



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

HELENA MARIA BEZERRA DE OLIVEIRA

**ESTUDO DOS FUNGOS EM SISTEMA DE ABASTECIMENTO DE
ÁGUASUPRIDO POR POÇOS DO RECIFE, PERNAMBUCO**

RECIFE
2016

HELENA MARIA BEZERRA DE OLIVEIRA

**ESTUDO DOS FUNGOS EM SISTEMA DE ABASTECIMENTO DE
ÁGUASUPRIDO POR POÇOS DO RECIFE, PERNAMBUCO**

Tese 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 Doutora em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Fungos de interesse industrial

Orientadora: Profa. Dra. Norma Buarque de Gusmão

Co-Orientadora: Profa. Dra. Elaine Malosso

Co-Orientador: Prof. Dr. Nelson Lima

RECIFE
2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Oliveira, Helena Maria Bezerra de
Estudo dos fungos em sistemas de abastecimento suprido por poços do Recife, Pernambuco. / Helena Maria Bezerra de Oliveira - Recife: O Autor, 2016.

137 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Norma Buarque de Gusmão

Coorientadores: Elaine Malosso e Nelson Lima

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biologia de Fungos, 2016.

Inclui referências e anexo

1. Fungos 2. Abastecimento de água 3. Biofilmes I. Gusmão, Norma Buarque de (orient.) II. Malosso, Elaine (coorient.) III. Lima, Nelson (coorient.)

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-640

HELENA MARIA BEZERRA DE OLIVEIRA

**ESTUDO DOS FUNGOS EM SISTEMA DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA
SUPRIDO POR POÇOS DO RECIFE, PERNAMBUCO**

Tese 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 Doutora em Biologia de Fungos.

Aprovada em: _____/_____/_____

**ESTUDO DOS FUNGOS EM SISTEMA DE ABASTECIMENTO DE
ÁGUASUPRIDO POR POÇOS DO RECIFE, PERNAMBUCO**

HELENA MARIA BEZERRA DE OLIVEIRA

DATA DA DEFESA: 17 de março de 2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Norma Buarque Gusmão – (Orientadora) / UFPE

Prof. Dr. Nelson Lima Examinador Externo – Titular / Universidade do Minho

Profa. Dra. Virgínia Medeiros de Siqueira. – Examinador Interno – Titular /
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Cristina Maria de Souza Motta – Examinador Interno

Prof. Dr. Cledir Rodrigues Santos Examinador Externo – Titular / Univerdidad de
La Frontera

Dra. Marília de Holanda Cavalcanti Maciel - Examinador
Externosuplente/Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Luciana de Oliveira Franco – Examinador Externo – Suplente /
Universidade Federal Rural de Pernambuco

À minha família querida.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos

A Deus origem e destino de todas as coisas.

Aos meus pais pelo amor, dedicação e exemplo.

Aos meus filhos queridos, pelo apoio, incentivo e paciência.

Ao meu esposo Ivson por me apoiar e pela ajuda no trabalho pesado.

À minha orientadora Professora Norma Buarque de Gusmão, pelas orientações, exemplo, apoio e amizade.

Ao Co-orientador Professor Nelson Lima, pelo apoio, pelo otimismo e força motivadora, pelo aprendizado junto à Micoteca da Universidade do Minho.

À co-orientadora Professora Elaine Malosso pelo apoio e orientações.

Ao Cleir Santos pelo apoio, ensinamentos e amizade.

Aos Professores da Pós- Graduação em Biologia de Fungos pelos ensinamentos transmitidos e pelos exemplos.

Aos amigos Carol e Sebastião pela cordialidade

À professora Maria Auxiliadora pelo seu exemplo e valiosa colaboração na taxonomia.

À Professora Débora pelo exemplo e valiosa colaboração na taxonomia

À Professora Cristina Motta pelos ensinamentos e colaboração.

À Professora Leonor Costa Maia pelo apoio e ensinamentos e exemplo.

Ao Professor André pelo apoio e colaboração.

À Virginia pelas orientações, exemplo, amizade e apoio.

À Mayra, Marcela, Marina, Jessica, Phelipe pela amizade e companheirismo

A Roger pela valiosa colaboração na taxonomia

À Lidiane Roberta pela valiosa colaboração na taxonomia.

Aos amigos, Rafael Vilela, Jadson Oliveira, Carlos pelo agradável convívio

À Thais Feijó, pela valiosa colaboração na taxonomia e pela amizade.

À Patrícia e Diana do Lamai por toda ajuda e amizade.

À Pérsio pelo coleguismo e colaboração.

A Erick pelo coleguismo e colaboração.

Aos colegas da turma de Doutorado pelo convívio.

Aos colegas do LAMAI, pelo agradável convívio e amizade.

Aos amigos do Laboratório da Pós-Graduação.

Aos amigos do Laboratório de Hifomicetos do Folheto.

Aos colegas da Micoteca da Universidade do Minho pela acolhida e apoio, especialmente Célia Soares, Sr Santos, e Dr Manuel Silva.

À Lúcia Simões, na Uminho, pelo tempo dedicado às orientações e suporte com o Propella

À Diana Patrícia, na Uminho, pelo apoio incansável, solidariedade e colaboração na Microscopia.

À Nicole Dias pelo apoio e amizade, incentivo e ajuda com a microscopia.

À Barbara, Andréia e Simone pelo agradável convívio na Uminho.

À UFPE pela infraestrutura.

À CAPES pela Bolsa de Doutorado Sanduiche.

Ao programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos.

À Universidade do Minho pela parceria e suporte técnico e científico.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho sou muito grata.

“Caminhar apesar da distância
Vencer apesar dos obstáculos
Sonhar apesar das decepções
Sorrir apesar das angústias
Acreditar acima de tudo”.

Daniel Silveira

RESUMO

Várias questões em potencial associadas aos fungos em água de consumo incluem obstruções da canalização, alterações como odor, sabor, pigmentos, formação de biofilmes, disseminação de fungos patogênicos e produção de micotoxinas. A legislação brasileira, assim como a de outros países, não determina a pesquisa de fungos, nem estabelece limites para a presença destes na água de abastecimento. Este trabalho aborda ocorrência de fungos filamentosos nas águas e em biofilmes formados nos reservatórios de um sistema de abastecimento suprido por poços em Recife-PE. Para formação e detecção *in situ* dos biofilmes, amostradores foram imersos na água nos pontos de coleta e foram usados reatores no laboratório. Foram estabelecidos pontos estratégicos de amostragem representados pelo reservatório da Estação de Tratamento de água, reservatórios do Restaurante Universitário, Núcleo de Educação Física e Hospital das Clínicas. Amostras de água foram coletadas bimestralmente em dois diferentes períodos de setembro de 2013 a março de 2014 e janeiro a julho de 2015. Os fungos foram quantificados por filtração em membrana, utilizando os meios R2A e SDA suplementados com antibióticos, a 30 °C até 10 dias. Os fungos foram detectados em todos os pontos de amostragem. As contagens variaram de 5 to 207 unidades formadoras de colônias (UFC)/100 mL, com uma média de 53 UFC/100 mL por ponto. Entre os 859 fungos identificados, os gêneros mais abundantes foram *Aspergillus* (37%), *Penicillium* (25%), *Trichoderma* e *Fusarium* (9 % cada) e *Curvularia* (5%). *Acremonium*, *Cladosporium*, *Cunninghamella*, *Humicola* e *Leptodontium* representaram 1% e os demais menos que 1%. Dentre os *Aspergillus*, foram isoladas espécies produtoras de toxinas e potencialmente patogênicas como *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus*, este último ocorreu nos reservatórios da Estação de Tratamento, Restaurante Universitário e Hospital das Clínicas. Por sua importância clínica *Aspergillus fumigatus* foi testado quanto a sua capacidade de formar biofilmes mono e multi espécie (com *P. brevicompactum* e *P.reactans*) no laboratório, em placas multipoços, e em reator que simula as condições hidráulicas do sistema de água. A espécie *Penicillium citrinum* foi a mais abundante no gênero. A detecção *in situ* dos fungos nos biofilmes foi realizada com o uso de técnicas de fluorescência e moleculares como: fluorocromos específicos, hibridização *in situ* com sondas DNA-FISH e PNA-FISH e microscopia de epifluorescência. Os biofilmes foram detectados principalmente no reservatório da Estação de Tratamento e Educação Física. Os fungos filamentosos não foram visualizados por epifluorescência nos biofilmes dos amostradores (placas PVC) analisados do reservatório do Hospital das Clínicas onde se faz desinfecção suplementar. *Aspergillus fumigatus* mostrou potencial para formar biofilmes monoespécie em reatores nas condições parecidas com a do sistema. Os testes abriram novos tópicos para serem testados e ajustados nos ensaios nos reatores. Considerando os resultados obtidos neste trabalho evidencia-se que os reservatórios são pontos de vulnerabilidade onde a água é exposta ao risco de degradação da qualidade. Logo uma maior atenção deve ser dada à presença desses organismos na água de abastecimento e aos reservatórios onde a água fica exposta a riscos de degradação da qualidade.

Palavras-chave: Sistema de abastecimento de água. Fungos. Biofilme. Técnicas de fluorescência. PNA-FISH

ABSTRACT

Several potential issues related to fungi in drinking water include pipe blockage, odor, flavour, pigments, biofilms development, pathogenic fungal dissemination and mycotoxin production. Fungi are not a concern in the Brazilian water legislation, as in other countries laws, where fungal survey and limits are not established for drinking water. This work addresses the filamentous fungi occurrence in water of reservoirs in a drinking water system supplied by wells in Recife-PE. For the development and in situ detection of biofilms samplers were immersed in the water at the collection points and reactors were used in the laboratory. For this study, strategic sampling points were established in four reservoirs: Treatment Plant, University Restaurant, Physical Education Centre and University Hospital. Water was collected in two different periods, from September 2013 to March 2014 and from January to July 2015, on a bimonthly basis. Fungi were quantified by membrane filtration, using R2A and SDA media supplemented with antibiotic, incubation was performed at 30 °C, in a period of 10 days maximum. Fungi were detected in water in all sampling points and in biofilms of two reservoirs. Counting ranged from 5 to 207 colony form units (CFU)/100 mL, with an average of 53 CFU/100 mL in sampling points. Among 859 identified fungi, the most abundant genera were *Aspergillus* (37%), *Penicillium* (25%), *Trichoderma* and *Fusarium* (9 % each), *Curvularia* (5%). *Acremonium*, *Cladosporium*, *Cunninghamella*, *Humicola* and *Leptodontium*, represented 1% and the remaining were less than 1%. Among *Aspergillus* genera, potential pathogenic and mycotoxin producing species like *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* were found. The latter one occurred at Treatment Plant, University Restaurant and University Hospital reservoirs. Due to its clinical importance *Aspergillus fumigatus* was checked for the ability to form mono and multispecies biofilm (using *P. brevicompactum* and *P. reactans*) in microtiter plates and reactor which simulates the water system hydraulic condition at laboratory. The species *Penicillium citrinum* was the most abundant representative in the genera. The fungal *in situ* detection of biofilms formed, was performed using fluorescent and molecular techniques: specific fluorochromes, *in situ* hybridization with DNA-FISH and PNA-FISH probes, associated with fluorescence microscopy. Biofilms were detected mainly in Treatment Plant and Physical Education Centre reservoirs. Filamentous fungi were not viewed by epifluorescence microscopy in biofilms from University Hospital analysed samplers (PVC plates), where a supplementary chlorination is performed. *Aspergillus fumigatus* showed potential to form monospecies biofilms in reactors, in similar conditions to the system. The tests opened new issues to be investigated and parameters adjusted in reactor assay. Considering the obtained results they bring evidences that reservoirs are points of vulnerability where water is exposed to deterioration risk, and a major attention should be given to fungi occurrence in water and reservoirs, where water is exposed to quality degradation,

Key-words: Drinking water system. Fungi. Biofilms. Fluorescence techniques. PNA-FISH

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO REATOR PROPELLA	57
FIGURA 2 – PONTOS DE COLETA NA REDE DE DISTRIB.DE ÁGUA NO CAMPUS DA UFPE	67
FIGURA 3 – AMOSTRADOR PVC PEÇAS E MONTAGEM	69
FIGURA 4 – AMOSTRADOR MF.....	69
FIGURA 5 – QUANTIFICAÇÃO DOS FUNGOS EM AMOSTRADORES PLACAS PVC.....	72
FIGURA 6 – QUANTIFICAÇÃO DOS FUNGOS EM AMOSTRADORES MF.....	73
FIGURA 7 – CUPONS DO REATOR PROPELLA	77
FIGURA 8 – DETECÇÃO DE BIOFILME EM PLACAS DE MULTIPOÇOS - TESTE 1.....	101
FIGURA 9 – DETECÇÃO DE BIOFILME EM PLACAS DE MULTIPOÇOS – TESTE 2.....	102
FIGURA 10 – BDETECÇÃO IN SITU DE BIOFILME DE <i>A.FUMIGATUS</i> EM PLACAS DE MULTIPOÇOS TESTE 2	103
FIGURA 11 – DETECÇÃO IN SITU DE BIOFILME EM PLACAS DE MULTIPOÇOS TESTE 2	104
FIGURA 12 – DETECÇÃO IN SITU DE BIOFILME EM PLACAS DE MULTIPOÇOS TESTE 3.....	105
FIGURA 13 – DETECÇÃO IN SITU DE BIOFILME EM PLACAS DE MULTIPOÇOS TESTE 3.....	105
FIGURA 14 – DETECÇÃO IN SITU DE BIOFILME NO REATOR PROPELLA ENSAIO 1.....	107
FIGURA 15– DETECÇÃO IN SITU DE BIOFILME NO REATOR PROPELLA ENSAIO 1.....	107
FIGURA 16 – DETECÇÃO IN SITU DE BIOFILME NO REATOR PROPELLA..... ENSAIO 2.....	109
FIGURA 17 – DETECÇÃO IN SITU DE BIOFILME NO REATOR PROPELLA..... ENSAIO 2.....	109
FIGURA 18 – DETECÇÃO IN SITU DE BIOFILME NO REATOR PROPELLA ENSAIO 3.....	110

FIGURA 19 – DETECÇÃO IN SITU DE BIOFILME NO REATOR PROPELLA.....	
ENSAIO 3.....	111
FIGURA 20 – DETECÇÃO IN SITU DE BIOFILME NO REATOR PROPELLA.....	
ENSAIO 4	112
FIGURA 21 – DETECÇÃO IN SITU DE BIOFILME NO REATOR PROPELLA.....	
ENSAIO 5	113
FIGURA 22– DETECÇÃO IN SITU DE BIOFILME EM PLACAS PVC NO RESERVATÓRIO DA ETA	115
FIGURA 23– DETECÇÃO IN SITU DE BIOFILME FORMADOS EM PLACAS PVC NO RESERVATÓRIO DO HC	116

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – VULNERABILIDADE DA UTILIZAÇÃO DA ÁGUA DE CONSUMO	30
TABELA 2 – PESQUISAS DE FUNGOS EM ÁGUA DE CONSUMO HUMANO	33
TABELA 3 – MÉTODOS DE CULTIVO PARA MICROORGANISMOS NA ÁGUA E BIOFILMES EM SISTEMAS DE ÁGUA.....	44
TABELA 4 – MÉTODOS QUÍMICOS PARA ESTIMATIVA DE BIOMASSA E COMPOSIÇÃO (CÉLULAS E EPS)DE MICRORGANISMOS.....	46
TABELA 5 – MÉTODOS DE COLORAÇÃO PARA ÁCIDOS NUCLEICOS E ESTADO FISIOLÓGICO DE MICCRORGANISMOS	47
TABELA 6 – MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS USADOS PARA ANÁLISE DE MICROORGANISMOS EM ÁGUA E BIOFILMES	49
TABELA 7 – MÉTODOS MOLECULARES PARA ANÁLISE DE MICROORGANISMOS EM BIOFILMES EM SISTEMAS DE ÁGUA.....	51
TABELA 8 – MICROSCOPIAS USADAS NO ESTUDO DE MICROORGANISMOS.EM SISTEMAS DE ÁGUA.....	53
TABELA 9 – FORMAÇÃO DE BIOFILME EM PLACA DE MULTIPOÇOS PARÂMETROS DO TÊSTE	76
TABELA 10 – FORMAÇÃO DE BIOFILME EM REATOR PROPELLA PARÂMETRO DOS TÊSTES	80
TABELA 11 – CORANTES PARA VISUALIZAÇÃO DE BIOFILMES POR MICROSCIPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA.....	81
TABELA 12 – RESULTADOS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA NO PERÍODO DE COLETA.....	84
TABELA 13 – FREQUÊNCIA RELATIVA DE DISTRIBUIÇÃO DOS FUNGOS ISOLADOS DA ÁGUA NOS PONTOS DE AMOSTRAGEM	95
TABELA 14 – FREQUÊNCIA RELATIVA DE DISTRIBUIÇÃO DOS FUNGOS DOS BIOFILMES EM AMOSTRADORES PVC E MF NOS PONTOS DE AMOSTRAGEM.....	99
TABELA 15 – MEIOS DE CULTURA USADOS NO EXPERIMENTO.....	135
TABELA 16 – SOLUÇÕES UTILIZADAS NO EXPERIMENTO.....	136

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANA	Agência Nacional das Águas
BDA	Batata dextrose Agar
CCEN	Centro de Ciências Exatas e da Natureza
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
CTG	Centro de Tecnologia e Geociências
CY	Carbocianina
CYA	Czapek Yeast Extract Agar
CW	Calcofluor White
CZ	Czapek Dox solution Agar
COMPESA	Companhia Pernambucana de Saneamento
COT	Carbono orgânico total
DAPI	Corante com afinidade para ácidos nucleicos
DNA-FISH	Hibridização fluorescente in situ com sonda molecular de ácido desoxirribonucleico
EPS	Substâncias poliméricas extracelulares
EDF	Núcleo de educação física e desporto
ETA	Estação de tratamento de Água
FDA	Diacetato de fluoresceína
FLUOS	Fluororeceína
FUN 1	Corante de viabilidade celular
FUN 1429	Sonda molecular DNA-FISH específica para fungos
DG18	Dicloran Agar 18% de glicerol
HC	Hospital das clínicas
In Situ	Expressão em latim que significa no local
MALD-TOF	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz seguida por detecção do tipo de tempo de voo (TOF – time of flight)
MF	Membrana filtrante
MEA	Agar extrato de malte
MUM	Micotecada Unversidade do Minho
PNA-FISH	Hibridização fluorescente in situ com sonda molecular de ácido nucléico peptídico
PNRH	Política Nacional de Recursos Hídricos
PVC	Policloreto de vinil
RMR	Região Metropolitana de Recife
R2A Agar	Meio de cultura para a contagem em placa de microrganismos heterotróficos em água potável
R2B	Meio de cultura na mesma composição do R2A só que na forma de caldo
RU	Restaurante universitário
SDA	Saboraud dextrose agar
SAA	Sistema de abastecimento de água para consumo humano
SINGREH	Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos
UFC	Unidades formadoras de colônias
UT	Unidade de turbidez
VIGIAGUA	Programa Nacional de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 OBJETIVOS.....	22
1.1.1 Objético geral.....	22
1.1.2.Objetivos específicos.....	22
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	23
2.1 ÁGUA E SUSTENTABILIDADE.....	23
2.2 SISTEMA DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA PRA CONSUMO HUMANO.	27
2.2.1 Componentes de um SAA.....	27
2.2.2 Solução alternativa coletiva de abastecimento de água.....	29
2.2.3 O controle e responsabilidade pela qualidade da água.....	29
2.2.4 Os riscos e vulnerabilidades da água de consumo humano.....	30
2.2.5 O sistema de abastecimento de água da UFPE.....	31
2.2.6 Problemas de reservação da água.....	31
2.3 FUNGOS EM SISTEMAS DE ÁGUA POTÁVEL.....	32
2.4 BIOFILMES EM SISTEMAS DE DISTRIBUIÇÃO DE ÁGUA POTÁVEL	36
2.5 MÉTODOS DE ESTUDO DOS FUNGOS EM ÁGUA E BIOFILMES DE SISTEMAS DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA.....	38
2.5.1 Métodos de amostragens para água e biofilmes em sistemas de distribuição de água.....	39
2.5.2 Aplicação dos métodos de estudo de fungos em água e biofilmes de sistemas de abastecimento de água.....	40
2.5.2.1 Isolamento.....	40
2.5.2.2 Quantificação.....	41
2.5.2.3 Identificação.....	42
2.5.3 Métodos dependentes de cultivo.....	43
2.5.4 Métodos não dependentes de cultivo.....	45
2.5.4.1 Métodos químicos.....	45
2.5.4.2 Métodos de coloração.....	47
2.5.4.3 Métodos espectroscópicos.....	49
2.5.4.4 Métodos moleculares.....	50
2.5.5 Métodos de microscopia.....	53
2.6 DETECÇÃO IN SITU DOS BIOFILMES.....	55
2.6.1 Biofilmes em placas de multipoços.....	56

2.6.2 Biofilmes em reator Propella®	56
2.6.3 Fluorocromos	58
2.7.3.1 FDA.....	58
2.7.3.2 FUN 1	59
2.7.3.3 Calcofluor White (CW)	59
2.7.3.4 DAPI	59
2.7.4 Microscopia de epifluorescência	60
2.7.5 DNA-FISH	61
2.7.5.1 Sondas oligonucleotídicas	61
2.7.5.2 Hibridização fluorescente <i>in situ</i> -FISH	62
2.7.6 PNA-FISH	64
3 MATERIAIS E MÉTODOS	65
3.1 LOCAL DO ESTUDO.....	65
3.2 PONTOS DE COLETA	66
3.3 AMOSTRAS.....	68
3.4 AMOSTRADORES	68
3.4.1 Amostrador de PVC	68
3.4.2 Amostradores MF	69
3.5 COLETA DAS AMOSTRAS	70
3.5.1 Água	70
3.5.2 Biofilmes	70
3.6 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA	71
3.6.1 Cloro livre	71
3.6.2 Temperatura, pH, condutividade, turbidez e oxigênio dissolvido	71
3.6.3 Carbono orgânico total	71
3.7 ANÁLISES MICOLÓGICAS	71
3.7.1 Quantificação dos fungos na água	71
3.7.2 Quantificação dos fungos em biofilmes dos amostradores placas PVC	72
3.7.3 Quantificação dos fungos em biofilmes dos amostradores de filtros de membrana - MF	73
3.7.4 Isolamento dos fungos da água e do biofilmes nos amostradores ..	74
3.7.5 Identificação dos fungos isolados	74
3.7.6 Formação dos biofilmes em laboratório	75

3.7.6.1 Fungos e condições de cultura	75
3.7.6.2 Suspensão de esporos	75
3.7.6.3 Preparação do inóculo	75
3.7.6.4 Formação de biofilme em placa de multipoços.....	76
3.7.6.5 Formação de biofilme em reator Propella	77
3.7.6.6 Parâmetros dos ensaios no reator Propella.....	79
3.7.7 Detecção in situ dos biofilmes	81
3.7.7.1 Fluorocromos	81
3.7.7.2 Sondas moleculares	82
3.7.8 Microscopia de epifluorescência.....	84
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
4.1 RESULTADOS FÍSICO-QUÍMICOS	84
4.1.1 Cloro residual.....	84
4.1.2 Temperatura	86
4.1.3 Potencial hidrogeniônico – ph.....	86
4.1.4 Turbidez.....	87
4.1.5 Condutividade	88
4.1.6 Oxigênio dissolvido.....	88
4.1.7 Carbono orgânico total	88
4.2 QUANTIFICAÇÃO DOS FUNGOS	89
4.2.1 Quantificação dos fungos na água	89
4.2.2 Quantificação dos fungos nos Biofilmes	91
4.2.2.1 Quantificação dos fungos formados em amostradores PVC	91
4.2.2.2 Quantificação dos fungos formados em amostradores MF.....	92
4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS	94
4.3.1 Identificação dos fungos na água	94
4.3.2 Identificação dos fungos nos biofilmes nos amostradores.....	98
4.3.2.1 Identificação dos fungos nos biofilmes nos amostradores PVC	98
4.3.2.2 Identificação dos fungos em biofilmes nos amostradores MF	98
4.5 DETECÇÃO IN SITU DOS FUNGOS NOS BIOFILMES	100
4.5.1 Biofilmes em placa multipoços	101
4.5.1.1 Teste 1	101
4.5.1.2 Teste 2.....	102
4.5.1.3 Teste 3.....	104

4.5.2 Biofilmes em reator propella	106
4.5.2.1. Ensaio 1.....	106
4.5.2.2. Ensaio 2.....	108
4.5.2.3. Ensaio 3.....	109
4.5.2.4. Ensaio 4.....	111
4.5.2.5. Ensaio 5.....	113
4.5.3 Biofilmes nos amostradores placas PVC	114
4.5.3.1 Biofilmes placas pvc ETA e EDF	114
4.5.3.2 Biofilmes amostradores PVC no HC	115
5 CONCLUSÕES	116
REFERÊNCIAS.....	118
ANEXO - MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES	134

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem um enorme potencial hídrico: 12% de toda água doce do planeta, é rico em mananciais superficiais (com vazões médias de 180 mil m³/s), mas a distribuição é desigual, como é o caso do semiárido brasileiro (região onde Pernambuco está localizado) onde a disponibilidade hídrica é inferior a 100 m³/s.

Em Pernambuco mais de 83% das sedes municipais são abastecidas por água proveniente exclusivamente de mananciais superficiais, devido a baixa vocação hidrogeológica do Estado, restando apenas 9% das sedes urbanas abastecidas por águas subterrâneas e 8% por sistemas mistos. A Região Metropolitana de Recife - RMR é formada por 14 municípios dos quais 8 apresentam abastecimento satisfatório e 6 apresentam balanço negativo entre oferta de água e demanda por abastecimento, de acordo com diagnóstico para 2015 (ANA, 2010, 2010b).

O déficit hídrico na RMR leva ao racionamento e intermitência de fornecimento de água. Embora a RMR seja abastecida predominantemente por águas superficiais de vários reservatórios, a oferta de água é complementada através de aquíferos que se estendem por toda a faixa costeira do Estado. Tais aquíferos com características hidrodinâmicas distintas, vinham sendo crescentemente explorados principalmente a partir da década de 90, numa tentativa de remediar a falta de água para a capital de Pernambuco. O uso indiscriminado dos aquíferos desta região tem provocado sérios danos como: rebaixamento do nível do lençol freático; alterações hidroquímicas; contaminação por agentes físico-químicos, ocupação indiscriminada das áreas de recarga, entre outros (BORBA; COSTA FILHO; MASCARENHAS, 2010).

Recife possui os aquíferos, Cabo e Beberibe e Boa Viagem. Em condições de superexploração, os aquíferos costeiros da Planície do Recife apresentam-se vulneráveis à salinização, por diferentes causas (MONTENEGRO; CABRAL; PAIVA, 2009). O Aquífero Boa Viagem localiza-se na região deltaica do conjunto de rios Capibaribe, Beberibe e Tejipió, correspondendo a Cidade Universitária, Caxangá e Várzea (BORBA; COSTA FILHO; MASCARENHAS, 2010). Deste modo o sistema de tratamento de água da UFPE, localizado na Cidade Universitária, utiliza o aquífero Boa Viagem.

Reservar a água tem sido o recurso utilizado, na RMR, para enfrentar o déficit de abastecimento e a intermitência de fornecimento de água, aumentando sua vulnerabilidade com relação à qualidade. Gois et al. (2013) estudaram riscos e vulnerabilidades da utilização da água para consumo humano, oriundas de sistemas públicos e soluções alternativas. Estes autores apontam como críticos: estado de conservação da tubulação da rede, dos reservatórios de distribuição, e intermitência no abastecimento. Todas estas características estão potencialmente presentes no sistema de água em estudo e oferecem risco à qualidade da água.

A qualidade da água produzida é responsabilidade do proprietário da solução alternativa de abastecimento. Uma preocupação com relação à qualidade da água é a sua contaminação por microrganismos patogênicos, pois o consumo de água contaminada causa surtos de doenças de veiculação hídrica, e é responsável por 600000 mortes por ano (WHO, 2014). A avaliação da qualidade microbiológica da água nas legislações da maioria dos países baseia-se na detecção de bactérias indicadoras de contaminação fecal (SAMMON et al., 2010; WINGENDER; FLEMMING, 2011). As condições que propiciam a proliferação de fungos nos sistemas de distribuição não eram investigadas (KELLEY et al., 1997).

Fungos entram nos sistemas de água por diversas vias e podem se estabelecer nos sedimentos, detritos vegetais e biofilmes (HAGESKAL; LIMA; SKAAR, 2009). Outra via de entrada dos fungos se dá durante instalações, reparos ou substituição das canalizações e eventos de baixa pressão ou pressão negativa na rede de distribuição (EPA-US, 2002; BESNER; PRÉVOST; REGLI, 2011; DOUTERELO et al., 2014).

A ocorrência de fungos nos sistemas de água potável tem sido relatada por diversos autores como associada à degradação da qualidade da água, obstrução de canalizações, depleção do desinfetante, riscos à saúde e formação de biofilmes (AL-GABR; ZHENG; YOU, 2014; GONÇALVES; PATERSON; LIMA, 2006a; HAGESKAL et al. 2006, 2009; MA, X. et al., 2015).

Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* despontam como mais abundantes em diversos estudos. Estes gêneros incluem espécies importantes em termos de patogenicidade, potencial alergênico e produção de micotoxina, o que torna a água um possível meio de disseminação desses fungos (AL-GABR; ZHENG; YOU, 2014; SKAAR; HAGESKAL, 2015). Entretanto não há estudos epidemiológicos relacionando a ocorrência de fungos na água à deflagração de

surtos acometendo grupos de consumidores (PATERSON; LIMA, 2005;). Assim esses fungos têm maior importância em sistemas de água de hospitais onde o número de indivíduos imunocomprometidos é crescente (OLIVEIRA, et al., 2013; PATERSON et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2011; SKAAR; HAGESKAL, 2015).

Os fungos ocorrem na água ou formam biofilmes nas superfícies internas no sistema de abastecimento de água causando diversos problemas. Os fungos não são considerados na legislação de potabilidade e sua consideração como contaminante ainda é controversa. Por isso é importante investigar os fungos em sistemas de água potável tanto na água como em biofilmes. A falta de padronização dos métodos de análise e de amostragem, o difícil acesso aos biofilmes nas canalizações são obstáculos ao estudo e detecção *in situ* dos fungos nos sistemas de água. Porém amostradores nos sistemas, placas de multiposços e reatores possibilitam a obtenção de biofilmes. O reator Propella se destaca nesta função por ter várias possibilidades de mimetizar as condições hidráulicas da rede de distribuição para formação de biofilmes, no laboratório.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Investigar os fungos que ocorrem em reservatórios no sistema de água da UFPE, fazendo sua detecção na água e *in situ* nos biofilmes desenvolvidos na rede e em dispositivos no laboratório, como placas de multiposços e no reator Propella, com uso de técnicas de fluorescência, sondas de Hibridização Fluorescente *in situ* – FISH e microscopia de epifluorescência.

1.1.2. Objetivos específicos

- a) Detectar e quantificar os fungos da água por filtração em membrana
- b) Obter biofilmes em amostradores inseridos nos reservatórios de pontos estratégicos do sistema e em reatores no laboratório
- c) Quantificar e detectar fungos nos biofilmes
- d) Identificar por taxonomia clássica os fungos da água e dos biofilmes
- e) Fazer detecção *in situ* dos biofilmes por meio de fluorocromos, sondas moleculares DNA-FISH e PNA-FISH e microscopia de epifluorescência.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ÁGUA E SUSTENTABILIDADE

A água é essencial à vida (vegetal, animal, humana), indispensável ao equilíbrio do planeta, pois é determinante para atmosfera, clima, vegetação, agricultura e cultura; por isso é um direito de todos. O futuro de nosso planeta depende da preservação da água e de seus ciclos. A água não é uma doação gratuita da natureza; ela tem um valor econômico: precisa-se saber que ela é, algumas vezes, rara e dispendiosa e que pode muito bem escassear em qualquer região do mundo (IFRAH, 1992).

Apesar do acesso à água ser um direito humano básico, há uma grande discrepância em todo mundo no acesso das populações a este bem fundamental. Por ser crucial para o desenvolvimento econômico e social a disponibilidade da água reflete os diferentes níveis de desenvolvimento no mundo.

A água está no centro do desenvolvimento sustentável. Ela gera benefícios e serviços como segurança alimentar e energética, saúde humana e ambiental, que contribuem para a redução da pobreza, para o crescimento econômico e para a sustentabilidade ambiental. A água provê as condições para as melhorias no bem-estar social e no crescimento inclusivo, afetando os meios de subsistência de bilhões de pessoas (UNICEF; WHO, 2015).

O modelo de desenvolvimento insustentável e falhas de governança têm afetado a qualidade e disponibilidade dos recursos hídricos. A demanda de água doce continua aumentando. A não ser que o equilíbrio entre demanda e oferta seja restaurado, o mundo deverá enfrentar um déficit global de água cada vez mais grave. O crescimento da população, a urbanização, as políticas de segurança alimentar e energética, e os processos macroeconômicos, tais como a globalização do comércio, as mudanças na dieta e o aumento do consumo afetam fortemente a demanda por água. Um aumento de 55% na demanda hídrica mundial, está previsto para 2050, principalmente nas áreas industrial, energética e uso doméstico. No modelo antigo de uso dos recursos naturais, a falta de gestão e a regulação deficiente, levam a uma retirada excessiva e sem controle da água resultando no abaixamento dos lençóis freáticos. A perturbação dos ecossistemas, devida a intensa urbanização, práticas agrícolas inadequadas, desmatamento e poluição está entre os fatores que ameaçam a capacidade do

meio ambiente de fornecer serviços ecossistêmicos, incluindo o provisionamento de água limpa (UNICEF; WHO, 2015).

A persistência da pobreza, em grande percentagem da população mundial, é causa e sintoma do acesso desigual ao abastecimento de água e serviços de saneamento, do financiamento inadequado, da deficiência de informação sobre o estado, uso e gerenciamento dos recursos hídricos. Dar aos pobres um melhor acesso e gestão da água pode contribuir fortemente para erradicação da pobreza e para o alcance de objetivos de desenvolvimento sustentável (UNESCO, 2003; UNICEF; WHO, 2015).

A solução para este fato está na busca do equilíbrio entre suprimento e demanda de água. Apesar de se ter obtido progresso considerável nesta questão mais recentemente, ainda existem 748 milhões de pessoas sem acesso à água potável de qualidade e os mais afetados são as pessoas de baixa renda, desfavorecidos e mulheres. Ao mesmo tempo, para responder às necessidades da população em constante crescimento, os setores de agricultura e energia precisam continuar a produzir cada vez mais. Até 2050, a agricultura, que consome a maior parte da água, precisará produzir mundialmente 60% a mais de comida, 100% em países em desenvolvimento. Entre 2000 e 2050, o crescimento da demanda de água para indústria é estimado em 400%. Se de um lado estima-se um aumento de 55% na demanda por água, de outro lado 20% das fontes de água subterrânea no mundo estão sendo superexploradas e não há um gerenciamento sustentável dos recursos hídricos (UNICEF; WHO, 2015). Além da pressão exercida pelo crescimento da demanda, o desenvolvimento gera outras pressões sobre os recursos hídricos como irrigação e liberação descontrolada de pesticidas e produtos químicos sobre os cursos de água e como é o caso de 90% das águas residuais nos países em desenvolvimento, e ausência de tratamento de esgoto. As mudanças climáticas aumentam ainda mais a pressão sobre os recursos hídricos com maior variação nas precipitações e aumento nas temperaturas provocando elevação da evapotranspiração vegetal (UNICEF; WHO, 2015).

Vários eventos críticos no mundo e no Brasil nos últimos anos evidenciam a gravidade do problema de acesso à água que afeta mais severamente a população de baixa renda de pequenos municípios e periferias dos grandes centros urbanos. Ofertar água às populações é uma tarefa do poder público e ao

mesmo tempo um grande desafio frente à grande diversidade geoclimática, socioeconômica e distribuição populacional diferenciada. A escassez hídrica de algumas regiões e a adversidade das condições de suprimento de água para populações urbanas brasileiras vêm sendo estudadas há anos sem terem sido resolvidas em definitivo, persistindo frequentes déficits de abastecimento (ANA, 2010).

No Brasil a “lei das águas” como é conhecida, a lei nº 9.433/1997, instituiu Política Nacional de Recursos Hídricos (PNRH) e criou o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos (SINGREH). Nela: 1- a água é considerada um bem de domínio público e um recurso natural limitado, dotado de valor econômico; 2- em situações de escassez, o uso prioritário da água é para o consumo humano e para a dessedentação de animais; 3- assegurar a disponibilidade de água de qualidade às gerações presentes e futuras, o uso racional e integrado dos recursos hídricos, a prevenção e defesa contra eventos hidrológicos (chuvas, secas e enchentes), sejam eles naturais sejam decorrentes do mau uso dos recursos naturais, são os objetivos do PNRH.

O Brasil tem um enorme potencial hídrico: 12% de toda água doce do planeta, 200 mil microbacias espalhadas em 12 regiões hidrográficas, daria um volume per capita 19 vezes maior que o mínimo estabelecido pela Organização das Nações Unidas (ONU) – de 1.700 m³/s por habitante por ano, mas não são inesgotáveis. As características geográficas de cada região e variações climáticas afetam sua distribuição (ANA, 2010). Porém além das águas superficiais, as águas subterrâneas são intensamente exploradas no Brasil. Em Estados do nordeste como Maranhão e Piauí 70% e mais de 80% respectivamente das cidades são abastecidas por poços. A água subterrânea participa do abastecimento de diversas capitais como Fortaleza, Recife, Natal e Maceió e de comunidades rurais no semiárido nordestino. Além disso, é amplamente utilizada na irrigação em Mossoró, no Rio Grande do Norte, no Oeste da Bahia e na região de Irecê (ANA, 2007)

A região nordeste, com quase todos estados (exceto Maranhão) localizados no semiárido brasileiro, representa 20% da população brasileira, 56% concentrada em áreas urbanas. O clima semiárido tem como característica reservas insuficientes de água, precipitação pluviométrica baixa e irregular, resultando em balanço hídrico negativo. Em consequência seus mananciais não

oferecem garantia de água para diversos usos, em particular para abastecimento humano (ANA, 2010 a) .

Em Pernambuco, que tem a maior parte de seu território no semiárido, dos 185 municípios, 153 utilizam águas superficiais, 17 utilizam águas subterrâneas e 14 utilizam mananciais mistos (ANA, 2009, 2013).

Os mananciais superficiais não vêm atendendo a demanda de abastecimento humano, da região metropolitana de Recife – RMR, que convive com um racionamento mesmo nas áreas regularmente abastecidas (10 % da população não são atendidas com abastecimento público). Nos anos 90 a empresa concessionária, a Companhia de Saneamento de Pernambuco (COMPESA), responsável pelos serviços de abastecimento público, chegou a utilizar na região norte da RMR, mais poços tubulares perfurados no Aquífero Beberibe, do que mananciais de superfície (BORBA; COSTA FILHO; MASCARENHAS, 2010). Na RMR nas cidades de Recife, Olinda e Jaboatão dos Guararapes, existiam 10.000 poços capitando águas dos aquíferos Beberibe, Cabo e Boa Viagem, em 2010. Somente no Recife estimava-se mais de 6.000 poços em operação (Costa Filho, W.D.; Borba, A.L.S. & Mascarenhas, J.C., 2010)

O sistema aquífero da Planície do Recife (PE) é composto por dois aquíferos profundos, Cabo e Beberibe, de características semi-confinadas, recobertos por um aquífero freático, o de Boa Viagem. Em condições de superexploração, os aquíferos costeiros da Planície do Recife apresentam-se vulneráveis à degradação por salinização, por diferentes causas (MONTENEGRO; CABRAL; PAIVA, 2009). Um manancial subterrâneo tem uma íntima relação com o a geologia, com o clima e com as atividades antrópicas em sua área de influência. Assim, é importante abordar algumas características da composição físico/química deste tipo de manancial que influenciam na qualidade da água e na ocorrência dos fungos nos sistemas e nas águas de abastecimento.

O aquífero Boa Viagem localiza-se na região deltaica do conjunto de rios Capibaribe, Beberibe e Tejipló, formando a atual planície do Recife. Ocorre encoberto outros aquíferos mais antigos, o Beberibe ao norte e o Cabo ao sul, ou diretamente sobre o embasamento cristalino, na região mais oriental do Recife, correspondendo a Cidade Universitária, Caxangá e Várzea (BORBA; COSTA FILHO; MASCARENHAS, 2010). Deste modo o sistema de tratamento de água da UFPE, localizado na Cidade Universitária, utiliza o aquífero Boa Viagem.

Reservar a água tem sido o recurso utilizado para enfrentar o déficit de abastecimento e a intermitência de fornecimento de água, o que aumenta sua vulnerabilidade com relação à qualidade.

2.2 SISTEMA DE ABASTECIMENTO DE PARA ÁGUA DE CONSUMO HUMANO

A água de consumo humano é definida pela Portaria 2914/2011 como toda água potável destinada à ingestão, preparação e produção de alimentos e à higiene pessoal, independentemente da sua origem (BRASIL, 2011). O fornecimento de água de consumo humano em quantidade suficiente e de qualidade é uma atribuição do poder público.

Por definição um sistema de abastecimento de água para consumo humano, SAA - é uma instalação composta por um conjunto de obras civis, materiais e equipamentos, desde a zona de captação até as ligações prediais, destinada à produção e ao fornecimento coletivo de água potável, por meio de rede de distribuição (BRASIL, 2011).

De acordo com a citada norma, água potável é aquela que atende ao padrão de potabilidade (conjunto de parâmetros físicos, químicos, biológicos, com valores máximos permitidos) que ela estabelece e que não oferece risco à saúde.

Um sistema de abastecimento de água se compõe de uma estrutura física que é concebida e construída para transformar a água *in natura*, em água potável por meio de um processo de tratamento.

2.2.1 Componentes de um SAA

A estrutura de um SSA é formada por manancial (superficial ou subterrâneo), captação, adutoras, estação de tratamento de água (ETA), reservatório e rede de distribuição da água produzida.

- a) O manancial é a fonte de água que é usada para abastecimento humano, podendo ser superficial, subterrânea ou de chuva (BRASIL, MS, 2006). A captação é a primeira unidade do SAA, constituída por um conjunto de equipamentos e instalações utilizadas para tomada de água do manancial, com a finalidade de leva-la até o sistema de abastecimento (BRASIL, MS, 2006).

- b) Adutoras são tubulações e peças que interconectadas conduzem água da captação até a ETA, desta até o reservatório de distribuição, e deste para rede de distribuição.
- c) A estação de tratamento de Água – ETA – é a parte do sistema de abastecimento, com vários módulos construídos, equipamentos e produtos para realizar o processo de tratamento da água e torná-la potável.
- d) Reservatório é uma caixa grande, geralmente construída de concreto para armazenar a água produzida pela ETA. É o elemento do sistema de abastecimento de água destinado a regularizar as variações entre as vazões de adução e de distribuição e condicionar as pressões na rede de distribuição.
- e) A rede de distribuição é formada por um conjunto de tubulações que levam água tratada até a casa do consumidor.
- f) Os reservatórios e a rede de distribuição são unidades estratégicas para a garantia da adequada qualidade da água. De nada adiantam os cuidados tomados na captação, adução e tratamento – se atenção especial não for dispensada aos reservatórios e à rede de distribuição para que eles não constituam pontos de contaminação e de perda de água (BRASIL, MS, 2006).

O tratamento da água num SAA é feito por meio de processos físicos, químicos, ou combinação de ambos, para purificar a água bruta captada do manancial e transformá-la em água potável, seguindo critérios de qualidade especificados na legislação - Portaria 2914/2011 (BRASIL, MS, 2011).

Os SAA objetivam não só propiciar o conforto às populações e prover parte da infraestrutura das cidades, mas buscam prioritariamente superar os riscos à saúde impostos pela água. Para este fim é essencial que os SAA cumpram com eficiência todas as suas fases: a concepção, o projeto, a implantação, a operação e a manutenção. O êxito desta tarefa requer: 1- escolha de mananciais livres de contaminantes naturais, protegidos contra a contaminação química ou biológica provocada pelas atividades antrópicas; 2- concepção de tratamento e projeto apropriados; e, 3- operação adequada do tratamento. Faz-se necessário controle em todas as unidades do sistema: captação, estações elevatórias, adutoras,

reservatórios e rede de distribuição. Essas unidades são cruciais para assegurar a qualidade da água e, portanto, devem ser encaradas com a visão de saúde pública (BRASIL, MS 2006a).

2.2.2 Solução alternativa coletiva de abastecimento de água para consumo humano

Uma solução alternativa coletiva de abastecimento de água é uma modalidade de abastecimento coletivo destinado a fornecer água potável, com captação subterrânea ou superficial, com ou sem canalização e rede de distribuição (BRASIL, MS, 2011).

O SAA da Universidade Federal de Pernambuco é um exemplo de sistema alternativo que utiliza mananciais subterrâneos, possui uma estação de tratamento e rede de distribuição para todo campus universitário.

2.2.3 O controle e responsabilidade pela qu

alidade da água potável

Para o atendimento da norma de potabilidade é necessário a escolha e proteção do manancial, um sistema bem projetado e operado segundo as boas práticas de operação, e também o controle operacional da ETA- com avaliação sistemática da eficiência do tratamento e da água distribuída. Esse controle é feito através de monitoramento da qualidade da água em cada etapa do processo de tratamento e da rede de distribuição (tubulações e reservatórios). O controle da qualidade da água envolve coleta sistemática de amostras da água em pontos representativos e se dá por meio de análises laboratoriais dos parâmetros estabelecidos na norma de potabilidade (BRASIL, MS, 2006).

Segundo a Portaria 2914/2011 cabe ao responsável pelo sistema, ou solução alternativa coletiva, de abastecimento de água para consumo humano:

- a) Realizar o controle da qualidade da água;
- b) Garantir a operação e a manutenção das instalações destinadas ao abastecimento de água potável;
- c) Manter e controlar a qualidade da água produzida e distribuída, nos termos da Portaria.

Compete ao poder público promover e acompanhar a vigilância da qualidade da água para consumo humano e, estabelecer ações especificadas no Programa Nacional de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano (VIGIAGUA). No âmbito da união através do Ministério da Saúde e das entidades a ele vinculadas, no âmbito dos estados e municípios, através das respectivas secretarias de saúde (BRASIL, MS, 2011).

2.2.4 Os riscos e vulnerabilidades da água de consumo humano

A poluição e a ausência ou precariedade dos serviços públicos de saneamento básico, ainda hoje são responsáveis pela morte ou enfermidades de parcela da população e constituem riscos à saúde. Estes riscos incluem consumo de água contaminada, manejo inadequado dos esgotos sanitários e resíduos urbanos, que funcionam como reservatório e agentes de disseminação de diversas doenças. No tocante a água de consumo humano, além das vias de exposição reconhecidas pelo MS como ingestão da água contaminada, pouca quantidade de água disponível para higiene satisfatória, e a disposição inadequada no ambiente, propiciando criadouros de vetores de doenças, as formas de abastecimento também constituem riscos à saúde. Formas de abastecimento como poços, fontes públicas, minadouros, chafarizes, cisternas, rios, lagoas, carro transportador (caminhão pipa), etc. associadas a condutas negligentes e tecnologias inadequadas podem fazer com que a água se torne uma via propagadora de doenças para população. NA Tabela 1, numa avaliação feita por Gois et al. (2013) entre dos riscos e vulnerabilidades da utilização da água para consumo humano, oriundas de sistemas públicos e soluções alternativas, classificadas de 0 a 100 destacam-se como riscos críticos:

Tabela 1 - Vulnerabilidades da utilização da água de consumo

Fator de vulnerabilidade	% confirmação
Estado de conservação da tubulação utilizada na malha de distribuição	100
Estado de conservação dos reservatórios de distribuição	95
Intermitência no abastecimento	93
Existência de ligações cruzadas	87

Fonte: Gois et al., 2013.

2.2.5 O sistema de abastecimento de água da UFPE

A cidade de Recife tem historicamente enfrentado problemas de abastecimento de água, com racionamentos e intermitência no fornecimento. Deste modo, os mananciais subterrâneos têm sido utilizados de forma complementar ao abastecimento público (COMPESA, 2014), ou de forma exclusiva em soluções alternativas de abastecimento, como é o caso da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, que tem seu próprio sistema de abastecimento utilizando água subterrânea. A solução alternativa coletiva de abastecimento de água para consumo humano da UFPE capta água subterrânea tem uma estação de tratamento de água que emprega aeração, decantação e desinfecção como processo de tratamento. A ETA tem um reservatório apoiado que distribui para outro reservatório elevado e deste a água segue para os reservatórios dos centros no campus.

2.2.6 Problemas de reservação da água

Reservatórios de água tratada apresentam características como ausência de luz, longo tempo de detenção e zonas de estagnação que facilitam a proliferação de microrganismos e formação de biofilmes. Tanto reservatórios cobertos como descobertos constituem possibilidades de entrada de contaminação microbiana para rede de distribuição e sua instalação em biofilmes. Reservatórios de água tratada, tanques de retenção e outras instalações construídas para os sistemas de águas superficiais ou subterrâneas sob a influência direta das águas superficiais, devem ser cobertos. Quando mal protegidos os reservatórios de água tratada podem servir de entrada para contaminação microbiana no sistema de distribuição. Até pelas entradas de ar a contaminação pode entrar à medida que a água sai e o ar entra preenchendo o espaço antes ocupado pela água. A contaminação será disseminada quando a água armazenada for distribuída ao consumidor final. Uma contaminação introduzida através de pontos anteriores do sistema de distribuição pode ser amplificada durante o armazenamento (por exemplo, o crescimento de biofilme). Reservatórios de água tratada podem acumular sedimentos, aumentando a

capacidade de micróbios para proliferarem durante o armazenamento (EPA-US, 2002).

O cuidado adequado com os reservatórios é uma estratégia para manutenção da qualidade da água e proteção da saúde da população consumidora. A adoção de ações preventivas como lavagem e desinfecção periódica das câmaras de reservação de água, principalmente após os serviços de construção ou de reparos. Os reservatórios devem ser dotados de ventilação adequada e protegidos contra entrada de insetos e roedores e da ação de vândalos que possam comprometer a qualidade da água (BRASIL, MS, 2006)

2.3 FUNGOS EM SISTEMAS DE ÁGUA POTÁVEL

Os fungos são bem conhecidos por serem ubíquos e adaptados aos mais diferentes habitats, podendo ser encontrados no solo, no ar, na água e ambientes extremos, apresentando hábitos diferenciados que vão de micropredadores, patógenos, simbiontes a sapróbios (WEBSTER; WEBER 2007). Os fungos típicos dos ambientes aquáticos são zoospóricos pertencem ao filo Chytridiomycota (segundo classificação de KIRK et al., 2008), porém fungos de outros filos presentes no solo, ar, matéria orgânica, podem entrar nos sistemas de água por diversas vias, e embora este seja um ambiente considerado não natural para eles, podem se estabelecer nos sedimentos, detritos vegetais e biofilmes (PATERSON; LIMA, 2005; HAGESKAL; LIMA; SKAAR, 2009). A precipitação, escoamento superficial, drenagem, descarga do lençol freático, assim como características climáticas e geológicas influenciam a dispersão dos esporos sobre os corpos de água. Pode-se esperar que ao percorrer esses caminhos as águas arrastem representantes de diferentes filos para os corpos hídricos, incluindo as águas subterrâneas. Além disto, deve-se levar em conta a contribuição dos esporos do ar, carregados pelos ventos (TAYLOR, 2003). As águas subterrâneas são amplamente usadas no Brasil e no mundo para suprir (de forma exclusiva ou complementar) os sistemas de abastecimento (KRAUSS; GRIEBLER, 2011; UNESCO, 2005). Nos processos de tratamento as águas são geralmente submetidas à desinfecção (CLARKE; KING, 2004). Entre os diferentes desinfetantes aplicados nos processos de tratamento o cloro é o mais comumente usado (MORATÓ et al., 2003). Os fungos ocorrem nas águas de consumo

porque são menos susceptíveis à desinfecção pelo cloro do que as bactérias, e assim conseguem sobreviver nos sistemas de distribuição, planctônicos na água, participando dos biofilmes nas superfícies das canalizações ou nos sedimentos, particularmente onde as temperaturas são mais quentes ou onde a água fica com fluxo é restrito (KINSEY; PATERSON; KELLEY, 2003). Outra via de entrada dos fungos se dá durante instalações, reparos ou substituição das canalizações e eventos de baixa pressão ou pressão negativa na rede de distribuição (EPA-US, 2002; HAGESKAL et al., 2006; BESNER; PRÉVOST; REGLI, 2011; DOUTERELO et al., 2014).

Nas últimas décadas vários estudos vêm dando contribuições significativas, ao conhecimento da ocorrência de fungos em sistemas de abastecimento de água de consumo humano, sejam superficiais, subterrâneas ou outros tipos, conforme Tabela 2.

Tabela 2 - Pesquisas de fungos em água de consumo humano.

Autores/ano	País/local	Tipo de Água	Método	Fungos mais abundantes
Kinsey et al., 1999	Reino Unido	Superficial e rede de distribuição	Filtração em membrana	<i>Aspergillus</i> e <i>Cladosporium</i>
Arvanitidou et al., 1999	Grécia Thessaloniki	Sistema municipal Centros de hemodiálise	Filtração em membrana	<i>Aspergillus</i> e <i>Penicillium</i>
Doggett, 2000	Springfields EUA	Água subterrânea	Plaqueamento direto	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Mucor racemosus</i> e <i>Stysamus stemonites</i>
Göttlich et al., 2002	Alemanha	Potável	Plaqueamento ou incorporação	<i>Acremonium</i> , <i>Exophiala</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Phialophora</i>
Gonçalves et al., 2006a	Portugal-Braga	Torneira	Filtração em membrana	<i>Penicillium</i> e <i>Acremonium</i>
Grabinska-Loniewska et al., 2007	Varsóvia, Polônia	Municipal	Filtração em membrana	<i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i>
Yamaguchi et al., 2007	Maringá Brasil	Mineral engarrafada e municipal	Filtração em membrana	<i>C. parapsilosis</i> , <i>C. glabrata</i> e <i>C. albicans</i> .
Hageskal et al., 2006, 2007	Noruega	Potável (superficial e subterrânea)	Filtração em membrana	<i>Penicillium</i> , <i>Trichoderma</i> e <i>Aspergillus</i>

Cont. Tabela 2

Autores/ano	País/local	Tipo de Água	Método	Fungos mais abundantes
Nazim et al., 2008	Parquistão-Karachi	Água e suco de fruta	Plaqueament o direto	<i>Aspergillus niger</i> e <i>A. clavatus</i>
Sammon et al., 2010	Austrália	Municipal	Filtração em membrana	<i>Cladosporium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> e <i>Fusarium</i>
Oliveira, 2010	Brasil- Recife	Superficial estação de tratamento, e rede de distribuição	Filtração em membrana	<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> e <i>Phoma</i>
Pontara et al., 2011	Brasil	Água mineral	Filtração em membrana	<i>Penicillium</i> e <i>Cladosporium</i>
Pereira et al., 2009, 2010	Portugal-Lisboa	Superficial, nascentesub terrânea	Filtração em membrana	<i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> e <i>Penicillium</i>
Oliveira et al., 2013	Portugal	Superficial, nascentesub terrânea	Filtração em membrana	<i>Aureobasidium</i> , <i>Trichoderma</i> e <i>Aspergillus</i>
Gashgari et al., 2012	Arabia Saudita	Estação de tratamento e torneira	Filtração em membrana	<i>Trichoderma viride</i> , <i>P. montanense</i> , <i>A. alternata</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>A. strictum</i> , <i>C. herbarum</i>
Samah et al., 2014	Egito	Subterrânea	Plaqueament o por espalhamento	<i>A. flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>P. egyptiacum</i> , <i>P. varioti</i> , <i>A. terreus</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>P. notatum</i> , <i>F. oxysporum</i>
Babic et al., 2016	Eslovênia	Torneira e subterrânea	Filtração em membrana	<i>A. melanogenum</i> , <i>E. dermatitidis</i> , <i>E. phaeomuriformis</i> , <i>Exophiala lecanii-corni</i> , <i>Rhinochadiella similis</i> , <i>R. mucilaginoso</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>Meyerozyma guillemondii</i> , <i>F. dimerum</i>

Fonte: Adaptado de Siqueira et al., 2011.

Diversos autores têm relacionado a ocorrência de fungos nos sistemas de água potável com degradação da qualidade da água, obstrução de canalizações, diminuição do desinfetante residual e formação de biofilmes. Fungos potencialmente patogênicos, alergênicos e produtores de micotoxinas podem constituir riscos à saúde (AL-GABR; ZHENG; YOU, 2014; DOGGETT, 2000; GONÇALVES et al., 2006a; PATERSON; LIMA, 2005; HAGESKAL et al. 2006;

2009; MA, et al., 2015; SKAAR; HAGESKAL, 2015). Nas pesquisas de fungos em água apresentadas na tabela 2, 98% apresentaram os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* como mais abundantes. Estes gêneros incluem espécies de maior importância em termos de patogenicidade, potencial alergênico e produção de micotoxinas, e sua ocorrência em abundância, torna a água um possível meio de disseminação desses fungos (AL-GABR; ZHENG; YOU, 2014; SKAAR; HAGESKAL, 2015). Entretanto, não há relatos nos trabalhos dos autores anteriormente citados, de surtos micóticos de grandes proporções acometendo consumidores da água. Outra razão para os fungos não terem sido mais completamente examinados é que não há nenhum envenenamento afetando rapidamente de seres humanos (ou outros animais) associados à presença deles na água (PATERSON; LIMA, 2005).

Estudos em sistemas de hospitais revelaram ampla diversidade de fungos na água incluindo os potencialmente patogênicos. O nível de *Fusarium* e *Aspergillus* mostrou-se aumentado nos cômodos do hospital, após uso repetido dos chuveiros. A hipótese é de que os fungos são aerossolizados, durante a passagem da água pelas torneiras, chuveiros etc. (ARVANITIDOU et al. 2000; WARRIS et al. 2001; WARRIS; ABRAHAMSEM; VERWIJE, 2002; ANAISSE et al., 2001, 2002; KANZLER et al., 2008). Desta forma a presença de fungos potencialmente patogênicos e alergênicos na água é motivo de preocupação nos hospitais e instituições de saúde, onde é crescente o número de indivíduos imunocomprometidos que são mais susceptíveis às infecções fúngicas (PATERSON et al., 2009; HAGESKAL; LIMA; SKAAR, 2009; SIQUEIRA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013; SKAAR; HAGESKAL, 2015).

A devida consideração sobre a ocorrência dos fungos na água é um processo em construção. Apesar da Organização Mundial da Saúde (WHO) afirmar que uma infecção pode ocorrer por ingestão da água contaminada, inalação de aerossóis contendo patógenos ou contato com a pele, membrana mucosa, olhos e ouvidos (WHO, 2006), os fungos tem ficado de fora da legislação das águas de consumo humano no Brasil e na maioria dos países, com exceção da Suécia. Em geral as normas reguladoras da qualidade da água de consumo humano nos países são baseadas no uso de bactérias de origem fecal como indicadores do risco da presença de bactérias patogênicas e protozoários intestinais, como *Giardia* e *Cryptosporidium* (SAMMON et al. 2010).

Antes de se fechar qualquer conclusão quanto a questões de segurança sanitária da ocorrência dos fungos nos suprimentos de água de consumo ou da necessidade de incluir certas espécies em futuras normalizações, relativas à água tratada ou não tratada, mais estudos são necessários para avaliar a diversidade de fungos no ambiente aquático, tanto quanto os benefícios e obstáculos que podem ser associados à presença deles na água (OLIVEIRA, 2013).

2.4 BIOFILMES EM SISTEMAS DE DISTRIBUIÇÃO DE ÁGUA POTÁVEL

O sistema de distribuição de água é composto de rede de canalizações e infraestrutura que transportam água potável da saída do tratamento ao consumidor, tem papel importante para o fornecimento de água segura sob o ponto de vista sanitário (FISH; OSBORN; BOXALL, 2016).

Organismos vivos e nutrientes podem entrar no sistema de distribuição de água por diversas vias. As matérias, orgânica e inorgânica, contidas na água quando se acumulam na superfície da tubulação, constituem depósitos cuja formação resulta de complexas interações entre os componentes químicos e microbiológicos da água com as condições vigentes no sistema de distribuição. Tais depósitos podem ser usados pelos microrganismos que sobrevivem ao tratamento (ZACHEUS, et al., 2001)

Uma superfície sólida em contato com a água, condição típica das canalizações nos sistemas de distribuição, é ideal para colonização microbiana e formação de biofilmes, causando uma série de problemas para as companhias de água como deterioração da qualidade da água, obstrução, biocorrosão, perda do residual desinfetante, significando perdas econômicas e risco à saúde (HAGESKAL et al., 2009; KERR et al., 2003, PATERSON; LIMA, 2005; 2009; SIQUEIRA et al, 2013).

Existem inúmeras definições de biofilmes que compartilham algumas afirmações:

- a) É um conjunto complexo de microrganismos e materiais (orgânicos e inorgânicos) aderidos numa superfície, embebido numa matriz composta por substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que eles produzem (EPA-US, 2002);

- b) Esta comunidade microbiana inclui bactéria (geralmente dominante), fungos filamentosos, leveduras, vírus, algas, protozoários, invertebrados etc (GONÇALVES et al., 2006 ; SIMÕES ; SIMÕES; LIMA, 2015);
- c) O modo de vida em biofilmes fornece proteção contra compostos tóxicos, dessecação, estresse térmico, depleção de nutrientes, cisalhamento e predação (FLEMMING; PERCIVAL; WALKER, 2002; SIMÕES ; SIMÕES. 2013; SIQUERA et al, 2013;).

Além disso, as estruturas dos biofilmes conseguem benefícios ecológicos como estabilidade, sinergismo, comunicação intercelular, digestão externa e transferência horizontal de genes. Isto faz com que o biofilme se comporte de forma organizada como se fosse um organismo multicelular (DONLAN; COSTERTON, 2002; FLEMMING; PERCIVAL; WALKER, 2002; KERR et al 2003; WINGENDER; FLEMMING, 2011). Para formação dos biofilmes os fatores predisponentes são temperatura, disponibilidade de nutrientes, deficiência de residual desinfetante, regime hidráulico e característica do substrato (WHO, 2014; KERR, et al. 2003). É bem conhecido o fato de que os microrganismos estão amplamente presentes nos sistemas de tratamento de água (EPA-US, 2002; GONÇALVES et al., 2006; PATERSON; LIMA, 2005; SIMÕES; SIMÕES, 2013; WINGENDER; FLEMING, 2011). A maioria dos microrganismos está aderida às superfícies dentro de biofilmes ou em depósitos nas canalizações, enquanto que as células planctônicas estão em minoria nos sistemas de distribuição de água (FLEMMING; PERCIVAL; WALKER, 2002; ZACHEUS, et al., 2001). Nas paredes destes sistemas representados por reservatórios, tubulações e módulos do tratamento, os biofilmes podem crescer a abrigar patógenos oportunistas/emergentes, incluindo fungos (HAGESKAL et al. 2009; SIQUEIRA et al., 2013). Deste modo os biofilmes nos sistemas de distribuição de água atuam como reservatórios de patógenos e fonte de contaminação, podendo afetar a densidade de células na massa de água.

Além dos aspectos de higiene, saúde e de qualidade da água os biofilmes causam problemas estéticos e operacionais nos sistemas de água. Assim, para garantir a qualidade da água, as empresas enfrentam uma difícil tarefa: impedir a formação de biofilmes e resultantes perdas da qualidade da água, uma vez que é

quase impossível eliminá-los destes sistemas (SIQUEIRA, 2013; SIMÕES; SIMÕES, 2013). Por isso a importância de estudos dos biofilmes e suas comunidades nos sistemas de distribuição de água.

2.5 MÉTODOS DE ESTUDO DOS FUNGOS EM ÁGUA E BIOFILMES DE SISTEMAS DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA

A pesquisa de fungos (ou outros microrganismos) em sistemas de água potável é um desafio considerando a complexidade estrutural e operacional da rede de distribuição com suas variáveis hidráulicas, tipos de materiais de que são constituídos, presença de desinfetantes, composição físico-química e microbiológica da água, interagindo entre si e com fatores ambientais dentro do sistema. Muitos métodos desenvolvidos para estudar a comunidade microbiana (planctônica e em biofilmes), na rede de distribuição de água pouco consideram outros microrganismos (protozoários, fungos, archaea, vírus) taxonomicamente diversos das bactérias que são as mais estudadas e identificadas (FISH; OSBORN; BOXALL, 2016). Inúmeros métodos destinados para estudar ecologia microbiana, (DOUTERELLO et AL., 2014), caracterização e quantificação de biofilmes (CAMPER et AL., 1999; DENKHAUS et AL., 2007; GOMES; SIMÕES; SIMÕES; 2014; STERNBERG; BJARNSHOLT; SHIRTLIFF; 2014) são utilizados ou são aplicáveis para pesquisa de fungos em sistemas de abastecimento de água.

A falta de padronização internacional dos métodos nos estudos de fungos na água e nos biofilmes tem sido um impedimento para comparação direta dos resultados (HAGESKAL; LIMA; SKAAR, 2009; PATERSON; LIMA, 2005;). Dependendo objetivo do pesquisador, o foco pode estar nos microrganismos planctônicos (HAGESKAL et al., 2006) ou nos aderidos em superfícies/partículas formando biofilmes (GRAIBŃSKA-LONIEWSKA, et al., 2007; PARIS; SKALI-LAMI; BLOCK, 2009). Por se tratar de assunto interdisciplinar, diferentes abordagens nas pesquisas de biofilmes, podem ser usadas: microbiologia, microscopia, biologia molecular, bio/química e física, dependendo da área de interesse do pesquisador (SIQUEIRA et al., 2015). Isto implica na escolha de um procedimento de amostragem que seja representativo e adequado para a metodologia de análise a ser empregada.

2.5.1 Métodos de amostragens para água e biofilmes em sistemas de distribuição de água

A amostragem é uma etapa chave em qualquer investigação microbiológica e precisa ser representativa. Para coleta de amostras de água existem métodos padronizados disponibilizados por várias instituições internacionais como Organização Mundial de Saúde (WHO), Agência de Proteção Ambiental americana (EPA-US), entre outros. No Brasil, a Agência Nacional de Águas (ANA) e a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) publicaram o Guia Nacional de Coleta e Preservação de Amostras - água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos em 2011, com métodos padronizados de coleta água em diversas modalidades incluindo sistemas de distribuição de água (ANA, 2011). Apesar da importância dos métodos padronizados acima citados para o monitoramento da qualidade da água, eles não oferecem qualquer protocolo para análises baseadas em biologia molecular (DNA/RNA), proteômica ou metabolômica, não há padronização do volume mínimo representativo do microbioma total existente na rede de distribuição de água potável (DOUTERELO et al., 2014)

No que se refere ao estudo dos biofilmes nas redes de distribuição, a dificuldade de amostragem é a principal limitação, já que os biofilmes não podem ser facilmente acessados dentro das tubulações dos sistemas de água, ficando difícil realizar análises *in situ* preservando as condições hidrodinâmicas da rede (DOUTERELO et al., 2014; GOMES; SIMÕES; SIMÕES, 2014; SIMÕES; SIMÕES; LIMA, 2015; SIQUEIRA et al., 2011). A amostragem de biofilme em geral requer extração da biomassa, por fricção com um swab, escovação ou raspagem da superfície com um bisturi (DOGGET, 2000; FISH et al., 2015), porém o uso de força mecânica para remover os biofilmes dos substratos, destrói sua estrutura. Outra opção de amostragem de biofilme é recortar segmentos das tubulações da rede de distribuição (WINGENDER; FLEMMING, 2004), mas é trabalhosa, cara, destrutiva, envolve escavação e risco de contaminação (DOUTERELO et al., 2014).

As dificuldades de acesso aos biofilmes e de repetições no experimento, dentro das tubulações, podem ser contornadas por sistemas em escala piloto no laboratório, que tentam simular as condições do sistema de distribuição de água.

Geralmente são reatores para uso em bancada no laboratório, desenvolvidos para estudar os biofilmes independentemente da rede de distribuição, os quais permitem testar *in situ*, diferentes condições de alimentação, materiais e fatores abióticos que influenciam a formação dos biofilmes (DOUTERELO et al., 2014; SIMÕES; SIMÕES; LIMA, 2015;). Uma importante revisão sobre reatores para estudo de biofilmes em sistemas de abastecimento de água encontra-se em Gomes; Simões; Simões, (2014).

Uma alternativa é construir dispositivos para serem introduzidos nas tubulações da rede, de modo que os biofilmes se desenvolvam nestes substratos e depois sejam retirados e levados adequadamente ao laboratório para análise. Uma limitação desses dispositivos é causar alterações nas condições hidráulicas, forças de cisalhamento e turbulência, que influenciam na formação dos biofilmes. Os dispositivos que podem ser inseridos, retirados e substituídos, destinados a servir de suporte para crescimento dos biofilmes são denominados genericamente de coupons, que tanto podem ser inseridos nos canos da rede de distribuição como podem ser parte integrante dos reatores (DOUTERELO et al., 2014).

Nas diferentes pesquisas, os objetivos mais frequentes são: quantificação, isolamento e identificação dos fungos na água e em biofilmes, assim como composição da matriz de exopolissacarídeos, cinética de formação, arquitetura do biofilme, caracterização da comunidade, distribuição e diversidade de fungos, e entre outros.

2.5.2 Aplicação dos métodos de estudo de fungos em água e biofilmes de sistema de abastecimento de água

2.5.2.1 - Isolamento

Para o isolamento é necessário apreender os fungos presentes na água ou nos biofilmes por meio da captura ou concentração dos seus propágulos para fazer sua observação ou detecção. A concentração pode ser feita por centrifugação, por filtração em membrana, iscas (fungos zoospóricos), etc. Os fungos concentrados podem ser observados diretamente por microscopia ou podem ser cultivados em laboratório até formarem colônias que podem ser vistas e posteriormente contadas, identificadas e os fungos enumerados ou ainda serem

submetidas a alguma análise como extração de DNA, testes enzimáticos ou aplicação biotecnológica etc. (HAGESKAL; LIMA; SKAAR, 2009; KINSEY; PATERSON; KELLEY, 1999; SKAAR, HAGESKAL, 2015).

Em amostras de biofilmes o isolamento pode ser feito pelas mesmas técnicas anteriormente apresentadas pra água e na sequência pode-se efetuar qualquer um dos métodos tradicionais cultivo dependentes (DOGGETT, 2000; HURTADO-MCCORMICK et al., 2016), ou outros métodos (FISH et al., 2015) que serão vistos adiante.

Os tipos e a quantidade de fungos isolados variam de acordo com a metodologia escolhida, com o tipo de meio de cultura, parâmetros de cultivo, resultando na recuperação de diferentes gêneros e espécies e sempre haverá alguma espécie não detectada (HAGESKAL; LIMA; SKAAR; 2009; SKAAR, HAGESKAL, 2015).

2.5.2.2– Quantificação

Na ausência de método padrão internacional, vários procedimentos de quantificação são empregados por diferentes autores. Tradicionalmente a quantificação dos fungos na água e biofilmes é feita pelo cultivo e pela contagem das colônias em placas de Agar e expressa em termos de unidades formadoras de colônias-UFC por volume de amostra (HAGESKAL; LIMA; SKAAR; 2009). A quantificação pode ser feita por plaqueamento em profundidade (pour plate) onde um volume de 1 mL da amostra é incorporado ao meio fundido, em placa, a 40-45°C (HUSSAIN et al., 2011) ou por plaqueamento em superfície (spread plate) onde são espalhados de 0,1 a 1,0 mL de amostra sobre a superfície de uma placa contendo meio específico (GÖTTLICH, 2002; PEREIRA et al., 2010; SAMAH; SHIMAA; AI-WASIFY, 2014). O método de filtração em membrana, o mais comumente utilizado, é uma das técnicas preconizadas no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater para detecção e quantificação de fungos em água e foi empregado no presente trabalho. Cada colônia é considerada uma unidade formadora de colônia – UFC, que pode ser proveniente de um, dois ou mais esporos agrupados ou ainda um propágulo. Devido à natureza dos fungos filamentosos é difícil estabelecer o que pode ser considerado

um indivíduo: se um conídio, um conidióforo ou um fragmento de hifa. Em consequência os métodos citados de quantificação não fornecem um número preciso e detectam apenas uma fração dos fungos (nem todos os fungos são cultiváveis nas condições do teste), mas podem dar uma indicação da densidade de fungos presentes na água (PATERSON; LIMA, 2005; HAGESKAL; LIMA; SKAAR; 2009; DOUTERELO et al., 2014). A quantificação por filtração em membrana é mais vantajoso porque permite filtrar volumes maiores (de 10 mL a 1L) que os utilizados nos plaqueamentos (0,1 a 1 mL) (AL-GABR; ZHENG; YU, 2014).

Para fungos em biofilmes, não existe um método rápido, confiável e padronizado, de quantificação. As diferenças entre os métodos utilizados resultam em diferentes limites de detecção e no percentual de recuperação dos fungos. Entretanto, a quantificação é útil para fornecer uma indicação do nível de contaminação da amostra (PATERSON; LIMA, 2009). Um procedimento comumente usado para quantificação é, raspar o biofilme (e os organismos a ele associados) do substrato, dispersar o material (vortex/sonicação), ressuspender as células, plaquear sobre um meio sólido, incubar e efetuar contagem (DOLAN; COSTERTON, 2002).

2.5.2.3 - Identificação

A identificação clássica que tem como pré-requisito o subcultivo, geralmente é baseada nas características fenotípicas. Consiste na observação da macro e micromorfologia em microscópio de luz, comparando com descrições das chaves de identificação sendo, portanto, subjetiva dependente da experiência individual do investigador e de chaves de identificação atualizadas. Além disso, dependendo da fase do ciclo de vida ou da condição fisiológica (viável/cultivável) o fungo pode não crescer ou ter apenas crescimento vegetativo, sem desenvolver as estruturas reprodutivas necessárias pra sua identificação morfológica (PATERSON; LIMA, 2005; HAGEKAL et al., 2009, SKAAR; HAGESKAL, 2015). A identificação molecular não está sujeita às limitações da metodologia cultivo-dependente. O sequenciamento de DNA não depende de esporulação ou viabilidade do fungo, mas depende da precisão dos bancos de dados públicos

como Genbank (HAGESKAL; LIMA; SKAAR; 2009). A identificação molecular vem ganhando relevância tanto para auxiliar a identificação clássica como para quantificar DNA fúngico diretamente na água/biofilme (AL-GABR; ZENG; YU 2013). A combinação de sondas moleculares específicas com microscopia de epifluorescência permite identificação de microrganismos em biofilmes (DENKHAUS, et al., 2007).

Para atendimento dos objetivos acima mencionados, os pesquisadores utilizam basicamente duas categorias de métodos : os dependentes de cultivo e os não dependentes de cultivo.

2.5.3 Métodos dependentes de cultivo

Os métodos dependentes de cultivo têm como requisito promover o crescimento do fungo em estudo, sob condições controladas no laboratório, para permitirem densidades visíveis a olho nu (KINSEY; PATERSON; KELLEY; 1999). Para este fim são utilizados meios de cultura ou substratos adequados, além de parâmetros específicos de cultivo. O processo pode envolver várias etapas até a obtenção de culturas puras dos fungos, em laboratório.

A escolha do método depende do objetivo da análise e difere quanto aos meios de cultura, parâmetros de cultivo como tempo e temperatura de incubação, presença ou ausência de luz. Meios de cultura diferem na concentração de nutriente podendo ter alto teor como Saboraud dextrose agar – SDA, Agar extrato de malte – MEA, etc. ou baixo teor como R2A e Agar água. Podem ainda variar na suplementação com antibióticos, inibidores de crescimento rápido como Dicloran agar 18% de glicerol – DG18. Podem ter corantes, indicadores, etc. Siqueira e colaboradores, (2011) e Kinsey et al., (1999), fizeram uma compilação dos principais meios de cultura usados para isolamento de diferentes fungos em água (HAGESKAL; LIMA; SKAAR, 2009; SIQUEIRA et al., 2011; SKAAR; HAGESKAL, 2015). Tradicionalmente, cultivos são direcionados para isolamento, quantificação, enumeração e/ou identificação dos microrganismos pela taxonomia clássica (GRABŃSKA-LONIEWSKA, 2007). Porém mais recentemente, o cultivo pode ser destinado a análises como identificação molecular, análise filogenética (POITELON, ET AL., 2009), microscopia (HU, et al., 2005) análises por

espectroscopia como MALDI –TOF (SANTOS, et al., 2009; De CAROLIS, et al., 2008). Os métodos de cultivo mais comuns são apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Métodos de cultivo para microrganismos na água e biofilmes em sistemas de água.

Método	Descrição	Aplicação	Amostra	Referência
Plaqueamento direto	Espalhamento da amostra na superfície do meio sólido (spread plate), incorporação da amostra no meio de cultura fundido (Pour plate)	Isolamento, Enumeração, quantificação (UFC), e identificação	Água Biofilme Água. sedimentos Água Água Água Água Biofilme	Kinsey; Paterson; Kelley; 1999. Doggett, 2000. Zacheus et al., 2001 Göttlich et al., 2002. Pereira et al., 2010 Samah; Shimaa; Al-Wasify; 2014. Nazim et al., 2008. Hurtado-McCormick et al., 2016.
Filtração em membrana	Filtração da amostra em discos de membranas de porosidades específicas que depois são postas sobre a superfície do meio sólido	Isolamento, Enumeração, quantificação (UFC), e identificação	Água e sedimentos Água Água Água	Zacheus et al., 2001 Anaisse et al., 2002 Hageskal et al., 2006. Gonçalves; Paterson; Lima; 2006 a. Pereira et al., 2010.
Swab	Fricção de uma haste com algodão na extremidade (swab), esterilizada na amostra e depois na superfície do meio de cultura	Isolamento, Enumeração, quantificação (UFC),	Água Biofilme	Gonçalves; Paterson; Lima; 2006 a. Hurtado-McCormick et al., 2016.
Isclas especiais ou armadilhas	Fragmentos autoclavados de substratos como: pele de cobra, grama, sementes, são imersas na amostra e incubadas. As colônias que surgem são transferidas para meios específicos.	Isolamento, enumeração e identificação	Água Água	Gonçalves; Paterson; Lima; 2006 a. Hussain et al., 2011

Fonte: Oliveira H.M, 2015.

Métodos cultivo-dependentes consomem tempo, são laboriosos e requerem experiência em taxonomia clássica para identificação baseada em características morfológicas. Qualquer que seja o método de cultivo escolhido, sempre haverá fungos não detectados, pois os parâmetros de cultivos são seletivos, favorecendo certas espécies e inibindo outras. Além disso, existem fungos que não esporulam ou mesmo não crescem nas condições de cultivo, de modo que só uma fração é detectada (SCHIMIT; LODGE, 2004; SKAAR; HAGESKAL, 2015). Contudo,

apesar das limitações citadas os métodos de cultivo são amplamente utilizados em laboratórios de microbiologia, têm sido empregados em muitas pesquisas e no presente trabalho.

Se de um lado ainda não existe uma metodologia internacional padronizada para análises de fungos na água nem nos biofilmes, de outro lado, os métodos cultivo-depende, tradicionalmente utilizados no monitoramento da qualidade microbiológica da água são, há muitos anos, preconizados como métodos padronizados pelos órgãos regulatórios em diversos países. Tais métodos são ferramentas úteis e de baixo custo para avaliação da condição microbiológica do sistema de abastecimento pelas empresas de água. Entretanto estes métodos detectam uma fração limitada dos microrganismos da água. Pelo fato de amostram apenas a fase líquida e serem notadamente voltados para pesquisa de bactérias planctônicas indicadoras de contaminação fecal, eles não são representativos dos microrganismos aderidos nas superfícies internas do sistema de água (DOUTERELO et al., 2014, FISH; OSBORN; BOXALL; 2016).

2.5.4 Métodos não dependentes de cultivo

Para superar as limitações dos métodos cultivo-dependentes novas técnicas vêm sendo propostas para análises de microrganismos em amostras ambientais. Muitas já amplamente estabelecidas nas pesquisas de bactérias vêm sendo empregadas também para estudos dos fungos na água e em biofilmes. Métodos diretos que não requerem o uso de meios complexos vêm sendo desenvolvidos e permitem identificar populações específicas em seu ambiente natural (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER; 1995, DENKHAUS et al., 2007). Os métodos não dependentes de cultivo são continuamente desenvolvidos e aperfeiçoados, novos métodos vêm sendo propostos, ou mesmo o uso associado de métodos já existentes. Nos tópicos a seguir alguns métodos independentes de cultivo são apresentados em categorias:

2.5.4.1 Métodos químicos

A composição bioquímica dos biofilmes, constituintes celulares importantes e principalmente dos componentes da matriz de exopolissacarídeos pode ser quantificada e avaliada por métodos químicos e também por microscopia, para

análise de biomassa, composição e atividade microbiana na água e nos biofilmes. Para tanto, é necessário escolher um método adequado que separe a matriz da fração celular do biofilme (DOUTERELO, et al., 2014). A tabela 4 apresenta alguns métodos químicos usados comumente para estimativa de biomassa na água e composição (células e EPS) de biofilmes de sistemas de água em sistemas de abastecimento de água.

Tabela 4 – Métodos químicos para estimativa de biomassa e composição (células e EPS) de microrganismos.

Método	Descrição	Aplicação	Amostra	Referência
Quantificação de ATP (adeno-sina trifosfato)	Reação do ATP com o complexo luciferina/luciferase, produzindo luminescência proporcional à quantidade de ATP	Estimativa de Bio-massa e atividade microbiana	Biofilme Água Água Água	Hammes et al., 2010 Van der Wielen; Van der Kooij; 2010 Liu et al., 2013
Quantificação dos tipos de carbono orgânico (CO): Assimilável (COA),	1- carbono orgânico-coassimilável - a fração dissolvida de baixo peso molecular como açúcares, ácidos orgânicos e amino-ácidos).	Estimativa de recrescimento microbiano e bio-massa em sistemas	Água Água	Escobar and. Randall, 2001.
dissolvido biodegradável (CODB) e ,	2-carbono orgânico biodegradável; ambos representam a fração que podem favorecer o crescimento microbiano.	de distribuição de água	Biofilme Água Água	Escobar and. Randall, 2001. Schaule; Griebe; Fleming; 2000.
total(COT)	3- carbono orgânico total:(orgânico e inorgânico).		Biofilme Biofilme	Jahn and. Nielsen, 1995 Lazarova and Manem, 1995
Análise de ácidos graxos de fosfolípidios	Determinação dos ácidos graxos derivados de fosfolípidios de Mem-branacelular dos microrganismos para	Estimativa de biomassa e composição de comunidade microbiana	Biofilme	Keinänen; Martikainen; Kontro; 2004

Cont. Tabela 4

Método	Descrição	Aplicação	Amostr a	Referência
Análise de proteínas e de carboidratos	Análise de carboidratos e proteínas por diversos métodos analíticos	Quantificação e composição de EPS	Biofilme EPS Biofilme Biofilme	Gomes; Simões; Simões; 2014 Sheng; Yu;Yu; 2005 Lazarova and Manem, 1995 Fang; Hu,;Ong; 201
Análise de proteínas e de carboidratos	Análise de carboidratos e proteínas por diversos métodos analíticos	Quantificação e composição de EPS	Biofilme EPS Biofilme Biofilme	Gomes; Simões; Simões; 2014 Sheng; Yu;Yu; 2005 Lazarova and Manem, 1995
Análise de polissacarídeos	Análise de polissacarídeos, por métodos diretos ou indiretos	Quantificação de exopolissacarídeos	Biofilme	Fang; Hu,;Ong; 2010
Análise de ergosterol	Quantificação de ergosterol (lipídio quase universal dos fungos)	Estimativa de biomassa fúngica	Água	Solé, et al., 2008. Paterson; Russel;Lima; 2005.

Fonte: Oliveira, H. M., 2016

2.5.4.2 Métodos de coloração

Corantes específicos que têm afinidade para ácidos nucleicos, ou que são reduzidos no processo de respiração intracelular, ou ainda são acoplados a anticorpos, quando associados à microscopia de fluorescência, são empregados na contagem de células, avaliação de viabilidade e atividade metabólica, distinção entre células vivas e mortas, etc em microrganismos plactônicos ou aderidos em biofilmes de sistemas de água. A tabela 5 apresenta algum métodos específicos de coloração.

Tabela 5 – Métodos de coloração para ácidos nucleicos e estado fisiológico de microrganismos

Método	Descrição	Aplicação	Amostra	Referência
Coloração de ácidos nucleicos	DAPI- 4,6-diamino-2-fenilindol	Quantificar microrganismos por microscopia	Água Biofilme	Schaule; Griebel; Fleming;1999.
DNA/RNA	AO- Acridina Orange SYBR Green PI – Iodeto de propídio	de epifluorescência,citometria de fluxo	Biofilme Água e biofilme	Camper et AL., 1999. Gomes; Simões; Simões; 2014 Douterelo et al., 2014

Cont Tabela 5

Método	Descrição	Aplicação	Amostra	Referência
Coloração para detectar vitalidade/atividade metabólica de reações de redução	Sais tetrazólicos que são ativados pelo sistema de transporte de elétrons da cadeia respiratória:	Detecção e localização de células fisiologicamente ativas num biofilme	Biofilme	Lazarova and Manem, 1995.
	TTC –Cloreto de trifenil-tetrazólio		Biofilme	Schaule; Griebe; Fleming;1999.
			Biofilme	Schaule; Griebe; Fleming;1999.
			Biofilme	Lazarova, et AL., 1994.
	INT- cloreto de 2p-iodofenil-3p-nitrofenil-5-fenil tetrazolio	Distinção entre células vivas e mortas	Biofilme	Gomes; Simões; Simões; 2014
	CTC- cloreto de5-ciano-2,3-ditolil-tetrazolio		Biofilme	Camper et AL., 1999 Lazarova and Manem, 1995.
Viabilidade	Combinação de um corante de DNA/RNA que cora todas as células com outro que cora apenas células mortas ou inviáveis:		Biofilme	Liu, et al., 2016
				Schaule; Griebe; Fleming;1999. Gomes; Simões; Simões; 2014
Integridade de membrana celular	SYTO 9 [®] associado a iodeto de propídioPI. Carbocianinas e rodamina	Testar a integridade da membrana celular		Schaule; Griebe; Fleming;1999.
Coloração imuno fluorescente	Reação de acoplamento entre anticorpos marcados com fluorocromos e organismos específicos. É possível associação com corante de atividade.	Detecção e identificação e localização de microrganismos específicos	Água	Camper et AL., 1999.
			Biofilme	Schaule; Griebe;
			Biofilme	Fleming;1999.

Fonte: Oliveira, H. M., 2016

2.5.4.3 Métodos espectroscópicos

São métodos que se baseiam na radiação emitida, absorvida, transmitida ou refletida de uma amostra. Estes métodos permitem quantificação direta de biomassa e análise química da superfície das células microbianas. Vários tipos de espectroscopia usadas individualmente ou associadas à microscopia, fornecem informação bioquímica e fisiológica de biofilmes, permitem monitorar e mapear a distribuição de compostos químicos constituintes dos biofilmes e identificação de microrganismos (DOUTERELO, et al., 2014). A tabela 6 mostra alguns métodos espectroscópicos usados nas pesquisas de microrganismos em sistema de abastecimento de água.

Tabela 6 – Métodos espectroscópicos usados para análise de microrganismos em água e biofilmes.

Método	Descrição	Aplicação	Amostra	Referência
FT-IR espectroscopia no infravermelho com transformadas de Fourier	ATR-FT-IR – reflectância total atenuada no infravermelho com transformada de Fourier	Informações bioquímicas e fisiológicas in situ	Água e Biofilme	Schmitt; Flemming; 1998. Quilès; Humbert; Delille; 2010
Espectroscopia ramam, pode ser associadas à microscopia	DRIFT reflectância difusa no infravermelho com transformada de Fourier	Monitoramento das partículas e biofilme	Sedimentos e biofilme	Gallé, T. et AL, 2004.
Espectroscopia ramam, pode ser associadas à microscopia	Espectroscopia ramam	Composição química dos exopolissacarídeos	Biofilme	Schiwartz, T. et. al., 2009.
PAS – espectroscopia fotoacústica	Baseia-se na absorção de radiação eletromagnética no interior da amostra	Análise <i>in situ</i> e online em profundidade e com resolução	Biofilm	Schmid T., et al., 2014.

Fonte: Oliveira, H. M., 2016

Cont Tabela 6

Método	Descrição	Aplicação	Amostra	Referência
Espectroscopia de raios X	Tem grande penetração e profundidade, além de sensibilidade em escala molecular	Estudo de imobilização e distribuição de metais no biofilme	Biofilme	Denkhaus, et al., 2007. Pennafirme, S. et al., 2015
MRS- espectroscopia de ressonância magnética	Com a excitação da amostra, a intensidade do sinal de ressonância magnética é captada para formar imagem	Visualização espacial e temporal dos biofilmes e alterações hidrodinâmicas	Biofilmes	Metzger, et AL., 2006
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time Of Flight Intact Cell Mass Spectrometry (MALDI-TOF ICMS)	Identificação e diferenciação de microrganismos	Células intactas do microrganismo	Santos, et al., 2009. Hettick, J. M. et al., 2008

Fonte: Oliveira, H. M., 2016

2.5.4.4 Métodos moleculares

Os métodos (genéticos) moleculares que se baseiam na afinidade de uma sequência específica de ácidos nucleicos para hibridizar com uma sequência complementar de interesse, conferindo alta especificidade ao método, vêm sendo cada vez mais empregados em estudos de fungos no ambiente (CE, 2014). Nestes métodos a extração de DNA e a amostragem são etapas imprescindíveis para o êxito da análise, assim como uma apropriada preparação da amostra (TSUI et al.2011). Como em outros métodos, estes apresentam vantagens e desvantagens. A tabela 7 apresenta métodos moleculares, usados com frequência no estudo de sistemas de abastecimento:

Tabela 7 – Métodos moleculares para análise de microrganismos em biofilmes em sistemas de água.

Método	Descrição	Aplicação	Tipo de amostra	Referência
Baseados em PCR	PCR – reação em cadeia de polimerase	Identificação de espécies fúngicas	Água e Biofilme	Hurtado-McCormick, et al., 2016
	q-PCR- PCR-quantitativa em tempo real	Quantificação de microrganismos	Água	Kahlisch, et al., 2010
	M-PCR- multiplex PCR	Detecção simultânea de microrganismos	Água	Kong, et al., 1995.
	T-PCR - PCR precedida de transcrição reversa	Quantificar e monitorar expressão de genes de interesse	Água	Van der Wielen ; Voos; Van der Kooij; 2009.
	PMA – qPCR			
	DGGE- eletroforese em gel com gra-diente de desnaturação	Quantificação e viabilidade de fungos	Água	Vesper, et al., 2008
Técnicas chamadas de im-	TGGE-eletroforese em gel de gradiente de temperatura	Avaliar a dinâmica da população	Água	Pereira et al., 2010. Babic, et al., 2016.
pressão digital ou código de barra, com base em PCR	SSCP - polimorfismo conformacional da fita simples	Avaliar a diversidade da população de fungos	Isclas de folhas	Solé, et al., 2008.
	ARISA - análise automatizada do espaço intergênico ribossomal	Tipagem genética de alta resolução	Água	Kahlisch, et al., 2010.
		Investigar diversidade da população bacteriana	Água e sedimento	Danovaro et al., 2006

Fonte: Oliveira, H. M., 2016

Cont.Tabela 7

Método	Descrição	Aplicação	Tipo de amostra	Referência
Técnicas com base em PCR, chamadas de impressão digital ou código de barra	ARDRA- análise de restrição de DNA ribossomal amplificado	Investigar diversidade da população bacteriana	Água	Ludmány; Borsányi; Vargha; 2006.
	VNRT- Variação aleatória de nucleotídeos variáveis (ou número variável de repetições em tandem) e	Traçar a origem da contaminação fúngica	Água	Ribeiro, et al., 2006
	T-RFLP – Polimorfismo de restrição terminal de fragmentos	Análise de composição de comunidade	Biofilme	Douterelo; Sharp; Boxal; 2014.
Microarranjos	Hibridização entre uma sequência de cDNA marcada com fluoróforo e sondas oligonucleotídicas para genes específicos são imobilizadas em suporte sólidos num arranjo padrão conhecido	Caracterização o de comunidade microbiana	Água	Stine, et al., 2003.
Clonagem e sequenciamento	Extração de ac. Nucleicos, amplificação de genes RNAr, coleção de clones, comparação da sequência do gene RNAr recuperado com sequências disponíveis em bancos de dados	Dados de filogenia pré-cisa, sucessão a longo prazo em biofilmes, diversidade microbiana	Biofilme	Douterelo et al., 2014
NGS- sequenciamento de nova geração	Métodos baseados em sequenciamento de alto desempenho como:	Caracterização do microbioma com alta resolução para identificação das espécies, microbioma ativa, capacidade funcional, metagenômica, etc	Biofilme	Proctor e Hammes, 2015
			Água	Douterelo et al., 2015
	Pyrosequenciamento, Illumina, Ion torrent	Água	Ma, et al., 2015	
Hibridização fluorescente <i>in situ</i> -FISH	Baseado na hibridização de sondas moleculares com sequências específicas de DNA ou RNA	Rápida identificação e visualização de células individuais diretamente em amostras ambientais	Biofilme	Baschien, et al., 2008. Gonçalves, et al., 2006

Outras abordagens de interesse crescente são análises “ômicas”, que envolvem métodos de alto rendimento para caracterização de moléculas e metabólitos, combinando genômica, proteômica, transcriptômica, secretômica e metabolômica, e obtenção de perfis diferenciais tanto dos microrganismos planctônicos como em biofilmes. A expressão das proteínas pode estar associada a atividades microbianas específicas, portanto a proteômica tem potencial para análise funcional em sistemas de distribuição de água. Dentro da metabolômica a análise de metabólitos intra e extracelulares fornecem informações sobre genômica funcional e comunicação entre células de uma comunidade microbiana. A transcriptômica revela a transcrição ativa de RNAr- ribossomal e RNAm- mensageiro, ligados a certos membros da comunidade microbiana (DOUTERELO et al., 2014).

2.5.5. Métodos de microscopia

Microscopia permite a observação direta dos fungos numa amostra ou após seu cultivo em preparações (KINSEY, PATERSON, KELLEY, 1999; CAMPER, ET AL., 1999). Dos mais simples aos mais complexos, os diferentes microscópios associados a programas de tratamento de imagem, fornecem um amplo leque de imagens, resoluções e ampliações. Microscopia permite contagem direta (LIU, et al., 2013), enumeração e observação morfológica dos microrganismos (ARVANITIDOU, et al., 2002), análise da arquitetura, da estrutura, da composição (células e matriz) da biomassa (FISH, et al., 2015) e viabilidade dos biofilmes. Diferentes tipos de microscopia usados em estudos de microrganismos em sistema de abastecimento de água são compilados na tabela 8:

Tabela 8 – Microscopias usadas no estudo dos microrganismos em sistemas de água

Método	Descrição	Aplicação	Amostra	Referência
Microscopia de luz	Útil como etapa preliminar fornecendo informação da aparência geral associado a corantes como INT-cloreto de[2(p-iodofenil)3-(p-io-dofenil)-5-fenil Tetrazolio	Observação direta e imediata de biofilmes em coupons recém-coletados	Biofilme	Lazarova And Manem, 1995 Doggett, 2000.

Cont Tabela 8

Método	Descrição	Aplicação	Amostra	Referência
Microscopia eletrônica de varredura - SEM	Microscopia de alta resolução e pode ser associadaa por exemplo à microanálise de raio X	Caracterização morfológica ultraestrutural de biofilme em coupons	Biofilme	Doggett, 2000. Hu, et al., 2005. Denkhaus, et al., 2007
Microscopia eletrônica de transmissão-TEM	Microscopia com base na transmissão do feixe de elétrons através da amostra. Fornece imagem estrutural de alta resolução ,	Análise da estrutura internado biofilme. demapeamento exopolissacarídeos	Biofilme	Lazarova And Manem, 1995 Denkhaus, et al., 2007
Microscopia de varredura de transmissão de raio X-STXM	Basia-se na espectroscopia de absorção de raio X proximo da borda	Mapear a distribuição dos constituintesbioquímicos do biofilme	Biofilme	Lazarova And Manem, 1995 Lawrence, et al., 2003 Denkhaus, et al., 2007
Microscopia de epifluorescência	Um microscópio de epifluorescência capta sinais de fluorescência de amostras tratadas com fluorocromos, corantes de ácidos nucleicos, sondas moleculares , corantes fluorescentes de atividade etc	Contagem de células, monitoramento de biofilme. Combinando filtros adequadamente , diferentes fluorocromos podem ser detectados na mesma lâmina	Biofilme	Gonçalves, et al., 2006 Jungfer, et al., 2013
Microscopia confocal de varredura a laser - CLSM	É um tipo de microscopia de epifluorescência de alta tecnologia. Associada com fluorocromos e aquisição digital de imagem, fornece imagem tridimensional e <i>in situ</i> seccionamento óptico da imagem	Análise em profundidade da estrutura e identificação dos componentes do biofilme	Biofilme	Denkhaus, et al., 2007 Gomes; Simões; Simões; 2014
Microscopia de força atômica-AFM	Fornece imagem topográfica em micro e nano escala	Investigar propriedades físico-químicas do biofilme e interações com substrato	Biofilme	Denkhaus, et al., 2007 Gomes; Simões; Simões; 2014 Beech, et al., 2002.

Fonte: Oliveira, H. M., 2016

Os métodos apresentados anteriormente não esgotam todas as técnicas existentes nem as combinações possíveis, e um levantamento completo está fora

do escopo deste trabalho. É importante assinalar que todos os métodos têm vantagens e limitações, bem apresentadas em CAMPER, et al., 1999; DENKHAUS, et al., 2007; DOUTERELO et al., 2014. Dentre as metodologias apresentadas acima, serão abordadas a seguir, as que foram empregadas no presente trabalho na detecção *in situ* dos biofilmes, a partir de amostradores, reatores, fluorocromos e microscopia de epifluorescência associada à DNA-FISH e PNA-FISH.

2.6 DETECÇÃO *IN SITU* DOS BIOFILMES

A expressão *in situ* significa no local, no interior. Em se tratando de detectar fungos nos biofilme do sistema de distribuição, a detecção *in situ* se refere a estratégia de analisar os fungos nos biofilmes, no local onde se desenvolveram, sem a prévia extração, sem destruir sua estrutura e sem removê-los do substrato sobre o qual cresceram. A detecção *in situ* pode ser obtida com métodos que empregam várias combinações de corantes fluorescentes, anticorpos marcados com fluorocromos, ou sondas moleculares desenhadas para moléculas alvo como RNAr. Para o efeito recorre-se à microscopia de epifluorescência. Estes métodos permitem contagens diretas, maior especificidade, e discriminação entre células viáveis/ não viáveis e hibridização fluorescente *in situ* - FISH (KATOR; RHODES, 2003).

Em condições reais nos sistemas de abastecimento de água o acesso para coleta de biofilmes é muito difícil, restringindo-se a ocasiões de reparos e troca das canalizações. Neste sentido recorre-se a reatores, que são dispositivos concebidos para possibilitar a formação dos biofilmes, sob controle das condições físicas (velocidade de fluxo, forças de cisalhamento, temperatura, etc), químicas (composição e quantidade de nutrientes orgânicos e inorgânicos, íons etc) e biológicas (composição microbiana da comunidade - única ou múltipla espécie, tipo de microrganismos, etc). Os reatores podem ter alimentação em fluxo contínuo ou intermitente - em bateladas. A formação de biofilmes submersos em placas de microtitulação é um exemplo de reator de alimentação em bateladas. Outra estratégia para detecção *in situ* de biofilmes em sistemas de distribuição de água é a inserção de dispositivos de amostragem (amostradores) diretamente nas canalizações ou módulos do sistema, como ETA, decantadores, reservatórios,

etc. Componentes removíveis dos amostradores, normalmente denominados de cupons, podem ser inseridos e retirados repetidamente tanto em reatores no laboratório, quanto em sistemas em escala piloto, em grande escala ou nas redes de distribuição reais dos sistemas de água (DENKHAUS, et al., 2007, DOUTERELO et al., 2014, FISH, et al., 2015). Diversos tipos de reatores para estudo de biofilmes de água potável são apresentados em Gomes, Simões, Simões, 2015. No presente trabalho dois dispositivos foram usados para desenvolvimento dos biofilmes em laboratório e subsequente detecção *in situ*: placas de multipoços e reator Propella

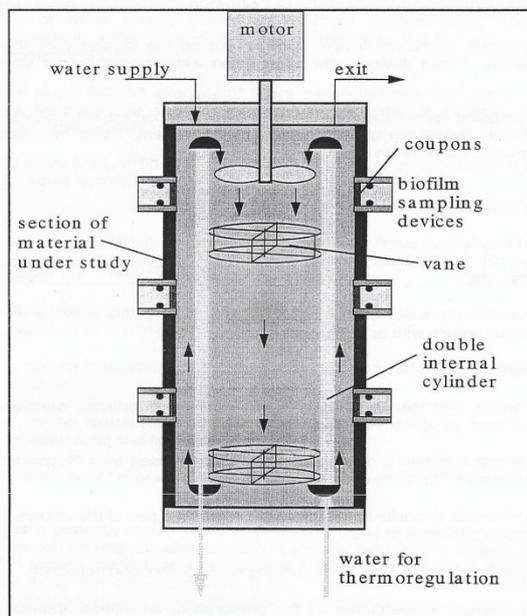
2.6.1 Biofilmes em placas de multipoços

As placas de multipoços são frequentemente empregadas para estudo de biofilmes como um método simples e rápido para avaliar simultaneamente diferentes parâmetros na formação dos biofilmes. Apesar destas vantagens, trata-se de um reator estritamente laboratorial e limitado para simular as condições reais do sistema de distribuição de água. Não opera em fluxo, só em batelada e com baixa força de cisalhamento. Mesmo com limitações as placas de multipoços são úteis para testar em pequena escala alguns parâmetros do experimento antes de montar num reator maior. Requerem pouco espaço, são fácil de operar e permitem o controle de algumas variáveis como temperatura, pH, materiais, etc. (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2007; 2010; SIMÕES; SIMÕES, 2013).

2.6.2 Biofilmes em reator Propella®

Um dos maiores desafios quando se estuda sistemas de abastecimento de água potável é reproduzir em laboratório as condições hidráulicas encontradas nas canalizações da rede de distribuição. O reator Propella® (patente conjunta entre NANCIE-International Water Centre, University Henri Poincaré e CNRS - Centre National De La Recherche Scientifique, Nancy, França) foi construído para simular no laboratório um trecho de canalização transportando líquido como água potável, água termal, etc. O Propella® é um reator misto onde o líquido é empurrado por uma hélice propulsiva através de um tubo interno (Figura 1).

Figura 1 - Esquema representativo do reator Propella



- Surface/volume relation identical to a real pipe
- Volume : approx. 3.5 L (generally \varnothing 100 x 500 mm)
- Flow variable speed from 0.05 to 0.5 m/s (typically 0.2 m/s)
- Inox or glass pipes available to study specifically water
- Material : inox 316l and Teflon (except studied pipe)
- Up to 20 sampling devices per pipe
- Possibility to connect reactors in series

Fonte: Propella[®] presentation, 2002

O líquido flui ao longo da secção de canalização em estudo, como se fosse uma canalização real. Permite reproduzir facilmente parâmetros hidráulicos como tipo de fluxo laminar, turbulento ou de transição pela definição do número de Reynolds e fixação da taxa de circulação no cano. No Propella[®] é possível estabelecer, de forma independente, um tempo de residência hidráulico e velocidade da circulação da água, pelo controle da alimentação. O reator possibilita controlar o fluxo hidráulico da água que é indispensável para reproduzir transferência ente as fases sólida, líquida e estudar as características das superfícies expostas e da água. O Propella[®] pode funcionar com ou sem fluxo contínuo possibilitando testar secções reais das canalizações ou coupons de diferentes materiais. De acordo com a necessidade, dispositivos de amostragem (coupons) podem ser colocados, retirados e substituídos no reator, em diferentes tempos. Os coupons podem ser de ácido inoxidável ou de PVC e podem ser observados diretamente em microscópio de epifluorescência sem remoção do biofilme, permitindo detecção *in situ*.

2.6.3 Fluorocromos

Uma substância química fluorescente, usada em coloração biológica para produzir fluorescência num espécime é um fluorocromo. Quando uma molécula absorve um fóton, ela entra em um estado eletrônico excitado, podendo voltar ao estado fundamental internamente através da conversão da energia absorvida em calor, transferindo a energia para outra molécula ou emitindo um fóton. A emissão de um fóton após excitação é chamada fluorescência. Existem substâncias que naturalmente exibem fluorescência.

Uma alternativa aos métodos tradicionais dependentes de cultivo são as técnicas fluorescentes. Nestas abordagens as células microbianas são tratadas com marcadores fluorescentes (fluorocromos) para visualizar e identificar as células marcadas por microscopia de fluorescência, com o auxílio de ferramentas de imagem digital e de análise de imagem. Por exemplo, a biomassa microbiana total de uma amostra pode ser facilmente marcada usando, DAPI - um fluorocromo geral, que se liga a ácidos nucleicos (SIMÕES; SIMÕES; LIMA, 2015). O DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) é um corante fluorescente que emite a cor azul brilhante.

2.6.3.1 FDA

O diacetato de fluoresceína – FDA (Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal) é um fluorocromo utilizado para testar a viabilidade celular. O método baseia-se na habilidade de enzimas ativas (estearases, lipases e protases) produzidas por bactérias ou fungos, clivarem a molécula do FDA, produzindo a fluoresceína que pode ser medida espectrofotometricamente ou fluorometricamente (SIMÕES; LIMA, 2015). A cor de excitação é azul e a coloração final conferida é verde claro.

A fluoresceína liberada pelas enzimas é ativada quando excitada em um comprimento de onda na faixa de 488 a 495 nm e observada sua emissão numa faixa de 518 a 525 nm (WANG, et al. 2005)

2.6.3.2 FUN[®]1

FUN1-[2-cloro-4-2,3(diidro-3-metil-(benzo-1,3-tiazol-2-il)metilidene)1iodeto-fenilquinolinium]- (Invitrogen/Molecular Probes) é um corante de viabilidade que explora os mecanismos bioquímicos endógenos, os quais parecem ser bem conservados entre as diferentes espécie de leveduras e outros fungos. Células metabolicamente ativas, metabolizam o FUN 1 formando estruturas intravacuolares cilíndricas (CIV's). Estas estruturas coram num fluorescente vermelho-laranja ou amarelo-laranja enquanto as demais estruturas intrcelulares se coram em verde fluorescente difusamente distribuído, quando excitadas sob feixe de luz com 470 nm a 590 nm (HUA et al., 2011; MILLARD et al., 1997).

2.6.3.3 Calcofluor White (CW)

Calcofluor White MR2[®] (Molecular Probes Europe, Leiden, The Neherlands) é um fluorocromo capaz de formar pontes de hidrogênio com ligações β -(1-4) e β -(1-6) de polissacarídeos. A parede celular fúngica é composta principalmente de quitina que tem ligações β -(1-4) e glicanos que possuem β -(1-3) e β -(1-6). Desta forma o CW exhibe grande afinidade química com tais compostos e cora a parede celular fúngica em azul fluorescente quando a amostra é visualizada num microscópio de fluorescência com um filtro de excitação perto dos 358 nm e um filtro de emissão perto dos 461 nm (BASELSKI et al., 1990; GONÇALVES et al., 2006).

2.6.3.4. DAPI

DAPI – 4', 6-diamidino-2-fenilindole é um corante que tem afinidade com ácidos nucleicos principalmente DNA rico em A-T. É um corante nuclear típico. Sua fluorescência necessita de uma excitação máxima perto da faixa de luz UV de 345 a 358 nm e de uma emissão máxima de 455 a 461 nm (BRAMMER; TONIAZZO; POERSCH, 2015).

2.7.4. Microscopia de epifluorescência

A microscopia de fluorescência baseia-se no fenômeno da fluorescência: um espécime orgânico ou inorgânico absorve luz e subsequentemente emite uma radiação quase simultaneamente, quando sobre ele incide uma radiação de comprimento de onda específico. Stokes criou o termo " fluorescência " em meados do século XIX, quando observou que o mineral fluorita emitia luz vermelha quando sobre ele incidia luz de excitação ultravioleta. Alguns espécimes autofluorescem quando estão sob radiação ultra-violeta, enquanto patógenos, tecidos animais, tem autofluorescência muito fraca ou inespecífica. Nestes casos se adiciona um fluorocromo ou fluoróforo que é um corante que se liga de forma específica a estruturas visíveis e invisíveis dentro da célula (SPRING, 2003). A microscopia de fluorescência é um campo crescente e uma poderosa ferramenta para biologia celular e molecular que permite visualização do interior das células a um nível de resolução subcelular. Uma grande variedade de marcadores moleculares específicos, incluindo proteínas fluorescentes geneticamente codificadas juntamente com uma gama de novas técnicas e modalidades de imagem fizeram a microscopia de fluorescência passar de um simples teste de localização para uma ferramenta quantitativa de análise funcional (COMBS, 2010; WATERS'; SWEDLOW, 2008).

Epifluorescência é um termo utilizado para especificar que a iluminação da excitação, passa pela objetiva incide diretamente sobre objeto através da objetiva e retorna pelo sistema optico. A separação da luz emitida daquela que não foi absorvida se dá através de um filtro barreira cromático (TANKE, 1998). A combinação de novas técnicas com marcadores e colorações fluorescentes com microscopia avançada de fluorescência forneceu novas ferramentas para analisar o comportamento dinâmico de moléculas celulares (SUZUKI et al., 2007). O uso de sondas moleculares oligonucleotídicas específicas ligadas covalentemente ao terminal 5' com fluorocromos, associado com hibridização fluorescente *in situ* e microscopia de epifluorescência foi empregado na detecção de biofilmes de fungos filamentosos em água por Gonçalves et al. (2006a), Siqueira et al. (2013).

2.7.5 Dna-FISH

FISH, em inglês – **F**luorescent **I**n **S**itu **H**ybridization e a sigla para técnica de hibridização fluorescente *in situ* com sondas moleculares desenhadas para moléculas alvo marcadas com fluorocromos. A técnica combina a precisão da genética molecular com a visualização por microscopia, para localização e identificação de células individuais em seu micro-habitat sem alteração da morfologia e integridade. Passos importantes antecederam a técnica FISH: 1- O uso já estabelecido de hibridização de ácidos nucleicos para elucidar a relação entre bactérias cultiváveis, também para identificação e quantificação de microrganismos, em uma população microbiana mista. 2- Aumento e aprofundamento do conhecimento sobre as sequências RNAr e crescimento das informações nas coleções de sequências RNAr e do uso dessas sequências para inferir relações evolutivas entre organismos celulares. 3- A existência de cerca de 10^4 ribossomos nas células em crescimento ativo, cada um funcionando como potencial alvo de sonda, possibilitando rotular e identificar células microbianas individuais por hibridização *in situ* associada a procedimentos microautorradiográficos (GIOVANNONI et al., 1988).

As sequências RNAr, estão presentes em toda célula viva. Alguns segmentos do RNAr são invariáveis em todos os organismos e, por isso, servem para ancorar iniciadores nos procedimentos de sequenciamento, enquanto outras são únicas em determinada espécie ou grupos relacionados. Essas características permitem a construção de sondas moleculares e são particularmente úteis para identificar virtualmente qualquer organismo ou grupo de organismos relacionados (AMANN; KRUMHOLZ; STAHL; 1997). As idiosincrasias regionais das sequências RNAr nos vários níveis taxonômicos, são peculiaridades que equivalem a “assinaturas” características dos grupos filogenéticos, que servem perfeitamente como alvos para identificação de base evolutiva. As sondas oligonucleotídicas são mais adequadas para triagem dessas assinaturas que o sequenciamento (AMANN, LUWDWIG; SCHLEIFER; 1995).

2.7.5.1 Sondas oligonucleotídicas

Uma sonda molecular é tipicamente uma sequência de nucleotídeos, à qual se encontra ligado um marcador fluorescente, que é complementar de

determinada região específica do RNA ribossomal alvo. As sondas moleculares podem ser polinucleotídicas (mais de 50 nucleotídeos) ou oligonucleotídicas (16 - 20 nucleotídeos). As oligonucleotídicas são mais usadas por serem mais curtas e possibilitam discriminar uma única incompatibilidade da sequência alvo. Além disso, oligonucleotídeos podem facilmente ser produzidos em quantidade sem alto custo (AMANN; GLÖCKNER; NEEF, A 1997).

O desenho de uma sonda oligonucleotídica é um processo assistido por programas computacionais que pesquisam sequências individuais ou grupos de sequências em árvores filogenéticas e fornecem listas de prováveis sondas, é feita avaliação quanto a acessibilidade de certas localizações da sequência RNAr, antes de ser escolhida e direcionada para síntese. A construção de uma sonda envolve o alinhamento da sequência de RNAr, identificação das idiosincrasias da sequência, seguida da síntese e marcação da sequência complementar de ácido nucleico da sonda, depois faz-se uma avaliação experimental e otimização das especificidades da sonda e ensaios de sensibilidade, com organismos alvo e não alvo (AMANN, LUWDWIG; SCHLEIFER; 1995). A marcação da sonda é feita pela incorporação enzimática de bases modificadas com fluoróforos ao longo do comprimento. Vários marcadores podem ser ligados covalentemente à extremidade 5' do oligonucleotídeo no último ciclo da síntese. São vários os tipos de marcadores existentes, nomeadamente: fluoresceína (FLUOS), tetrametilrodamina, "texas red", e carbocianinas fluorocromos CY3, CY5 e CY7, etc (AMANN; GLÖCKNER; NEEF, A 1997). O mais comum é a marcação direta de um ou mais fluorocromos, mas também pode ser indireta usando uma molécula repórter (digoxigenina ou peroxidase de rábano-tiramina fluoresceína) para amplificação de sinal, ou ainda o uso combinado de sondas polirribonucleotídicas marcadas internamente com digoxigeninas e com sistemas fluoresceína-tiramina (BOTTARI et al., 2006)

2.7.5.2 Hibridização fluorescente *in situ*-FISH

O pressuposto da hibridização *in situ* é conseguir que a mesma aconteça no interior da célula morfológicamente intacta e sem removê-la de seu ambiente natural. Na hibridização fluorescente *in situ* em condições controladas, a sonda é posta em contato a amostra, para que possa hibridizar com a sequência alvo.

Deste modo para que ocorra hibridização *in situ* com sondas oligonucleotídicas marcadas com fluoróforos, a morfologia da célula deve ser estabilizada e a membrana deve ser permeabilizada para penetração da sonda. A aplicação da sonda deve ser combinada com adequada solução tampão, temperatura e tempo de hibridização. A sonda pode ser aplicada tanto em amostras ambientais fixadas com formaldeído ou etanol, quanto em culturas. Nos ribossomos a sonda irá anelar especificamente com sua sequência complementar, resultando num heteroduplex (AMANN, ET AL., 1995, 1997; TSUI et al., 2011). Um protocolo típico envolve as etapas de fixação, permeabilização, lavagem para remover a sonda não hibridizada e detecção. Após a hibridização da(s) sonda(s), devido à existência do(s) marcador(es) fluorescente(s) as células tornam-se detectáveis por microscopia de epifluorescência, ou microscopia confocal de varredura a laser – CLSM, ou citometria de fluxo, etc (AMANN; GLÖCKNER; NEEF, A 1997, AMANN et al., 2001, BOTTARI et al., 2006).

A técnica permite visualizar a precisa localização de uma sequência de DNA ou RNA particular no citoplasma, organela ou núcleo de materiais biológicos. Como resultado a técnica pode detectar fungos metabolicamente ativos diretamente no ambiente sem cultivo quando RNA esta presente. A distribuição espacial do micélio em crescimento ou dentro e um substrato colonizado também pode ser investigado (LI et al., 1996; BASCHIEN et al., 2008; MCARTHUR et al., 2001).

As sondas oligonucleotídicas fluorescentemente marcadas para moléculas alvo como RNAr, são ferramentas eficientes para muitas áreas da ecologia microbiana uma vez que pode monitorar populações específicas em amostras ambientais baseadas nas características genotípicas constantes e não nas características fenotípicas variáveis como morfologia. No caso de comunidades imobilizadas como biofilmes, a exata distribuição espacial dos organismos pode ser analisada numa escala micrométrica e ainda, dependendo do desenho de sondas específicas, pode-se fazer a distinção entre populações (AMANN; GLÖCKNER; NEEF, A 1997). O uso de FISH tem sido bem sucedido para caracterizar microrganismos em biofilmes e detectar patógenos em água potável. Algumas propostas de aprimoramento da técnica FISH têm sido desenvolvidas como: CARD-FISH (catalized repórter deposition fluorescence *in situ* hybridization) que usa uma enzima para ampliar a intensidade do sinal obtido;

LIVE/DEAD-FISH que combina Fish com kit de viabilidade celular e PNA-FISH (peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization) que combina ácidos peptidionucleicos de alta afinidade com FISH (DOUTERELO et al., 2014; CERQUEIRA, 2011; DEINES et al. 2010, LEHTOLA, et al., 2007).

2.7.6 PNA-FISH

PNA do inglês - **P**eptide **N**ucleic **A**cid, são sequências de peptídios sintéticos que imitam DNA. As sondas para FISH feitas com PNA (PNA-FISH) têm um melhor desempenho se comparadas com as sonda DNA com relação à penetração na célula, velocidade de hibridização e discriminação de incompatibilidade única (EGHOLM, et al., 1993; STENDER et al., 2002). As sondas DNA apresentam fraca estabilidade e baixa temperatura de fusão, exigindo fixação e permeabilização adicionais por meio de enzimas e outros agentes, enquanto as sondas PNA são mais estáveis, resistentes a nucleases e proteases, do que as sondas DNA (Cerqueira, 2011)

Nsa sondas PNA-FISH as moléculas de ácido desoxirribonucleico – DNA que tem o esqueleto de açúcar-fosfato negativamente carregado são substituídas pelas de ácidos peptídeonucleicos –PNA, formando um esqueleto de poliamida neutra formada por unidades repetitivas de N- (2-aminoetil) glicina. Apesar da diferença na composição, a configuração química é muito próxima do DNA natural de modo que PNA hibridiza com sequências complementares DNA ou RNA (CERQUEIRA, 2008, 2011).

Embora as moléculas de PNA, não tenham pentoses, uma hibridização específica entre o PNA e sequências complementares de ácidos nucleicos, ainda ocorrem por ligações de hidrogénio, de acordo com as regras de Watson-Crick. A molécula de PNA neutra característica é responsável por uma estabilidade térmica mais elevada (alta Tf) entre sequências PNA/rRNA alvo (ou de DNA de cadeia dupla), em comparação com as sondas de DNA tradicionalmente usadas. Devido a esta elevada afinidade, as sondas de PNA têm normalmente sequências relativamente menores (13-18 nucleótidos) que as sequências com 18 ou mais nucleótidos nas sondas de DNA. Por serem menores as sondas PNA têm mais facilidade de penetração, nas células e na matriz de EPS dos biofilmes, que as sondas DNA; e por terem um esqueleto sem cargas negativas, não enfrentam

forças de repulsão eletrostática entre a sonda PNA e o esqueleto açúcar-fosfato negativamente carregado da molécula alvo. Em consequência as sondas PNA apresentam mais rapidez, maior afinidade, especificidade e sensibilidade que as sondas DNA (RAY AND NORDEN, 2000; BOTTARI et al., 2006; JAIN, 2004, CERQUEIRA et al., 2008, 2011)

Neste trabalho utilizou-se sonda DNA-FISH específica para fungos em geral e uma sonda PNA-FISH específica para identificação de *A fumigatus* na detecção *in situ* deste patógeno nos biofilmes.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi conduzido no sistema de abastecimento de água da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, em reservatórios situados em pontos estratégicos como: estação de tratamento de água - ETA, restaurante universitário - RU, núcleo de educação física e desporto - EDF, e hospital das clínicas - HC. O sistema está em operação desde 2006, localizado próximo ao Centro de Ciências Exatas e da Natureza - CCEN no Campus Universitário, Cidade Universitária - Recife. O sistema de tratamento de água UFPE é composto de estação de tratamento de água - ETA e rede de distribuição formada pela malha de tubulações que alimentam os reservatórios (elevados e/ou semienterrados) que abastecem todo os prédios do campus. A ETA consiste de uma caixa de reunião de água bruta, dois aeradores tipo bandeja, um decantador, três filtros, casa de bombas, sistema de cloração, um reservatório apoiado, leito de secagem do lodo do decantador e um laboratório para monitoramento de qualidade da água. O sistema trata 72,3 m³/h de água subterrânea, atualmente opera captando de 3 poços situados no Centro de Tecnologia e Geociências (CTG): poço CTG 1 - vazão de 34,1 m³/h; CTG 2 – vazão de 23,9 m³/h; CTG 3 – vazão de 19,8 m³/h. Além desses, outro poço com vazão de 12 m³/h abastece o hospital universitário – Hospital das Clínicas (HC) que é operado e gerenciado em separado pela administração do hospital.

A água dos poços CTG é bombeada para caixa de reunião de água bruta, de onde segue por gravidade e percola pelos aeradores. Estes promovem o contato da água com oxigênio para que ocorram reações de oxidação, que precipitam metais solúveis como ferro e manganês, pra serem removidos na etapa seguinte. Dos aeradores a água vai por gravidade para o decantador onde são sedimentados os flocos formados pela aeração e também onde recebe cloro (quando está sendo aplicada pré-cloração). A água decantada é recolhida por calhas de coleta de água decantada e seguem para os filtros de fluxo ascendente. Após a filtração a água segue para o reservatório da ETA, recebe cloração final na saída deste, e é canalizada para o reservatório elevado, de onde é distribuída para os centros universitários (e seus reservatórios) pela rede de distribuição. O lodo acumulado no decantador é descarregado em um leito de secagem, antes da disposição final. A rede de distribuição compreende o conjunto de tubulações que conduzem água aos diversos centros do campus.

A partir de 2013, quando o experimento foi iniciado, o sistema vem sendo submetido a intervenções para estudos e diagnósticos com vistas à elaboração de projeto de melhorias. Tais intervenções incluíram desde paralização ocasional de bombeamento de algum poço, ou paralização total para lavagem do decantador, lavagem do reservatório, substituição do leito dos filtros, além de manobras de distribuição, com ocasionais intermitências de fornecimento. Para superar os transtornos causados por eventuais interrupções no fornecimento de água, alguns centros com grande demanda de água (como é o caso do HC e RU), utilizam de forma complementar água oriunda do abastecimento público ou de carro pipa. Indubitavelmente estas intervenções influenciam a população de microrganismos no sistema. Entretanto o foco deste trabalho não incide na avaliação da operação do sistema nem do controle de qualidade da água produzida, e sim na detecção dos fungos filamentosos presentes na água e em biofilmes, nos pontos do sistema de abastecimento em que há armazenamento da água - reservatórios da ETA, RU, EDF e HC.

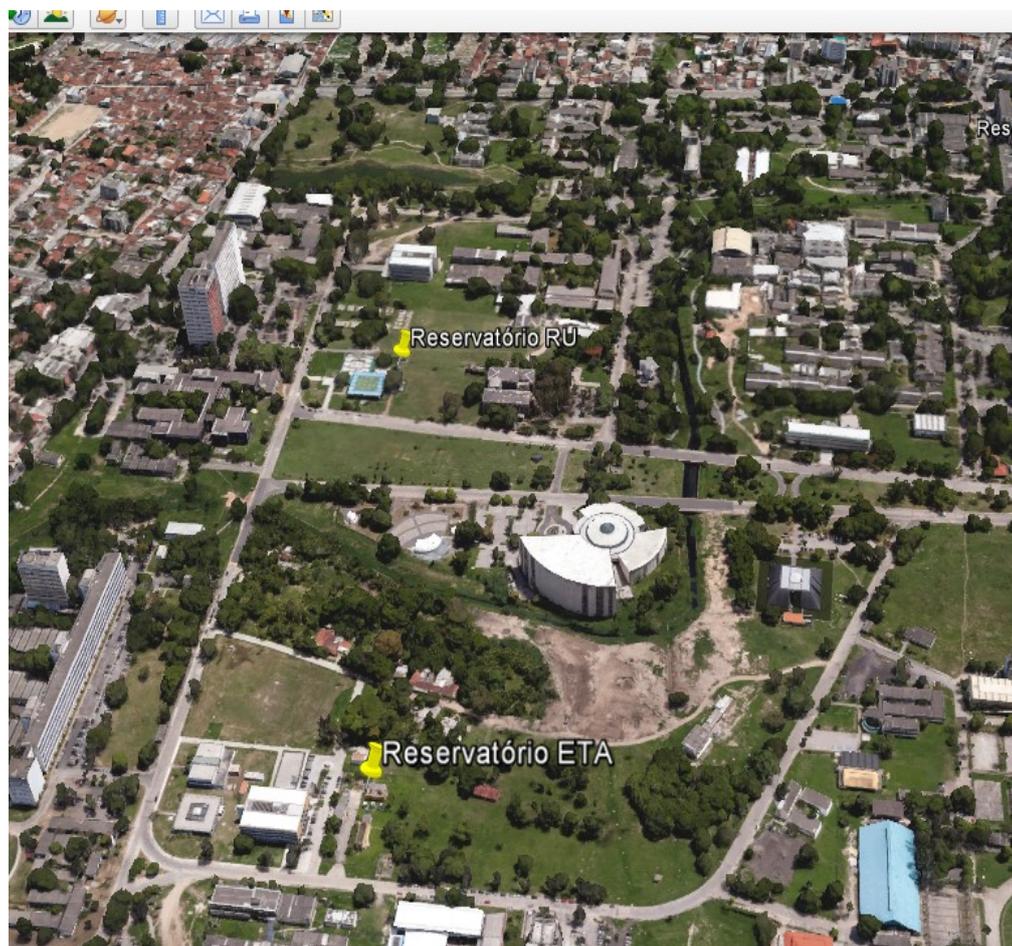
3.2 PONTOS DE COLETA

Para amostragem no sistema de abastecimento da UFPE foram escolhidos locais da rede de distribuição, onde a água é reservada. São pontos importantes

por suprirem um grande número de usuários e apresentarem consumo elevado, como o reservatório da ETA que distribui para todos os centros e abastece os demais reservatórios semienterrados e elevados. O reservatório do Restaurante Universitário cuja água é usada para preparar até 5000 refeições por dia, incluindo dejejum, almoço e janta (www.ufpe.br), o reservatório do Núcleo de Educação Física que além das piscinas supre os chuveiros dos vestiários e o reservatório do Hospital das Clínicas que atende em média 12000 pacientes por mês (www.ufpe.br).

Foram estabelecidos quatro pontos de coleta (Figura 2): ponto 1- Reservatório da Estação de Tratamento de água do sistema UFPE – **ETA**; ponto 2 – Reservatório do Restaurante Universitário – **RU**; ponto 3 – Reservatório do Núcleo de Educação Física – **EDF** e, ponto 4 - Reservatório do Hospital das Clínicas – **HC**. O reservatório da ETA é apoiado e os demais pontos são reservatórios semienterrados.

Figura 2 - Pontos de coleta na rede de distribuição de água no campus da UFPE



Fonte: Goole earth, 2013

3.3 AMOSTRAS

Dois tipos de amostras foram usadas neste estudo para detecção dos fungos: água e biofilmes.

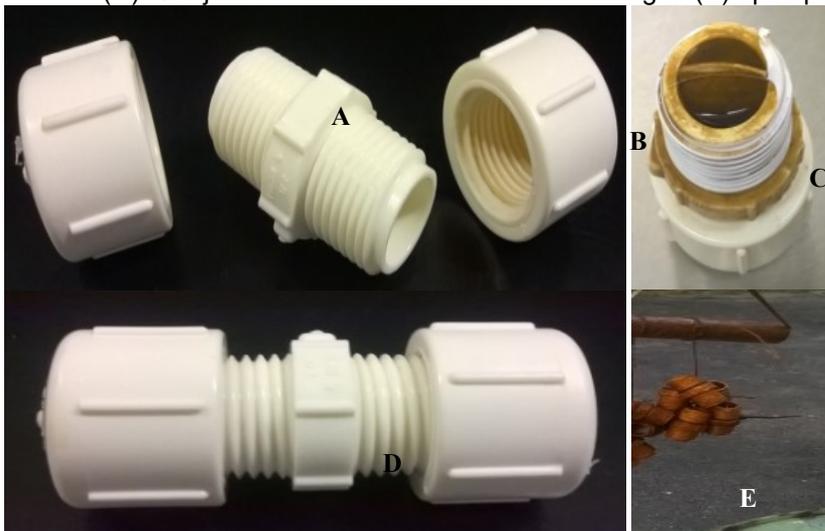
3.4 AMOSTRADORES

São dispositivos concebidos para propiciar o desenvolvimento dos biofilmes em cada ponto de amostragem, e servir tanto para isolamento dos fungos e extração de DNA genômico, quanto para detecção *insitu* dos biofilmes formados. Dois tipos de amostradores foram utilizados:

3.4.1 Amostrador de PVC

Conforme a Figura 3, para cada amostrador utilizou-se uma placa de PVC (Figura 3 C) inserida no interior de um nípel (Figura 3 A) de PVC de ½ polegada (Tigre-Camaçari, BA, Brasil). Nípel ou niple é o negativo de outra peça hidráulica chamada luva. Nípel serve para conectar peças numa tubulação. Esse nípel tem roscas nas duas extremidades o que permite que os mesmos sejam tampados, na hora da coleta, com capes de rosca (Figura 3 B), previamente desinfetados. Capes são tampas rosqueadas de ½ polegada (marca Tigre-Camaçari, BA, Brasil), que ao serem rosqueadas nas extremidades do amostrador (Figura 3 D), possibilitam o preenchimento com a água do ponto de coleta e o fechamento, evitando exposição ao meio externo e mantendo os biofilmes hidratados durante o transporte até o laboratório. A figura 3 E mostra um conjunto de amostradores suspensos por nylon em um suporte, no momento da retirada do reservatório, antes da colocação dos capes.

Figura 3 – Amostrador PVC-Peças e montagem do amostrador: nípel (A), cape (B), amostrador aberto = nípel + placa de PVC inserida no nípel, mostrando água no interior (C), amostrador fechado (D). Conjunto de amostradores retirados da água (E) após período de imersão.



Fonte: Oliveira HMB, 2013.

Estes amostradores ficaram imersos na água por 22 meses, para permitir o desenvolvimento de biofilmes sobre as placas de PVC, após este período, de cada ponto de coleta 9 amostradores foram retirados (Figura 3 E) : 6 para isolamento dos fungos e 3 foram destinadas à detecção *in situ*.

3.4.2 Amostradores MF

Foram confeccionados com filtros de membranas de éster de celulose (Figura 4A) esterilizadas, coladas (no interior da cabine de fluxo laminar) usando cola PVC a anéis de vedação (Figura 4B) (previamente esterilizados em vapor fluente). Cada conjunto de 9 amostradores foi colocado dentro de uma proteção de nylon (esterilizada em vapor fluente), (Figura 4C). Em conjuntos de 9, estes amostradores ficaram imersos na água dos reservatórios, de jan a junho de 2015 para funcionarem como suporte para o desenvolvimento dos biofilmes.

Figura 4 - Amostrador MF. A – membrana filtrante colada em anel de vedação B (agrupado com fio de nylon); C – Conjunto de amostradores MF protegidos por tela de nylon.



Fonte: Oliveira HMB, 2014.

3.5 COLETA DAS AMOSTRAS

3.5.1 Água

As amostras da água distribuídas pelo sistema de abastecimento de água UFPE e da água que abastece o Hospital das Clínicas, estocadas em reservatórios, foram coletadas bimestralmente, de setembro de 2013 a maio de 2014, e de janeiro a julho de 2015, em recipientes plásticos de 1L previamente esterilizados, segundo metodologia estabelecida no Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater, 22th Ed. (APHA, 2012). Nos reservatórios semienterrados foram realizadas coletas em frascos esterilizados, segundo Cetesb (2011). As amostras foram transportadas e mantidas refrigeradas até o momento do processamento da análise num prazo máximo de 24 h e foram utilizadas em triplicatas para análises físico-químicas e de 6 a 10 replicatas para análises micológicas. Alíquotas de cada amostra de água foram colhidas para análise de carbono orgânico total.

3.5.2 Biofilmes

Em cada período de coleta, e de cada reservatório, um conjunto (de 9 amostradores Placa PVC) foi retirado, preenchido com a água do ponto de coleta e tampado com os caps (Figura 2 D). Em seguida foram acondicionados em plásticos, transportados e mantidos sob refrigeração até o processamento no laboratório.

Conjuntos com 9 amostradores MF, protegidos por num saco de nylon vazado para permitir contato com a água e proteger de choque mecânico (figura 2 B), foram retirados após períodos de 2 e 4 meses para cada ponto de amostragem. Destes 6 foram transferidos para placas contendo meios de cultura para isolamento dos fungos e 3 destinados para microscopia.

3.6 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA ÁGUA

Foram analisados os parâmetros: Cloro livre, temperatura, pH. Condutividade, turbidez, oxigênio dissolvido e carbono orgânico total.

3.6.1 Cloro livre

O cloro residual livre foi medido no momento da coleta por comparação visual em kit DPD Hach modelo CN-70, conforme instrução do fabricante.

3.6.2 Temperatura, pH, condutividade, turbidez e oxigênio dissolvido

Os parâmetros temperatura, pH, condutividade, turbidez e oxigênio dissolvido foram analisados em triplicata, no momento da coleta, em um medidor multiparamétrico HORIBA modelo U50 (HORIBA Ltd, Miyano Higashi, Kisshoin Minami-Ku, Kyoto, Japão).

3.6.3 Carbono orgânico total

As análises de carbono orgânico total foram realizadas no Laboratório de Saneamento Ambiental do Centro de Tecnologia e Geociências – UFPE, pelo método de oxidação catalítica de combustão a 680 ° C em analisador de carbono orgânico total modelo TOC-Vcsh (Shimadzu Corporation, Tóquio, Japão).

3.7 ANÁLISES MICOLÓGICAS

Os meios de cultura e soluções utilizados nas análises micológicas encontram-se no ANEXO 1.

3.7.1 Quantificação dos fungos na água

O método de filtração em membrana consiste na filtração de volumes adequados de amostra (ou da amostra diluída) em filtro de membrana com porosidade de 0,45 µm, onde esporos ou propágulos ficam retidos na superfície da membrana. Em seguida a membrana é transferida para uma placa de Petri com meio de cultura específico. Por capilaridade o meio de cultura se difundirá através da membrana e chegará até os fungos que o utilizarão para sua nutrição e reprodução. Após incubação nas condições definidas de nutrição, temperatura, tempo, haverá formação de colônias, que serão visualizadas e contadas. Cada colônia representa uma UFC - Unidade Formadora de Colônia, que pode ser proveniente de um ou mais esporos agrupados, ou ainda de um propágulo.

Foram filtradas alíquotas de água cujos volumes totais variaram de 30 a 100 mL, (dependendo da presença de partículas em suspensão, reduzia-se o volume filtrado) e as membranas foram transferidas para placas contendo meios de cultura R2A e SDA. A incubação foi a 30 °C e o crescimento acompanhado até 10 dias.

Para o cálculo da densidade de fungos em UFC por um dado volume da amostra, foram usados o número de colônias contadas e o volume filtrado da amostra. O resultado obtido foi expresso em UFC/100 mL. O resultado foi calculado por:

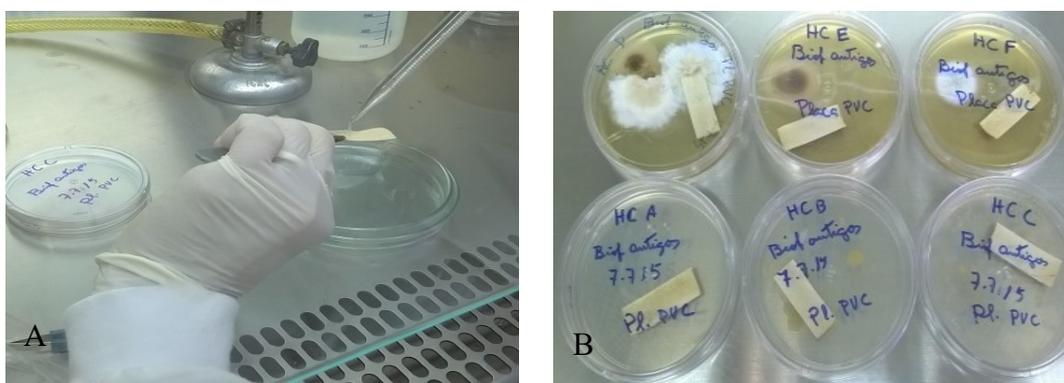
$$\text{UFC/100 mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de col\~{o}nias contadas}}{\text{Volume de amostra filtrado}} \times 100$$

Após a quantificação, seguiram as etapas de isolamento e identificação.

3.7.2 Quantificação dos fungos em biofilmes dos amostradores Placas PVC

Após a coleta dos amostradores (Figura 6), com os biofilmes formados, assepticamente em cabine de fluxo laminar, as placas PVC, com área de 3,1 cm² foram retirada de dentro dos tubos, lavadas com 2 esguinchos suaves água de diluição esterilizada, para retirar os microrganismos frouxamente aderidos ao biofilme (Figura 6A). Os amostradores foram em seguida transferidos para placas contendo meios R2A e SDA sendo pressionados contra o meio. A incubação foi feita a 30 °C, o crescimento foi acompanhado até 15 dias e as colônias foram contadas (Figura 6B). Os resultados foram expressos em UFC/ cm².

Figura 5 – Quantificação dos fungos em amostradores placas PVC. A- lavagem para retirar os microrganismos frouxamente aderidos; B- isolamento em meios de cultura R2A e SDA.

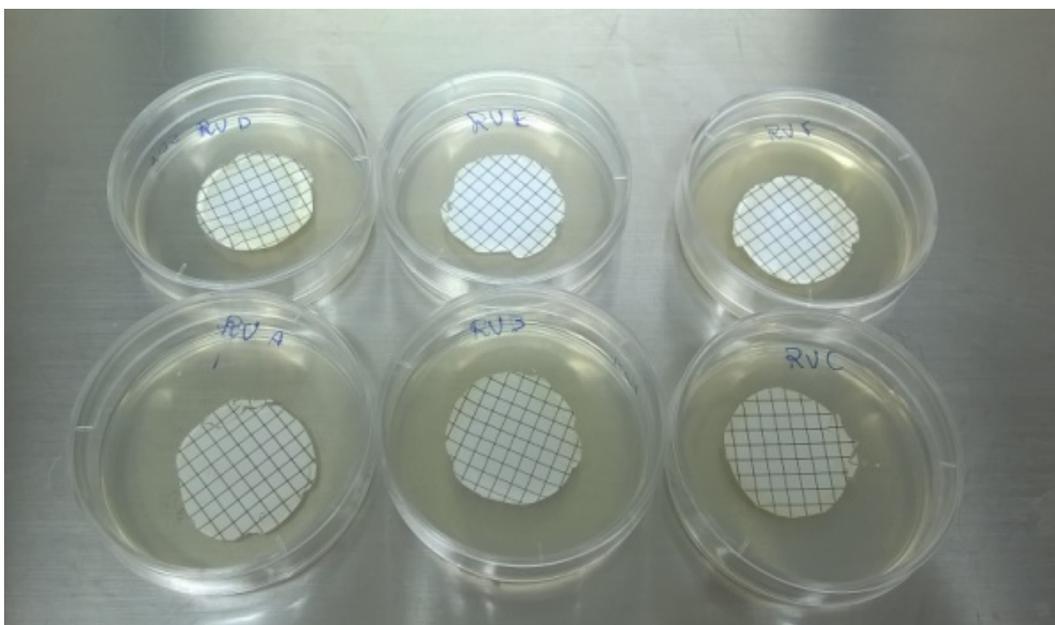


Fonte: Oliveira H.M, 2015.

3.7.3 Quantificação dos fungos em biofilmes dos amostradores de filtros de membrana - MF.

Após a retirada dos amostradores MF, em cabine de fluxo laminar, as membranas foram recortadas com bisturis esterilizados (ficando com área circular de 8,8 cm²), das quais posteriormente 3 foram transferidas para placas (Figura 5) contendo meios de cultura R2A e 3 para placas com BDA. A incubação foi a 30 °C e as placas observadas até 15 dias e as colônias foram contadas. O resultado foi expresso em termo de UFC/cm².

Figura 6 – Quantificação dos fungos em Amostradores MF em meios de cultura R2A e SDA.



Fonte: Oliveira HMB, 2014.

3.7.4 Isolamento dos fungos da água e dos biofilmes nos amostradores

As colônias crescidas em meios R2A e SDA nas etapas anteriores de quantificação nas amostras de água e de biofilmes, foram repicadas inicialmente em BDA. Quando necessário, sucessivos cultivos foram feitos até obtenção de culturas puras. Empregou-se incubação a 30 °C e o crescimento foi acompanhado até 15 dias.

3.7.5 Identificação dos fungos isolados

Os fungos isolados em BDA, quando necessário, foram em seguida cultivados em meios específicos para grupos taxonômicos definidos: MEA - segundo Blakeslee, 1915, CYA - Czapek Yeast Extract Agar segundo Pitt, 1973 CZ - Czapek Dox solution Agar, formulado por Czapek em 1902, modificado por Dox em 1910.

A incubação foi feita a 30 °C e o crescimento foi acompanhado até 10 dias para outros gêneros. No caso dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* a incubação foi a 25 °C por 7 dias. As observações das características macroscópicas e microscópicas das colônias crescidas nesses meios foram a base da identificação. As características macroscópicas como cor e texturas da colônia, micélio, presença de dimorfismo, pigmento, exudato, etc. foram observadas diretamente a olho nu ou em lupa (Leica DMR).

As características microestruturais como cor, tamanho e forma dos conídios, células conidiogênicas, micélio, vesículas, métulas, fiálides, esclerócios, foram observadas em microscópio de luz Leica DMR. Para observações microscópicas foram preparadas culturas em lâminas onde: em cabine de segurança fez-se a transferência de 2 a 3 inóculos para placa de Petri contendo meio específico para o gênero em estudo, e sobre cada um deles se sobrepôs uma lamínula esterilizada. Fez-se a incubação em temperatura e prazo típicos para o gênero em estudo. Ao final da incubação as lamínulas foram retiradas das placas e montadas (invertidas) sobre uma gota de corante azul de Amman (ou água) sobre lâminas. Ocasionalmente fez-se lâmina direta onde, assepticamente com agulha de inoculação, se transferiu pequena quantidade de material de uma colônia, para uma gota de azul de Aman (ou água) sobre a lâmina, cobriu-se com lamínula, com papel absorvente enxugou-se o excesso de corante e observou-se em microscópio óptico.

As microestruturas típicas foram comparadas com as descritas na literatura especializada (PITT; HOCKING, 1997, BARNET; HUNTER, 1972; SAMSON; HOEKSTRA; FRISVAD, 2004; ELLIS, 1971; 1976; SUTTON, 1980; DOMSCH; GAMS; ANDERSON; 1980; 1993; KIRK; COOPER, 2005; DE HOOG; HERMANIDES-NIJHOF, 1977).

3.7.6 Formação dos biofilmes em laboratório

3.7.6.1 Fungos e condições de cultura

Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram predominantes entre os fungos isolados da água do sistema e presentes em todos os pontos de amostragem. Dois representantes destes gêneros foram utilizados para avaliação de suas capacidades de formar biofilmes: *Aspergillus fumigatus* – cepa MUM 14.04 e *Penicillium brevicompactum* cepa MUM 02.07 da coleção de cultura da Micoteca da Universidade do Minho–MUM (Braga Portugal). *A.fumigatus* foi escolhido por ter sido detectado em três pontos de amostragem, incluindo o Hospital das Clínicas e por sua relevância como patógeno. *P. brevicompactum* foi escolhido para verificar a capacidade formação de biofilme misto com *A.fumigatus*. A bactéria *Pseudomona reactans* foi utilizada para testar biofilme misto com *A.fumigatus*. Os fungos foram mantidos em MEA a 4 °C.

3.7.6.2 Suspensão de esporos

Para cada cepa, os esporos foram obtidos a partir de culturas puras em MEA crescidas a 22 °C por sete dias. Adicionou-se 2 mL de solução salina com tween 80 sobre a superfície das placas com fungo crescido em tapete e com movimentos circulares suaves, a suspensão de esporos foi recolhida em recipiente esterilizado. A suspensão foi homogeneizada em vortex (Heidolph Reax 200, Schwabach, Germany), os esporos foram contados em câmara de Neubauer e a concentração final foi calculada. A suspensão estoque assim obtida, foi mantida a 4 °C e utilizada para preparação dos inóculos.

3.7.6.3 Preparação do inóculo

Cada suspensão estoque de esporos de fungo foi homogeneizada em vortex e imediatamente depois um volume adequado foi diluído em caldo R2B esterilizado, de modo a obter um inóculo com concentração de esporos desejada (10^5 /mL ou 5×10^4 /mL) para o teste de formação de biofilme.

O inóculo da *P. reactans* foi preparado a partir de cultivo overnight em caldo R2B, e ajustado para uma densidade ótica de 0,4, que equivale a uma

suspensão 1×10^9 /mL, um volume adequado foi diluído de modo a obter 1×10^5 /mL.

3.7.6.4 Formação de biofilme em placas de multipoços

O objetivo do teste: avaliar a cinética inicial de formação de biofilme monoespécie de *A. fumigatus* com meio de cultura R2B na concentração normal e também na concentração reduzida em 50%, e a formação de biofilme multiespécie *A. fumigatus* + *P. brevicompactum*. Foram utilizadas placas de multipoços em poliestireno (Greiner Bio-one Cellstar®) de 6 e 12 poços e os testes ocorreram em temperatura ambiente. Em cada ensaio foi feito um controle negativo, onde se adicionou uma alíquota de volume igual ao do inoculo, só com R2B sem esporos. Para detecção *In situ* e visualização dos biofilmes, empregou-se corante Calcofluor White, Fun 1, FDA (Sigma-Aldrich, Sintra, Portugal) e sonda PNA-FISH (Biomode, Braga, Portugal). Os parâmetros dos testes são resumidos na Tabela 9.

Tabela 9: Formação de biofilme em placas de multipoços- parâmetros do teste

Teste	Meio de cultura	Inóculo Suspensão de esporos	Agitação	Tempo (h)	Lavagem	Secagem	Coloração ou hibridização
1 Biofilme mono- espécie Placa de 6 poços	R2B (concentração 100%)	3mL <i>A.fumigatus</i> 10^5 /mL em R2B 100%	80 rpm	24	2 esguinchos de	Ao ar por	Calcofluor White
				48	1mL	30 min	
				72	escoando lentamente nas paredes dos poços	Temperatura ambiente	
2 Biofilme mono- espécie Placa de 12 poços	R2B (concentração 50%)	1mL <i>A.fumigatus</i> 10^5 /mL em R2B 50%	80 rpm	24	2 esguinchos de 0,5	Ao ar por	Calcofluor White Fun 1 FDA PNA-FISH
				48	mL escoando	30 min	
				72	Lentamente nas paredes dos poços	Temperatura ambiente	
3	R2B	1mL	80 rpm		2	Ao ar por	Calcofluor

Biofilme multi-espécie em Placa de 12 poços	(concentração 50%)	<i>A.fumigatus</i> 5x10 ⁴ /mL +1 mL <i>P. brevicom- pactum</i> 5x10 ⁴ /mL em R2B 50%	esguinchos de 0,5 mL escoando lentamente nas paredes dos poços	30 min Temperatura ambiente	White Fun 1 FDA PNA-FISH
---	--------------------	---	--	--------------------------------	-----------------------------------

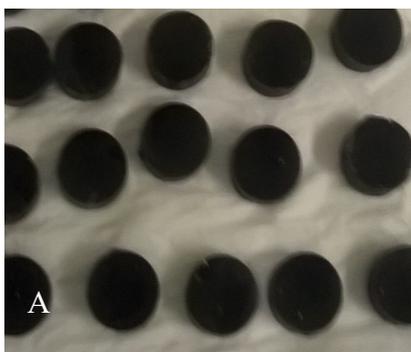
Fonte: Oliveira HMB, 2015.

3.7.6.5 Formação de biofilme em reator Propella

a) Preparação do Propella para um ensaio:

Todos os coupons (Figura 7A) foram colados nos respectivos suportes (Figura 7B), e depois da secagem total da cola, antes de serem instalados no reator, foram desinfetados com solução de hipoclorito de sódio 15% (V/V), depois enxaguados em água de torneira esterilizada.

Figura 7 – Coupons do reator Propella: A -coupons de PVC e B-coupons colados nos suportes



Fonte: Oliveira HMB, 2015.

Os coupons assim limpos e desinfetados foram introduzidos no reator.

Antes de qualquer ensaio o reator Propella foi limpo externamente e cada orifício de inserção de coupon foi limpo manualmente, com gaze embebida em hipoclorito 15%. Os coupons previamente desinfetados foram inseridos no reator. Internamente o Propella foi desinfetado com hipoclorito de sódio 15% (V/V),

circulando em circuito fechado por 30 minutos, com o rotor ligado. Também foi passada a solução de hipoclorito 15% nas tubulações de alimentação e de saída de meio de cultura. Em seguida fez-se a drenagem do hipoclorito e passou-se água de torneira esterilizada em circuito aberto com o rotor ligado por 30 min.

b) Procedimentos para execução de um ensaio no reator Propella.

Previamente, quando da preparação do meio de cultura, utilizou-se um Jerrycan (capacidade 30 L) com um parte da mangueira a ser usada para alimentação inserida no Jerrycan e com um peso, para manter esta extremidade no fundo. Preparou-se e introduziu-se 25 L de R2B e rosqueou-se a tampa com orifício pelo qual passa a extremidade externa da mangueira que seria acoplada ao reator. Esta extremidade foi protegida e embalada com papel kraft e por fora deste, com papel alumínio, e foi amarrada ao Jerrycan para ser autoclavada juntamente com meio de cultura a 121 °C por 1h. Para iniciar um ensaio, parou-se o sistema e conectou-se assepticamente a parte externa da mangueira de alimentação de meio de cultura na tubulação de entrada. Para isso, no momento de conectar utilizou-se uma chama nas proximidades para prevenir contaminação. Em seguida, ligou-se a bomba para transferir meio de cultura do Jerrycan para o interior do reator. Antes de encher o volume interno do Propella, interrompeu-se a alimentação, assepticamente desconectou-se a mangueira e protegeu-se a extremidade de contaminação. Assepticamente, conectou-se uma das extremidades de outra mangueira, também esterilizada, de menor comprimento, na tubulação de alimentação, e a outra extremidade, no recipiente que contém o inóculo. Ligou-se a bomba todo inóculo foi aspirado para dentro do reator. O fluxo foi interrompido, a mangueira que introduziu o inóculo foi desconectada e religou-se a mangueira de alimentação de meio de cultura, até completar o enchimento do reator, o que pode ser conferido quando começou a sair meio na mangueira de efluente. Para o período inicial em batelada, o sistema ficou funcionando com o rotor ligado, mas sem alimentação, ou seja: com a bomba desligada.

Após o período em batelada (16 h), no ensaio 1, ligou-se a alimentação, ajustou-se o rotor para o valor de rpm previamente calculado de modo a atender o regime de escoamento que se estabeleceu para o experimento. Neste trabalho o valor calculado foi 450 rpm e o regime hidráulico usado foi de escoamento

laminar. A vazão de alimentação foi medida (pelo efluente) e ajustada para o valor que atendesse ao tempo de residência de 10 h. O sistema ficou funcionando em contínuo pelo período de até 96 h. Nos tempos 24, 48 e 72 h os coupons foram retirados para serem visualizados por microscopia.

c) Retirada e substituição dos coupons

Para retirada de cada coupon, não foi necessário desmontar o sistema. Bastou parar a bomba de alimentação e usar uma válvula de registro e o extrator que acompanha o equipamento. Primeiro a válvula foi acoplada ao orifício de inserção de coupons, introduziu-se o extrator por meio da válvula (nesta hora é comum verter um pouco de líquido), girou-se o extrator até que fixasse no suporte de coupons e puxou-se com cuidado para fechar a válvula assim que o extrator passasse. Os coupons retirados foram acondicionados em tubos falcon esterilizados e sem atrito para não destruir os biofilmes formados. Com o processo inverso se repôs um novo coupon no local onde se retirou um coupon anteriormente. Neste manuseio com suspensão de esporos de organismos patogênicos como *Aspergillus fumigatus*, a retirada e substituição dos coupons foi feita com uso de equipamentos individuais de proteção (luvas, óculos, etc). Todas as vezes em que o meio com esporos/propágulos verteu ou esguichou, o local e a parte molhada foram devidamente desinfetados após a retirada dos coupons.

Após encerrar um ciclo, todo conteúdo foi drenado, o reator foi novamente limpo e desinfetado conforme procedimento já apresentado anteriormente.

3.7.6.6 Parâmetros dos ensaios no reator Propella

Todos os ensaios (Tabela 10) ocorreram em regime laminar, tentando se aproximar à situação real do regime hidráulico nos reservatórios. Exceto para o primeiro ensaio que iniciou com 16 h em batelada, com circuito fechado. O reator foi alimentado em contínuo, tempo de residência de 10 h e temperatura ambiente.

Tabela 10: Formação de biofilme em reator Propella- parâmetros dos testes

Teste	Meio de cultura (concentração)	Inóculo Suspensão de esporos	Agitação	Tempo (h)	Coloração ou hibridização
1 Biofilme mono- espécie em reator Propella	R2B (100%)	<i>A.fumigatus</i> 10 ⁵ /mL em R2B 100%	500 rpm	24	Calcofluor White
				48	
				72	
				96	
2 Biofilme mono- espécie em reator Propella	R2B (50%)	<i>A.fumigatus</i> 10 ⁵ /mL em R2B 50%	450rpm	24	Calcofluor White
				48	
4 Biofilme multi- espécie em reator Propella	R2B (50%)	<i>A.fumigatus</i> 5x10 ⁴ /mL em R2B 50% + <i>P. brevicom- pactum</i> 5x10 ⁴ /mL em R2B 50%	400 rpm	48	PNA-FISH Calcofluor White DNA-FISH
				72	
5 Biofilme multi- espécie em reator Propella	R2B (50%)	<i>A.fumigatus</i> 5x10 ⁴ /mL em R2B 50% + <i>P. brevicom- pactum</i> 5x10 ⁴ /mL em R2B 50% + <i>Pseudomonas reactans</i> 10 ⁵ /mL em R2B 50%	400 rpm	24	PNA-FISH DAPI
				48	

Fonte: Oliveira HMB, 2015.

3.7.7. Detecção *in situ* dos biofilmes

Todos os biofilmes desta pesquisa sejam os obtidos no laboratório, ou desenvolvidos nos amostradores instalados nos reservatórios, foram detectados *in situ*, pois os biofilmes não foram removidos das superfícies sobre a qual cresceram.

A detecção *in situ* foi feita por técnicas de fluorescência associando coloração com fluorocromos específicos como calcofluor White, FDA e Fun 1, além de hibridização fluorescente *in situ*-FISH com as sondas moleculares FUN 1429 (DNA-FISH) para fungos e a sonda Probe4Fumigatus (PNA-FISH) específica para *Aspergillus fumigatus*.

3.7.7.1. Fluorocromos:

a) Calcofluor White (CW)

O corante específico para DNA Calcofluor White MR2[®] (Molecular Probes Europe, Leiden, The Netherlands), foi utilizado na concentração 25 µM para visualização dos fungos tanto nos biofilmes da rede desenvolvidos nas placas de PVC dos amostradores, como em biofilmes desenvolvidos em laboratório nas placas de poços e no reator Propella. Os dados de volume aplicado, incubação e lavagem são resumidos na tabela 11:

Tabela 11 Corantes para visualização de biofilmes por microscopia de epifluorescência

Biofilme em	CW 25 µM	Incubação	Lavagem	Observação
Amostrador placa PVC	50 µL para 1 cm ²	No escuro por 15 min na temperatura ambiente	Água destilada esterilizada	Microscopia de epifluorescência excitação 358 nm, sinal obtido é azul
Placa de multipoços	30 µL por poço			
Cupons de PVC do reator Propella	50 µL por cupon			

Fonte: Oliveira HMB, 2015

b) FDA

Foram adicionados 30 µL de FDA (Sigma-Adrich, Sintra, Portugal) na concentração de 0,05 mg/L sobre os biofilmes (lavados e secos) nas placas de multipoços, e 50 µL nos biofilmes dos coupons do reator Propella. Em seguida incubou-se no escuro por 15 min à temperatura ambiente. Após incubação, os biofilmes foram para observação em microscópio de epifluorescência.

c) FUN 1.

Os biofilmes nas placas de multipoços da foram lavados com água destilada esterilizada e secos à temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 30 µL do corante sobre o biofilme e incubado no escuro por 30 minutos a 30 °C. Após este período, as amostras foram analisadas por microscopiade epifluorescência com fonte de excitação de 480 nm e sinal obtido verde/vermelho.

d)Dapi

Os biofilmes nos coupons PVC foram lavados com água destilada esterilizada e secos à temperatura ambiente. Foram adicionados 50 µL de DAPI 100 nM/L diretamente sobre os biofilmes por 30 min à temperatura ambiente. O comprimento de onda de excitação foi 340 e o sinal azul.

3.7.7.2 Sondas moleculares.

Para detecção visualização dos fungos nos biofilmes, pela técnica FISH foram utilizadas sondas moleculares DNA-FISH e PNA-FISH.

a) Sonda DNA-FISH FUN 1429

A sonda DNA-FISH FUN1429: 5'-GTGATGTACTCGCTGGCC-3' (MWG Biotech, Ebersberg – Germany) marcada com Oregon Green no terminal 5' é específica para Eumycota. Foi empregada para detecção *in situ* dos biofilmes de *P. brevicompactum* seguindo o protocolo adaptado de Nuovo (1997) utilizada por Siqueira et al. (2013). Resumidamente, biofilmes secos a 46 °C por 10 min foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 80% e 96%) por 10 min cada, intercaladas com secagens ao ar. Em seguida foi adicionada quantidade suficiente de tampão de hibridização de modo a cobrir a superfície do biofilme, mais 4µL de sonda FUN 1429 e foram homogeneizados com movimentos suaves. O restante do tampão de hibridização foi usado para saturar o ambiente onde vai ocorrer a hibridização (pode-se umedecer papel absorvente dentro de uma placa de Petri ou colocar um papel encharcado com a solução dentro de um dos poços na placa multipoços). A hibridização foi feita incubando os biofilmes nesta câmara por pelo menos 3 h a 46 °C. Após este tempo, os biofilmes foram lavados com tampão de lavagem (previamente aquecido) a 48 °C

e incubadas por 20 min. Em seguida, os biofilmes foram lavados suavemente com água e secos com ar comprimido e posteriormente observadas em microscopia de epifluorescência.

b) Sonda PNA para *Aspergillus fumigatus*.

Antes de se iniciar o protocolo, foi preparada a solução de lavagem PNA-FISH. Para biofilmes em placas de multipoços, a primeira etapa foi a preparação dos biofilmes. Inicialmente toda parte líquida foi aspirada, em seguida lavou-se com 600 µl de água destilada esterilizada (escoando lentamente pelas paredes com cuidado para não soltar o biofilme). Esta etapa objetivou retirar o que está frouxamente aderido. Depois a água foi aspirada com cuidado para não danificar o biofilme. A segunda etapa foi fixação: o biofilme foi seco à temperatura ambiente. Em seguida adicionou-se a solução 1 de fixação, suficiente para cobrir a superfície do poço (1 ou 2 gotas), por 10 min à temperatura ambiente. Para remoção do excesso de solução 1, emborcou-se a placa de multipoços sobre papel absorvente. Na terceira etapa, a hibridização: adicionou-se duas gotas de sonda PNA Probe4Fumigatus (Biomode, Braga, PT) sobre a superfície do biofilme e incubou-se no escuro a 55 °C por 60 ± 5 min. Colocou-se junto a solução de lavagem para pré-aquecer a 55°C. Passados os 60 min, adicionou-se 500 mL de solução de lavagem pré-aquecida e incubou-se no escuro por 30±5 min a 55 °C. Em seguida retirou-se solução de lavagem e secou-se a 55 °C.

Para os coupons do Propella, seguiu-se o mesmo protocolo, tendo como diferenças os volumes de solução de fixação 1 e 2 empregados - o suficiente para cobrir a parte côncava do coupon. O volume de sonda foram 2 gotas + duas gotas de solução extra de hibridização (fornecida à parte pelo fabricante) e o volume de solução de lavagem – o suficiente para encher a parte côncava do coupon). Após a secagem final os biofilmes puderam ser visualizados por microscopia de epifluorescência.

3.7.8 Microscopia de epifluorescência

As amostras de biofilmes desenvolvidos nas placas PVC dos amostradores, nas placas de multipoços ou nos coupons do reator Propella, coradas com fluorocromo ou hibridizadas com sondas, foram observadas em

microscópio de epifluorescência Olympus BX51, usando luz UV equipado com objetivas 20x/0,30 e filtros (EX 350-370, 470-490, 530-550 nm). As imagens foram adquiridas com câmera Zeiss AxioCam HRc utilizando o software CellB®. As placas de poços foram observadas no microscópio invertido Leica DMI 300.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RESULTADOS FÍSICO-QUÍMICOS

Os resultados das análises físico-químicas da água são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Resultados físico-químicos da água no período de coleta.

RESULTADOS FÍSICO-QUÍMICOS - VALORES MÁX E MÍNIMOS OBTIDOS NO PERÍODO DE COLETA								
Pontos de coleta →	ETA		RU*		EDF		HC*	
PARÂMETROS	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.	Max.	Min.
Cloro Residual mg/L	-	-	1,5	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0
Temperatura °C	28,0	26,4	27,6	26,5	27,2	26,6	27,5	26,3
pH	6,6	5,0	6,4	4,1	7,3	5,1	6,7	5,6
Turbidez UT	13,0	5,7	13,6	7,5	16,5	7,9	8,3	5,2
Condutividade mS/cm	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3
Oxigênio Dissolvido mg/L	12,3	5,4	13,2	9,2	12,6	8,1	18,2	8,2
Carbono Orgânico Total mg/L	3,6	2,8	4,2	2,8	4,2	2,9	4,0	3,7

ETA: Estação de tratamento de água; RU: Restaurante universitário; EDF: Núcleo de educação física e HC: Hospital das clínicas. -: significa que a cloração é feita após este ponto. *: significa que é feita uma cloração adicional manualmente.

Fonte: Oliveira HM, 2015.

4.1.1 Cloro residual

O teor de cloro residual variou de 0,0 a 1,5 mg/L. No reservatório da ETA não foi possível detectar cloro residual, porque a cloração final era aplicada na saída do reservatório, numa concentração de 2 mg/L. Como a amostra foi coletada no reservatório e não na rede de distribuição, não foi possível detectar cloro residual quando a cloração estava sendo aplicada. Devido a esta particularidade na cloração do sistema, só se pode detectar cloro no reservatório quando está sendo aplicada pré-cloração. Entretanto nos dias em que as amostras foram coletadas não estava sendo aplicada pré-cloração.

No reservatório EDF ocorreu ausência de cloro residual em todas as coletas (Tabela 12). Vários fatores podem ter contribuído para este resultado: desinfecção deficiente, incluindo o efeito de matéria particulada sobre o desinfetante residual. De fato este ponto de amostragem apresentou os maiores

valores de turbidez, variando de 7,9 a 16,5 UT (unidades de turbidez), os quais além de ultrapassarem o valor máximo permitido na norma de potabilidade Portaria 2914/2011, possivelmente contribuíram para diminuição do desinfetante.

As amostras dos pontos RU e HC apresentaram cloro residual em 25% das amostras. Estes pontos de reservação receberam aplicação manual de cloração suplementar. Entretanto este processo descontínuo pode não ter mantido constante o nível de residual desinfetante. Para tanto, quando as bombas não estavam funcionando adequadamente ou ocorria alguma falha no sistema, o procedimento adotado era de colocar uma solução de cloro diretamente na água. Para o RU, pastilhas de cloro foram também usadas buscando obter concentração de cloro residual entre 0,2 e 2,0 mg/L. No HC mesmo com cloração suplementar da água, não foi detectado cloro residual em 75% das amostras.

Valores de cloro residual entre 0,2 e 0,5 mg/L, em geral são considerados satisfatórios para desinfetar a água de organismos vivos livres (WHO, 2011). Entretanto, no presente trabalho, nenhum cloro residual foi obtido em 22 das 24 amostras coletadas para RU, EDF e HC.

No decorrer do experimento, diversas paralizações do sistema foram necessárias para diagnóstico e estudos de intervenções para elaboração de projeto de melhoria do sistema (2013-2014), e posteriormente para execução dos serviços (2015). Nas paralizações do sistema os poços foram bombeados diretamente na rede, sem passar pela ETA. De onde se conclui que a desinfecção nestes casos foi inexistente. Outras vezes a cloração aplicada mostrou-se ineficaz. A manutenção de cloro residual suficiente na rede de distribuição é difícil quando a água tem uma alta demanda de cloro que é causada pela presença de matéria orgânica e inorgânica como ferro, produtos de corrosão, etc. Uma estratégia para evitar a queda do teor de residual de cloro é aplicar cloração suplementar (SIMÕES; SIMÕES, 2013). A água do sistema em estudo tem como característica elevada concentração de ferro e também apresentou elevada turbidez que são fatores que contribuem para o decaimento da concentração de cloro residual.

Os fungos são mais resistentes ao cloro livre que as bactérias e vírus o que os torna menos susceptíveis à desinfecção pelo cloro (PEREIRA et al., 2013; MA et al., 2015). Entretanto Samon et al. (2010) demonstraram a eficácia de tratamentos como coagulação/floculação, filtros de areia, e cloração na remoção

de fungos da água bruta, mas salientam que poderá ocorrer recontaminação se uma cloração suplementar não for feita rotineiramente nos reservatórios para prevenir o crescimento dos fungos ou reduzir seus metabólitos.

4.1.2 Temperatura

As temperaturas medidas variaram de 26,4 a 28,0 °C nos pontos de coleta, apresentando os maiores valores no mês de janeiro/14. O valor médio ao longo do período de coleta foi 26,9 °C. Os fungos, na maior parte são mesófilos, apresentam uma temperatura ótima de crescimento em torno de 20-45 °C, uma temperatura mínima de 15-20 °C e uma temperatura máxima de 45 °C ou menos (COOKE; WHIPPS, 1993; CÔRTE-REAL; JOHANSSON; SARAIVA, 2010). Além de influenciar a taxa de crescimento, a temperatura também afeta direta ou indiretamente outros fatores que interferem no crescimento microbiano como, por exemplo, eficiência do tratamento e da desinfecção, dissipação do desinfetante residual, taxa de corrosão e hidráulica do sistema de distribuição (EPA-US, 1992). Os resultados demonstram que água do sistema apresentou temperatura no intervalo de temperatura ótima de crescimento, portanto favorável ao crescimento de fungos mesófilos.

4.1.3 Potencial hidrogeniônico – pH

Os valores de pH oscilaram entre 4,1 e 7,3 com média de 6,0. O maior valor ocorreu na cisterna EDF em setembro/13. Um percentual de 87,5 % dos pontos de coleta tinham água com pH abaixo de 7,0. Os fungos se desenvolvem na faixa de pH 2,5 – 9,0, sendo favorecidos em pH < 6,5. Em laboratório crescem melhor na faixa de pH de 5 a 7 (COOKE; WHIPPS, 1993; LESSARD; LE BIHAN, 2003; CÔRTE-REAL; JOHANSSON; SARAIVA, 2010). O pH predominantemente ácido durante todo experimento, de acordo com os autores mencionados, foi favorável ao crescimento de fungos.

O pH também influencia a desinfecção da água com cloro e seus derivados (hipoclorito ou isocianuratos clorados). A forma desinfetante de cloro mais ativa (o ácido hipocloroso) é função do pH e predomina em pH abaixo da neutralidade (MORATÓ et al., 2003). Deste modo os valores de pH que favorecem o

crescimento dos fungos, também favorecem a desinfecção, quando a mesma é aplicada sistematicamente.

A norma de potabilidade brasileira recomenda o valor de pH entre 6,0 e 9,5 para água de consumo humano (BRASIL- MS, 2011). Portanto o valor médio do pH durante o experimento, atendeu ao padrão de potabilidade. Entretanto, considerando-se valores mínimos individuais, não atendeu a recomendação da norma de potabilidade, mas esteve na faixa < 6,5 citados pelos autores como favorável ao desenvolvimento dos fungos.

4.1.4 Turbidez

Os teores de turbidez nos pontos de coleta variaram entre 5,2 e 16,5 UT (unidades de turbidez). No reservatório da ETA os valores oscilaram de 5,7 a 13,0 UT e estão em desacordo com padrão de potabilidade para águas subterrâneas pós filtração ou pré-desinfecção (1,0 UT). Nos demais pontos todos os teores de turbidez ultrapassaram o valor máximo de 5,0 UT permitido pela Norma de Potabilidade, para qualquer ponto da rede de distribuição (BRASIL- MS, 2011).

A turbidez além do aspecto estético tem uma conotação sanitária, porque representa material (partículas) em suspensão. Acumulação de sedimento e resíduos no sistema de abastecimento favorece o crescimento e protege os microrganismos contra desinfecção. Partículas orgânicas e inorgânicas abrigam os microrganismos que são assim transportados através do sistema, contribuindo para o aumento da demanda de cloro e interferindo negativamente na desinfecção (EPA-US, 1992).

Em todos os pontos de amostragem a turbidez da água esteve em desacordo com padrão de potabilidade para águas subterrâneas pós filtração ou pré-desinfecção (1,0 UT) - ETA e nos demais pontos a turbidez ultrapassou o valor máximo de 5,0 UT permitido pela Norma de Potabilidade, para qualquer ponto da rede de distribuição (BRASIL-MS, 2011). Assim a turbidez da água no sistema foi propícia ao crescimento dos fungos.

4.1.5 Condutividade

Os valores de condutividade elétrica da água variaram entre 0,26 e 0,42 mS/cm nos pontos de coleta, e os de sólidos totais dissolvidos de 0,17 a 0,27 g/L. A RESOLUÇÃO CONAMA 396 DE 2008, estabelece o limite máximo permissível de 1000 mg/L para águas subterrâneas destinadas ao consumo humano e a norma de potabilidade PORTARIA 2.914 de 12 de dezembro de 2011 estabelece o mesmo valor para água de consumo humano (CONAMA 2008). A condutividade da água do sistema atendeu às citadas normas.

4.1.6 Oxigênio dissolvido

Os teores de oxigênio dissolvido nas amostras oscilaram entre 5,38 e 18,23 mg/L com uma média de 11,7 mg/L. De acordo com Cooke e Whipps (1993), na natureza muitos fungos raramente encontram condições ideais de aeração durante seus ciclos de vida e a depleção de oxigênio é uma ocorrência em habitats aquáticos e ambientes fechados como madeira. Entretanto os resultados mostram que ocorreu disponibilidade de oxigênio dissolvido na água do sistema, possivelmente suprido pelo sistema de aeração.

4.1.7 Carbono orgânico total

As concentrações de carbono orgânico total variaram de 2,86 a 4,21 mg/L, com valor médio de 3,37 mg/L. Os teores mostraram-se ligeiramente maiores em março/13. Segundo Baird (2006) o carbono orgânico total é usado para caracterizar a matéria orgânica dissolvida e em suspensão em água natural, e o valor habitual para água subterrâneas é de aproximadamente 1 mg/L de carbono. Os resultados mostram que a água do sistema disponibilizou cerca de 3 a 4 vezes a concentração usual segundo este autor. Logo a fonte de carbono na água do sistema não foi limitante para o crescimento dos fungos. Gooddy e Hinsby, (2008), analisaram COT em mais de 400 amostras de água subterrânea de 8 países da União Europeia. Encontraram uma concentração média de 2,7 mg C/L com uma variação de 0,1 a 59,4 mg C/L.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

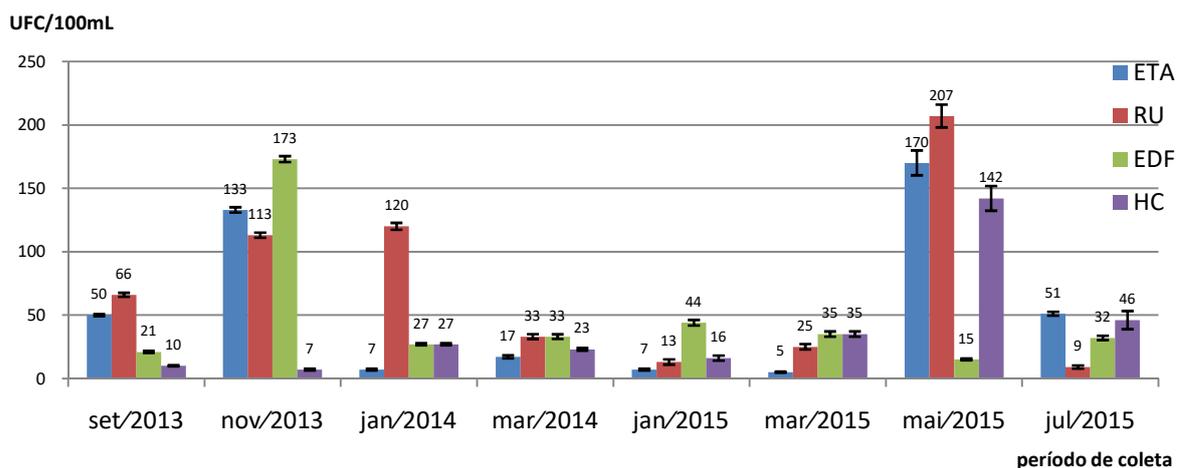
4.2.1 Quantificação dos fungos na água

A densidade dos fungos em UFC/100 mL em cada amostra foi calculada como a média da quantificação nos meios R2A e SDA para cada ponto de coleta. Todas as amostras foram positivas para fungos filamentosos. No total 1712 UFC/100 mL foram contadas.

Como apresentado no Gráfico 1, as contagens variaram de 5 a 207 CFU/100 mL, com uma média de 53 UFC/100 mL por ponto. A maior quantificação ocorreu no RU com 207 UFC/100 mL (mai/15), seguido por 173 UFC/100 mL em EDF (nov/13), ETA com 170 UFC/100 mL (nov/13 e mai/15) e HC com 142 UFC/100 mL (mai/15). O menor valor ocorreu no reservatório da ETA (mai/15) com 5 UFC/100 mL.

Tomando-se a legislação sueca de 100 UFC/100 mL de fungos em água como referência, 22% das amostras excederiam este limite. As amostras do RU com 207, 120 e 113 UFC/100 mL. A ETA excedeu por duas vezes com 170 e 133 UFC/100 mL. EDF e HC excederam uma vez, cada uma apresentando 173 e 142, respectivamente.

Gráfico 1 - Quantificação dos fungos da água em UFC/100mL



Fonte: Oliveira H.M, 2015.

Estudos da microbiota em água de consumo humano demonstraram que os fungos são relativamente comuns em sistemas de distribuição de água e,

algumas vezes podem ser isolados em concentrações elevadas (HAGESKAL et al., 2009). Na Polônia, Grabińska-Loniewska e colaboradores (2007), avaliaram a água do sistema que abastece a cidade de Warsaw e as contagens de fungos variaram de 20 a 500 UFC/100 mL, enquanto na Austrália as contagens foram 33 e 97 UFC/100 mL para água das canalizações e reservatório, respectivamente (SAMMON, et al., 2010). OTTONI et al. (2014), analisaram águas subterrâneas (mineral e de poço semiartesiano submetido à cloração) e em 40 % de amostras positivas para fungos filamentosos, a contagem variou de 01 a 100 UFC/100 mL. Na Governadoria Giza - Egito, Samah et al. analisaram fungos em águas subterrâneas e encontraram 4 a 119 UFC/100 mL enquanto em água subterrânea não tratada a contagem dos fungos foi 66 UFC/100 mL em média (PEREIRA et al., 2009). Consequentemente, muitos dos presentes valores para o Brasil, são muito altos e podem representar o risco para saúde dos consumidores.

Os fungos são menos susceptíveis ao tratamento que as bactérias. Evidências sugerem que os fungos sobrevivem e se multiplicam em sistemas de distribuição em biofilmes e sedimentos, particularmente águas mais quentes, ou onde o fluxo é restrito (KINSEY; PATERSON; KELLEY, 2003). Um aspecto importante a ser salientado é que no presente trabalho, estamos tratando com água reservada. Os reservatórios apresentam características típicas como ausência de luz, longo tempo de retenção e zonas de estagnação que favorecem a proliferação de microrganismos e formação de biofilme. Este último protege os microrganismos da desinfecção e pode ser responsável pela transferência de fungos (e outros microrganismos) para massa de água (SIQUEIRA et al., 2011.; WINGENDER; FLEMING, 2011). A qualidade físico-química da água, como as temperaturas, turbidez e disponibilidade de carbono orgânico total foram favoráveis ao crescimento dos fungos. Além disso a desinfecção mostrou-se deficiente ou algumas vezes inexistente, no presente sistema, devido às intervenções já mencionadas.

O reservatório do Hospital das Clínicas apresentou, com exceção da amostragem de mai/15 a mais baixa densidade de fungos (máximo de 46 e mínimo de 7/100 mL). Estes resultados podem ser atribuídos ao tratamento com aeração e filtração com carvão ativado que a água recebe antes de entrar no

reservatório, e à sistemática aplicação de cloro, que é feita no tanque, contribuindo assim para redução da população de fungos.

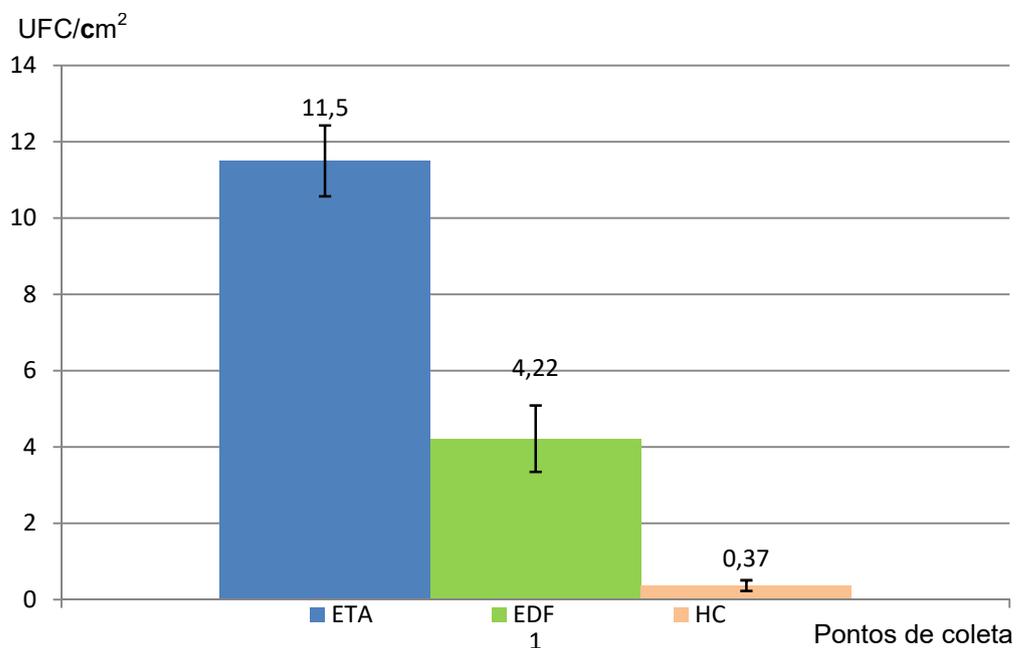
4.2.2 Quantificação dos fungos nos Biofilmes

Os biofilmes formados em amostradores MF e em amostradores PVC, foram quantificados em UFC por área de cada amostrador. Cada placa de amostrador PVC tem um área retangular de $3,1 \text{ cm}^2$ e cada amostrador MF tem uma área circular de $8,8 \text{ cm}^2$.

4.2.2.1 Quantificação dos biofilmes formados em amostradores PVC

Foram contadas 59 UFC em 18 placas de amostradores PVC de 3 pontos de amostragem (ETA, EDF e HC) de coleta única em jul/15 e a quantificação foi expressa em termos de densidade média em UFC/ cm^2 . A maior densidade - $11,5 \text{ UFC/ cm}^2$ ocorreu na ETA e a menor no ponto EDF com $0,37 \text{ UFC/ cm}^2$, como apresentados no Gráfico 2.

Gráfico 2 - Quantificação dos fungos nos amostradores PVC em UFC/ cm^2

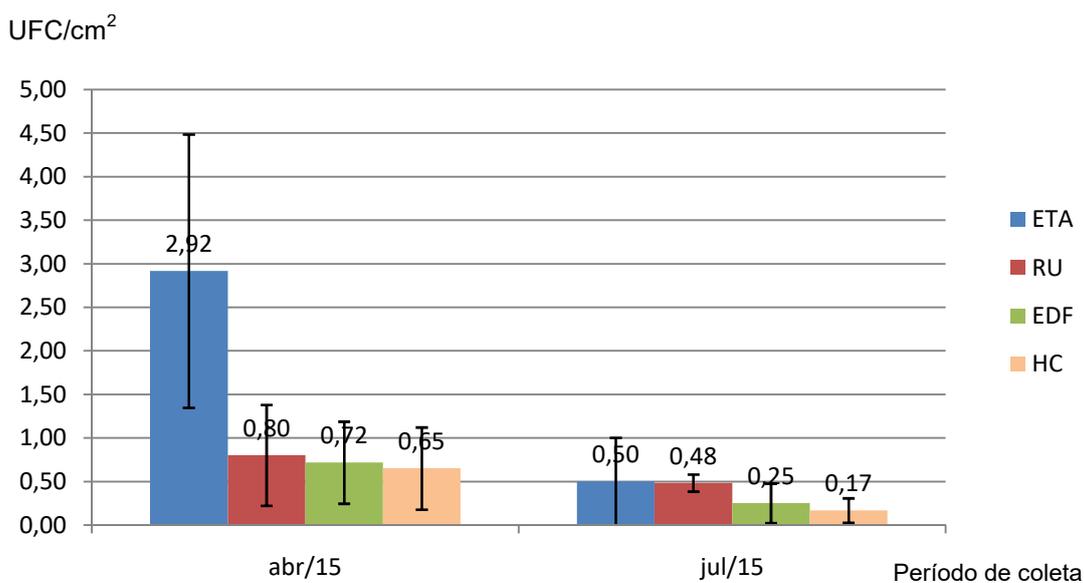


Fonte: Oliveira H.M, 2015.

4.2.2.2 Quantificação dos fungos em biofilmes formados nos amostradores MF

Ao todo foram contadas 341 UFC em 48 amostradores MF, cada um com 8.8 cm² de área circular, coletados em dois períodos: abr/15 e jul/15 equivalendo respectivamente a dois e cinco meses de imersão dos amostradores na água dos reservatórios. A quantificação foi expressa em UFC/ cm². A densidade total de fungos nos biofilmes, nos dois períodos, foi de 6,49 UFC/ cm², variando de 0,17 a 2,92 UFC/ cm² com valor médio de 0,81 UFC/ cm² por ponto de amostragem. Como se observa no Gráfico 3, a ETA mostrou a maior densidade em abr/15, enquanto no HC ocorreu a menor densidade em jul/15.

Gráfico 3 - Quantificação dos fungos nos amostradores MF em UFC/cm²



Fonte: Oliveira H.M, 2015.

Conforme apresentado nos Gráficos 2 e 3, os biofilmes formados no reservatório da ETA apresentaram as maiores densidades de fungos: 11,5 UFC/cm² na placa PVC e 2,92 UFC/cm² no amostrador MF.

Em todo experimento não foi detectado residual de cloro no reservatório da ETA o que, junto com outros fatores como temperatura, turbidez e disponibilidade

de nutrientes, podem ter influenciado as densidades dos fungos nos biofilmes terem sido maiores na ETA do que nos demais pontos.

Fazendo-se uma comparação com os fungos na água, curiosamente no período de formação dos biofilmes que antecederam a primeira coleta dos amostradores MF (jan a mar/15), os resultados dos fungos na água (ver Gráfico 1), não foram altos e particularmente a ETA apresentou as menores densidades de fungos planctônicos neste período (7 e 5 UFC/100 mL respectivamente). Isto comprova que a amostragem da água não é representativa dos fungos aderidos formando biofilmes e nos sedimentos, e que a comunidade dos biofilmes é muito diferente da planctônica (DOUTERELO; SHARPE; BOXAL, 2013; FISH; OSBORN; BOXAL; 2016).

Comparando ainda os gráficos 2 e 3, o ponto EDF teve uma densidade média próxima do menor valor em cada período e também apresentou condições de turbidez elevada, ausência de cloro e disponibilidade de nutrientes que favoreceram a formação de biofilmes. Contudo no 1º semestre/2015 houve uma operação de esvaziamento do reservatório para troca de tubulação de entrada e saída, submetendo os amostradores a um período de desidratação, que pode ter interferido na diminuição da densidade de fungos no biofilme, neste ponto. Contudo, o fato comprova a capacidade dos biofilmes sobreviverem, mesmo tendo ocorrido uma desidratação temporária; com a restauração das condições normais de água, nutrientes, etc os biofilmes conseguem se manterem. A matriz de EPS oferece proteção ao biofilme contra condições de estresse e uma das vantagens da vida em biofilmes é adquirir resistência a vários fatores adversos como estresse mecânico, agentes antimicrobiano, etc (SIMÕES; SIMÕES, 2013).

No HC ocorreram as menores densidades de fungos tanto nos biofilmes formados em placas PVC (Gráfico 2) como nas membranas dos amostradores MF (Gráfico 3). Neste reservatório, a água passava previamente por filtração com carvão ativado e a cloração foi mais freqüente. Este foi também o ponto de coleta que apresentou o menor valor de turbidez (Tabela 11) e, exceto por mai/15, baixas densidades de fungos na água durante o experimento (Gráfico1). A prevenção de acumulação de sedimento e manutenção de um nível suficiente de desinfetante residual são apontadas como medidas de prevenção e controle de biofilmes em sistemas de distribuição de água (SIMÕES; SIMÕES, 2013). Mesmo

tendo oferecido condições favoráveis à formação dos biofilmes, este ponto demonstrou que a vigilância mais intensa e aplicação suplementar sistemática de cloro contribuíram para redução dos fungos na água e nos biofilmes.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS FUNGOS

4.3.1 Identificação dos fungos na água

Entre os 859 fungos identificados, os gêneros mais abundantes foram *Aspergillus* (37%), *Penicillium* (25%), *Trichoderma* e *Fusarium* (9% cada), e *Curvularia* (5%). *Acremonium*, *Cladosporium*, *Cunninghamella*, *Humicola* and *Leptodontium* 1% e os demais menos que 1%. Os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Curvularia* e *Pestalotiopsis* foram detectados na água de todos os reservatórios.

A Tabela 13 mostra as espécies identificadas. Espécies como: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, complexo *Aspergillus niger* (incluindo *amawori* e *Aspergillus tubingensis*), *Aspergillus versicolor*, *Penicillium citrinum*, *Fusarium solani*; *Trichoderma harzianum*, *Curvularia pallescens* e *Pestalotiopsis karstenii* ocorreram em todos os reservatórios. Foram detectados em menor número: *Cladosporium cladosporioides*, *Lichtheimia hyalospora*, *Paecilomyces variotii*, *Ramichloridium matsushimae*, *Scolecobasidium humicola*, e *Talaromyces purpurogenus*.

Entre as espécies de *Aspergillus*, *A.flavus* teve a mais alta frequência relativa seguido do complexo *A Níger* e *A. parasiticus*. A espécie *P.citrinum* foi a mais abundante dentro do gênero *Penicillium*. Na ETA as espécies *A.flavus*, *P.citrinum*, e complexo *A Níger* tiveram as mais altas frequências relativas (Fr) com respectivamente 7,3%, 6,8% e 5,5%, o que pode ser atribuído à falta de cloração. O gênero *Penicillium* mostrou resiliência aos efeitos da cloração nos pontos de amostragem RU (Fr 5,7%) e HC (Fr 5,2%) quando comparado com ETA (Fr 6,8%). Em contraste, no ponto EDF sem cloro residual e com alta turbidez, que favorece o crescimento de fungos, *P.citrinum* teve Fr de 2,7%, o que pode ter ocorrido por influência de fatores externos que podem ter sido prejudiciais a esta espécie. Ainda em EDF onde a cloração foi ausente, *A. flavus* foi mais abundante (Fr 3,4%). No HC a maior frequência relativa foi de *Penicillium citrinum* (Fr 5,2%), seguido de *Fusarium solani* (Fr 4,5%); *Trichoderma harzianum*

(Fr 3,1%). Interessantemente, a espécie *A. fumigatus* (Fr 0,2%) ocorreu em três dos quatro pontos de amostragem: ETA, RU e HC .

Tabela 13 - Frequência relativa de distribuição dos fungos isolados da água nos pontos de amostragem

Ponto de amostragem	ETA	RU	EDF	HC
Especies	Frequência relativa (%)			
<i>Aspergillus alliaceus</i> Thom & Church	0.2	0.1	0.6	0.0
<i>Aspergillus chevaliere</i> Thom & Church		0.1		
<i>Aspergillus flavus</i> Link	7.3	0.1	3.4	2.7
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen	0.2	0.2	0.0	0.2
<i>Aspergillus neoniveus</i> Samson, Peterson, Frisvad & Varga			0,2	
<i>Aspergillus niger</i> Tiegh (complexo)	5.5	1.4	1.3	0.8
<i>Aspergillus violaceofuscus</i> Gasperini	0.0	0.0	0.2	0.0
<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare	1.7	1.6	1.9	0.7
<i>Aspergillus terreus</i> Thom	0.6	0.3	0.0	1.4
<i>Aspergillus versicolor</i> (Vuill) Tirab.	0.2	3.3	0.6	0.7
<i>Penicillium citrinum</i> Thom	6.8	5.7	2.7	5.2
<i>Penicillium corylophilum</i> Dierckx	0.0	0.0	0.0	0.2
<i>Penicillium janczewskii</i> K.M. Zaleski	0.0	0.9	0.0	0.5
<i>Penicillium janthinellum</i> Biourge	0.0	0.0	0.0	0.1
<i>Penicillium oxalicum</i> Currie e Thom	0.1	1.0	0.8	0.0
<i>Penicillium waksmanii</i> K.M. Zassleky	0.0	0.1	1.0	0.0
<i>Acremonium</i> Link	0.0	0.0	0.3	1.0
<i>Chaetomium</i> Kunze	0.2	0.0	0.0	0.0
<i>Cladosporium cladosporioides</i> Fresen.	0.0	0,9	0.0	0.1
<i>Cladosporium macrocarpum</i> Preuss	0.0	0.3	0.0	0.0
<i>Colletotrichum</i> Corda	0.0	0.1	0.0	0.0
<i>Cunninghamella</i> Matr.	0.0	0.9	0.2	0.0
<i>Curvularia pallescens</i> Boedijn	1.3	2.0	0.2	1.7
<i>Emericella nivea</i> B.J. Wiley e E.G. Simmons	0.0	0.0	0.2	0.0
<i>Fungo artrosporado</i>	0.7	0.7	0.2	0.5
<i>Fusarium solani</i> (Mart.) Sacc	0.7	2.2	1.4	4.5
<i>Humicola grisea</i> Traaen	0.0	0.0	0.6	0.0
<i>Humicola fuscoatra</i> Traaen	0.0	0.1	0.0	0.0
<i>Myrothecium</i> Tode	0.0	0.0	0.0	0.1
<i>Paecilomyces aerugineus</i> Samson	0.0	0.1	0.0	0.0
<i>Paecilomyces variotii</i> Bainier	0.0	0.3	0.0	0.0
<i>Pestalotiopsis karstenii</i> (Sacc. E P.Syd.) Stevaert	1.0	0.1	0.7	0.5
<i>Phaeoacremonium</i> W. Gams. Crous e M.J. Wingf	0.2	0.1	0.0	0.0
<i>Phialophora richardsiae</i> (Nannf.) Conant	0.1	0.0	0.0	0.0
<i>Phoma leveille.</i> Boerema e G.J. Bollen	0.0	0.0	0.0	0.1
<i>Ramichloridium matsushimae</i> de Hoog.	0.0	1.0	0.1	0.0
<i>Scolecobasidium humicola</i> G.L. Barron e Lév. Busch	0.0	0.0	0.1	0.0
<i>Talaromyces purpurogenus</i> Samson. Yilmaz. Frisvad e Seifert	0.0	0.0	0.1	0.0

<i>Trichoderma aureoviride</i> Rifai	0.0	0.0	0.7	0.0
<i>Trichoderma viride</i> Pers	0,0	0.0	1.4	0.0
<i>Verticillium</i> Nees	0.3	0.0	0.0	0.0

Fonte: Oliveira H.M, 2015.

A incidência de infecções nosocomiais tem crescido dramaticamente nas últimas décadas. O gênero *Aspergillus* é apontado como segunda causa de infecções nosocomiais fúngicas e pacientes imunocomprometidos têm sido afetados por aspergiloses (RICHARDSON; RICHARDSON, 2015; PERLROTH et al., 2007). Anaisse et al., (2002) recuperaram espécies *Aspergillus* do sistema de água de um hospital e demonstraram uma densidade maior de propagulos de fungos no ar ($2,95 \text{ UFC/m}^3$) dos banheiros onde se usou mais água do que nos quartos dos pacientes ($0,78 \cdot \text{UFC/m}^3$). Além disso eles relataram que a água dos tanques fornecem contagens superiores às da água do sistema municipal. Além disso, muitas áreas do mundo apresentam ampla distribuição de fungos em surpimentos de água (RICHARDSON; RICHARDSON, 2015). Cerca de 4,8 milhões de adultos que têm asma são também acometidos por aspergilose broncopulmonar alérgica (STEVENS, A. D. et al., 2003; DENNING; PLEUVRY; COLE, 2013).

Os resultados, no presente trabalho, mostram que a espécie *A. fumigatus* apareceu em três pontos de amostragem importantes: ETA, RU e HC. Este fungo é altamente significativo como patógeno causador de infecção fúngica em pacientes imunocomprometidos (RICHARDSON; RICHARDSON, 2015; WHITE, D. A. 2005). Entretanto, *A. fumigatus* foram recuperados em 49% das torneiras na unidade de transplante de medula óssea no Hospital Nacional na Universidade de Oslo, Noruega, e uma alta ocorrência desta espécie foi encontrada em poços domésticos no Brasil (RICHARDSON; RICHARDSON, 2015). *A. fumigatus* responde por 90% dos casos das infecções invasivas, enquanto *Fusarium* e zigomicetos são comuns entre as demais (PATERSON; LIMA, 2005; 2015).

Neste trabalho, em todos os pontos de amostragem ocorreram *A. flavus* e *A. parasiticus* e estas espécies são reconhecidas como produtoras de aflatoxinas. A produção de aflatoxina foi demonstrada em tanques de estoaxagem de água (PATERSON; KELLEY; GALLAGHER, 1997). Água armazenada em, reservatórios, cisternas e garrafas, por longos períodos, podem conter concentrações crescentes de micotoxinas. A longo prazo, o consumo diário de grande volumes

de água contendo baixas concentrações de micotoxinas, necessitam de futuras considerações em termos de riscos à saúde (HAGESKAL; LIMA; SKAAR, 2009; SKAAR; HAGESKAL, 2015; DEFRA, 2016)

Interessantemente, *P. citrinum* também ocorreu em todos os pontos de amostragem. Esta espécie produz a micotoxina citrinina e também é implicada como causa de micoses (PATERSON; LIMA, 2011). As outras espécies de *Penicillium* na Tabela 13 ainda não tem sido apontados como agente causador em micoses de humanos. Ma et al., (2015) analisaram um sistema de água quente de um hospital, com relação a fungos potencialmente patogênicos, usando sequenciamento de ITS e *Penicillium* foi o gênero mais abundante. Em geral estes fungos contribuem menos para doenças em humanos, com exceção de *Talaromyces marneffi* que provoca uma infecção sistêmica letal: a Peniciliose (PATERSON; LIMA, 2011). Por isso é conveniente e tão importante a identificação de *Penicillium* ao nível de espécie.

Fusarium e *Trichoderma* apresentaram a mesma abundância (9%) entre os fungos isolados e ocorreram em todos os pontos de coleta. *Fusarium* pode causar várias micoses oportunistas, tais como infecções subcutâneas e micoses invasivas em pacientes imunocomprometidos (MANIKANDAM, M. et al., 2011). *Fusarium solani* foi isolado com frequência das amostras e esta espécie está associada com a produção da toxina T-2 que é solúvel em água (DE LUCCA; WALSH, 2015). As espécies de *F. oxysporum* e o complexo *F. solani* são responsáveis por 80% das infecções humanas por *Fusarium* (O'DONNELL, K. et al., 2010). Estes fungos têm a capacidade para formar biofilmes em lentes de contato, como no caso dos surtos de queratite associadas ao uso de lentes de contato no sudeste da Ásia e na América do Norte que foram causadas por *Fusarium* spp (CHANG, et al., 2006).

Representantes do gênero *Trichoderma* tem sido mencionado como patógenos emergentes geralmente associados a fatores de risco como transplantes de órgãos, diálise peritoneal e distúrbios hematológicos. Algumas espécies tais como *Trichoderma longibrachiatum*, que é apontado como o principal patógeno deste gênero para humanos. Além disso *T. atroviride*, *T. citrinoviride*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. orientale*, *T. pseudokoningii*, *T. reesei*, e *T. viride* estão relacionados com infecções tais como, sinusites alérgicas, keratites, otites, peritonites, endocardites, infecções superficiais e subcutâneas,

abcesso cerebral e infecção pulmonar profunda (SANDOVAL-DENIS, et al., 2014; KUBICEK; DRUZHININA; 2015).

Ramichloridium matsushimae ocorreu em baixa percentagem. Este fungo é uma levedura negra, termo empregado para um grupo de fungos melanizados que exibem estado leveduriforme, especialmente em cultura. Este grupo inclui patógenos oportunistas para o homem (WEBSTER; WEBER; 2007).

4.3.2 Identificação dos fungos nos Biofilmes formados nos amostradores

4.3.2.1 Identificação dos fungos em biofilmes nos amostradores PVC

Dos fungos isolados dos biofilmes formados nos amostradores PVC, 55 foram identificados ao nível de espécie. Os gêneros mais abundantes foram: *Pestalotiopsis* (29%), seguido de *Fusarium* (24%), *Penicillium* (16%), *Curvularia* (15%) e *Trichoderma* (13%). O gênero *Aspergillus* com (4%) foi o menos abundante.

4.3.2.2 Identificação dos fungos em biofilmes formados nos amostradores MF

Foram identificados 323 dos fungos dos biofilmes formados nos amostradores MF. *Fusarium* foi o gênero mais abundante (58%), seguido de *Trichoderma* (17%), *Aspergillus* (16%). *Penicillium*, *Cladosporium*, *Acremonium* e *Curvularia* foram menos abundantes com (4%, 2%, 1,5% e 0,6% respectivamente).

Considerando os fungos nos biofilmes dos amostradores PVC e MF (Tabela 14), os gêneros *Fusarium*, *Trichoderma*, foram comuns aos dois tipos de amostradores figurando entre os mais abundantes. *Aspergillus*, *Penicillium* e *Curvularia*, alternam como mais abundantes num tipo de amostrador e menos abundantes no outro. Entretanto estes gêneros ocorreram como mais abundantes na água e estão presentes aderidos e colonizando biofilmes dos reservatórios. Como já mencionado, representantes destes gêneros são reconhecidos como patógenos oportunistas, alergênicos e produtores de micotoxinas, os resultados confirmam um fato já reconhecido: os biofilmes servem de reservatório de patógenos incluindo fungos e fonte de contaminação (HAGESKAL, et al., 2009; SIQUEIRA, et al., 2013).

Curiosamente o gênero *Pestalotiopsis* figurou como mais abundante e ocorreu em todos os pontos de coleta que receberam amostradores PVC (ETA, EDF e HC). *Pestalotiopsis spp* é um fungo filamentoso conhecido como Patógeno de planta e também ocorre como edofítico. Responsável por perdas econômicas, causando doenças e redução na produção de maçã, mirtilo, coco, castanha, gengibre, videira, goiaba, avelã, lichia, mangueira, orquídea, pêssigo, etc.(MAHARACHCHIKUMBURA, et al., 2013, 2014). Várias espécies tem sido recuperada de solo, águas correntes poluídas, madeira, efluentes de fabricas de papel etc. Algumas espécies tem sido associadas a infecções de humanos e de animais (SUTTON, 1999; MONDEN et al., 2013)

Tabela 14 - Frequência relativa de distribuição dos fungos dos biofilmes em amostradores PVC e MF nos pontos de amostragem

Pontos de amostragem	ETA		RU		EDF		HC		
	PVC	MF	PVC*	MF	PVC	MF	PVC	MF	
Tipo de Amostrador		Frequência relativa (%)							
Especies		Frequência relativa (%)							
<i>Acremonium</i> Link				-	2,2				
<i>Aspergillus flavus</i> Link				-	3,4	2,5		2,2	
<i>Aspergillus neoniveus</i> Samson, Peterson, Frissvad & Varga				-	0,6				
<i>Aspergillus parasiticus</i> Speare				-	1,2	1,2		2,9	
<i>Aspergillus fumigatus</i> Fresen			0,3	-				1,8	
<i>Aspergillus Niger</i> Tiegh (ccomplexo)				-				1,8	2,8
<i>Cladoporium cladosporioides</i> Fresen				-	1,5				
<i>Curvularia pallescens</i> Boedijn		9,1		-		3,6		1,8	
<i>Curvularia lunata</i> Wakker, Boedijn				-	0,6				
<i>Fusarium Solani</i> Mart, Sacc		10,9	52	-		7,3	5,6		
<i>Fusarium lateritium</i> Nees		5,5		-	0,3				
<i>Mucor SSP</i> Fresen				-	0,3				
<i>Penicillium citrinum</i> Thom		12,7		-	0,9	1,2		2,2	
<i>Penicillium jankzewskii</i> K.M. Zaleski		3,6		-					
<i>Pestalotiopsis karstenii</i> Sacc. E. P. Syd., Stevaert.		12,7		-		12,7		3,6	
<i>Trichoderma aureoviride</i> Rifai				-		4,0		3,7	
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai		10,9	2,2	-	7,1			1,8	

*Não houve amostrador PVC no RU

Fonte: Oliveira H.M, 2015.

Fusarium solani foi a espécie mais abundante nos biofilmes, mostrou a habilidade de aderir tanto em placas de PVC como nas membranas do amostrador MF. Ocorreu na ETA com a maior frequência relativa (52% no PVC e

10,9% no MF) e EDF (7,3% no PVC e 5,6% no MF). Uma vez que esteve também presente na água em todos os pontos de coleta (Tabela 14), não é surpreendente que ocorra nos biofilmes desenvolvidos nos amostradores imersos nos reservatórios.

Fusarium spp é abundante no solo como saprófita, mutualista, parasita de plantas e animais, dentro de habitações e em ambientea aquáticos. Muitas espécies de *Fusarium* formam complexos, como é o caso de *F. solani* e *F. oxysporum*, responsáveis por 80% das fusarioses me humanos. Nos sistemas de água, espécies de formam biofilmes em canalizações de PVC (cloreto de polivnil). *Fusarium* forma biofilmes em lentes de contato e a água do sistema de encanamento foi apontada como principal reservatório ambiental para infecções de olhos por *Fusarium* (SHORT, et al., 2011).

Penicillium ocorreu em todos os pontos de coleta, tanto nos amostradores PVC quanto MF, *P. citrinum* compartilha o mesmo valor (12,7 %) de freqüência relativa que *Pestalotiopsis karstenii*.

O gênero *Trichoderma*, aqui representado pelas espécies *T. aureoviride* e *T. harzianum*, ocorreu em todos os pontos de amostragem. *T. harzianum* foi o mais freqüente. Esse fungo normalmente encontrado no solo e folhas em decomposição mas também causam infecções no homem e em animais. A maioria de infecções de *Trichoderma* em humanos é ausada por *Trichoderma longibrachiatum* mas outras espécies incluindo *T. harzianum*, detectado neste trabalho são citadas mais ocasionalmente como causas de doenças em humanos (Denis, et al., 2014).

4.5 DETECÇÃO *IN SITU* DOS FUNGOS NOS BIOFILMES

4.5.1 Biofilmes em placa multipoços

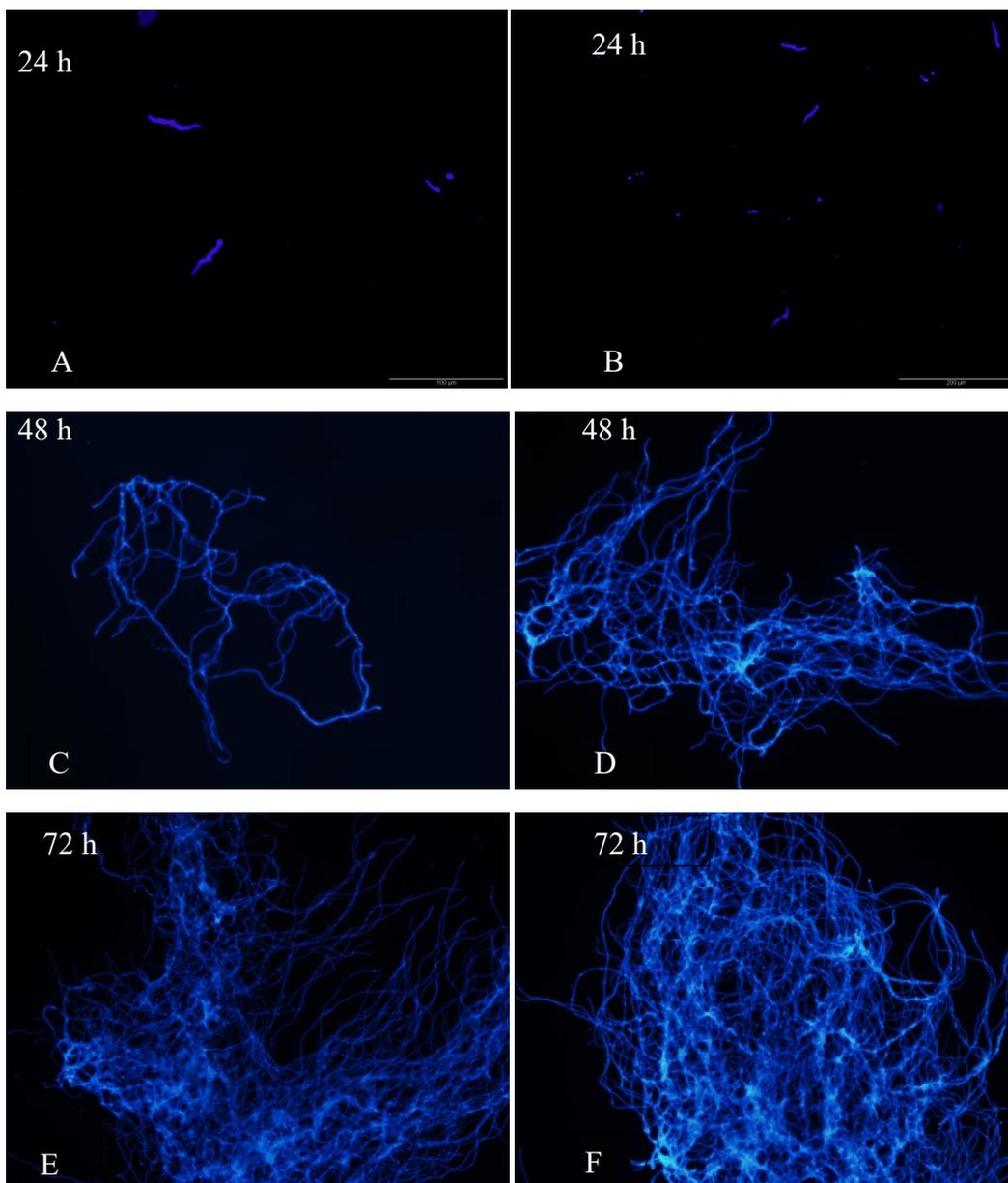
4.5.1.1 Teste 1

Foi detectado, *in situ*, o biofilme de *A. fumigatus* com inóculo de 10^5 /mL em R2B, formado em placa multipoços, nos tempos 24, 48 e 72 h, após coloração com CW (Figura 8).

Numa análise qualitativa das imagens de epifluorescência percebe-se que em placas de multipoços a cinética de formação do biofilme exhibe fase inicial de

adesão e germinação dos esporos em 24 h, desenvolvimento e ramificação do micélio expansão em 48 h, espessamento do micélio formando aglomerados maiores e consolidação do biofilme em 72 h.

Figura 8 - Detecção de biofilme em placa de multipoços. Teste 1: Biofilme de *Aspergillus fumigatus* - após coloração com CW (A e B) - 24 h, germinação de esporos. (C e D) - 48 h, expansão do micélio. Na (Figura 9 E e F) - 72 h, espessamento do micélio, biofilme estabelecido.



Fonte: Oliveira H.M, 2015.

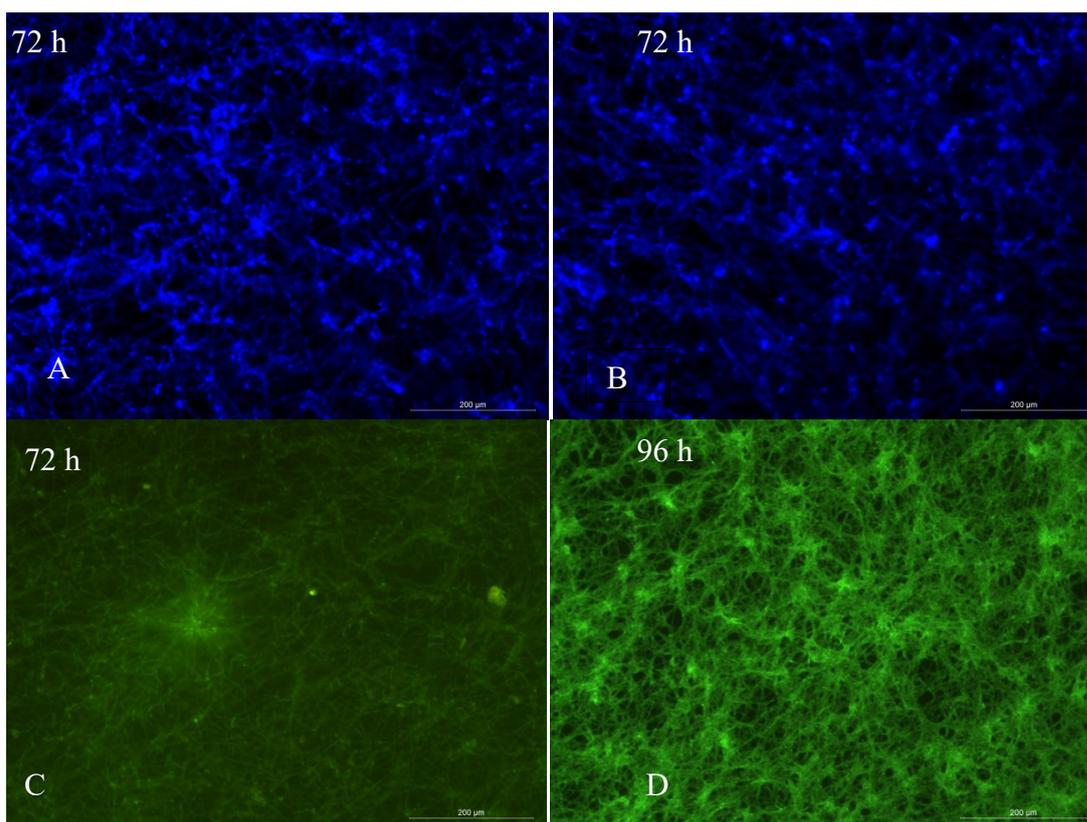
Os resultados mostram que em placas de poços o biofilme monoespécie de *A. fumigatus* se estabelece plenamente em 72h. Entretanto deve-se levar em consideração que o meio de cultura R2A apesar de ter baixo teor de nutrientes, ainda é bastante rico em relação à água potável que em tese, é muito pobre em

nutrientes. Por esta razão nos testes seguintes usou-se R2A com concentração reduzida em 50%.

4.5.1.2 Teste 2

Detectou-se biofilme de *A. fumigatus* 10^5 /mL de R2B 50%, formado em placa multipoços, nos tempos 72 e 96 h, após coloração com CW, a viabilidade foi comprovada com FDA (Figura 10). As imagens de microscopia de epifluorescência após coloração com CW (Figura 10 A e B) mostraram biofilme de *A. fumigatus* bem estabelecido nas 72 h, mesmo com a fonte de nutrientes reduzidas para 50% da concentração normal, as células se apresentam viáveis como evidenciado pela fluorescência verde do FDA (Figura 10 C e D).

Figura 9 - Detecção de biofilme em placa de multipoços. Teste 2: Biofilme de *A. fumigatus* 10^5 /mL em R2B 50% – após coloração com CW. (A e B) – biofilme de 72 h corado com CW. Em (C) – biofilme de 72h e D - biofilme de 96 h ambos corados com corante de viabilidade FDA.

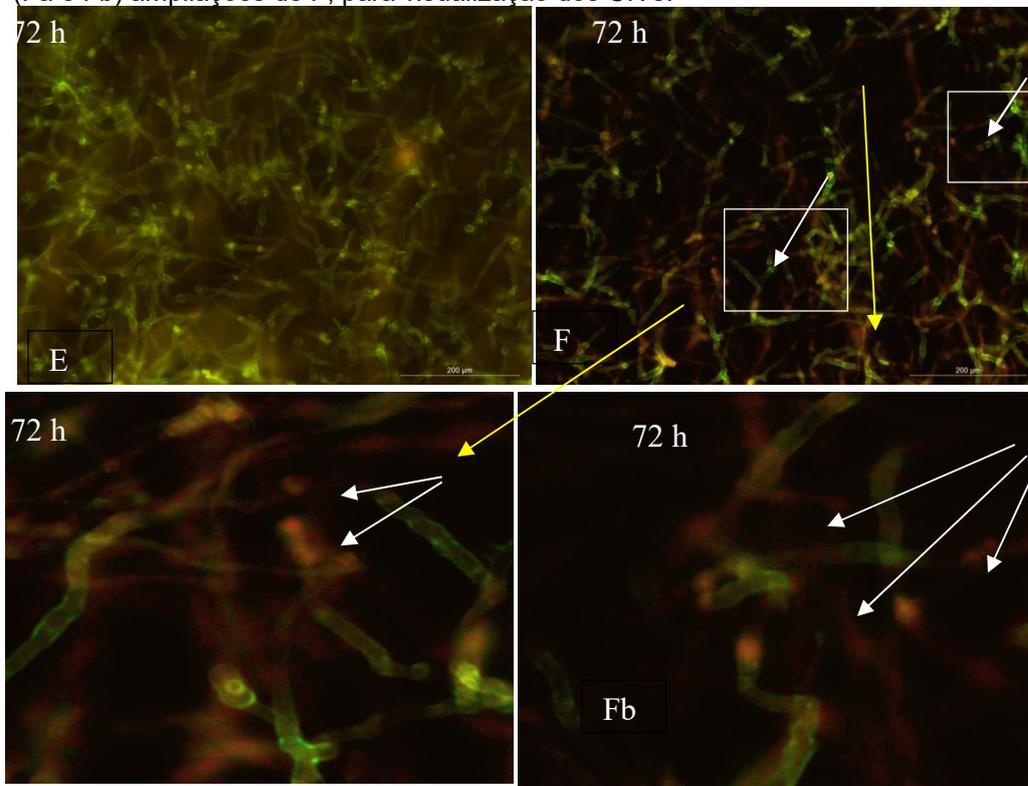


Fonte: Oliveira H.M, 2015.

A atividade metabólica foi verificada com Fun1 (Figura 11), A coloração com Fun 1 (Figura 11 E e F) confirmou pela imagem das estruturas cilíndricas intravacuolares - CIV's (Figura 11 Fa e Fb) que o biofilme exibiu atividade

metabólica mesmo em baixa disponibilidade de nutrientes como é típico dos sistemas de água de consumo humano.

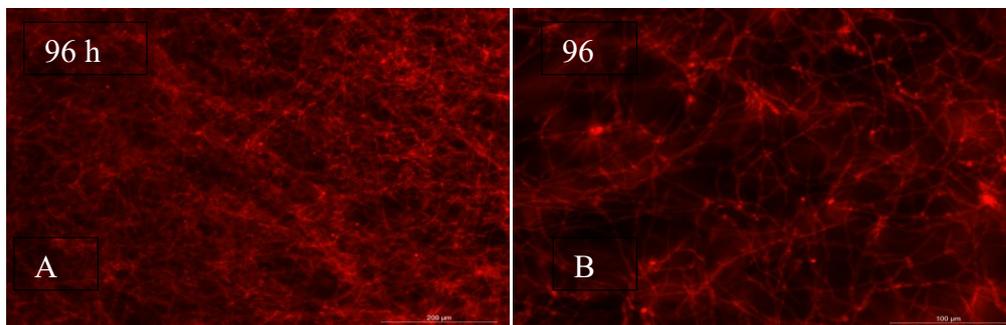
Figura 10: Detecção *in situ* de biofilme em placa de multipoços. Teste 2 :Biofilme de *A. fumigatus*: $10^5/L$ em R2B 50%, com 72 h. (E e F) - biofilme após coloração com corante de atividade FUN 1. (Fa e Fb) ampliações de F, para visualização dos CIVs.



Fonte: Oliveira H.M, 2015.

O biofilme monoespécie de *A. fumigatus* $10^5/mL$ em R2B 50%, de 96 h formado em placa de multipoços foi testado *in situ* com sonda PNA FISH probe4 *Fumigatus* específica para *A. fumigatus*. A sonda hibridizou bem, os micélios foram visualizados exibindo fluorescência vermelha típica da sonda, mostrando a adequabilidade e sensibilidade da sonda PNA-FSH na detecção *in situ* de *A. fumigatus* em biofilme formados nas placas de multipoços (Figura 11 A e B).

Figura 11 - Detecção *in situ* de biofilme em placa de multipoços. Teste 2 :Biofilme de 96 h *A. fumigatus* 10^5 /mL em R2B 50%. A e B - após hibridização com a sonda PNA-FISH - probe4 Fumigatus.



Fonte: Oliveira H.M, 2015

.4.5.1.3 Teste 3

A formação do biofilme misto de *A. fumigatus* + *P. brevicompactum*, concentração dos esporos $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1} + 5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$, em meio R2B 50%, de 16 h, em placa de multipoços foi detectada com sonda PNA-FISH probe4Fumigatus + CW. A Hibridização *in situ* do biofilme, com sonda PNA-FISH, permitiu distinguir os filamentos de *A. fumigatus* das estruturas do *P. brevicompactum* por diferenciação entre o que estava corado em azul e não estava correspondentemente corado em vermelho. Pois o CW corou ambos *A. fumigatus* e *P. brevicompactum* com fluorescência azul, enquanto só *A. fumigatus* fluoresceu em vermelho típico da sonda PNA-FISH. Deste modo estruturas coradas em azul sem imagem correspondente em vermelho, foram do *Penicillium brevicompactum* (Figuras 12 e 13).

Figura 12 - Detecção *in situ* de biofilme em placa de multipoços. Teste 3 Biofilme de 16 h *A. fumigatus* + *P. brevicompactum*, 10^5 /mL em R2B 50%. Um mesmo campo fotografado com filtro azul para calcofluor White (A) e com filtro verde para fluorescência vermelha (B) - após hibridização com a sonda PNA-FISH probe4 Fumigatus. Sobreposição das imagens (A+B)

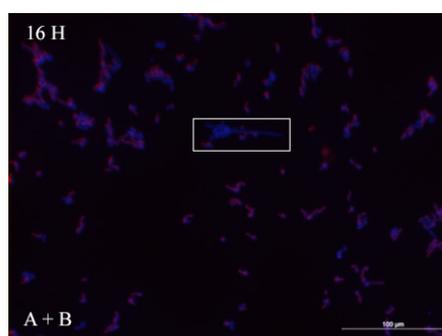
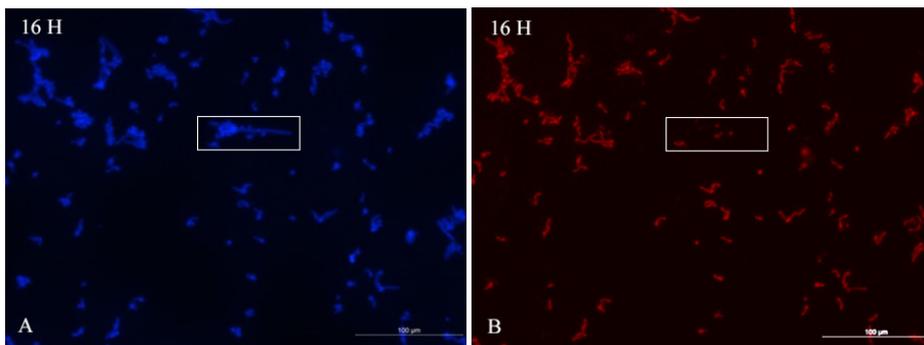
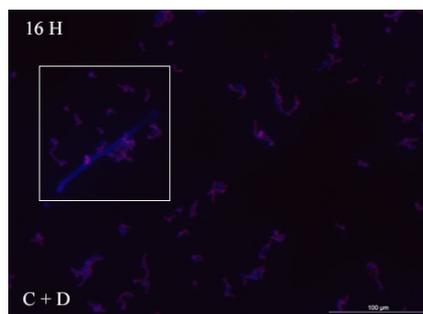
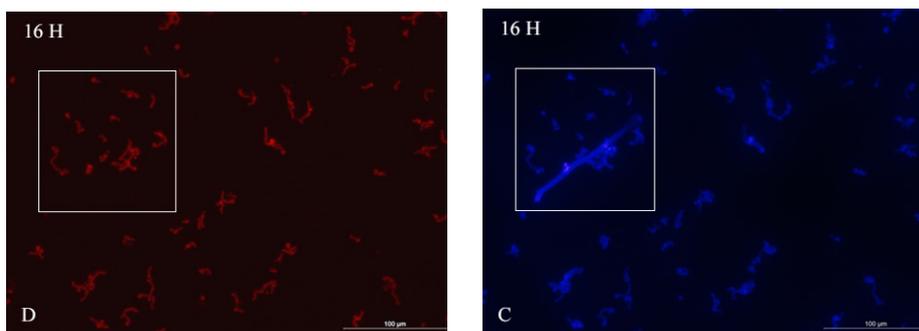


Figura 13 - Detecção *in situ* de biofilme em placa de multipoços. Teste 3 Biofilme de 16 h *A. fumigatus* + *P. brevicompactum*, 10^5 /mL em R2B 50%. Um mesmo campo fotografado com filtro azul para calcofluor White (C) e com filtro verde para fluorescência vermelha (D)- após hibridização com a sonda PNA-FISH probe4 Fumigatus. Sobreposição das imagens (C+D)



Fonte: Oliveira, H.M, 2015

Nas imagens as estruturas destacadas pelo retângulo exibem fluorescência azul do CW (Figura 12 A e C) e não apresentam imagem correspondente no mesmo campo com fluorescência vermelha da sonda PNA FISH específica para *A. fumigatus*.

Na sobreposição (A+B) e (C+D) é possível distinguir a estrutura corada só em azul (*P. brevicompactum*), enquanto as de *A. fumigatus* aparecem em tom lilás, resultante da sobreposição do azul com vermelho. representando o *A. fumigaatus* único que se cora em azul (CW) e vermelho da sonda PNA-FISH probe4 Fumigatus.. O *P. brevicompactum* cora só em azul pois não tem RNAr alvo pra sonda PNA-FISH. Conclui-se que a estrutura (morfologicamente semelhante a um conidióforo em A e uma estipe em C) é do *P. brevicompactum*.

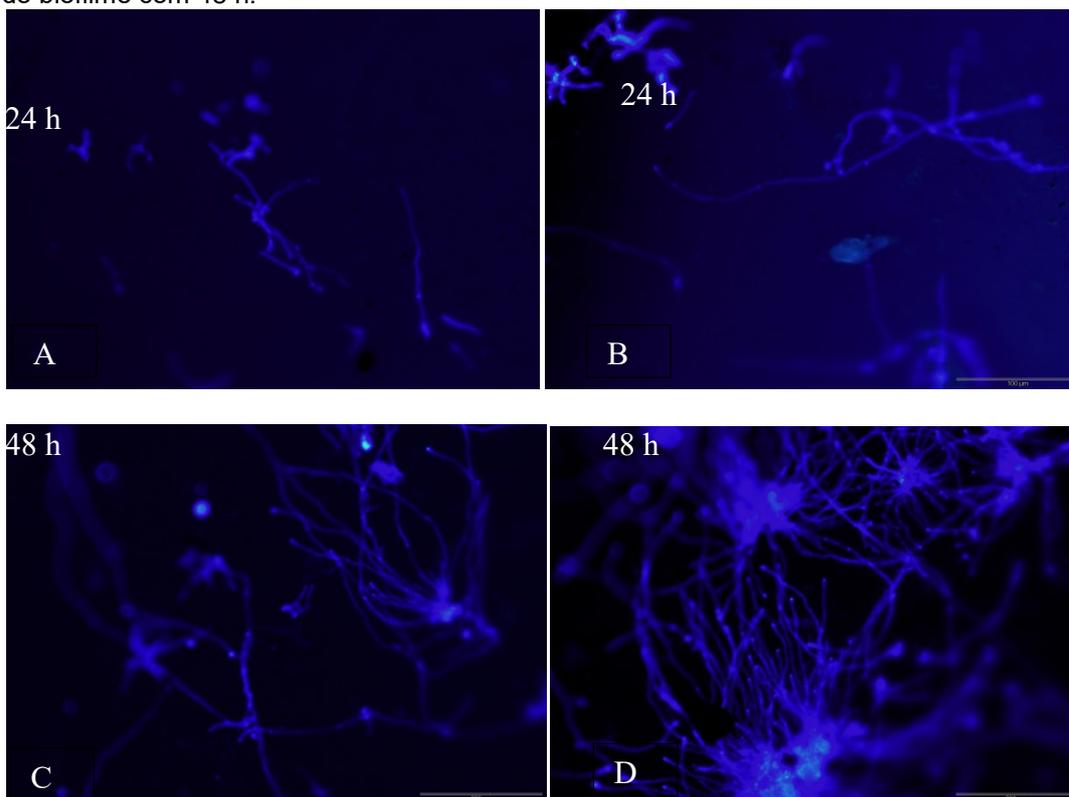
Na sobreposição das imagens (A+B e C+D) pode-se notar a predominância de estruturas de *Aspergillus fumigatus* com fluorescência simultânea em vermelho e azul. Tem-se em aberto aqui, uma questão a investigar: se há predominância de germinação do *Aspergillus fumigatus* quando inoculado junto *P. brevicompactum* ou algum mecanismo diferencial na adesão de modo que o *P. brevicompactum* praticamente não participou do biofilme formado na placa de poços nas condições do teste.

4.5.2 Biofilmes em reator propella

4.5.2.1. Ensaio1

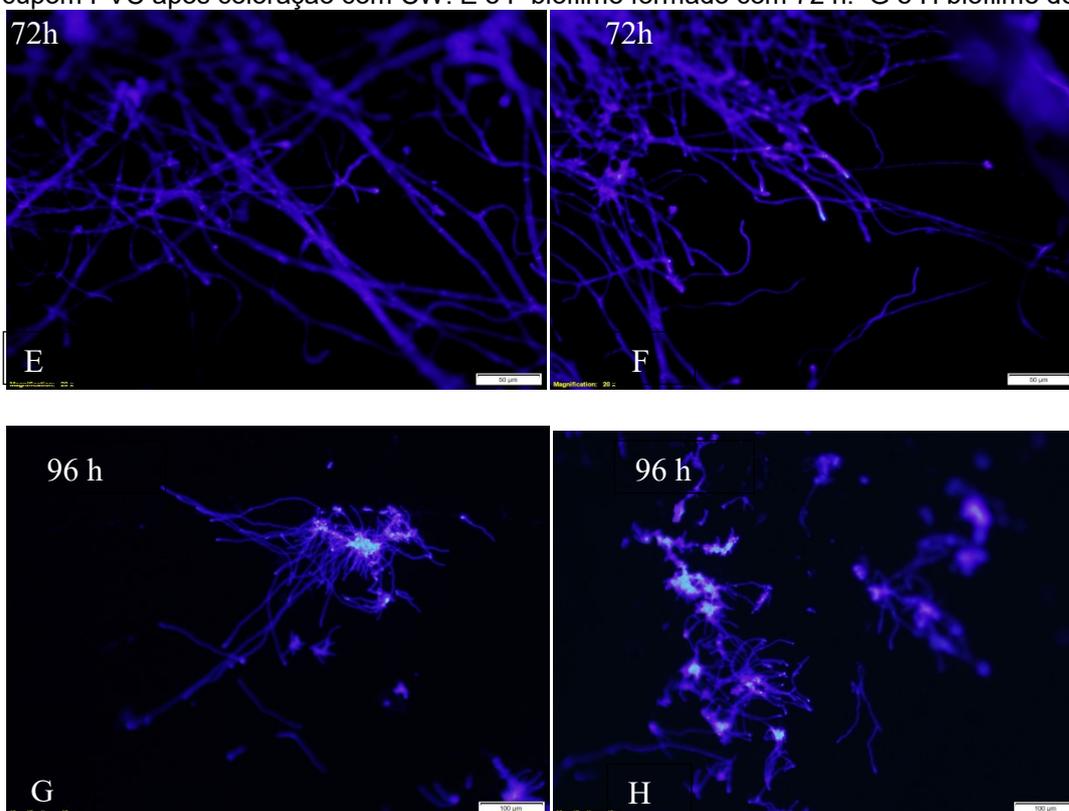
No ensaio de formação de biofilme em reator Propella, com inóculo *A. fumigatus* 1×10^5 esporos por mL, duração 96 h dias, meio R2B, 500 rpm. Inciou-se em batelada (circuito fechado) nas primeiras 16 h e depois em contínuo. O biofilme foi detectado *in situ* com Calcofluor White (Figura 14 e 15).

Figura 14- Detecção *in situ* de biofilme no reator Propella. Ensaio 1: Biofilme de *A. fumigatus* em cupom PVC após coloração com CW. A e B estágio inicial germinação com 24 h. C e D expansão do biofilme com 48 h.



Fonte: Oliveira H.M, 2015.

Figura 15- Detecção *in situ* de biofilme no reator Propella. Ensaio 1: Biofilme de *A. fumigatus* em cupom PVC após coloração com CW. E e F biofilme formado com 72 h. G e H biofilme de 96 h.



Fonte: Oliveira H.M, 2015.

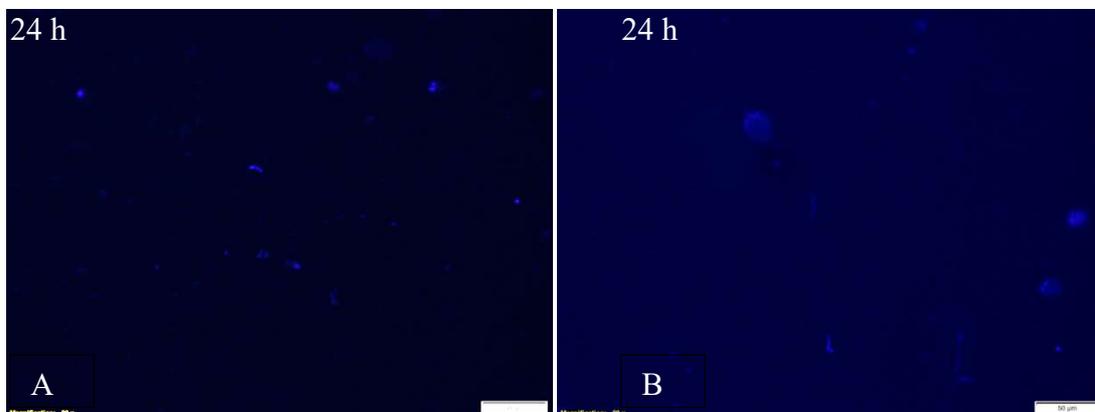
Numa análise qualitativa da cinética inicial de formação do biofilme por *A. fumigatus* em R2B, com base nas imagens vê-se o estágio inicial de germinação e alguma filamentação nas 24 h (Figura 14 A e B), com expansão do micélio em 48 h (Figura 14 C e D) e mais pronunciada até 72 h (Figura 14 E e F) com biofilme formado. Nas 96 h (Figura 14 G e H) visualmente a expansão parece menos pronunciada comparativamente ao intervalo 24-48 h pois não evidencia uma camada contínua como a que se formou em placas de poços no mesmo tempo de formação (96h). As imagens confirmam a habilidade do *A. fumigatus* para formar biofilmes em condições próximas às do sistema de abastecimento de água, exceto pela maior disponibilidade de nutriente, nas condições acima descritas. Vale salientar que neste ensaio a concentração do R2B está em 100% e portanto um teor de nutriente superior ao da água. O biofilme em formação mostrou expansão pronunciada nas 72 h, entretando no tempo seguinte (96 h), não houve avanço significativo na formação de uma camada consistente e contínua de micélio, como ocorreu no caso das placas de poços. Podendo-se supor que a expansão não foi acompanhada de correspondente adesão e enredamento das hifas.

4.5.2.2. Ensaio 2

Formação de biofilme em reator Propella, com inóculo *A. fumigatus* 1×10^5 esporos por mL, meio R2B concentração 50%, duração 72 e 96 h 450 rpm. A detecção *in situ* com CW (Figura 16 e 17) e microscopia de epifluorescência, permitiu uma análise qualitativa da cinética inicial de formação dos biofilmes por *A. fumigatus* em R2B 50%. As imagens de mostraram neste ensaio, que a germinação foi escassa nas 24 h (Figura 16 A e B). Observam-se pouquíssimas estruturas que sugerem esporos iniciando germinação, praticamente ausentes. Não foi evidenciado o desenvolvimento micelial nas 48 h (Figura 17 A e B). Obsevou-se que com redução de 50% nos nutrientes e sem bateladas, a formação do biofilme não se consolidou para este tempo e condições de ensaio. Este ensaio foi em contínuo e a retirada de um período inicial em batelada pode ter interferido negativamente na adesão inicial. Com a redução de nutriente é possível que os fenômenos de formação do biofilme necessitem de um prazo

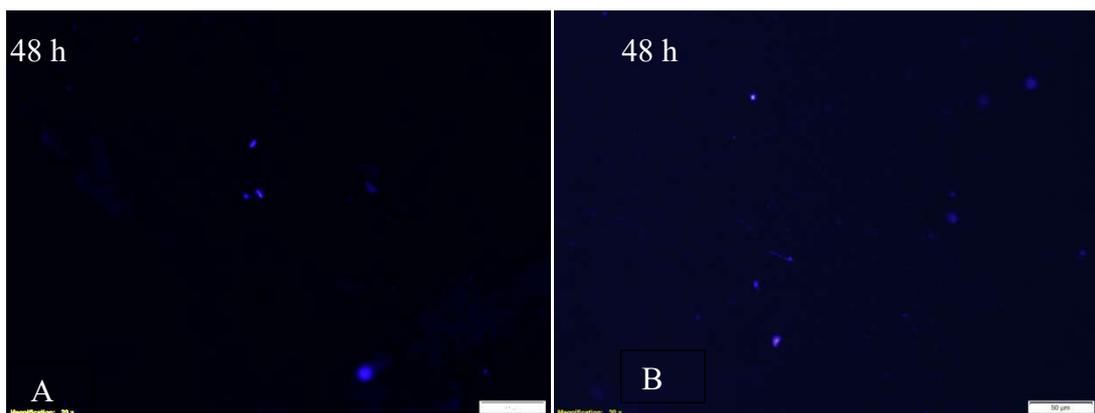
maior para se acontecer. Não houve formação de biofilme para o tempo e condições deste ensaio.

Figura 16 - Detecção *in situ* de biofilme no reator Propella. Ensaio 2: Biofilme de *A. fumigatus* em cupom PVC após coloração com CW. A e B cupom com 24 h,



Fonte: Oliveira H.M, 2015.

Figura 17 - Detecção *in situ* de biofilme no reator Propella. Ensaio 2: Biofilme de *A. fumigatus* em cupom PVC após coloração com CW. A e B cupom com 48 h,



Fonte: Oliveira H.M, 2015.

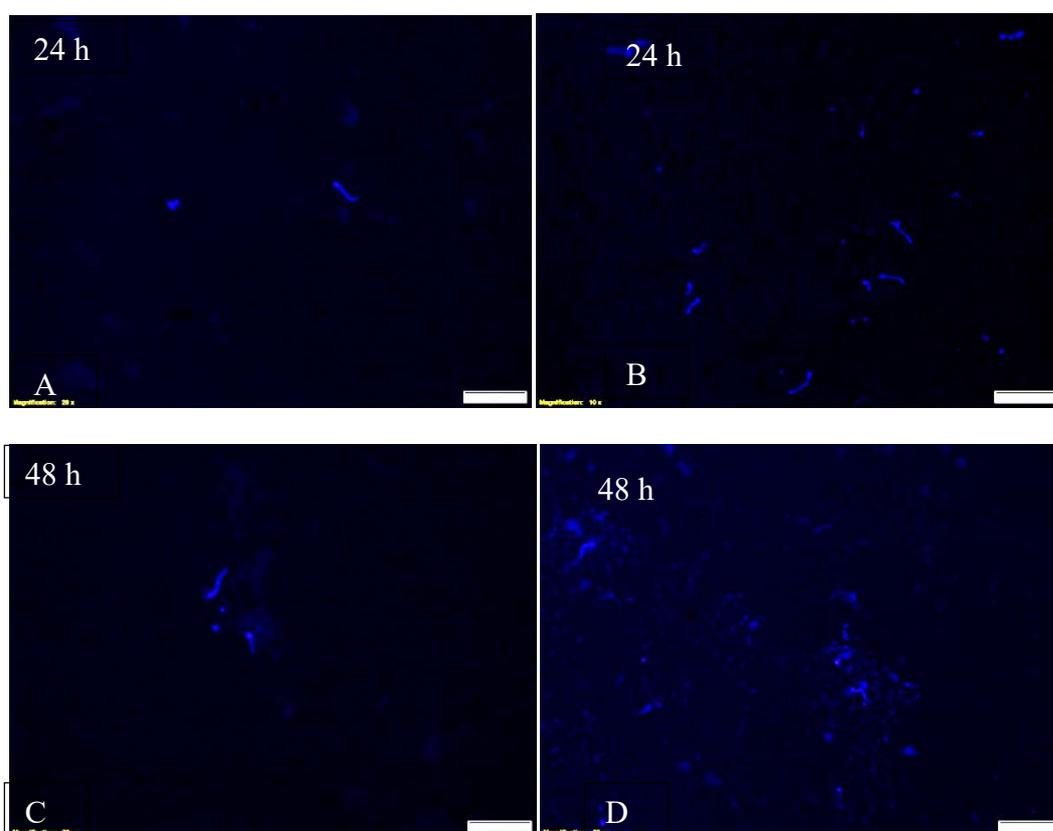
4.5.2.3. Ensaio 3

Formação de biofilme misto em reator Propella, com inóculo *A. fumigatus* + *P. brevicompactum*, concentração dos esporos 5×10^4 /mL + 5×10^4 / mL, meio R2B 50%, duração 4 dias, 500 rpm. O ensaio foi todo em contínuo e a detecção *in situ* com CW + PNA FISH + FUN 1429 (Figura 18 e 19) com objetivo de testar a formação de biofilme misto com os dois dos gêneros que foram mais abundantes na água do istema.

Uma análise qualitativa da cinética inicial de formação do biofilme misto de *A. fumigatus* e *P. brevicompactum* em R2B 50 %, corado com CW. Nas imagens podem ser visualizados esporos germinando e que a germinação ocorreu porém

foi escassa nas 24 h (Figura 18 A e B). No tempo 48 h (Figura 18 C e D), não foi detectado o crescimento do micélio indicando que a germinação foi insuficiente ou que o pouco que germinou não aderiu na superfície do cupom. Pelas imagens constata-se que não se consolidou a formação do biofilme misto até 48 h e nas condições testadas. A redução de 50% nos nutrientes e a ausência do período de batelada pode ter influenciado negativamente na formação do biofilme misto.

Figura 18 Detecção *in situ* de biofilme no reator Propella. Ensaio 3: Biofilme misto de *A. fumigatus* e *P. brevicompactum* em cupom PVC após coloração com CW (A e B) cupom com 24 h e (C e D) com 48 h



Fonte: Oliveira H.M, 2015.

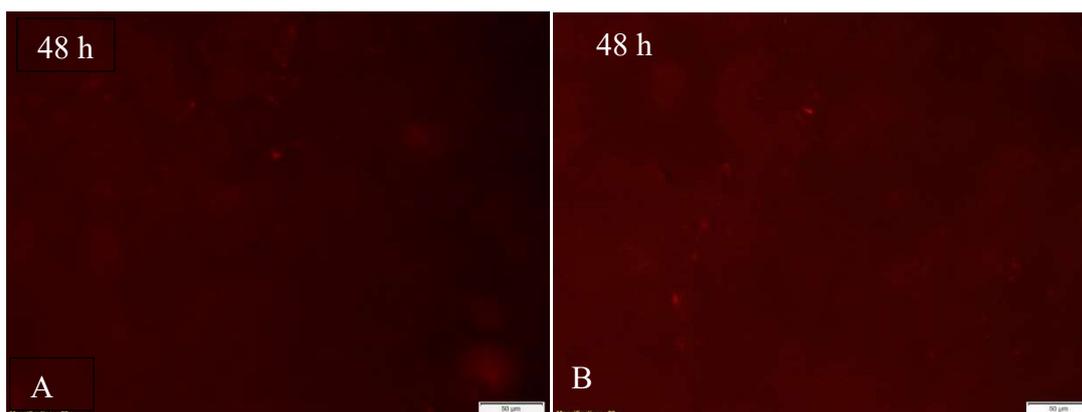
A detecção *in situ* do mesmo biofilme misto do ensaio 3 foi realizada com sonda PNA-FISH para visualização do micélio de *A. fumigatus* pela exibição de fluorescência vermelha e com sonda molecular DNA FISH para visualização do micélio misto já que a sonda DNA-FISH FUN 1429 exibe fluorescência verde para ambos os fungos (Figura 19).

A hibridização com sonda DNA-FISH FUN 1429 (Figura 19 A) e com sonda PNA-FISH (Figura 19 B) não produziu um nível de sinal detectável. Nas imagens

de microscopia de epifluorescência não são visualizadas estruturas com sinal fluorescente vermelho nem verde.

Entre as possíveis causas pode-se supor que as sondas não hibridizaram como previsto pela escassez de filamentos, dando baixo sinal de fluorescência. Na ausência de biofilme não se pode afirmar que as sondas não tinham a capacidade potencial de hibridizar. Surge aqui um tópico para estudos futuros: testar fatores que influenciam negativamente a formação do biofilme e em seguida otimizar os protocolos DNA-FISH e PNA-FISH para uso nos coupons do reator Propella, como temperatura, tempo, soluções de hibridização, lavagem etc.

Figura 19 Detecção *in situ* de biofilme no reator Propella. Ensaio 3: Biofilme misto de *A. fumigatus* e *P. brevicompactum* em cupom PVC com 48 h. Após hibridização com sonda DNA-FISH (19 A) e com PNA-FISH probe4 *fumigatus* (19 B).

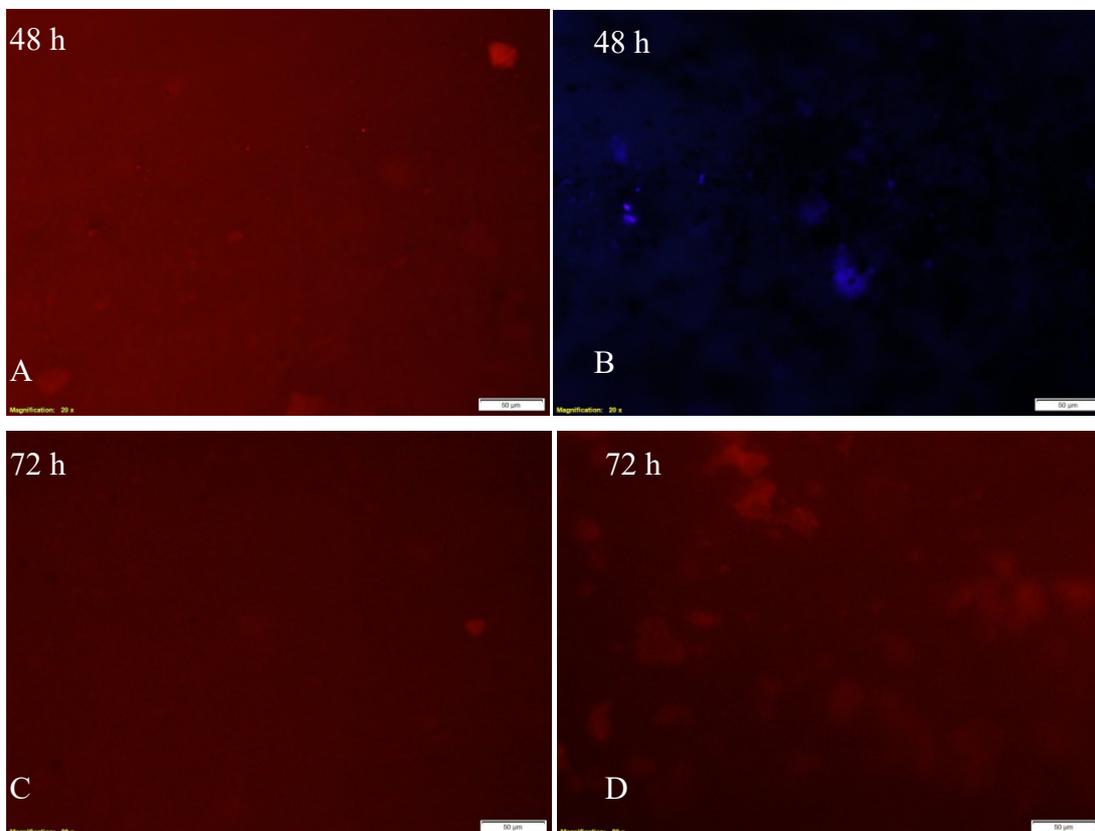


Fonte: Oliveira H.M, 2015.

4.5.2.4. Ensaio 4

Formação de biofilme misto em reator Propella, com inóculo *A. fumigatus* + *P. brevicompactum*, concentração dos esporos 5×10^4 /mL + 5×10^4 /mL, em meio R2B 50%, duração 48 h, 400 rpm. O ensaio foi todo em contínuo e a detecção *in situ* foi feita com CW + PNA FISH +FUN 1429 (Figuras 20). A diferença entre este ensaio e o anterior foi que o protocolo PNA-FISH foi feito no laboratório da empresa BIOMODE Biomolecular Determination, em Braga, onde o kit foi produzido, para se verificar se algum equívoco no protocolo ou solução seria a causa do baixo nível de sinal fluorescente.

Figura 20 Detecção *in situ* de biofilme no reator Propella. Ensaio 4: Biofilme misto de *A. fumigatus* e *P. brevicompactum* em cupom PVC, biofilme com 48 h. A - Após hibridização com sonda PNA-FISH probe4 fumigatus (20 A). Após coloração com CW (20 B) e biofilme com 72 h após hibridização *in situ* com sonda DNA-FISH FUN 1429 (20 C e D).



Fonte: Oliveira H.M, 2015.

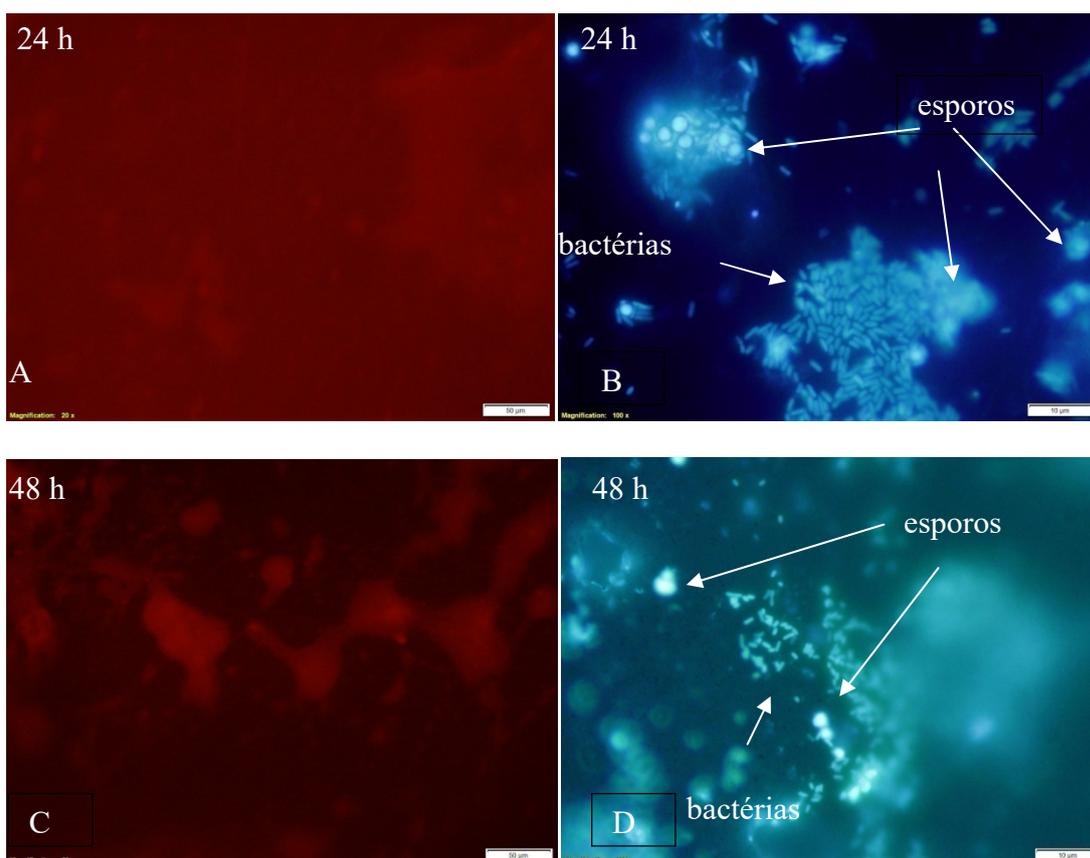
As imagens permitiram avaliar qualitativamente, que a mesma ausência de sinal detectável e a não visualização de estruturas fúngicas fluorescentes do ensaio anterior se repetiu, mostrando que o ensaio 4 (Figura 20 A, B, C e D) reproduziu a ausência de sinal detectável que o ensaio anterior, possivelmente pela formação insuficiente de biofilme para este tempo e parâmetros do ensaio. Não foram observadas estruturas fúngicas suficientes para hibridização das sondas. Novos ensaios serão necessários para testar possíveis fatores intervenientes na adesão e germinação, hibridização das sonda PNA-FISH.

4.5.2.5. Ensaio 5

Formação de biofilme misto de fungos e bactéria em reator Propella. Além dos fungos introduziu-se no ensaio a bactéria *Pseudomonas reactans*, que foi

isolada de água em Portugal. Usou-se inóculo de fungos *A. fumigatus* + *P. brevicompactum* + *P. reactants*, concentração dos esporos $5 \times 10^4/\text{mL}$ + $5 \times 10^4/\text{mL}$ + $1 \times 10^5/\text{mL}$, em meio R2B 50%, duração 48 h, 400 rpm, todo em contínuo. A Detecção *in situ* foi feita com sonda PNA FISH + Dapi (Figura 21).

Figura 21 Detecção *in situ* de biofilme no reator Propella. Ensaio 5: Biofilme misto de inóculo *A. fumigatus*+ *P. brevicompactum* + *P. reactans* em coupon PVC. Em A - biofilme de 24 h, após hibridização com sonda PNA-FISH probe4Fumigatus e B- após coloração com Dapi. Em C e D biofilme de 48 h - após hibridização com sonda PNA FISH probe 4 Fumigatus e coloração com Dapi, respectivamente.



Fonte: Oliveira H.M, 2015.

As imagens exibem baixo sinal de fluorescência da sonda PNA-FISH na ausência de estruturas fúngicas fluorescentes (Figura 21 A e C). Entretanto a coloração com Dapi mostra um biofilme com bactérias misturadas com os esporos fúngicos numa matriz (Figura 21 B e D).

Mesmo não havendo germinação dos esporos fúngicos no tempo do teste, foi possível observar uma maior quantidade de esporos possivelmente embebidos na matriz do biofilme. A falta de sinal da sonda PNA-FISH pode ser explicada pelo fato de que a sonda não hibridiza esporos, que oferecem resistência a entrada da sonda, e não ocorreu germinação e crescimento micelial para hibridização da

sonda. Mais ensaios serão necessários para verificar as condições do teste que torne possível a formação dos biofilmes e as interações nos biofilmes mistos. Em condições reais os biofilmes na rede de distribuição de água são predominantemente misto e as bactérias são apontadas como primeiras colonizadoras e promotoras de biofilmes. É possível que algum fator interferente na adesão e produção de matriz tenha dificultado a formação de biofilmes nas condições dos ensaios realizados no reator Propella.

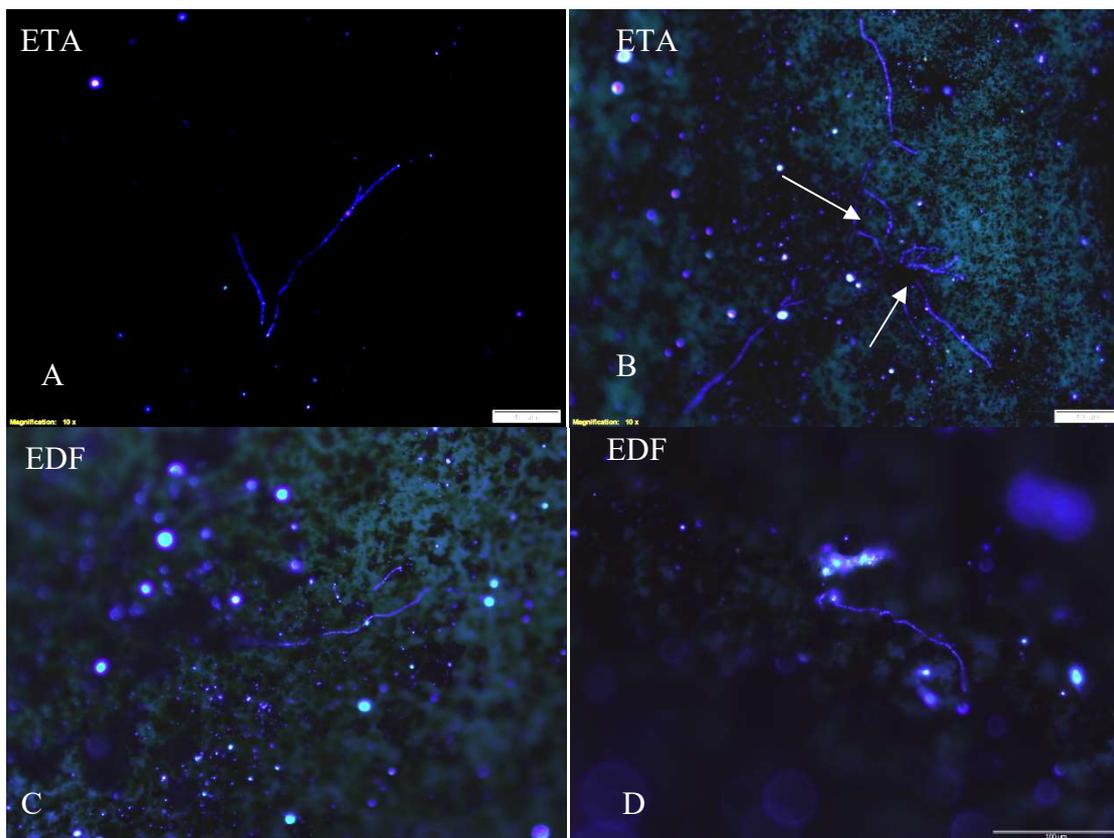
4.5 .3 Biofilmes nos amostradores placas PVC

Os biofilmes nas placas de PVC foram formados durante 22 meses, período em que os amostradores ficaram imersos nos reservatórios, sujeitos às mesmas variações de temperatura, nutrientes etc que ocorreram no sistema, inclusive sob mesmo regime hidráulico.

4.5.3.1 Biofilmes nos amostradores PVC na ETA e EDF

Os fungos filamentosos colonizaram os biofilmes formados nas placas de PVC inseridas nos amostradores imersos nos reservatórios da ETA e EDF. Os biofilmes foram detectados *in situ* por meio da coloração com CW (Figura 22). Foi possível visualizar os filamentos, compatíveis com hifas de fungos filamentosos nos biofilmes formados *in situ* nos reservatório da ETA (22 A e B) e EDF (22 C e D), principalmente nos trechos em que se posicionaram mais superficialmente nos biofilmes. A presença de muitos sedimentos aderidos ao PVC deu ao biofilme aspecto esponjoso (Figura 22 B e C) com muitas reentrâncias e orifícios. Na (Figura 22 B) foi possível observar filamentos penetrando os orifícios irregulares do biofilme (seta), compatíveis com filamentos fúngicos nos biofilmes formados nos reservatório da ETA (Figura 22 A e B) e EDF (Figura 22 C e D). Estes dados são compatíveis com os dados do isolamento de fungos nos amostradores PVC (ver Gráfico 2), onde ETA apresentou maior abundância de fungos, seguida de EDF.

Figura 22 Detecção *in situ* de biofilmes formados em placas PVC no reservatório da ETA. (Figura 22 A e B) e de EDF (Figura 22 C e D) após coloração com CW. Estruturas compatíveis com fungos filamentosos colonizando o biofilme formado por 22 meses



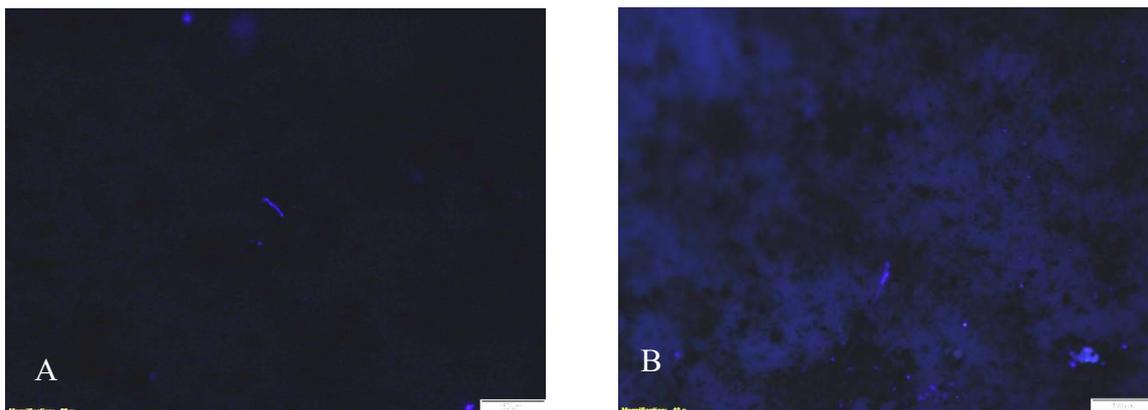
Fonte: Oliveira H.M, 2015.

4.5.3.2 Biofilmes amostradores PVC no HC

Os biofilmes se formaram nas placas PVC inseridas nos amostradores que foram imersos no reservatório HC (Figura 23 A e B). As imagens mostraram a ocorrência de resíduos e reentrâncias, mas o biofilme é aparentemente mais claro.

Entretanto não foram visualizados filamentos fúngicos colonizando o biofilme nos amostradores analisados, As imagens mostram só uma estrutura compatível com esporo germinando (Figura 23 A), mas muito escasso, mostrando a baixa frequência de fungos nos biofilmes neste reservatório. Este resultado possivelmente é consequência das menores densidades mostradas na quantificação dos fungos na água, neste reservatório. E são coerentes com o isolamento de fungos nos mesmos tipos de amostradores (Gráfico) onde HC é o ponto com menor ocorrência de fungos nos biofilmes.

Figura 23 Detecção in situ de biofilme formados em placas PVC no reservatório do HC por 22 meses, a pós coloração com CW



Fonte: Oliveira H.M, 2015.

Observa-se a escassez de estruturas fúngicas (Figura 20), visualizando-se apenas uma estrutura compatível com esporo em germinação, mostrando a baixa frequência de fungos nos biofilmes neste reservatório. Este resultado possivelmente é consequência das menores densidades mostradas na quantificação dos fungos na água, neste reservatório. Por sua vez as densidades mais baixas deveu-se provavelmente à uma aplicação mais sistemática de cloro e intensa vigilância no reservatório HC.

5 CONCLUSÕES

Os resultados confirmaram que as águas em todos os reservatórios examinados apresentaram fungos filamentosos e em densidades significativas. A ocorrência de espécies patogênicas/opportunistas, alergênicas ou produtoras de toxinas nas águas dos reservatórios fazem do sistema de abastecimento um meio de disseminação destes fungos que poderão chegar aos consumidores finais pelas vias de ingestão, contato ou aerossolização dos mesmos. A detecção in situ de fungos filamentosos em biofilmes predominantemente nos reservatórios ETA e EDF onde a cloração se mostrou falha, mostrou que a cloração pode funcionar como uma barreira inicial para a ocorrência de fungos e biofilmes nos reservatórios. A contrapartida também foi evidenciada com menor densidade de fungos na água e não detecção de filamentos fúngicos (apenas poucos esporos em germinação) nos biofilmes dos coupons analisados do reservatório HC, onde foi aplicada cloração suplementar. A combinação das condições típicas dos

reservatórios estudados e as características físico-químicas da água como baixo ou nenhum teor de cloro, altas turbidez e temperaturas, disponibilidade de carbono orgânico e oxigênio dissolvido favoreceram a ocorrência de fungos e biofilmes no sistema de abastecimento da UFPE. Com base nestas evidências pode-se concluir que os reservatórios (principalmente naqueles onde faltou a barreira da cloração), se constituíram pontos de vulnerabilidade do sistema com relação à deterioração da qualidade da água.

As placas de poços foram uma vantajosa estratégia para detecção *in situ* e avaliação da cinética inicial de formação de biofilmes. O reator Propella mostrou-se adequado para simular as condições do sistema no estudo da cinética inicial de formação dos biofilmes. Entretanto, ensaios adicionais serão necessários para estabelecer ajustes nas condições dos testes e outros fatores de modo a testar parâmetros como concentração do meio de cultura, tempo de ensaio, influencia de bateladas iniciais nos ensaios, e interações entre os organismos em biofilmes mistos. O *Aspergillus fumigatus* demonstrou capacidade para formar biofilme monoespécie nas placas de poços e no reator Propella. Com relação aos biofilmes mistos, mais ensaios serão necessários para ajuste dos parâmetros, de modo a obter biofilme nos cupons PVC.

A sonda PNA-FISH mostrou-se um método eficaz para detecção *in situ* de *Aspergillus fumigatus* em biofilmes misto nas placas de poços. Contudo nos cupons do reator Propella os protocolos das sondas DNA-FISH e PNA-FISH não puderam ser bem avaliados, devido a formação insuficiente de biofilmes mistos. O uso de fluorocromos associados a técnicas fluorescentes foram válidos para detecção *in situ* de biofilmes. Permitindo avaliação qualitativa e teste de viabilidade e atividade metabólica. Considerando algumas espécies de fungos isolados neste trabalho são conhecidos produtores de toxinas ou de metabólitos, outros emergem como patógenos oportunistas de humanos, além dos problemas organolépticos, uma maior atenção deve ser dada à presença desses organismos na água de abastecimento e maiores cuidados com os reservatórios onde a água fica exposta a riscos de degradação da qualidade.

REFERÊNCIAS

- AL-GABR, Hamid Moh.; ZHENG, Tianling; YU, Xin. Occurrence and quantification of fungi and detection of mycotoxigenic fungi in drinking water in Xiamen City, China. **Science Of The Total Environment**, v. 466-467, p.1103-1111, jan. 2014.
- ALVAREZ, Gerard et al., Method to quantify live and dead cells in multi-species oral biofilm by real-time PCR with propidiummonoazide. **AMB Express**, v 3, n 1, jan. 2013
- AMANN, Rudolf; GLÖCKNER Frank; NEEF Alexander. Modern methods in subsurface microbiology: *in situ* identification of microorganisms with nucleic acid probes. **FEMS MicrobiologyReviews** v.20, 191-200, jul 1997.
- AMANN, Rudolf; LUDWIG, Wolfgang; SCHLEIFER, Karl-Heinz. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews**, v 59, n1, p. 143-169, mar. 1995.
- ANA – AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS (BRASIL). Atlas Brasil Abastecimento Urbano de Água. 2010. Disponível em: <<http://atlas.ana.gov.br/Atlas/forms/ResultadosEstado.aspx>>, consulta em março de 2016
- ANA – AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS (BRASIL). **Atlas Brasil: Abastecimento urbano de água**; Panorama nacional/Agência Nacional das Águas; Engecorps/Cobrape, Brasília, v 1, 2010a.
- ANA – AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS (BRASIL). **Atlas Brasil: Abastecimento urbano de água**; Panorama nacional/Agência Nacional das Águas; Engecorps/Cobrape, Brasília, v 2, 2010b.
- ANA – AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS (BRASIL). **Panorama do enquadramento dos corpos d'água do Brasil, e, Panorama da qualidade das águas subterrâneas no Brasil**. Coordenação geral, João Gilberto Lotufo Conejo ; coordenação executiva, Marcelo Pires da Costa, José Luiz Gomes Zoby. Brasília : **Caderno de Recursos Hídricos**, 5, 124 p, 2007.
- ANA - AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS (BRASIL). **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil/ Agência Nacional de Águas**. Brasília, ANA, 2009.
- ANA - AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (BRASIL). **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil** : informe 2011. Brasília: ANA, 112 p. 2011.
- ANA - AGÊNCIA NACIONAL DAS ÁGUAS (BRASIL). **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil/Agência Nacional de Águas**. Brasília, ANA, 2013.
- ANAISSIE, Elias J. et al. Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: a new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. **Clinical Infectious Diseases** v 33, 1871-1878, dec. 2001.

ANAISSIE, Elias J. et al. Pathogenic *Aspergillus* species recovered from a hospital water system: a 3-year prospective study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 6, p.780-789, mar. 2002

APHA-AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA), WATER ENVIRONMENTAL FEDERATION (WEF). **Standard methods for the examination of water and wastewater**, 22nd ed.; Washington DC, USA, 2012.

ARVANITIDOU, Malamatenia et al. The occurrence of fungi in hospital and community potable waters. **Letters In Applied Microbiology**, v. 29, n. 2, p.81-84, aug. 1999.

ARVANITIDOU, Malamatenia et al. High level of recovery of fungi from water and dialysate in haemodialysis units. **Journal of Hospital Infection**, v. 45, n. 3, p.225-230, jul. 2000.

BABIČ, Monika Novak et al. Yeasts and yeast-like fungi in tap water and groundwater, and their transmission to household appliances. **Fungal Ecology**, [s.l.], v. 20, p.30-39, apr. 2016.

BASELSKI, Vickie S. et al. Rapid detection of *Pneumocystis carinii* in bronchialveolar lavages samples by using Cellufluor staining. **Journal of Clinical Microbiology**, v 28, n 2, p. 393-394, feb. 1990.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. Illustrated genera of imperfect fungi . 3rd edition, **Burgess Publishing Co**, 273 pp. 1972.

BASCHIEN, Cristiane. et al., *In situ* detection of freshwater fungi in an alpine stream by new taxon-specific fluorescence in situ hybridization probes. **Applied And Environmental Microbiology**. V. 74, n 20, p. 6427-6436, sep.2008.

BESNER, Marie-Claud.; PRÉVOST, M.; REGLI, S. Assessing the public health risk of microbial intrusion events in distribution systems: conceptual model, available data, and challenges. **Water Res**, 45, n 3, p.961–979, jan. 2011.

BORBA, Alexandre Luis Souza, COSTA FILHO, Walldir Duarte. & MASCARENHAS, João de Castro. Configuração geométrica dos aquíferos da Região Metropolitana do Recife. *In*: VI Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas e XVII Encontro Nacional de Perfuradores de Poços, São Luis – MA. **Revista Águas Subterrâneas Suplemento VI Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas e VII Encontro Nacional de Perfuradores de Poços- livro de resumos. Associação Brasileira de Águas Subterrâneas, 2010.**

BRAMMER, Sandra Patussi;TONIAZZO Claudia; POERSCH, Liane Balvedi. Corantes comumente empregados na citogenética vegetal, **Arquivos do Instituto Biológico**, v 82, p.1-8, 2015.

BRASIL, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, **Águas Subterrâneas: programa de Águas subterrâneas**, Brasília, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União da Republica Federativa do Brasil**. Brasília, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano/** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – (Série B. Textos Básicos de Saúde). Brasília : Ministério da Saúde, 212 p., 2006a.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boas práticas no abastecimento de água: procedimentos para a minimização de riscos à saúde** /Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – (Série A. Normas e Manuais Técnicos) – Brasília, DF, 252 p., 2006.

CAMPER, Anne. et al. Development and structure of drinking water biofilms and techniques for their study. **Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement. The Society for Applied Microbiology**, v 85, n S1, p.1S-12S, dec.1999.

CERQUEIRA, Laura Isabel Macieira. Development and evaluation of peptide nucleic acid (PNA) probes for the rapid detection of clinically relevant microorganisms. **Tese de doutoramento em Engenharia Biomédica**. Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Braga, PT. 2011

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos**/companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2011

CHANG, Douglas C. et al. Multistate outbreak of Fusarium keratitis associated with use of contact lens solution. **JAMMA**, V. 296, n 8, p. 953-963, aug. 2006.

CLARKE, Robin; KING, Jannet. **The Atlas of Water: mapping the world's most critical resource**. Londres: Earthscan Publications Ltd, 2004.

COMBS, Christian.A. Fluorescence microscopy: a concise guide o current imaging methods. **Current Protocols in Neuroscience**, v 50, n 2.1, p. 2.1.1-2.1.14, jan. 2010.

COMPESA- COMPANHIA PERNAMBUCANA DE SANEAMENTO. Disponível em: <www.compesa.com.br>, Acesso em:18 agosto 2014.

CONAMA- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (BRASIL), Resolução 396/2008.

COOK Roderic C.; WHIPPS, J.M., **Ecophysiology of Fungi**. Blackwell Scientific Publications, 1993

CÔRTE-REAL, M.; JOHANSSON, B.; SARAIVA, L. Nutrição e crescimento microbiano. In: Ferreira, W.F.C.; Sousa, J.C.F; Lima, N. (ed) **Microbiologia**. Lidel Edições Técnicas Ltda, pp 166-195, 2010.

COSTA FILHO, Waldir Duarte. et al.. A Qualidade Físico-Química das Águas Subterrâneas na Planície de Recife-Jaboatão dos Guararapes/PE. In: *XII Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas*, Florianópolis-SC. **Revista Águas Subterrâneas Suplemento XII Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas- livro de resumos. Associação Brasileira de Águas Subterrâneas. 2002.**

COSTA FILHO, Waldir Duarte; BORBA, Alexandre Luis Souza & MASCARENHAS, João de Castro. Monitoramento de aquíferos costeiros da Região Metropolitana do Recife/PE. In: *XVI Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas*, São Luis- MA. **Revista Águas Subterrâneas Suplemento XVI Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas**, XVII Encontro Nacional de Perfuradores de Poços- **livro de resumos. Associação Brasileira de Águas Subterrâneas. 2010.**

DANOVARO, Roberto. et al. Comparison of Two Fingerprinting Techniques, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism and Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis, for Determination of Bacterial Diversity in Aquatic Environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v 72, n 9, p. 5982–5989, set. 2006.

DAIMS, Holger; WAGNER, Michael. Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis. **Appl Microbiol Biotechnol**. v.75, n 2, p. 237-248, may 2007.

DE CAROLIS, Elena et al. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Mucorales* with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. **Clinical Microbiology and Infection**, v.18, n 5, p. 475-484, may 2012.

DEFRA. **Review of fungi in drinking water and implications for human health**. Disponível online:< <http://dwi.defra.gov.uk/research/completed-research/reports/dwi70-2-255.pdf>>. Acesso em: 9 de fevereiro de 2016

DEINES, Peter et al. A new coupon design for simultaneous analysis of in situ microbial biofilm formation and community structure in drinking water distribution systems. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 87, n 2, p. 749–756, jun.2010.

DE LUCCA, Anthony; WALSH, Thomas J. Mycotoxins of *Fusarium* spp. biochemistry and toxicology. In *Molecular Biology of Food and Water Borne Mycotoxigenic and Mycotic Fungi*; **Paterson, R.R.M., Lima, N., Eds. Food Microbiology Series**; Boca Rotan, FL, USA, p. 323-353, 2015.

DENKHAUS, Evelin et al. Chemical and physical methods for characterization of biofilms. **Microchim Acta**, v 158, p. n 1, p. 1-27, apr.2007.

DENNING, David W.; PLEUVRY, Alex; COLE, Donald C. Global burden of allergic bronchopulmonary aspergillosis with asthma and its complication chronic pulmonary aspergillosis in adults. **Med mycol.** v. 51, n 4, p.361-370, may 2013.

DOGGETT, M.Steven. Characterization of fungal biofilms within a municipal water distribution system. **Appl. Environ. Microbiol**, v 66, n 3, p.1249–1251, mar.2000.

DOMSCH, K.H.; GAMS, W.; ANDERSON, T-H. **Compendium of soil fungi.** Academic Press, New York, 1980.

DOMSCH, K.H.,GAMS, W., ANDERSON, T.H. **Compendium of soil fungi.** Verlag : IHW, 1264p, 1993.

DONLAN, Rodney M.; COSTERTON, J. Willian. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology**, v 15, n 2, p. 167-193, apr. 2002.

DOUTERELO, Isabel. et al. Methodological approaches for studying the microbial ecology of drinking water distribution systems. **Water Res** 65,134-156, nov 2014.

DOUTERELO, Isabel; SHARPE, Rebecca Louise; BOXALL, Joby B. Bacterial community dynamics during the early stages of biofilm formation in a chlorinated experimental drinking water distribution system: implications for drinking water discoloration. **Journal of Applied Microbiology**, v.117, n 1, p. 286-30, apr.2014.

DOUTERELO, Isabel et al., Microbial analysis of in situ biofilm formation in drinking water distribution systems: implications for monitoring and control of drinking water quality. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v 100, n7, p. 3301-3311, apr. 2016

EGHOLM et al., Encyclopedia, Lehr, J., Keeley, J., Lehr, J. and Kingery III, T.B. (eds.), **John Wiley and Sons.** 1993

ELLIS, Martin Beazor. **Dematiaceous hyphomycetes.** [s.l.]: Kew: Common wealth Mycological Institute, 1971. 608 p.

ELLIS, M.B. **More Dematiaceous Hyphomycetes.** Kew: Common wealth Mycological Institute, 1976, 507p

EPA-U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY., **Seminar publication:** Control of biofilm growth in drinking water distribution systems. Office of Research and Development, Washington DC, 1992.

EPA-U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Health risk from microbial growth and biofilms in drinking water distribution systems,** Office

of Ground Water and Drinking Water, 2002. Disponível em:
<<http://www.ccsenet.org/journal/index.php/ijb/article/viewFile/6610/5207>>, acesso em 09 de fevereiro 2016).

ESCOBAR, Isabel C. and RANDAL Andrew A. Assimilable organic carbon (AOC) and biodegradable dissolved organic carbon (BDOC): complementary measurements. **Water Res**, v 35, n 18, p. 4444–4454, dec. 2001.

FANG, W.; HU, Jiangyong; ONG, Say-Leong. Influence of phosphorus on biofilm formation in model drinking water distribution systems. **Journal of Applied Microbiology**, v 106, n 4, 1328–1335, feb. 2009.

FISH, Katherine. E. et al. Characterisation of the physical composition and microbial community structure of biofilms within a model full-scale drinking water distribution system. **PloSOne**, V.10, nº 2. 1-22, feb. 2015.

FISH, Katherine E.; OSBORN A. Mark; BOXAL, Joby. Characterising and understanding the impact of microbial biofilm and the extracellular polymeric substance (EPS) matrix in drinking water systems. **Environmental Science Water Research & Technology**, v 2, p. 614-630, apr. 2016.

FLEMMING, Hans Curt; PERCIVAL, Stevens I.; WALKER, James T. Contamination potential of biofilms in water distribution systems. **Water Sci Technol**, v 2, n 1, p. 271-280. Jan. 2002

GALLÉ, Tom et al. An FTIR-DRIFT Study on River Sediment Particle Structure: Implications for Biofilm Dynamics and Pollutant Binding. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 17, p. 4496-4502, set. 2004.

GASHGARI, Rukaia; ELHARIRY, Hesham M.; GHERBAWY, Youssuf A. Molecular detection of mycobiota in drinking water at four different sampling Points of water distribution system of Jeddah City (Saudi Arabia), **Geomicrobiology Journal**, v 30, n 1, p. 29-35, nov. 2012.

GIVANNONI, Stephen. J. et al. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cell. **J. Bacteriol**, v. 170, n 2 . p. 720-726, feb.1988.

GIVANNONI, Stephen. et al. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplakton. **Nature,(London)**, v. 345, n 6270, p. 60-63, may1990.

GOMES, I. B; SIMÕES, Lúcia Chaves; SIMÕES, Manuel. An overview on the reactors to study drinking water biofilms. **Water Res.** v.62, p. 1249-1251, jun.2014.

GONÇALVES, Ana.B. et al., FISH and Calcofluor staining techniques *in situ* filamentous fungal biofilms in water. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 23, n 3, p. 194-198, sep. 2006.

GONÇALVES, Ana B; PATERSON, R. Russel M; LIMA, Nelson. Survey and significance of filamentous fungi from tap water. **Int J Hyg Environ Health**, v 209, n 3, p. 257-264, may 2006a.

GOIS, Luis Henrique Batista; NOGUEIRA, Aline Coelho; MORAES, Luis Roberto Santos. Água para consumo humano: Uma visão sobre os riscos e vulnerabilidades de sua utilização. **Revista Eletrônica de Gestão e Tecnologias ambientais (GESTA)**, v 1, nº 2, p. 251-266, nov.2013.

GOODDY, D.C.; HINSBY, K. Organic quality of groundwaters. In: Edmunds, W.Mike; Shand, Paul, (eds.) **Natural groundwater quality**. Oxford, Blackwell, p. 59-70, 2008.

GÖTTLICH Elke, et al., Fungal flora in groundwater derived public drinking water. **Int J Hyg Environ Health**, v 205, p. 269–279, jun. 2002

GRABINSKA-LONIEWSKA, Anna et al. Occurrence of fungi in water distribution system. **Polish Journal of Environmental Studies**, V.16, n 4, p. 539-547, mar. 2007.

HAGESKAL, Gunhild et al. Diversity and significance of mold species in Norwegian drinking water. **Appl. Environ. Microbiol**, v 72, n 12, p. 7586-7593, dec. 2006.

HAGESKAL, Gunhild et al. Occurrence of moulds in drinking water. **Journal of Applied Microbiology**, v 102, n 3, p. 774–780, mar. 2007.

HAGESKAL, Gunhild; LIMA, Nelson; SKAAR, Ida. The study of fungi in drinking water. **Mycol Res**, v 113, n 2, p. 165-172, feb.2009.

HETTICK, Justin M. et al., Discrimination of *Aspergillus* isolates at the species and strain level by matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. **Anal Biochem**, v 380, n 2, p. 276–281, sep. 2008.

HOOG, G Sybren; HERMANIDES-NIJHOF, E J. The black yeasts and allied Hyphomycetes. **Studies In Mycology**. Utrecht, v 15, p. 1-222. 1997.

HU, Jiang Yong et al., Investigation into biofilms in a local drinking water distribution system. **Biofilms**, V. 2, n 1, p. 19-25, jan. 2005.

HUA, Sui Sheng T. et al. Fluorescent Viability Stains to Probe the Metabolic Status of Aflatoxigenic Fungus in Dual Culture of *Aspergillus flavus* and *Pichia anomala*. **Mycopathologia**, v 171, n 2, p.133–138, feb. 2011.

HURTADO-McCORMICK, Stefania. et al., Fungi in biofilms of a drinking water network: occurrence, diversity and mycotoxins approach. **Water Science & Technology: WaterSupply**, v 16, n 4, p. 905-913, aug. 2016.

HUSSAIN, Tanver et al. Study of drinking water fungi and its pathogenic effects on human beings from district Bhimber, Azad Kashmir, Parkistan, **Pak J. Bot**, v 43, n 5, p. 2581-2585, 2011.

IFRAH, G. L'Histoire de l'eau, Paris, 1992, Declaração Universal dos Direitos da Água, Rio de Janeiro, 22 de Março de 1992, **Biblioteca Virtual de Direitos Humanos da Universidade de São Paulo - Comissão de Direitos Humanos**. São Paulo, 13 jun. 2008.

JAIN, K. K. Current status of fluorescence in situ hybridization. **Med Device Technol**, v 15, n 4, p. 14-17, may 2004.

JAHN, Andreas. and NIELSEN, Per Halkjær.; Extraction of extracellular polymeric substances (eps) from biofilms using a cationexchange resin. **Wal.Sci.Tech**, v. 32, n 8, p. 157-164, out. 1995.

JUNGFER, Cristina et al., Drinking water biofilms on copper and stainless steel exhibit specific molecular responses towards different disinfection regimed at waterworks. **Biofouling**, v 29, n 8, p. 891-907, jul. 2013.

KAHLISCH, Leila et al. High-Resolution In Situ Genotyping of Legionella pneumophila Populations in Drinking Water by Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis Using Environmental DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v 76, n 18, jul. 2010.

KATOR, Howard; RHODES, Martha. 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, 2003.

KANZLER, D. et al. Occurrence and hygienic relevance of fungi in drinking water. **Mycosis**, v. 51, n 2, p. 165-160, mar.2008

KEINÄNEN, Mina M.; MARTIKAINEN, Pertti J. AND KONTRO, Merja H. Microbial community structure and biomass in developing drinking water biofilms. **Can. J. Microbiol**, v 50, n 3, p. 183–191, mar. 2004.

KELLEY, Joan. Identification, significance and control of fungi in water distribution systems. In: **Water Quality technology Conference Proceedings**. Denver, CO. Public American Water Works Association, 1-20, 1997.

KERR, et al. Biofilms in water distribution systems. In.: D. Mara & N. J. Horan (Eds.). **Water and Wastewater Engineering**, London Academic Press, 757–776, 2003.

KINSEY, Graham C.; PATERSON, Russell R.; KELLEY, Joan. Methods for the determination of filamentous fungi in treated and untreated waters. **Journal of Applied Microbiology symposium Supplement**, v 85, n S1, p. 214S-224S, 1999.

KINSEY, Graham C; PATERSON, Russell R.; KELLEY, Joan. Filamentous fungi in water systems. In: Mara, D., Horan, N.(eds) **Handbook of Water and Wastewater Microbiology**. Academic Press, v 77, p. 98, 2003.

KIRK, P.M.; COOPER, J. **Index Fungorum – Authors of Fungal Names**.2005. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/>>Acesso em: 20 setembro 2014.

KONG, R. Y. C. et al. Co-detection of Three Species of Water-Borne Bacteria by Multiplex PCR.**Marine Pollution Bulletin**, v 31, n 4-12, p. 317-324, dec. 1995.

KUBICEK, Christian. P.; DRUZHININA, Irina. S. Trichoderma mycoses and mycotoxins, In **Molecular Biology of Food and Water Born Mycotoxigenic and Mycotic Fungi**; Paterson, R.R M., Lima, N., Eds.; Food Microbiology Series; CRC Press: Boca Rotan, FL, USA, p 521-537, 2015.

KRAUSS, Steffen; GRIEBLER, Christiaan. Pathogenic microorganisms and viruses in groundwater. **Acatech (National Academy of Science and Engineering)**. 2011.

LAZAROVA, V. AND MANEM, J. Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment.**Wat. Res**, v 29, n 10, p. 2227-2245, 1995.

LAZAROVA, Valentina, et al. Integrated approach for biofilm characterization and biomass activity control. **Wat.Sci. Technol**, v 29, n 7, p. 345-354, apr.1992.

LEHTOLA, Markku J. et al., Survival of *Mycobacterium avium*, *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, and Caliciviruses in drinking water-associated biofilms grown under high-shear turbulent flow. **Applied and Environmental Microbiology**, v 73, n 9, p. 2854–2859, mar. 2007.

LESSARD, Paul., LE BIHAN, Yann. Fixed film processes. In: Mara, D., Horan, N. (eds) **The Handbook of Water and Wastewater Microbiology**. Academic Press, p. 317-336, 2003.

LIU, Gang; VERBERK, Jasper Q.J.C; VAN DIJK, J. C. Bacteriology of drinking water distribution systems: an integral and multidimensional review. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v 97, n 21, p. 9265-9276, sep. 2013.

LIU, Sanly et al. Understanding, Monitoring, and Controlling Biofilm Growth in Drinking Water Distribution Systems. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 50, n 17, p. 8954-8976, aug. 2016.

LUDMÁNY, Zsuzsa; BORSÁNYI, Matyas AND VARGHA, Marta. Evaluation of biofilms occurring in drinking water distribution system of Balatonfüred. In: In: Simeonov L., Chirila E. (eds) **Chemicals as Intentional and Accidental Global Threats**, 501-507, 2006.

MA, Xiao. et al., Fungal diversity and presence of potentially pathogenic fungi in a hospital hot water system treated with on-site monochloramine. **Water Res.** V 71, p. 197-206, mar. 2015

MACARTUR, Fiona A. et al. Asking probing questions: can fluorescent in situ hybridization identify and localize aquatic hyphomycetes on leaf litter? **International Review of Hydrobiology**, v 86, p. 429-438, jan 2001.

MAHARACHCHIKUMBURA, Sajeewa S.N. et al. Pestalotiopsis species associated with Camellia sinensis (tea). **Mycotaxon**, v. 123, n. 1, p. 47-61, aug. 2013.

MAHARACHCHIKUMBURA, Sajeewa S.N. et al. Pestalotiopsis revisited. **Studies In Mycology**, v. 79, p.121-186, set. 2014.

MANIKANDAN, Palanisamy et al., *Fusarium*. In: Molecular Detection of Human Fungal Pathogens; Liu, Dongiou., Ed. CRC Press. Boca Rotan, FL, USA, p. 323-337, 2011.

MARA, D. HORAN, N. The handbook of water and wastewater microbiology, 1stedn. **Elsevier Academic Press**, London, 2006.

METZGER, Ulrich et al., Monitoring the formation of an *Aureobasidium pullulans* biofilm in a bead-packed reactor via flow-weighted magnetic resonance imaging. **Biotechnol Lett.**, V.28, n 16, 1305–1311, aug. 2006.

- i. MILLER, Melissa .B. and TANG, Yi-Wei. Basic Concepts of Microarrays and Potential Applications in Clinical Microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v 22, n 4, p. 611-633, out. 2009.

MILLARD, Peter.J. et al., Development of the FUN-1 Family of Fluorescent Probes for Vacuole Labeling and Viability Testing of Yeasts. **Applied And Environmental Microbiology**, v 63, n7, p. 2897–2905, jul. 1997.

MONDEN, Yu. et al., First case of fungal keratitis caused by Pestalotiopsisclavispora. **ClinicalOphthalmology**, **ClinicalOphthalmology**, V. 7, p. 2261–2264, nov. 2013.

MONTENEGRO, Suzana M^a Gico Lima; CABRAL, Jaime Joaquim da Silva Pereira; PAIVA, Anerson Luiz Ribeiro; Águas Subterrâneas na Zona Costeira da Planície do Recife (PE): Evolução da Salinização e Perspectivas de Gerenciamento. **RBRH — Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v 14, n 3, p. 81-93, Jul/Set 2009.

MORATÓ, Jordi. et al., Microbial response to disinfectants. In: Mara, D., Horan, N.(eds) **Handbook of Water and Wastewater Microbiology**. Academic Press, p. 657-693, 2003.

NAZIM, Sameera. et al., Quantitative estimation of mycoflora in drinking and fruit juices of Karachi. **Pakistan J. Bot**, v 40, n 3, p. 1263-1268, may, 2008

NUOVO, G.J., **PCR *in situ* Hybridization - Protocols and Applications**. Third Edition, Lippincott-Raven, Philadelphia & New York. 1997.

O'DONNELL, Kerry. et al., Internet-accessible DNA sequence database for identifying fusaria from human and animal infections. **J. Clin. Microbiol.** V. 48, n 10, p. 3708-3718, out. 2010.

OLIVEIRA, H.M.B. Fungos filamentosos na água e formando biofilme na rede de distribuição de água potável do sistema Alto do Céu, Recife - PE. 2010. 101 **Dissertação de Mestrado em Biologia de Fungos** – Programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

OLIVEIRA, Beatriz R. et al.; New insights concerning the occurrence of fungi in water sources and their potential pathogenicity. **Water Res.** V. 47: n 16, 6338-6347, out. 2013.

OTTONI Lilian Cristina Camargo et al. Ocorrência de fungos em água para consumo humano. **Enciclopedia Biosfera**, V, 10, n 18, p. 3426-3433, jul. 2014.

PARIS, Tony; SKALI-LAMI, Salaheddine; BLOCK, Jean-Calud. Probing young drinking water biofilms with hard and soft particles. **Water Res**, v 43, n 1, p. 117-126, nov. 2009.

PATERSON, Russel. R. M.; LIMA, Nelson. Penicillium – Mycosis and micotoxicosis. In **Molecular Detection of Human Fungal Pathogens**; Liu, D. Ed.; CRC Press: Boca Rotan, FL, USA, pp. 323-337, 2011.

PATERSON Russel .R.M.; KELLEY, Joan; GALLAGHER, M. Natural occurrence of aflatoxina e *A. flavus* (link) in water. **Lett. Appl. Microbiol**, v 25, n 6, p. 435-436, dec. 1997.

PATERSON Russel R.M; LIMA, Nelson. Fungal contamination of drinking water. In.: Lehr J, Keeley J, Lehr J, Kingery TB (Eds.) **Water Encyclopedia: Water Quality Control**. New Jersey, Hoboken, 2005.

PATERSON Russel R.M. et al. Occurrence, problems, analysis and removal of filamentous fungi in drinking water. In.: De Costa, P, Bezerra P (Eds.) **Fungicides: Chemistry, environmental impact and health effects**. New York, Nova Biomedical Books, PP 379-399, jan. 2009.

PENNAFIRME, Simone, et al. Microbial biofilm study by synchrotron X-ray microscopy. **Radiat. Phys. Chem**, v 116, 116-119, nov. 2015.

PEREIRA, V.J. et al., Occurrence of filamentous fungi and yeasts in three different drinking water sources. **Water Research**, v 43, n 15, p. 3813-3819, aug. 2009.

PEREIRA, Vanessa J. Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods. **Water Research**, v 44, n 17, p. 4850-4859, set. 2010.

PEREIRA, Vanessa J. et al., Free chlorine inactivation of fungi in drinking water sources. **Water Res**, v 47, n 2, p. 517-523, feb. 2013.

PERLHOTH, Joshua; CHOI, Bryan; SPELLBERG, Brad. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. **Med. Mycol**, v 45, n4, p. 321-346, jun.2007

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. Fungi and Food Spoilage Vol. II, ed. Pitt, J.I. and Hocking, A.D. London: Blackie Academic and Professional, 1997.

POITELON, Jean-Baptiste. et al., Identification and phylogeny of eukariotic 18S rDNA phylotypes detected in chlorinated finished drinking water samples from three Parisian surface water treatment plants. **Letters in Applied Microbiology**, v 49, n 5, p.589-595, aug. 2009.

PONTARA, André Venturine. et al. Microbiological monitoring of mineral water commercialized in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v 42, n 2, p. 554e559, apr. 2011.

PROCTOR, Claitlin. R. and HAMMES, Frederik. Drinking water microbiology – from measurement to management. **Current Opinion in Biotechnology**, v 33, p. 87-94, jun. 2015.

QUILÈS, Fabienne; HUMBERT, François; DELILLE, Anne. Analysis of changes in attenuated total reflection FTIR fingerprints of *Pseudomonas fluorescens* from planktonic state to nascent biofilm state. **Spectrochimica Acta Part A**, v 75, n 2, p. 610–616, feb. 2010.

RAY, Arghya; NORDÉN, Bengt. Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. **FASEB J**, v 14. n 9, p. 1041-1060, jun. 2000.

RIBEIRO, Ana et al. Fungi in bottled water: a case of a production plant. **Rev. Iberoam. Mycol**, v 23, n 3, p.139-144, sep. 2006

SAMAH, A. Mohamed; SHIMAA R. Hamed.; AL-WASIFY Raed S. Relative diversity of filamentous fungi and yeasts in groundwater and their correlation to fecal pollution indicators and physicochemical parameters. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v 3, n 11, p. 905–919, 2014.

SAMMON, Noel B. et al. Incidence and distribution of microfungi in a treated municipal water supply system in sub-tropical Australia. **International Journal of Environmental research and Public Health**, v 7, n 4. P. 1597-1611, apr. 2010.

SAMSON, R.A.; HOEKSTRA, E.S.; FRISVAD, J.C. Introduction to Food- and Airborne Fungi. 7th edition. **Centraalbureauvoor Schimmelcultures**, Utrecht, The Netherlands, 2004.

SANDOVAL-DENIS, Marcelo Patrício et al. Phylogeny of the clinically relevant species of the emerging fungus *Trichoderma* and their antifungal susceptibilities. **Journal of Clinical Microbiology**, v 52, n 6, p. 2112-2125, jun. 2014.

SANTOS, Cledir. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Applied Microbiology**, v 108, n 2, p. 375-385, jun. 2009.

SCHAULE, Gabriela et al. Steps in biofilm sampling and characterization in biofouling cases. In: FLEMMING, Hans-curt et al (Ed.). **Biofilms: Investigative methods and applications**. Lancaster: Technomic Publishing, Cap. 1. p. 1-14. 2000.

SCHMID, Tobias. et al., Biofilm monitoring by photoacoustic spectroscopy (PAS). **Water Sci. Technol**, v 47, n 5, mar. 2003

SCHMIT, John Paul; LODGE, D.Jean. Classical methods and modern analysis for studying fungal diversity, **DK3133_book.fm**, p.193-214, dec. 2004.

SCHMITT, Jürgen.; FLEMMING, Hans Cut. FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. **International Biodeterioration & Biodegradation**, V. 41, n1, p. I-11, 1998.

SCHWARTZ, Thomas. et al., Combined use of molecular biology taxonomy, Raman spectroscopy, and ESEM imaging. **Chemosphere**, v .77 , n 2, p. 249–257, sep. 2009.

SHENG, Guo-Ping.; YU, Han-Qing.; YU, Zhou. Extraction of extracellular polymeric substances from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, V. 67, n 1, p. 125–130, apr. 2004.

SHORT, Dylan P. G. et al., Widespread occurrence of diverse human pathogenic types of fungus *Fusarium* detected in plumbing drains. **Journal of Clinical Microbiology**, v 49, n 12, dec 2011.

SKAAR, Ida ; HAGESKAL, Gunhild. Fungi in drinking water. In: R. Russel M Paterson, Nelson Lima.(eds) **Molecular Food and Water Borne Mycotoxigenic and Mucic Fungi**. Food Microbiology Series. CRC Press, p. 597-606, 2015.

SIMÕES Lúcia Chaves.; SIMÕES Manuel; LIMA Nelson. Kinetics of biofilm formation by drinking water isolated *Penicillium expansum*. **Biofouling**, v 31, n 4, p. 349-362, may 2015.

SIMÕES, L. C.; SIMÕES, M.; VIEIRA, M. J. Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water. **Appl. Environ. Microbiol**, v 73, n 19, p. 6192-6200, nov 2007.

SIMÕES, Lúcia Chaves; SIMÕES, Manuel; VIEIRA, Maria João. Adhesion and biofilm formation on polystyrene by drinking water-isolated bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek, Int. Mol. Microbiol**, v 98, n 3, p. 317—329, out. 2010.

SIMÕES; SIMÕES. Biofilm in drinking water: problems and solutions. **RSR Advances**, V. 3, p. 2500-2533, 2013.

SIQUEIRA, Virgínia M.; LIMA, Nelson. Efficacy of free chlorine against water biofilms and spores of *Penicillium brevicompactum*. In: Ulrich Borchers, K Clive Thompson (Org.). **Water contamination emergencies: monitoring, understanding and acting**. Cambridge: RSC Publishing, 157-165, 2011a

SIQUEIRA, Virgínia. M. et al., Filamentous Fungi in drinking water, particularly in relation to biofilm formation. **Int J Hyg Environ Health**, v 8, n 2, p. 456-469, feb. 2011.

SIQUEIRA, Virgínia M. et al., Biofilms from a Brazilian water distribution system include filamentous fungi. **Can.J.Microbiol**, v 59, n 3, p.183-188, mar. 2013.

SIQUEIRA, Virgínia Medeiros. Chapter 1 – Fungal biofilms: an overview. p. 3-10, In: Vijai Kumar Gupta, Robert I March and S. Sreenivasaprasad. **Fungal Biomolecules: Sources, Application and Recent Developments** 1st ed. 2015.

SOLÉ, Magali et al., Improved coverage of fungal diversity in polluted groundwaters by semi-nested PCR. **Science of The Total Environment**, v. 406, n 1-2, p. 324-330, nov. 2008.

SPRING, Kenneth. Fluorescence Microscopy. **Encyclopedia of Optical Engineering**, p. 548-555, 2003.

STENDER Henrik, et al., PNA for rapid microbiology. **J Microbiol Methods**, v 48, n 1, p. 1–17, feb. 2002.

STEVENS, David A. et al., Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis – state of the art: Cystic fibrosis foundation consensus conference. **Clin. Infect. Dis**, V. 37, (Suppl.3), p. S225-S2264, out. 2003.

STINE, O. Colin. et al., Characterization of microbial communities from coastal waters using microarrays. **Environmental Monitoring and Assessment**, V. 81, n 1-3, p. 327-336, jan 2003.

SUTTON, D. A. Coelomycetous fungi in human disease. A review: Clinical entities, pathogenesis, identification and therapy. **Rev Iberoam Micol**, V. 16, 171-179, 1999.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes**. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England. 696p, 1980.

STERNBERG, Claus; BJARNSHOLT, Thomas and SHIRTLIFF, Mark. Methods for dynamic investigations of surface-attached in vitro bacterial and fungal biofilms. **Methods Mol Biol**, v 1147, p. 3-22, mar. 2014.

SUZUKI, Takeshi et al. Recent advances in fluorescent labeling techniques for fluorescence microscopy. **Acta Histochem Cytochem**, v 40, n 5, p. 131–137, dec. 2007.

TANKE, H.J., Flow cytometry. In “Quantative fluorescence microscopy”. (Ed. Rost, F.W.D.), **Cambridge University Press**: Cambridge, p. 147-161, 1998

TAYLOR, H. Surface water. In: Mara, D., Horan, N.(eds) **Handbook of Water and Wastewater Microbiology**. Academic Press, 2003.

TSUI, C. K.M, et al., **Ima Fungus**, V2, N2: 177-189, 2011.

UNIÃO EUROPÉIA. UNIÃO EUROPÉIA: JOINT RESEARCH CENTER. Review of methods for the rapid identification of pathogens in water samples: ERNCIP thematic area Chemical & Biological Risks in the Water Sector Task 7, deliverable 1 - Study. Luxemburg: **Publications Office Of The European Union**, 2014. 42 p. Disponível em: <<https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/69b14a4c-0944-41ea-9634-7b074f45cb50/language-en>>. Acesso em: 1 nov. 2016

UNESCO - United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. **Water e-Newsletter No. 103**. 2005. Disponível em: <http://webworld.unesco.org/water/news/newsletter/103.shtml#eve_3>. Acesso em: 04 ago. 2014.

UNESCO -United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization. **Water for People, Water for Life-Executive Summary**, UN World Water Development Report.2003

UNICEF;WORLD HEALTH ORGANIZATION. 25 Years, **Progress on Sanitation and Drinking Water**, Update and MDG Assessment, 2015.

VAN DER WIELEN, Paul W. J. J; VOOST, Stefan. and VAN DER KOOIJ, Dick. Ammonia-Oxidizing Bacteria and Archaea in Groundwater Treatment and Drinking Water Distribution Systems. **Applied and Environmental Microbiology**, v 75, n14, p. 4687–4695, jun. 2009.

VAN DER WIELEN, Paul W. J. J; VAN DER KOOIJ, Dick. Effect of water composition, distance and season on the adenosine triphosphate concentration in unchlorinated drinking water in the Netherlands. **Water Research**, v 44, n 17, p. 4860-4867, sep. 2010.

VERPER, Stephen. et al. Quantifying fungal viability in air and water samples using quantitative PCR after treatment with propidium monoazide (PMA). **Journal of Microbiological Methods**, v 72, n 2, p. 180–184, feb. 2008.

WANG, Xiao-Qi et al. Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester Fluorescent Dye for Cell Labeling, **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v 37, n 6, p. 379-385, jun 2005.

WATERS, Jennifer C. and SWEDLOW, Jason R. Interpreting fluorescence microscopy images and measurements. **In Evaluating Techniques in Biocchemical Research**, D Zuk, ed. Cambridge, MA: Cell Press, 37-42, 2008. Disponível em: < <http://www.cellpress.com/misc/page?page=ETBR> > acesso em 8 de março de 2016.

WEBSTER, Jonh; WEBER, Roland W.S. Introduction to Fungi. Cambridge, **University Press**. 2007.

WHITE, Dorothy. A. *Aspergillus* pulmonary infections in transplant recipients. **Clin. Chest. Med**, v 26, n 4, p. 661-674, dec. 2005)

WINGENDER, Jost; FLEMMING, Hans Curt. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. **International Journal of Hygiene and environmental Health**, Alemanha, v. 214, n. 6, p. 417-423, jun. 2011.

WINGENDER, Jost; FLEMING, Hans Curt. Contamination potential of drinking water distribution network biofilms. **Water Sci Technol**. 49, n 11-12, p. 277-286, feb. 2004.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guideline for drinking-water quality. First addendum to third edition. Vol 1. **Recommendations, 3rd ed. World Health Organization , Geneva**. 2006.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Water Safety in Distribution Systems**. 2014. Disponível em: <http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/Water_Safety_in_Distribution_System/en/>. Acesso em 06-02-2016 11:25 h.

WARRIS, Adilia; BJORNEKLETT, Arvid; GAUSTAD, Peter. Invasive pulmonary aspergillosis associated with infliximab therapy. **N Engl J Med**, v 344, n1 4, p.1099–1100, apr. 2001.

WARRIS, Adilia. et al., Recovery of filamentous fungi from water in a paediatric bone marrow transplantation unit. **Journal of Hospital Infection**, V. 47, n 2, p. 143-148, feb. 2001.

WARRIS, Adilia; ABRAHAMSEM, Tore Gunnar; VERWIJE, Paul E. Contamination of hospital water with *Aspergillus fumigatus* other molds. **Clin. Infect. Dis**, v 34, n 8, p.1159-1160, may 2002

YAMAGUCHI, Miriam Ueda. et al. Yeasts and filamentous fungi in bottled mineral water and tap water from municipal supplies. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v 50, n 1, p. 1- 9, jan. 2007.

ZACHEUSS, Outti M. et al., Soft deposits, the key site for microbial growth in drinking water distribution networks. **Water Research**, v 35, n 7, p. 1757-1765, aug. 2001.

ANEXO 1

MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

A tabela 15 descreve os meios de cultura utilizados para as análises micológicas de quantificação, isolamento, identificação e formação de biofilmes em placas de poços e no reator Propella. A tabela 16 as soluções usadas nos experimentos

Tabela 15, meios de cultura utilizados no experimento

Meio de cultura	Referência ou procedência	Finalidade	Formulação
R2A (suplementado com cloranfenicol)	Difco- Becton, Dickinson and Company-Sparks, USA	Quantificação	Extrato de levedura 0,05%, proteose de peptona 0,05%, casaminoácidos 0,05%, dextrose 0,05%, amido solúvel 0,05%, 0.3 g piruvato de sodio 0,03%, fosfato dipotássico 0,03%, sulfato de magnésio 0,005%, agar 1,5% e cloranfenicol 0,01% em 1 L de água destilada, pH 7,2 ± 0,2
R2B (caldo)	Preparado a partir dos reagentes	Nutriente para formação de biofilme	A mesma do R2A , porém sem Agar e sem cloranfenicol
R2B (caldo) 50%	Preparado a partir dos reagentes	Nutriente para formação de biofilme	A mesma do R2B com redução de 50% na concentração
SDA - Saboraud dextrose agar (suplementado com cloranfenicol)	Preparado a partir dos reagentes	Quantificação	Peptona 1%, dextrose 4%, agar 1,5% e cloranfenicol 0,01% em 1 L de água destilada, pH 5.4-5.8.
BDA - Batata dextrose agar	Preparado a partir dos reagentes	Isolamento e identificação	Extrato de batata 20%, glicose 2% e agar 15% em 1 L de água destilada, pH 6.8-7.0.
MEA – Agar extrato de malte	Blakeslee (1915)	Isolamento e identificação	Extrato de malte 2%, peptona 0,1%, glicose 2%, Agar 1,5% em 1 L de água destilada, pH 5,0-5,5
CYA - Czapek Yeast Extract Agar	PITT; HOCKING, (1973)	Identificação	Sacarose 3%, nitrato de sódio 0,3%, fosfato dipotássico 0,1%, sulfato de magnésio 0,05%, cloreto de potássio 0,05%, sulfato ferroso 0,001%, extrato de levedura 0,5%, Agar 1,5% em 1L de água destilada.
CZ - Czapek Dox Solution Agar	Formulado por Czapek(1902), modificado por Dox (1910).	Identificação	Solução de Czapek 10 mL, fosfato de potássio bibásico 0,1%, sacarose 3%, Agar 1,5%, em 1 L de água destilada, pH 6,0-6,4 Solução Czapek: NaNO ₃ 30 g; KCL 5g; MgSO ₄ .7H ₂ O 5g; FeSO ₄ .7H ₂ O 0,1 g; ZnSO ₄ .7H ₂ O 0,1 g; CuSO ₄ .5H ₂ O 0,05g; Água destilada 100 mL

Fonte: Oliveira H M, 2015

Cont Tabela 15

Meio de cultura	Referência ou procedência	Finalidade	Formulação
CZ - Czapek Dox Solution Agar	Formulado por Czapek(1902), modificado por Dox (1910).	Identificação	Solução de Czapek 10 mL, fosfato de potássio bibásico 0,1%, sacarose 3%, Agar 1,5%, em 1 L de água destilada, pH 6,0-6,4 Solução Czapek: NaNO ₃ 30 g; KCL 5g; MgSO ₄ .7H ₂ O 5g; FeSO ₄ .7H ₂ O 0,1 g; ZnSO ₄ .7H ₂ O 0,1 g; CuSO ₄ .5H ₂ O 0,05g; Água destilada 100 mL

Fonte: Oliveira H M. 2015

Tabela 16 Soluções utilizadas nos experimentos

Solução	Finalidade	Preparação
Sol Estoque de fosfato de potássio monobásico	Preparação da água de diluição tamponada	Dissolver 34 g de KH ₂ PO ₄ , em 500 mL de água destilada. Se necessário ajustar o pH para 7,2 adicionando pequenas quantidades de hidróxido de sódio 1 N (preparado dissolvendo 4,0 g de hidróxido de sódio em 100 mL de água destilada). Completar para 1000 mL com água destilada
Solução estoque de cloreto de magnésio	Preparação da água de diluição tamponada	Dissolver 81,1 g de MgCl ₂ .6H ₂ O em água destilada e completar para 1000 mL.
Água de diluição tamponada	Preparação das diluições das amostras e lavagem dos funis de filtração durante o processo de filtração entre amostras consecutivas.	Adicionar 1,25 mL da solução estoque de fosfato de potássio monobásico e 5 mL de solução de cloreto de magnésio, dentro de um frasco autoclavável de boca larga (cap. 1000 mL) e diluir para 1000 mL com água destilada. OBS: antes da utilização das qualquer alteração da turbidez ou presença de material em suspensão. Em caso afirmativo, a solução deverá ser descartada soluções acima, verificar se há e nova solução preparada.

Fonte; Oliveira H M, 2015

Cont Tabela 16

Solução salina com tween 80	Preparação da suspensão de esporos de fungos	NaCl 0,85 g mais 0,05g Tween 80 em 100 mL e água destilada. A solução deve ser esterilizada em autoclave a 121 °C por 5 min.
	Água de diluição tamponada	Adicionar 1,25 mL da solução estoque de fosfato de potássio monobásico e 5 mL de solução de cloreto de magnésio, dentro de um frasco autoclavável de boca larga (cap. 1000 mL) e diluir para 1000 mL com água destilada.
		OBS: antes da utilização das qualquer alteração da turbidez ou presença de material em suspensão. Em caso afirmativo, a solução deverá ser descartada soluções acima, verificar se há e nova solução preparada.
Solução corante azul de lactofenol ou azul de algodão	Coloração de lâminas para visualização das estruturas no microscópio	Fenol fundido: 200 mL/L; Ácido láctico: 200 mL/L; Glicerina branca: 400 mL/L; Azul de algodão: 0,5 g/L; Água purificada: 200 mL/L.
Solução de hipoclorito de sódio 15% v/v	Desinfecção do reator Propella	Medir em proveta 150 mL de solução de hipoclorito de sódio comercial (2 a 2,5%) e completar para 1000 mL
Solução de Etanol 70%	Para desidratação de biofilme no protocolo DNA-FISH	Medir 736,8 de álcool 96 °GL (=95%) em balão volumétrico e completar para 1000 com água destilada
Solução de Etanol 80%	Para desidratação de biofilme no protocolo DNA-FISH	Medir 842,1,8 de álcool 96 °GL (=95%) em balão volumétrico e completar para 1000 com água destilada
Tampão de hibridização DNA-FISH	Para hibridização da sonda no protocolo DNA-FISH	360 µL de NaCl 5M, 40 µL de TRIS 1M, 300 µL de formamida, 130 µL de água ultrapura (MilliQ), 4 µL de SDS 10%, em tubo eppendorf de 2 mL.
Tampão de lavagem	Etapa de lavagem no protocolo DNA-FISH	1 mL de TRIS 1 M, 3180 µL de NaCl 5 M, e ajustar para 50 mL em um tubo de Falcon com água ultrapura. Adicionar 50 µL de SDS 10% e homogeneizar em vortex.

Fonte; Oliveira H M, 2015