology, 3rd Alfa-Val Natura Meeting, 3rd Scientific Journey of LIKA, Recife-PE-Brasil, 1:423-424.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. (2000). "A Desinfecção da Água", série: Autoridades Locais de Saúde: Avaliação de Meados da Década sobre Água Potável.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. (1988). Guías para la Calidad del Agua Potable, vol. 3, Publicación Científica n.° 58.

PANAGOPOULOU, P. et al. (2002). "Environmental Surveillance of Filamentous Fungi in Three Tertiary Care Hospitals in Greece". In: Journal of Hospital Infection, 52: 185-191.

PATERSON, R. R. M.; VENÂNCIO, A.; LIMA, N. (2007). "Congresso Nacional Microbiotecnology - XXXIII, Lisboa, Portugal.

PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. (2009). Fungal Growth and Mycotoxin Production in Drinking Water, IBB - Biological Engineering Centre, University of Minho, Braga, Portugal.

PEREIRA, V. J. et al. (2009). "Occurrence of Filamentous Fungi and Yest in Three Different Drinking Water Sources". In: Water Res, 44:4850-4859.

PIRES-GONÇALVES, R. H. et at. (2008). "Occurrence of Fungi in Water Used at a Haemodialysis Centre". In: Letters in Applied Microbiology, 46:542-547.

PONTARA, A. V. et al. (2011). "Microbiological Monitoring of Mineral Water Commercialized in Brazil". In: Brazilian Journal of Microbiology, 42:554-559 (ISSN 1517-8382).

REVANKAR, S. G.; SUTTON, D. A. (2010). "Melanized Fungi in Human Disease". In: Clinical Microbiology Reviews, p. 884-928.

RIBEIRO, A. et al. (2006). "Fungi in Bottled Water: a Case Study of a Production Plant". In: Revista Iberoamericana de Micologia, 23:139-144.

RUSSELL, R.; PATERSON, M.; LIMA, N. (2008). "Fungal Contamination of Drinking Water". In: Int. J. Environ. Res. Public. Health, 8(2):456–469.

SAMMON, N. B. et. al. (2010). "Incidence and Distribution of Microfungi in a Treated Municipal Water Supply System in Sub-Tropical Australian". In: International Journal of Environmental research and Public Health, 7(4):1597-1611.

SIQUEIRA, V. M.; LIMA, N. (2012). "Surface Hydrophobicity of Culture and Water Biofilm of Penicillium spp.". In: Curr. Microbiol., 64:93-99.

SIQUEIRA, M. V.; LIMA N. (2011). "Surface Hydrophobicity of Solid Culture and Water Biofilm of Filamentous Fungi". In: MicroBiotec'11 (Book of Abstracts), Braga, Portugal, p. 216.

SIQUEIRA, V. M.; LIMA, N. (2009). " Quantification of Fungal Biomass in Penicillium brevicompactum Biofilms by Image Analysis". In: MicroBiotec'09 (Book of Abstracts), Vilamoura, Portugal, p. 146.

SIQUEIRA, V. M. (2011). Characterising Filamentous Fungal Biofilm in Drinking Water Distribution Systems Using Microscopic and Molecular Techniques. [Tese de Doutorado: Engenharia Química e Biológica], Braga. Universidade do Minho.

SIQUEIRA V.; LIMA N. (2011). Surface Hydrophobicity of Culture and Water Biofilm of Penicillium spp. Published online: 20 October 2011. Springer Science Business Media, LLC 2011.

SILVA, C. H. P. M. (1999). Bacteriologia: Texto ilustrado, Minas Gerais: PUC, p. 531.

SHARMA, S.; SACHDEVA, P.; VIRDI, J. S. (2003). "Emerging Water-Borne Pathogens". In: Applied Microbiology and Biotechnology, 61:424-428.

SHAHEEN, R. et al. (2010). Persistence Strategies of Bacillus cereus Spores Isolated from Dairy Silo Tanks". In: Food Microbiol., 27:347-355.

SCHWAB, C. J.; STRAUS, D. C. (2004). The Roles of Penicillium and Aspergillus in Sick Buildings Syndrome". In: Advances in Applied Microbiology, 55:215-237.

VARO, S. D. et al. (2007). "Isolation of Filamentous Fungi from Water Used in a Hemodialysis Unit (in Brazilian)". In: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 40:326–331.

ZHANG, T.; BISHOP, P. (1994). "Structure, Activity and Composition of Biofilm". In: Water Science Technology, 29:335-344.

WARRIS, A. et al. (2001). "Recovery of Filamentous Fungi from Water in a Paediatric Bone Marrow Transplantation Unit". In: Journal of Hospital Infection, 47:143-148.

WARRIS, A. et al. (2002). "Contamination of Hospital Water with Aspergillus fumgatus and Other Moulds". In: Clinical Infectious Diseases, 34 1159-1160.

WEBSTER, J.; WEBER, R. W. S. (2007). Introduction to Fungi, 3rd ed., Cambridge: Cambridge University Press.

WINGENDER, J.; FLEMMING, H. C. (2011). "Biofilms in Drinking Water and their Role as Reservoir for Pathogens". In: Int. J. Hyg. Environ. Health, 214(6):417-423.

WHO - World Health Organization. (2011). Guidelines for Drinking Water Quality, 4th ed.