



**HELENA MARIA BEZERRA DE OLIVEIRA**

**FUNGOS FILAMENTOSOS NA ÁGUA E FORMANDO BIOFILMES NA REDE  
DE DISTRIBUIÇÃO DE ÁGUA POTÁVEL DO SISTEMA ALTO DO CÉU,  
RECIFE - PE**

**RECIFE  
NOVEMBRO/2010**



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

**FUNGOS FILAMENTOSOS NA ÁGUA E FORMANDO BIOFILMES NA  
REDE DE DISTRIBUIÇÃO DE ÁGUA POTÁVEL DO SISTEMA ALTO  
DO CÉU, RECIFE - PE**

**NOME: HELENA MARIA  
BEZERRA DE OLIVEIRA.**

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

**Área de Concentração:** Fungos de interesse industrial.

**Orientador:** Norma Buarque de Gusmão

**Co-orientador:** Nelson Manuel Viana. Lima

**RECIFE**

**NOVEMBRO/2010**

**Oliveira, Helena Maria Bezerra de**

**Fungos filamentosos na água e formando biofilmes na rede de distribuição de água potável do Sistema Alto do Céu, Recife-PE/ Helena Maria Bezerra de Oliveira. – Recife: O Autor, 2010.**

**80 folhas : il., fig., tab.**

**Orientadora: Norma Buarque de Gusmão**

**Coorientador: Nelson Manuel Viana Lima**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biologia de Fungos, 2010.**

**Inclui bibliografia e anexo**

1. Água- estações de tratamento 2. Microorganismos 3. Fungos  
I. Título.

**579.5**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2011-232**

**FUNGOS FILAMENTOSOS NA ÁGUA E FORMANDO BIOFILMES NA  
REDE DE DISTRIBUIÇÃO DE ÁGUA POTÁVEL DO SISTEMA ALTO  
DO CÉU, RECIFE - PE**

**HELENA MARIA BEZERRA DE OLIVEIRA**

Data da defesa: 26/11/2010

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**MEMBROS TITULARES**

---

Dr<sup>a</sup>. Norma Buarque de Gusmão (orientadora)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Nelson Manuel Viana Silva Lima  
IBB/Centro de Engenharia Biológica – Universidade do Minho

---

Dr Cledir Rodrigues Santos  
IBB/Centro de Engenharia Biológica – Universidade do Minho

---

Dr<sup>a</sup>. Cristina Maria Souza Motta  
Universidade Federal de Pernambuco

“...a vida é de fato escuridão,  
exceto lá onde houver impulso,  
e todo impulso é cego, exceto onde houver  
sabedoria,  
e toda sabedoria é vã, exceto onde há  
trabalho,  
e todo trabalho é vazio, exceto quando há  
amor,  
e quando voce trabalha com amor,  
você se liga com você mesmo e com o outro,  
e com Deus.”

(Khalil Gibran)

## **Agradecimentos**

A Deus origem e destino de todas as coisas.

Ao meu pai por me ensinar que o conhecimento vale tanto mais, quanto mais ele for compartilhado.

À minha mãe exemplo de coragem e fé.

Ao meu esposo Ivson por me apoiar e ajudar nessa caminhada.

Aos meus filhos que dão sentido e motivação à minha vida.

À minha orientadora Professora Norma Buarque de Gusmão, pelo seu apoio, ensinamentos, paciência, companheirismo e principalmente pelo exemplo.

Ao Co-orientador Professor Nelson Lima, pelos ensinamentos, incentivo, pelo jeito estimulante de desafiar na busca do conhecimento, e por viabilizar o aprendizado junto à Micoteca da Uminho

Ao Cleir Santos pelo apoio, ensinamentos e amizade.

À professora Cristina Motta pelos ensinamentos e colaboração.

À Virginia pela amizade e inestimável apoio pessoal, técnico e científico

À Maria Salete de Oliveira por ter acreditado no meu potencial e dado oportunidade para realização deste sonho.

À Diretoria de Controle Operacional da Compesa por apoiar este estudo.

À Superintendência de Controle de Processos na pessoa de Ronaldo G. Castro

À Gerência de Controle de qualidade na pessoa de Maria Julita Formiga.

À Coordenação de Laboratórios de controle na pessoa de Nancy Lins por todo apoio, incentivo e colaboração.

Ao Roberto Luiz, por sua amizade, colaboração e pela ajuda na concepção dos amostradores.

Ao Sávio André pelas dicas e por toda ajuda

A toda equipe da ETA Alto do Céu.

Ao herói anônimo que salvou o amostrador no canal de decantação.

A toda equipe do CAS Dois Irmãos.

A todos os colegas da Compesa, em especial Márcio, Fabiana e Tacitana, pela ajuda com as análises.

À Maira, Talyce, Yuri pelo apoio incondicional e bom humor sempre.

À Patricia e Diana por toda ajuda.

À Giovana por sua solidariedade

Aos colegas da turma do mestrado.

À Rita de Cássia pelo apoio, colaboração e incentivo

A todos os colegas do LFEA, pelo excelente convívio e partilha cotidiana.

Aos amigos do Laboratório de Coleção de Cultura do Departamento de Antibióticos em especial Fátima Regina, Eliz, Érika e Adriana.

Aos amigos do Laboratório de Elaboração do Meio de Cultivo e Preparo Material do Departamento de Antibióticos, em especial Luiz, José Orlando e José Carlos.

Aos professores da Pós Graduação em Biologia de Fungos pelos ensinamentos transmitidos, em especial a professora Maria Auxiliadora pelo seu exemplo de garra e amor a ciência.

À Cristiane Ottoni por toda solidariedade e ajuda.

Aos colegas da Micoteca da Universidade do Minho pela acolhida, companheirismo e apoio.

À Compesa por dar suporte e apoio que tornaram possível a execução deste trabalho

À UFPE e Departamento de Antibióticos por propiciarem este trabalho.

Ao programa de Pós Graduação em Biologia de Fungos pelo auxílio para o deslocamento que permitiu a realização de parte deste trabalho na Uminho –PT.

À Universidade do Minho pela parceria dando suporte técnico e científico

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

## RESUMO

As 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. As bactérias e os fungos têm sido bem sucedidos nesse meio por possuírem estratégias metabólicas que lhes permitem sobreviver em ambientes oligotróficos como água potável. Assim, algumas espécies de fungos podem ser encontradas habitando sistemas de distribuição de água. 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 e bactérias heterotróficas na rede de distribuição de um sistema de abastecimento em Recife-PE. As coletas foram realizadas até 150 dias nos pontos: reservatório da estação de tratamento de água, início, meio e fim da rede de distribuição. Fungos e bactérias heterotróficas foram quantificados por filtração em membrana, utilizando peptona glicose rosa Bengala Agar com antibióticos e R2A, incubação a 30° até 10 dias e 35°C por 48 h respectivamente. As bactérias mantiveram-se dentro do limite estabelecido pela legislação. Das 180 amostras de fungos isoladas, os mais abundantes foram *Penicillium* e *Aspergillus*, seguido de *Phoma*, *Curvularia*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Nigrospora*, *Pestalotiopsis* e *Cunninghamella*. Nos canos de distribuição da rede foram encontrados filamentos de fungos, formando biofilmes. Como a água pode veicular a disseminação de patógenos, espera-se com estes registros, contribuir para o conhecimento sobre o envolvimento dos fungos no sistema de distribuição de água potável Alto do Céu em Recife –PE.

**Palavras Chave:** Estação de Tratamento, Microrganismos, Cloro, Canos Rede

**ABSTRACT**

The many potential issues related to fungi in drinking water include blockage of water pipes, changes of odor, taste and pigments, spreading of pathogenic fungi and the mycotoxin production. Fungi and bacteria have been successful because they have metabolic strategies that allow them to survive in oligotrophic environments such as drinking water. Thus, some fungal species can be found inhabiting the water distribution systems. Brazilian law, similarly to other country's law, does not require fungus testing, nor establishes limits for presence of these microorganisms in drinking water. This research concerns occurrence of filamentous fungi and heterotrophic bacteria in the water distribution system of Recife city, in Brazilian state Pernambuco. Collections were performed up to 150 days in four points: water treatment plant reservoir, starting, middle and end of water distribution network. Fungi and heterotrophic bacteria were quantified by membrane filtration using peptone glucose rose Bengal agar with antibiotics and R2A, incubated at 30 °C to 10 days, 35 °C by 48 h respectively. Bacteria were within the limits set by law. Of 180 fungi were isolated, the most abundant genus were *Penicillium* and *Aspergillus*, followed by *Phoma*, *Curvularia*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Nigrospora*, *Pestalotiopsis* and *Cunninghamella*. Filaments of fungi were found forming biofilms in the pipes of distribution network. Since water can disseminate pathogens, we hope, with these registers, to contribute to the knowledge about fungal involvement in Alto do Céu Drinking water distribution system, Recife-PE.

**Keywords:** wastewater treatment, microorganisms, chlorine, Pipes Network

**Lista de abreviaturas**

CAS – Coordenação de Agência de Serviço  
CIV- Cilindric intravacuolar structures  
COMPESA- Companhia pernambucana de saneamento  
CW- Calcofluor White  
CYA- Czapek Yeast Extract Agar  
CZ- Czapek Agar  
EPS- Substância poliméricas extracelulares  
FISH- Fluorescent *in situ* Hybridization  
FR- Final de rede  
IR- Início de rede  
MEA- Agar Extrato de Malte  
MR-Meio de rede  
PGRBA- Peptona glicose rosa Bengala Agar  
pH- Potencial hidrogeniônico  
UFC/L- Unidades formadoras de colônias por litro  
UV- Ultra violeta

## Lista de figuras

<b>Fundamentação Teórica</b>		<b>Pág.</b>
Figura 1	Percentual de água salgada e doce no planeta (CLARKE E KING, 2004).....	19
Figura 2	Disponibilidade da água doce no planeta, dados de (CLARKE E KING, 2004)..	20
Figura 3	Demanda de água por tipo de uso (CLARKE E KING, 2004).....	20
Figura 4	Regiões hidrográficas do Brasil – CNRH /ANA 2009.....	21
Figura 5	Distribuição espacial das vazões específicas no território brasileiro – Conjuntura dos Recursos Hídricos no Brasil. Fonte: ANA, 2009.....	22
Figura 6	Mapa representativo do semi-árido brasileiro, mostrando os estados nordestinos. (A) Região hidrográfica do atlântico Oriental. (B) região hidrográfica do São Francisco. Fonte: ANA, 2009.....	23
Figura 7	Classificação da qualidade da água em função do lançamento de esgotos nas regiões hidrográficas Atlântico Nordeste Oriental (A) e São Francisco (B). Fonte: (ANA, 2009).....	24
Figura 8	Representação dos sistemas do abastecimento urbano em Pernambuco – Conjuntura dos Recursos Hídricos no Brasil. Fonte: (ANA, 2009).....	25
Figura 9	Representação do diagnóstico do abastecimento em Pernambuco. Fonte: ANA, 2009.....	25
Figura 10	Modelo proposto por Harding e colaboradores (2009) para a formação de biofilme por fungos filamentosos.....	35
Figura 11	Estrutura química do Calcofluor.....	38
 <b>Capítulo 3</b>		
Figura 1	Valores de pH da água nos pontos de coleta por período.....	46
Figura 2	Temperatura da água nos ponto de coleta por período.....	47
Figura 3	Valores de Cloro residual nos ponto de coleta por período.....	48
Figura 4	Bactérias heterotróficas $10^2$ UFC/L nos pontos de coleta por período.....	49
Figura 5	Fungos totais UFC/L nos pontos de coleta por período.....	50
Figura 6	Concentração de bactérias heterotróficas $10^{-1}$ UFC/L x fungos filamentosos UFC/L no Reservatório de água tratada da estação de tratamento de água - RETA.....	51
Figura 7	Concentração de bactérias heterotróficas $10^{-1}$ UFC/L x fungos filamentosos UFC/L no início da rede de distribuição - IR.....	52

Figura 8	Concentração de bactérias heterotróficas $10^{-1}$ UFC/L x fungos filamentosos UFC/L no meio da rede de distribuição – MR.....	52
Figura 9	Concentração de bactérias heterotróficas $10^{-1}$ UFC/L x fungos filamentosos UFC/L no fim da rede de distribuição – FR.....	53
Figura 10	Densidade de bactérias heterotróficas versus Fungos totais.....	54

#### Capítulo 4

Figura 1	Amostradores em PVC.....	65
Figura 2	Microscopia de epifluorescência de filamentos fúngicos corados com calcofluor nos biofilmes formados sobre placas de polietileno dos amostradores, exibindo autofluorescência e filamento (A e B).....	68
Figura 3	Imagens de microrcopia de epifluorescência, mostrando autofluorescência em placa de PVC (A,B,C) e em placa de acetato (C,D,E) usando respectivamente nos filtros azul (A,D), verde (B,E) e vermelho (C e F).....	68
Figura 4	Imagens de epifluorescência de tubos da rede com resultados positivos para detecção de biofilme com filamentos fúngicos com CW (A), (B) e (C).....	69
Figura 5	Imagens de epifluorescência de tubos da rede, corados após tratamento com glicose 1% para melhorar o sinal de fluorescência.....	70
Figura 6	Imagens de epifluorescência de tubos da rede, submetidos a hibridização com sondas oligonucleotídicas –FISH. Ensaio presuntivo: filamentos corados com CW em A, D, G, J. Tipificação: filamentos hibridizados com sonda EUK 516 para eucariotos em C, F, I, L, e com sonda FUN1429 específica para fungos em B, E, H, K.....	71
Figura 7	Imagem ampliada de epifluorescência do tub 6 da rede, submetido a coloração com FUN 1 exibindo fluorescência vermelho – laranja típica de células viáveis	72

**Lista de tabelas**

<b>Capítulo 2</b>		<b>Pág.</b>
Tabela 1	Disponibilidade dos recursos hídricos <i>versus</i> densidade demográfica.	22
<b>Capítulo 3</b>		
Tabela 1	Gêneros de fungos isolados da água.....	55

**SUMÁRIO****Pág.**

RESUMO.....	<b>VII</b>
ABSTRACT .....	<b>VIII</b>
Lista de abreviaturas.....	<b>IX</b>
Lista de figuras.....	<b>X</b>
Lista de tabelas.....	<b>XII</b>
1.INTRODUÇÃO .....	<b>16</b>
1.1 OBJETIVOS.....	<b>18</b>
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	<b>19</b>
2.1. Água e sua utilização.....	<b>19</b>
2.2. Distribuição da água no mundo.....	<b>19</b>
2.3. Distribuição da água no Brasil.....	<b>21</b>
2.4. Água em Pernambuco.....	<b>23</b>
2.5 Água e legislação.....	<b>26</b>
2.6. Caracterização da água de abastecimento.....	<b>27</b>
2.6.1 pH.....	<b>28</b>
2.6.2. Temperatura.....	<b>28</b>
2.6.3. Cloro residual.....	<b>29</b>
2.7. A água e os microrganismos.....	<b>29</b>
2.7.1. Os fungos e a água.....	<b>32</b>
2.7. 2 Biofilmes.....	<b>34</b>
2.8. Métodos de detecção e enumeração de fungos em água.....	<b>36</b>
2.8.1. Coloração com Calcofluor White MR2 .....	<b>37</b>
2.8.2. Hibridização Fluorescente “in situ” - FISH.....	<b>38</b>
2.8.3. FUN <sup>®</sup> 1.....	<b>39</b>
3. FUNGOS EM UM SISTEMA DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA POTÁVEL EM RECIFE, PE.....	<b>41</b>
Resumo.....	<b>42</b>
Abstract.....	<b>43</b>
Introdução.....	<b>44</b>
Materiais e métodos.....	<b>44</b>
Amostragem.....	<b>44</b>
Análises físico-químicas.....	<b>45</b>
Análises microbiológicas.....	<b>45</b>

Isolamento e identificação de fungos filamentosos.....	45
Tratamento estatístico.....	46
Resultados e discussão.....	46
Análises físico-químicas.....	46
pH.....	46
Temperatura.....	47
Cloro residual livre.....	48
Quantificação de bactérias hetertróficas.....	49
Quantificação de fungos.....	50
Comparação bactérias heterotróficas e fungos filamentosos.....	51
Isolamento e identificação de fungos filamentosos.....	55
Conclusões.....	57
4. FUNGOS EM BIOFILMES NA REDE DE DISTRIBUIÇÃO DE ÁGUA POTÁVEL EM RECIFE, PE.....	59
Resumo.....	60
Abstract.....	61
Introdução.....	62
Materiais e métodos.....	64
Amostradores.....	64
Coleta dos amostradores.....	65
Transporte e conservação das amostras.....	65
Detecção <i>in situ</i> .....	66
Coloração com Calcofluor .....	66
Hibridização Fluorescente <i>In Situ</i> - FISH.....	66
Coloração com Fun 1.....	67
Microscopia de epifluorescência.....	67
Resultados e discussão.....	67
Detecção <i>in situ</i> de biofilmes com Calcofluor.....	67
Amostradores com placa de polietileno.....	68
Teste de autofluorescência.....	68
Amostradores com placas de acetato.....	69
Amostras de canos substituídos da rede de distribuição.....	69
Detecção e tipificação com FISH.....	71
Detecção com FUN 1.....	72
Conclusões.....	73

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
ANEXO.....	80

## 1. INTRODUÇÃO

Uma preocupação dos consumidores em relação à qualidade da água é sua contaminação por microrganismos patogênicos. As empresas de água devem assegurar que o líquido fornecido esteja completamente livre de patogênicos (Kerr, *et al.*, 2003).

Historicamente o estudo da microbiologia da água potável focava principalmente a ocorrência de bactérias que são indicadoras de contaminação fecal. As condições que propiciam a proliferação de fungos nos sistemas de distribuição não eram investigadas. Os fatores que podem promover a colonização e desenvolvimento dos fungos neste ambiente oligotrófico e a possibilidade de metabólitos secundários, com implicações na saúde ou causando sabor e odor, não têm sido completamente estudados (Kelley, *et al.*, 1997).

No passado os fungos eram raramente considerados quando se tratava de microrganismos patogênicos na água. Uma possível razão para isto é que é comum para muitas bactérias, vírus, parasitas, ao ocorrerem na água contaminada causarem doenças agudas enquanto a contaminação por fungo, não causa (Hageskal, *et al.*, 2009).

Os fungos são cosmopolitas ocupando quase todos os nichos e ambientes, ar, solo e água. Não é surpreendente que sejam encontrados na água bruta, nos reservatórios e nos sistemas de distribuição (Kinsey, *et al.*, 2003, Hageskal, *et al.*, 2006, Grabinska - Loniewska, *et al.*, 2007, Hussain, *et al.*, 2010).

A presença de fungos na água potável e em biofilmes do sistema de distribuição tem recebido atenção limitada. Isto se deve em parte ao fato de que a relação entre a ocorrência de fungos e a qualidade da água ainda é pouco esclarecida (Dogget, *et al.*, 2000). Uma questão relevante para a saúde humana é a formação de biofilmes nos reservatórios de água e no sistema de distribuição, uma vez que estes biofilmes impedem a eficiência da operação desses sistemas. Além disso, oferece risco a saúde do consumidor criando um habitat para organismos patogênicos (Flemming, *et al.*, 2002).

Fungos são menos susceptíveis ao cloro que as bactérias. Existem evidências que sugerem que os fungos sobrevivem e se multiplicam nos sistemas de distribuição em filmes nas superfícies e nos sedimentos, particularmente onde as condições são mais quentes ou o fluxo é restrito (Kinsey, *et al.*, 2003) A presença de biofilmes em sistemas de distribuição de água causa problemas operacionais como corrosão das canalizações e deterioração da qualidade da água (Hu, *et al.*, 2005).

Não existem métodos padronizados internacionalmente para análise e identificação de fungos na água. Entretanto, a filtração em membrana é um método muito utilizado para enumeração e isolamento de fungos (Paterson, *et al.*, 2009). É difícil estudar *in situ* as paredes das canalizações

e a maioria das informações sobre desenvolvimento de biofilmes foram derivadas de modelos de laboratório onde as condições podem ser facilmente reguladas (Kerr *et al.*, 2003).

Fungos filamentosos em biofilmes têm sido demonstrados apenas em casos específicos. A detecção de fungos filamentosos pelos métodos tradicionais é complexa, indireta e demorada. Além disso, quando usam remoção dos biofilmes destroem toda sua estrutura. Fazendo-se necessário o uso de técnicas não invasivas, sensíveis e específicas para o estudo dos biofilmes. Métodos não dependentes de cultivo combinam corantes fluorescentes, sondas moleculares e microscopia de epifluorescência, para estudos *in situ* de populações microbianas (Gonçalves, *et al.*, 2006, Donlan e Costerton, 2002, Kator e Rodhes, 2003, Amann, 2001).

Gonçalves *et al.* 2006, empregaram uma combinação de corante fluorescente e sondas oligonucleotídicas r RNA para detecção *in situ* de biofilmes na rede de distribuição de água potável. O objetivo deste trabalho foi isolar e identificar os fungos filamentosos da água distribuída e detectar *in situ* biofilmes com fungos filamentosos nos canos de distribuição de água potável no sistema Alto do Céu- Recife, PE.

## **1.1OBJETIVOS**

### **Geral**

O presente trabalho visa isolar e identificar fungos filamentosos na água e em biofilmes, na rede de distribuição de água potável do sistema Alto do Céu em Recife – PE.

### **Específicos**

- Isolar fungos filamentosos na água;
- Isolar fungos filamentosos em biofilmes no sistema de distribuição de água;
- Identificar os fungos filamentosos isolados da água;
- Detectar e tipificar os biofilmes a partir do uso de marcadores moleculares e microscopia de epifluorescência;
- Verificar dentre os fungos isolados aqueles que, de acordo com a literatura, causam danos à saúde.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1. Água e sua utilização

A água é o alimento mais fundamental e imprescindível, pois todos os outros sejam os de origem animal ou vegetal, dependem dela para serem produzidos. Inúmeros alimentos são produzidos a custa da utilização de grandes volumes de água. Por exemplo, para produzir 1 Kg de arroz são necessários 3000 L de água, para cada xícara de café, são gastos 140 L, cada litro de leite produzido consome 1000 L (WFN, 2010). A disponibilidade de água afeta o desenvolvimento de uma região ou país com consequência direta na saúde, na economia e na cultura de um povo.

A água é um recurso finito e, ao contrário de outros escassos recursos consumíveis, é usada para atender as necessidades da sociedade, como as biológicas, econômicas, estéticas e prática espiritual. Não existe o gerenciamento da água para um único objetivo. Todo gerenciamento da água tem múltiplos usos e baseia-se na coexistência de interesses competitivos. Dentro de uma nação estes interesses incluem uso doméstico, agricultura, geração de energia elétrica, atividades de lazer e ambiental. Dependendo da sua utilização sempre haverá conflito à medida que mais interesses econômicos e sociais estão envolvidos (Aaron, 2010).

### 2.2. Distribuição da água no mundo

Existem cerca de 1.386 milhões de quilômetros cúbicos de água no planeta, formando oceanos, mares, rios, aquíferos, gelo, neve e vapor d'água. Deste volume 97,5 % são de águas salgadas e 2,5 % são de águas doces (Figura 1).

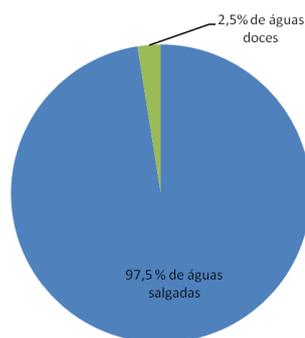


Figura 1. Percentual de água salgada e doce no planeta (Clarke e King, 2004).

Do pequeno percentual (2,5 %) de águas doces 69,5 % estão indisponíveis (Figura 2) na forma de geleiras, neves, gelo e permanentemente congelada no subsolo, enquanto apenas 30,5 % estão disponíveis como águas subterrâneas e superficiais (Clarke e King, 2004)

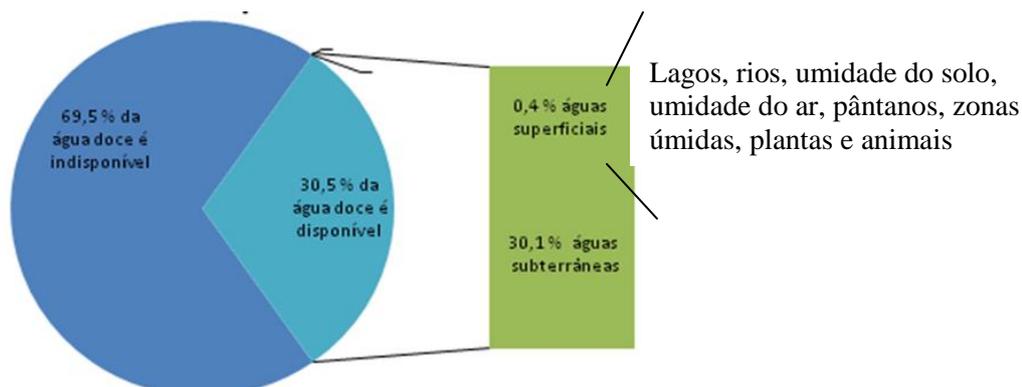


Figura 2. Disponibilidade da água doce no planeta (Clarke e King, 2004).

Do percentual da água doce (30,5 %) disponível, 30,1 % são subterrâneas e apenas 0,4 % encontram-se nas superfícies formando lagos, rios, pântanos, córregos, zonas úmidas, umidade do solo, umidade do ar, plantas e animais (Clarke e King, 2004).

Com o baixo percentual de água doce disponível, o suprimento no mundo está em crise e a situação tende a piorar porque o volume de água doce superficial é fixo (não pode ser aumentado nem diminuído) enquanto os níveis de poluição hídrica, ao contrário, têm aumentado. Entretanto, as populações crescem, as aspirações individuais aumentam e cada vez mais se tem menos água disponível *per capita*. A escassez de água é a maior barreira para o desenvolvimento e é uma das razões pelas quais tantas pessoas no mundo pobre ainda continuam pobres. Na maioria dos locais a agricultura responde pelo maior uso da água (Figura 3) sendo responsável pela utilização de 70 % de toda água, depois a indústria e produção de energia gastam 20 %, e finalmente o uso doméstico de água que é essencial a vida (para beber, preparar alimentos, higiene e banho) permanece como o menor percentual da água em relação aos dois anteriores, respondendo por apenas 10 % de todo suprimento de água do planeta. O mais grave é que parte dessa água é devolvida tão poluída para os mananciais, que não é mais adequada para consumo humano (Clarke e King, 2004).

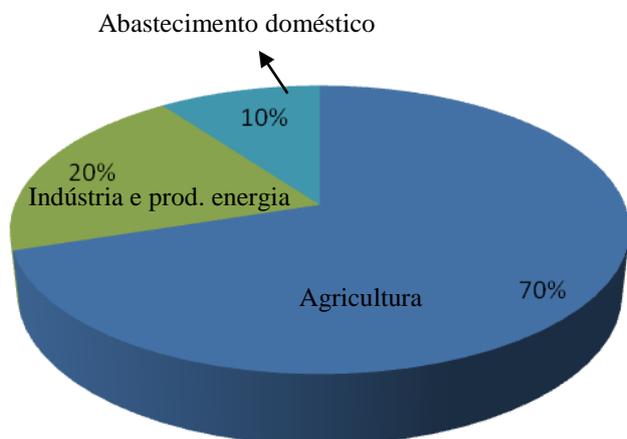


Figura 3. Demanda de água por tipo de uso (Clarke e King, 2004).

### 2.3. Distribuição de água no Brasil

O Brasil concentra em torno de 12 % da disponibilidade dos recursos hídricos do mundo sendo encontrados em rios e aquíferos. No país encontra-se o maior rio em volume do planeta, o Amazonas. Porém a distribuição desta água não é uniforme apesar da abundância. A Amazônia, onde estão as mais baixas concentrações populacionais, possui 76,6 % da água superficial no Brasil (ANA, 2009). Enquanto isso, no Sudeste, essa relação se inverte, a maior concentração populacional do país tem disponível 6% do total da água e o nordeste apenas 3% (ISA, 2010) As regiões mais populosas e industrializadas apresentam menor disponibilidade de recursos hídricos (Rede das Águas, 2010). O Brasil reúne doze grandes bacias hidrográficas (Figura 4), a Amazônica, Tocantins Araguaia, Atlântico Nordeste Ocidental, Parnaíba, Atlântico Nordeste Oriental, São Francisco, Atlântico Leste, Atlântico Sudeste, Paraná, Atlântico Sul, Uruguai e Paraguai (ANA 2009).



Figura 4. Regiões hidrográficas do Brasil – Conjuntura Nacional dos Recursos Hídricos no Brasil (ANA 2009).

A Tabela 1 apresenta com base nos dados da Conjuntura dos Recursos Hídricos no Brasil – Agência Nacional de Água (ANA, 2009) a disponibilidade hídrica e densidade demográfica das regiões hidrográficas, onde se observa a relação entre a disponibilidade de recursos hídricos e o número de habitantes pó Km<sup>2</sup>.

Tabela 1. Disponibilidade dos recursos hídricos *versus* densidade demográfica.

Região hidrográfica	Disponibilidade hídrica m <sup>3</sup> /s	Densidade demográfica hab/km <sup>2</sup>
Amazônica	73748	2,3
Tocantins-Araguaia	5447	8,7
Atlântico Nordeste Oriental	91	81,1
Atlântico Nordeste Ocidental	320	21,1
São Francisco	1886	22,1
Parnaíba	379	12,1
Atlântico Leste	305	38,6
Atlântico Sudeste	1109	127,1
Atlântico Sul	647	66,8
Paraná	5792	67,2
Uruguai	565	22,3
Paraguai	782	5,6

O Brasil possui uma vazão específica média de 20,9 L/s/km<sup>2</sup>. Em valores globais, uma grande oferta de recursos hídricos superficiais, comparada a outros países. Entretanto apresenta acentuada diferença entre suas regiões hidrográficas (Figura 5), as vazões específicas chegam a variar de 2,0 L/s/km<sup>2</sup> em bacias do semi-árido brasileiro até valores superiores a 30 L/s/km<sup>2</sup>, para região hidrográfica Amazônica (ANA, 2009).

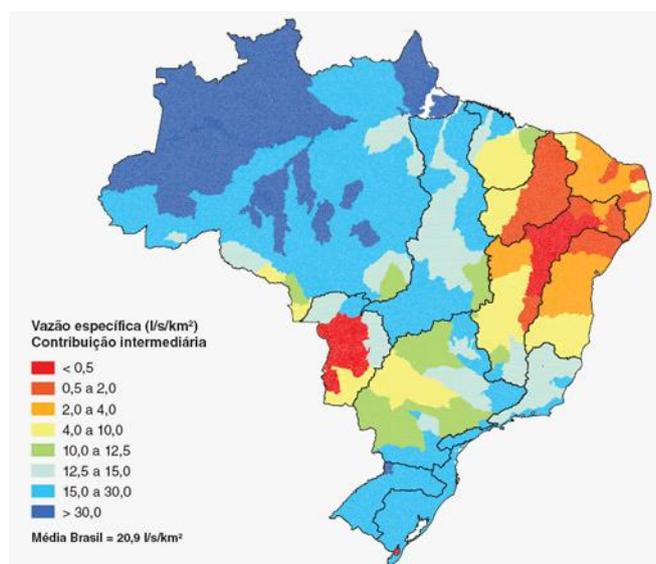


Figura 5. Distribuição espacial das vazões específicas no território brasileiro – Conjuntura dos Recursos Hídricos no Brasil (ANA, 2009).

## 2.4. Água em Pernambuco

Grande parte do território do estado de Pernambuco encontra-se no semi-árido brasileiro (Figura 6A), esta área foi delimitada com base nas seguintes características: I- precipitação pluviométrica média anual inferior a 800 milímetros; II- índice de aridez de até 0,5 calculado pelo balanço hídrico que relaciona as precipitações e a evapotranspiração potencial, no período entre 1961 e 1990; e III- risco de seca maior que 60 %, tomando-se por base o período entre 1970 e 1990 (Brasil- Ministério da Integração Nacional, 2005).

As principais bacias hidrográficas (Figura 6B e C) do estado são a Atlântico Nordeste Oriental e a bacia do São Francisco (ANA, 2009).

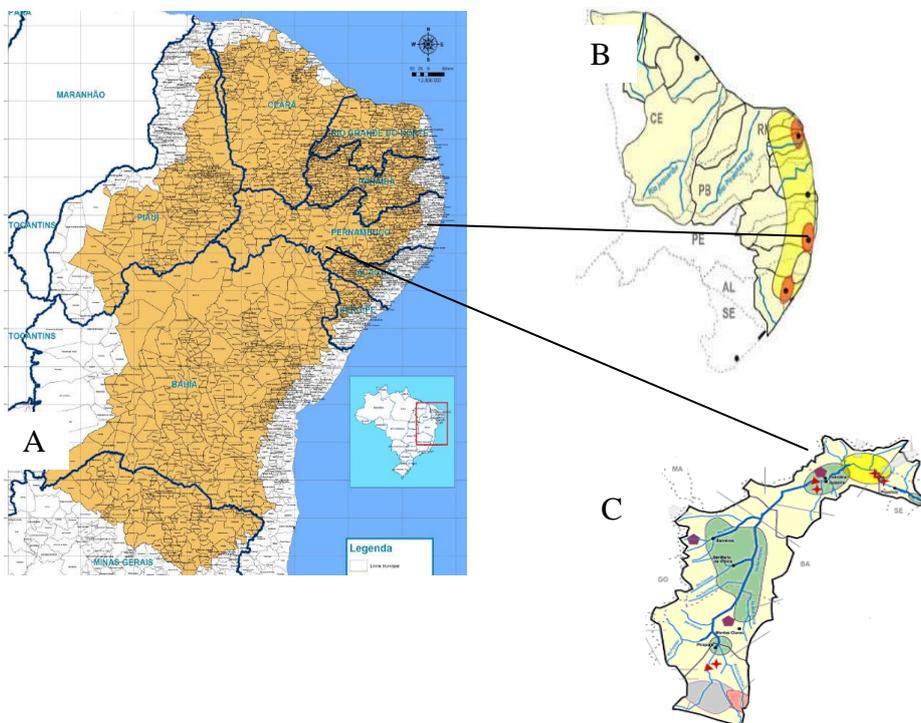


Figura 6. Mapa representativo do semi-árido brasileiro (A), mostrando os estados nordestinos. Região hidrográfica do Atlântico Nordeste Oriental (B) e região hidrográfica do São Francisco (C) (ANA, 2009).

A região hidrográfica Atlântico Nordeste Oriental abrange os estados: Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco e Alagoas, abrangendo 5 capitais da região nordeste e se compõe de pequenas bacias costeiras que se caracterizam por possuírem rios de pequena extensão e com baixa vazão (ANA, 2009).

A região hidrográfica do São Francisco abrange sete estados: Goiás, e Distrito Federal, Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, é formada pelo São Francisco, rio que nasce em Minas Gerais, segue em sentido sul-norte pela Bahia e Pernambuco, quando altera seu curso

para sudeste e chega a sua foz, no oceano Atlântico, entre os estados de Alagoas e Sergipe. A região hidrográfica do São Francisco tem 58 % de sua área no semi-árido. Estas duas regiões hidrográficas estão situadas no semi-árido, se caracterizam por ter reservas insuficientes de água em seus mananciais, temperaturas elevadas durante todo ano, baixas amplitudes térmicas e forte insolação. Seus totais pluviométricos irregulares e inferiores a 900 mm são normalmente superados por elevados índices de evapotranspiração, resultando em taxas negativas de balanço hídrico (ANA, 2009).

A região hidrográfica Atlântico Nordeste Oriental é a que possui um maior desequilíbrio em relação à demanda e disponibilidade no país, com 91 % de seus rios analisados classificados de acordo com a ANA, como possuindo situação muito crítica, crítica a preocupante. Outro fator importante no estado é o índice de qualidade dos mananciais, relacionado aos lançamentos de esgotos. Na Figura 7, são apresentadas as classificações da qualidade da água em função do lançamento de esgotos domésticos nas bacias hidrográficas do São Francisco e Atlântico Oriental (ANA, 2009).

Como pode ser observado na Figura 7A, na região Atlântico Nordeste Oriental, 42 % da extensão dos principais rios estão com péssima qualidade e 20 % são de qualidade ruim. Na região hidrográfica do São Francisco Figura 7B, 5 % dos rios apresentam qualidade péssima e 16 % ruim (ANA, 2009).

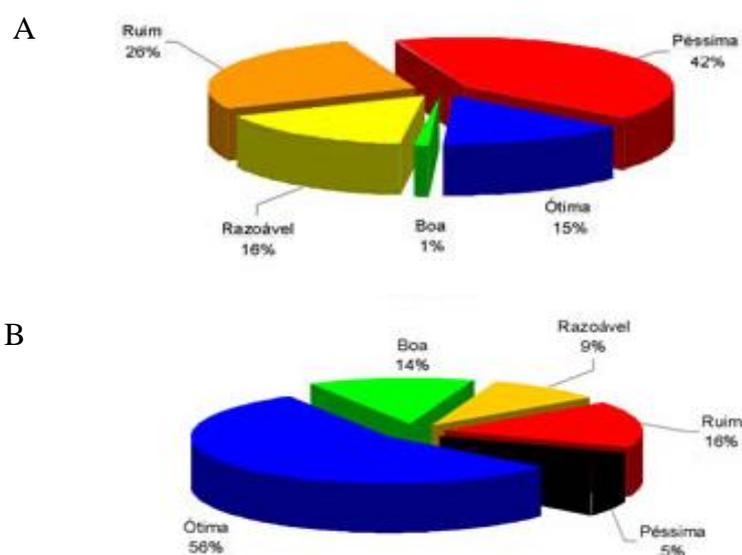


Figura 7. Classificação da qualidade da água em função do lançamento de esgotos nas regiões hidrográficas Atlântico Nordeste Oriental (A) e São Francisco (B) (ANA, 2009).

No semi-árido predominam o abastecimento por açudes e sistemas integrados (partilhados por mais de uma localidade) e no litoral nordestino são mais frequentes sistemas isolados com captações em rios perenes e poço e as regiões metropolitanas concentram sistemas de produção

mais complexos e interligados. Quase 2/3 das captações estão associadas aos mananciais de superfície, muitas vezes localizados em outras bacias hidrográficas, implicando em importantes transferências de vazões (ANA, 2009). Na Figura 8 é apresentada a situação do abastecimento em Pernambuco, em que alguns municípios apresentam um sistema integrado, ou isolado, abastecimento satisfatório ou até mesmo um sistema existente.

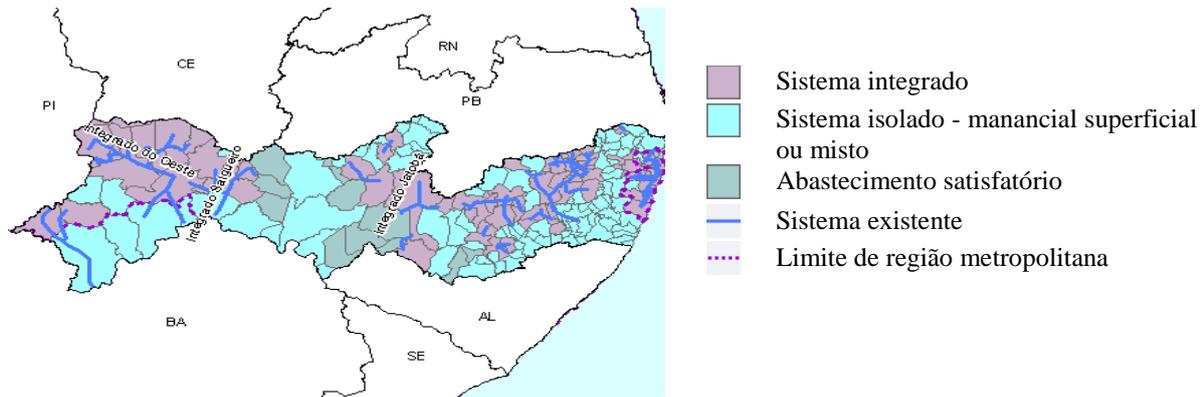


Figura 8. Representação dos sistemas do abastecimento urbano em Pernambuco – Conjuntura dos Recursos Hídricos no Brasil (ANA, 2009).

Para verificar a situação dos mananciais e dos sistemas produtores de água, em Pernambuco, quanto ao atendimento das demandas hídricas futuras, a Agência Nacional de Águas - ANA elaborou um diagnóstico do abastecimento urbano, onde identifica as áreas que vão necessitar de novos mananciais, ou de adequação dos já existentes (Figura 9).

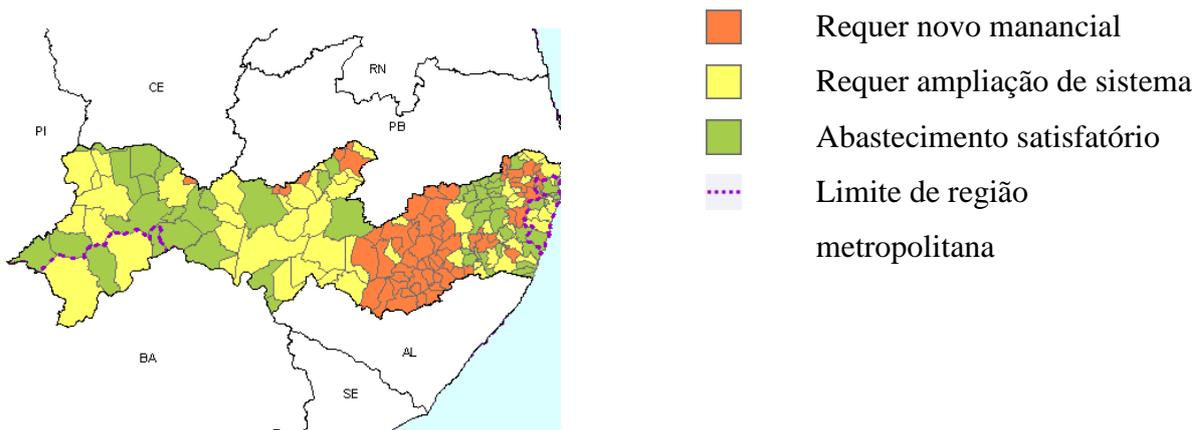


Figura 9. Representação do diagnóstico do abastecimento em Pernambuco (ANA, 2009).

Neste mapa podem ser identificadas as áreas que necessitam de melhor atendimento da demanda de recursos hídricos.

Estas características locais tornam o fornecimento de água potável em quantidade e qualidade, requeridas para atender a demanda de abastecimento humano, industrial e agrícola um enorme desafio.

No mundo, o abastecimento para consumo humano é normatizado com padrões de qualidade rigorosos visando garantir fornecimento de água segura. A contaminação da água é uma preocupação mundial, podendo causar transmissão de doenças e levar ao aumento da mortalidade, principalmente em populações sem saneamento básico (Brasil, Ministério da Saúde. OPAS, 2000).

No Brasil, o Ministério da Saúde é o órgão que regulamenta água de abastecimento público (Portaria 518/2004) e o fornecimento de água potável fica a cargo de empresas públicas estaduais (principalmente) ou municipais. Em Pernambuco a Companhia Pernambucana de Saneamento – COMPESA é a responsável pela produção, distribuição e comercialização (regime de concessão), e pelo controle de qualidade da água potável (COMPESA, 2010).

O sistema de abastecimento Alto do Céu opera desde 1958, sendo responsável por 10 % do volume distribuído na Região Metropolitana do Recife, abrangendo a zona norte da cidade do Recife (inclusive os morros desta área), Jardim Paulista, Paulista e parte do município de Olinda. A água que chega para tratamento é captada dos rios Utinga, Pitanga, Paratibe e Beberibe. A estação de tratamento de água - ETA Alto do Céu - está localizada no Bairro do Fundão, na Cidade do Recife. O sistema possui 2 reservatórios apoiados, sendo um de 5000 m<sup>3</sup> e outro de 20000 m<sup>3</sup>, dentro da área da própria ETA Alto do Céu. Na região metropolitana de Recife o abastecimento (incluindo o sistema Alto do Céu) é feito em regime de intermitência, de acordo com o calendário de abastecimento, divulgado pela COMPESA, onde constam dias e horários em que cada localidade vai receber água. Deste modo a rede passa por flutuações de fluxo e pressão, que vão de ausência de fluxo/pressão negativa a fluxo /pressão positiva (COMPESA, 2010).

## **2.5. Água e legislação**

Os suprimentos e a qualidade da água de consumo exercem importante impacto sobre a saúde e desenvolvimento socioeconômico e conseqüentemente, permanecem importantes componentes do ciclo de pobreza no mundo. A gestão do suprimento e da qualidade da água de consumo varia grandemente entre os países em resposta a fatores ambientais, climáticos, capacidade técnica, nível de desenvolvimento econômico, cultural e de normas práticas e sociais. Promover o acesso ao abastecimento de água potável de melhor qualidade, que limite o risco a saúde é cumprir um direito básico e implica em fazer um melhor uso dos recursos limitados para estas prioridades (Bartram e Howard, 2003).

Na maioria das legislações e padrões mundiais predomina a preocupação com a saúde. A Organização Mundial da Saúde – OMS publicou o Guia para Qualidade da Água, para auxiliar países de todos os níveis de desenvolvimento a estabelecerem avaliações da água que sejam efetivas na proteção da saúde (WHO, 2003).

No Brasil a resolução CONAMA 357 do Ministério do Meio Ambiente estabelece a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece condições e padrões de lançamento de fluentes, e dá outras providências. A Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde estabelece procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Nesta norma constam inúmeros parâmetros para substâncias químicas orgânicas e inorgânicas, agrotóxicos, cianotoxinas, desinfetantes, produtos secundários da desinfecção. Também são estabelecidos parâmetros físico-químicos e de radioatividade. Os parâmetros microbiológicos estabelecidos baseiam-se nos indicadores bactérias coliformes totais, coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e ainda bactérias heterotróficas. A pesquisa de patogênicos, enterovirus, cistos de *Giardia spp.* e oocistos de *Cryptosporidium sp.* nesta norma consta como recomendação, e portanto não tem caráter obrigatório (Portaria 518/2004).

Os padrões microbiológicos da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos incluem coliformes totais (incluindo fecais e *E.coli*), vírus entéricos, *Legionella*, *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia* (todos com zero como limite máximo permitido) e bactérias heterotróficas. A União Européia adota como padrões microbiológicos *Escherichia coli* e enterococos, ambos com limite 0/100 mL. A Organização Mundial da Saúde estabelece o limite não detectável/100 mL para *E. coli* ou coliformes termotolerantes, para água tratada tanto na entrada do sistema de distribuição, como na rede de distribuição e também para toda e qualquer água que se destina ao consumo humano (WHO, 2008). A legislação Suíça para água potável estabelece um limite para microfungos 100 UFC/100 mL (Hageskal *et al.*, 2007).

## **2.6. Caracterização da água de abastecimento**

A água contém substâncias dissolvidas, microrganismos e material em suspensão, que lhe confere características físico-químicas e microbiológicas. A norma de potabilidade brasileira estabelece uma série de limites e parâmetros físico-químicos e microbiológicos que tem que ser atendidos para que a água seja considerada potável, ou seja: adequada para consumo humano.

Alguns desses parâmetros, como pH, temperatura e cloro residual além de serem critérios de potabilidade e terem conotação sanitária, exercem influencia direta sobre o crescimento dos organismos nos mananciais e na rede de distribuição, e também interferem nas reações químicas envolvidas no processo de coagulação e desinfecção da água.

### 2.6.1. pH

O pH é uma característica físico-química que expressa a concentração do íon  $H^+$  numa solução. O valor de pH pode ser medido por um potenciômetro conhecido como pHmetro, que mede a diferença de potencial gerado pelos íons  $H^+$ . O pH está intrinsecamente relacionado à composição química da amostra e é uma grandeza adimensional que indica se a água é ácida, neutra ou alcalina. O pH afeta de forma muito marcada o crescimento microbiano, cada espécie tem um intervalo de pH, assim como um valor de pH ótimo, no qual a taxa de crescimento é máxima.

Diferentes grupos microbianos apresentam preferências por valores de pH característicos. A maior parte das bactérias e protozoários são neutrófilos, enquanto as algas e os fungos preferem ambientes ácidos com pH entre 4,0 – 6,0 (Côrte-Real *et al.*, 2010). Os fungos se desenvolvem na faixa de pH entre 2,5 – 9,0 mais ampla que a das bactérias e são favorecidas em  $pH < 6,5$  (Lessard e Bihan, 2003).

O pH também afeta o tratamento da água, interferido nas reações químicas de coagulação e desinfecção. Quando se usa cloro e seus derivados (hipoclorito ou isocianuratos clorados) a espécie desinfetante ativa é o ácido hipocloroso. A divisão dessas formas é função do pH, tendo-se 96,5 % do cloro na forma ácido hipocloroso (HOCl) em pH 6 e 78,5 % na forma de  $OCl^-$  em pH 8 em geral as formas ativas de cloro são predominantes em pH abaixo da neutralidade (Morató *et al.*, 2003).

### 2.6.2. Temperatura

A temperatura é um dos mais importantes fatores ambientais que afetam o crescimento microbiano. Para todos os organismos existe uma temperatura mínima ( $T_{min}$ ) abaixo da qual o crescimento não é mensurável, uma temperatura ótima ( $T_{ot}$ ) para qual a taxa específica de crescimento é máxima e uma temperatura máxima ( $T_{max}$ ), acima da qual o crescimento não é possível. Os microrganismos mesófilos apresentam uma  $T_{ot}$  em torno de 20-45°C, uma  $T_{min}$  de 15-20°C e uma  $T_{max}$  de 45°C ou menos (Côrte-Real *et al.*, 2010). Os fungos, na maioria, são mesófilos conseguem crescer entre 5 e 35°C, com temperatura ótima entre 25 e 30°C e geralmente os esporos sobrevivem mais que as hifas. A temperatura para crescimento do termotolerante *Aspergillus* é em torno de 50°C e para alguns termófilos como *Thermomyces lanuginosus* é 60°C (Kinsey *et al.*, 2003).

No processo de tratamento da água a temperatura, assim como o pH, interfere nas reações dos processos de coagulação, desinfecção, na dissolução de oxigênio e CO<sub>2</sub> na água, entre outras.

Para a maioria dos desinfetantes um aumento na temperatura implica na diminuição do tempo necessário para reduzir (em um dado fator) os níveis de contaminante (Morató *et al.*, 2003).

### 2.6.3. Cloro residual

O cloro é o desinfetante químico mais empregado pelas empresas de saneamento, sendo aplicado no tratamento convencional, após a filtração. A desinfecção é a operação que assegura proteção contra o risco de infecção de origem hídrica (OPAS, 2000). O cloro é adicionado à água, em excesso, para que após reagir com compostos orgânicos e inorgânicos, reste algum resíduo de cloro na água distribuída, para inativar microrganismos que venham a ser introduzidos na rede após o tratamento. Este teor remanescente de cloro é chamado de cloro residual (Kerr *et al.*, 2003). O cloro presente na forma de cloraminas é denominado cloro combinado enquanto na forma de ácido hipocloroso e íon hipoclorito é chamado cloro livre. Em pH acima de 4 e menor que 6 predomina HOCl. Em pH < 4 predomina Cl<sub>2</sub>. A ação desinfetante do cloro é controlada pelo ácido hipocloroso (Meyer, 1994).

## 2.7. A água e os microrganismos

As águas superficiais são qualquer corpo de água que esteja fluindo ou parado na superfície da terra como córregos, rios lagoas, lagos e barragens. A precipitação, escoamento superficial, drenagem, descarga do lençol freático, assim como componentes climáticos e geológicos, determinam as características das águas superficiais. Por sua capacidade de dissolução e transporte, carreando substâncias (matéria orgânica e inorgânica), partículas em suspensão e microrganismos, a qualidade da água superficial pode ficar comprometida e pode apresentar muita turbidez.

A composição química, física e biológica que a água adquire ao percorrer essas várias vias de acesso, determina a qualidade da água nos rios e outras fontes superficiais. As atividades humanas levam a exploração cada vez maior dos corpos de água para irrigação, indústria, consumo, comércio e para disposição dos resíduos dessas e outras atividades (Taylor, 2003).

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

A eutrofização dos corpos de água é um dos grandes problemas de qualidade da água do país e compromete o uso. Entre os efeitos negativos da eutrofização estão a mortalidade de peixes, dificuldades para o tratamento das águas para abastecimento doméstico e o prejuízo para produção de energia hidroelétrica.

No nordeste brasileiro a água acumulada nos açudes fica submetida à intensa evaporação, o que, juntamente com as escassas precipitações, concentra os sais e os compostos de fósforo e nitrogênio, acelerando a eutrofização e o conseqüente crescimento de microalgas e cianobactérias (ANA, 2009).

Condições eutróficas reduzem a adequabilidade da água bruta para fins de tratabilidade, uma vez que elevados números de microrganismos reduzem a eficácia da cloração e aumenta o tempo de sobrevivência de organismos patogênicos. A estas informações, acrescenta-se o elevado índice de despejos lançados nos corpos de água causando a contaminação dos mananciais. Todo corpo de água tem sua microbiota normal típica sujeita a flutuações causada por fatores abióticos locais. Porém lançamentos de resíduos e excretas gerados por atividades antropogênicas aos corpos de água, colocam em risco a saúde humana e ambiental, por adicionar uma flora fecal não natural de bactérias e outros microrganismos entéricos, incluindo patógenos. A veiculação hídrica de patógenos inclui bactérias, vírus, protozoários e helmintos parasitas (Taylor, 2003).

O problema de contaminação das águas superficiais permanece significativo em todo mundo, pois ainda causa doenças. A contaminação microbiana das águas superficiais usadas para abastecimento humano é uma preocupação em muitos países. Microrganismos de importância sanitária presentes nas águas naturais são derivados de lançamentos de esgotos domésticos e escoamentos não pontuais contendo excretas de humanos e de animais. Rios, lagos e águas costeiras têm servido para receber, diluir e dispersar esgotos domésticos e resíduos não tratados de humanos e de outros animais. Estes lançamentos contribuem com organismos patogênicos de importância sanitária como bactérias (salmonelas, vibriões e aeromonas), vírus (pólio, hepatite e enterovirus) e protozoários (*Cryptosporidium*, *Giardia*). Grande número de organismos indicadores (coliformes, enterococos, estreptococos, bacteriófagos, *Bacterioides fragillis*, *Bifdobacterium* sp., clostridio) e compostos marcadores potenciais (proteínas, enzimas, esteróis, agentes clarificantes) também estão presentes (Kator, 2003)

As águas superficiais possuem uma comunidade ecológica típica de águas continentais, com diversos nichos e cadeias alimentares, porém específicos de cada corpo de água. Nos vários extratos e regiões encontram-se produtores primários, consumidores e decompositores, com representantes

microscópicos ou não, compondo o plâncton (organismos flutuantes - fitoplâncton e zooplâncton), benton (nos sedimentos), nécton (nadantes), nêuston (interface ar-água – bactérias e fungos) e plêuston (plantas superiores) (Esteves, 1998).

Na abordagem da microbiologia da água o foco será dado aos microrganismos de nutrição heterotrófica, principalmente bactérias heterotróficas planctônicas e nos componentes do nêuston (bactérias e fungos) (Esteves, 1998). Toda esta microbiota deve degradar a matéria orgânica particulada enzimaticamente para forma mais simples que possam ser assimiladas e posteriormente quebradas metabolicamente e, finalmente, mineralizadas a solutos inorgânicos e gases (Wetzel e Likens, 1995).

Microrganismos heterotróficos são amplamente definidos como organismos que requerem carbono para seu crescimento e incluem bactérias e fungos entre outros. Os microrganismos heterotróficos são parte da microbiota natural da água, mas eventualmente, podem ser derivados de fontes poluentes (WHO, 2002). Bactérias heterotróficas utilizam nutrientes orgânicos como fonte de carbono para construção de seu protoplasto. A maioria das bactérias (muitas associadas aos sistemas de água potável) é heterotrófica, o grupo inclui as bactérias ambientais inofensivas, as patogênicas, e patógenos oportunistas (EPA, 2006).

A composição dos gêneros no grupo destas bactérias pode variar de acordo com o local, com a estação, com características físicas e químicas da água, com fontes poluentes, etc. Espécies dentro dos gêneros *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Flavobacterium*, *Chromobacterium*, e outros como *Legionella* e Micobactéria não tuberculosa, são incluídas nas heterotróficas (Leclerck, 2003).

Bactérias heterotróficas podem crescer nos sistemas de abastecimento tanto na água como nas superfícies em contato com a água formando biofilmes. O crescimento após o tratamento é denominado recrescimento, que é detectado pelo aumento nas contagens de bactérias heterotróficas. A partir do final do século XIX, análises de heterotróficas foram empregadas como indicadores da eficiência do tratamento (principalmente por filtros de areia) e, conseqüentemente, como indicadores indiretos do nível de segurança da água. Posteriormente, com o surgimento dos indicadores fecais específicos, seu uso como indicador da segurança da água decaiu, mas ainda consta nas regulamentações de muitos países (Bartram, 2003).

A contagem de bactérias heterotróficas serve de parâmetro auxiliar na avaliação da qualidade da água, quer indicando a condição higiênica geral da rede quer a eficiência do processo de tratamento, porém evidências suportam a conclusão de que na ausência de contaminação fecal, não há uma relação direta entre a água ingerida e efeitos na saúde da população como um todo (WHO, 2003).

A legislação brasileira determina a quantificação de bactérias heterotróficas em 20 % das amostras coletadas mensalmente para análise de coliformes e estabelece um limite máximo de 500 UFC/mL (Portaria 518/2004).

### 2.7.1. Os fungos e a água

Fungos são ubíquos, encontrados em todos os possíveis habitats, com hábitos que vão de micro predadores e patógenos a sapróbios e simbiontes (WEBSTER, 2007). Fungos no ar e no solo podem alcançar um número elevado e podem entrar na distribuição de água por vários locais e vice-versa (Gonçalves *et al.*, 2006a).

Os fungos considerados naturais nas águas em geral são os hifomicetos, porém não são associados aos problemas causados por fungos em água, a não ser ocasionalmente um aumento do número de indivíduos (Paterson e Lima, 2005). Alguns fungos são primariamente adaptados ao ambiente aquático e, portanto, encontrados naturalmente na água. Estes fungos são zoospóricos e muitos pertencem ao filo Chytridiomycota, porém outros fungos do reino Eumycota presentes no solo, ar, matéria orgânica, etc., podem entrar nos sistemas de água por diversas vias, embora este seja um ambiente considerado não natural para eles (Hageskal *et al.*, 2009).

Taylor (2003) menciona a influencia da precipitação, escoamento superficial, drenagem, descarga do lençol freático, assim como características climáticas e geológicas sobre os corpos de água para dispersão de esporos. Pode-se esperar que ao percorrer esses caminhos as águas arrastem representantes de diferentes filos, para os corpos hídricos. Além disto, deve-se levar em conta a contribuição dos esporos do ar, carregados pelos ventos.

Em todo mundo são amplamente utilizadas águas superficiais ou subterrâneas para suprir os sistemas de abastecimento de água (Clarke e King, 2004) e apesar dos desinfetantes usados nos processos de tratamento diferirem de acordo com as empresas, o cloro é o mais comum (Morató *et al.*, 2003).

Os fungos são menos susceptíveis ao tratamento pelo cloro do que as bactérias. Eles sobrevivem e se multiplicam nos sistemas de distribuição, tanto nas superfícies em biofilmes e como nos sedimentos, particularmente em temperaturas mais quentes ou onde o fluxo é restrito.

É possível, que os fungos detectados na água sejam alóctones, e que a maioria passe transitoriamente como esporos. Neste caso, o principal fator determinante será a habilidade deste esporo suportar uma série de condições e se manter viável até chegar a um substrato ou em condições favoráveis (Kinsey *et al.*, 2003).

Entretanto Kelley *et al.* (1997) relatam que os fungos podem crescer em sistemas de abastecimento e em todo tipo de água desde água bruta, a águas tratadas, engarrafadas, da ultra-

pura ou destilada até as mais poluídas. Podem crescer aderidos em superfícies, nos biofilmes dentro das canalizações, em detritos ou sedimentos e mais provavelmente se estabelecem onde haja rachaduras, corrosão e áreas mortas e fim de rede. Deste modo é importante conhecer as características da água e os fatores que influenciam a sobrevivência dos fungos neste ambiente, como pH, temperatura, cloro residual, etc.

Arvanitidou *et al.* (1999) comparando a ocorrência de fungos, entre as redes de água potável de um hospital e da comunidade na Grécia, encontraram 82,5 % de fungos filamentosos e 11,1 % de leveduras. Os fungos filamentosos foram mais abundantes nas amostras oriundas da comunidade que nas do hospital, e os gêneros prevalentes foram *Penicillium* e *Aspergillus*.

Estudando a microbiota de um sistema público na Alemanha suprido por água subterrânea Göttlich *et al.* (2002), encontraram baixos números de fungos na água bruta (5,1 %), um pouco maiores nas águas de tubos recém-instalados e nas instalações hidráulicas (9,1 % e 8,4 %, respectivamente) e logo após o hidrômetro (4,3 %) apresentam-se ligeiramente menor que na rede doméstica (7,1 %), e os gêneros mais encontrados foram *Phialophora*, *Acremonium*, *Exophiala* e *Penicillium*.

Investigando um sistema de produção de águas engarrafadas, Ribeiro *et al.* (2006) encontraram contaminação fúngica na fonte de água e em várias etapas do processo de engarrafamento, incluindo produto final, espécies de *Penicillium* foram mais prevalentes, seguidas por outros como *Cladosporium* e *Aspergillus*.

Na Noruega, Hageskal *et al.* (2006) isolaram 24 espécies de fungos no sistema abastecido por água subterrânea e 89 espécies num sistema suprido por água superficial onde a micobiota dominante consistiu de *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*.

Varo e colaboradores (2007) analisaram fungos na água utilizada por uma clínica de hemodiálise no interior de São Paulo e relatam que os mais abundantes foram *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Fusarium*.

Hussain *et al.* (2010) investigaram a incidência de fungos em diversas fontes de água no vale Samahni no Paquistão e isolaram 21 espécies entre os gêneros *Penicillium* e *Cephalosporium*.

Sammon *et al.* (2010) isolaram fungos da água bruta, da rede de distribuição e nos reservatórios água tratada de um sistema municipal de abastecimento de água, na Austrália subtropical. Os gêneros mais encontrados foram *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pithomyces*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Acremonium* e *Paecylomyces*.

### 2.7.2. Biofilmes

As paredes das canalizações nos sistemas de distribuição oferecem uma superfície ideal para colonização microbiana e formação de biofilmes, causando uma série de problemas para as companhias de água, como obstrução, danos às superfícies das canalizações e perda do residual desinfetante (significando perdas econômicas) e risco para saúde abrigando patógenos oportunistas (Kerr *et al.*, 2003). Um biofilme forma-se naturalmente em qualquer superfície sólida em contato com água não esterilizada (Xavier *et al.*, 2003). Um biofilme é uma comunidade microbiana aderida a uma superfície ou interface e embebida numa matriz de polímeros extracelulares produzida pelos microrganismos que a compõem. Esta comunidade inclui bactérias, fungos filamentosos, leveduras, protozoários e outros microrganismos. Ainda, a contribuição de fungos filamentosos na formação de biofilmes nos sistemas de distribuição de água potável ainda é uma área pouco esclarecida, se comparada à contribuição das bactérias (Gonçalves *et al.*, 2006).

Um biofilme pode ser iniciado na presença de forças de turbulência, possivelmente o fluxo melhora a adesão por empurrar as bactérias planctônicas sobre a superfície, mas qualquer que seja o mecanismo, os biofilmes se formam preferencialmente em locais de forte turbulência nos sistemas naturais e industriais. Quando se forma em regime de baixa turbulência ele apresenta baixa resistência e quebra facilmente (Donlan e Costerton, 2002).

A origem e desenvolvimento de biofilme envolvem fatores predisponentes: a formação de um filme condicionante e adesão, os quais dependem do material do substrato. A adesão por adsorção ocorre em duas etapas: adesão reversível e adesão irreversível. Após a adesão irreversível, ocorre a multiplicação celular e síntese da matriz de substâncias poliméricas extracelulares (exopolissacarídeos) - “EPS”, que além de reforçar a adesão, mantém as células unidas e protegidas. Em ambientes oligotróficos se desenvolvem canais abertos de água entre as micro-colônias que funcionam como sistema circulatório. Depois das primeiras adesões, colonizadores secundários aderem aos organismos no biofilme em desenvolvimento resultando numa comunidade com diferentes espécies, gêneros e até domínios. A comunicação num biofilme envolve um comportamento coletivo, mediado por moléculas sinalizadoras (“quorum sensing”), que regulam a expressão de genes específicos em resposta à densidade populacional. Essas moléculas podem ser reconhecidas intra e entre espécies (Kerr *et al.*, 2003).

Dois aspectos dos biofilmes são de particular importância: (1) estabilidade mecânica da matriz de exopolissacarídeos, porque é esta que tem de ser quebrada nos processos de limpeza, e (2) o aumento da tolerância aos desinfetantes pelos organismos dos biofilmes, que pode ser duas ou três vezes maior que a das células livres (Flemming, 2002). Em 2003, Batté e colaboradores relatam que o cloro residual resultante do tratamento de águas, que é usualmente menor que 1 mg Cl<sub>2</sub>/L, é

insuficiente para eliminar e remover toda biomassa. Estes mesmos autores afirmam que mesmo grandes dosagens e tratamentos são ineficazes para erradicar biofilmes (Batté *et al.*, 2003).

Doggett (2000) caracterizou biofilmes num sistema de distribuição municipal de água a partir de secções longitudinais dos canos e encontrou 39 espécies de fungos, sendo espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* os mais abundantes.

Harding *et al.* (2009) chamam atenção para o fato que, de modo geral, a formação de biofilmes é tratada como uma habilidade das bactérias e de leveduras, sem levar em conta a possibilidade de fungos filamentosos participarem do processo. Entretanto após analisarem vários artigos, os autores recolhem relatos de estruturas, difusão de sinais e reguladores, de comunicação celular dependentes da densidade populacional, análogos ao “quorum sensing,” os quais são indicativos da formação de biofilmes por fungos filamentosos. Os autores propõem um modelo para biofilmes fúngicos e concluem que as evidências por eles apontadas suportam a hipótese de que os fungos filamentosos formam biofilmes.

O modelo proposto por Harding *et al.* (2009) de desenvolvimento de biofilmes em bactérias, leveduras e fungos filamentosos encontram-se na figura 10. Em bactérias (a) e *Candida albicans* (b), cinco estágios são geralmente definidos: (i) adsorção, (ii) adesão, (iii) formação de micro colônia, (iv) biofilme maduro, e (v) dispersão. O modelo em fungos filamentosos para desenvolvimento de biofilme (c) inclui os seguintes estágios: (i) adsorção, (ii) adesão ativa, (iii) micro colônia I (germinação e/ou monocamada), (iv) micro colônia II (desenvolvimento micelial, camada de hifa, agregação), (v) desenvolvimento de um biofilme maduro, e (vi) dispersão ou fase planctônica; (modificado de Stoodley et al. reproduzido com permissão da Annual Review of Microbiology, volume 56\_2002 pela Annual Reviews, [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org). Trends in Microbiology, vol 17 n° 11, 477).

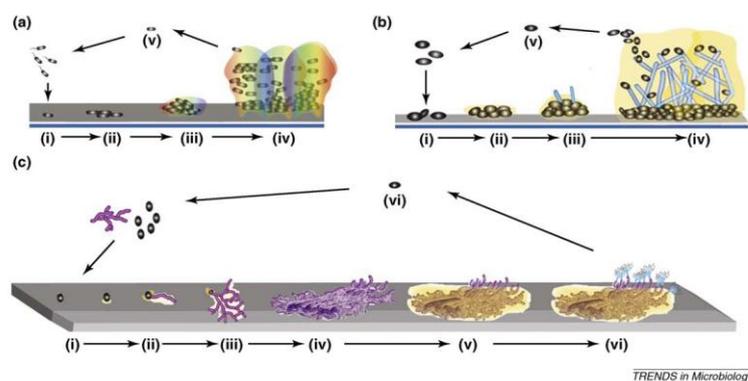


Figura 10. Modelo proposto por Harding e colaboradores (2009) para a formação de biofilme por bactérias, *Candida albicans* e fungos

## 2.8. Métodos de detecção e enumeração de fungos em água

Um fator importante no estudo dos fungos em água é a metodologia. A maioria dos estudos conduzidos emprega métodos cultivo dependentes, onde são requeridos isolamentos intermediários em meios apropriados para obtenção do organismo (Hageskal *et al.* 2009). Ainda não existe padronização internacional dos métodos para análise de fungos filamentosos. Alguns métodos baseiam-se em plaqueamento direto ou na centrifugação da água para obtenção de propágulos. O uso de diferentes métodos resulta em diferentes limites de detecção e no percentual de recuperação dos fungos. Pode haver algumas dificuldades na quantificação de fungos filamentosos porque não são uniformemente distribuídos na água, podem originar colônias por fragmentos de hifas ou de grupos de esporos, alguns não são cultiváveis em laboratório, outros encontram-se numa fase do ciclo de vida que não esporulam, etc. Entretanto, a quantificação é útil para fornecer uma indicação do nível de contaminação da amostra. A técnica de filtração é empregada na maioria dos estudos (Paterson *et al.*, 2009) e é indicada no “Standard Methods for Examination of Water and Wastewater” como um dos métodos para enumeração de fungos na água.

Vários métodos de isolamento têm sido utilizados em diferentes estudos, dificultando que se faça uma comparação direta (Paterson *et al.* 2005). Os meios de cultura usados nos isolamentos diferem na concentração e tipo de nutrientes e na suplementação com antibióticos, corantes e indicadores (Hageskal *et al.* 2009), que combinados a diferentes temperaturas de incubação, levam a uma seletividade que favorece uns grupos e outros são perdidos.

A identificação tem sido geralmente baseada na morfologia por meio de chaves de identificação sendo, portanto, subjetiva dependente da experiência individual do investigador e de chaves de identificação atualizadas. Um problema freqüente é quando os fungos não esporulam e assim não podem ser identificados morfológicamente. Algumas limitações metodológicas dificultam a comparação entre os diferentes estudos e podem explicar as variações nos resultados obtidos (Hageskal *et al.* 2009).

Muitos estudos frequentemente usam técnicas baseadas na remoção dos biofilmes (ou de organismos associados aos biofilmes) do substrato por algum tipo de força mecânica, como agitação em vortex, ultra-som, para então proceder a análise e medição. O procedimento mais comumente usado para medição é contagem em placa, no qual se faz a re-suspensão e dispersão das células do biofilme que são depois plaqueadas, incubadas e contadas. O uso de antissoros fluorescentes e sondas fluorescentes de hibridização *in situ* (FISH), permitem identificar organismos específicos dentro de uma comunidade mista de um biofilme (Donlan, 2002).

Métodos que não requerem o uso de meios complexos para facilitar o crescimento das células e permitir densidades visíveis a olho nu, consomem menos tempo que os métodos cultivo dependentes, sendo por isso mais vantajoso. Vários desses métodos vêm sendo desenvolvidos. Estes métodos empregam várias combinações de corantes fluorescentes, anticorpos marcados com fluorocromos, ou sondas moleculares desenhadas para moléculas alvo como rRNA. Para o efeito recorre-se à microscopia de epifluorescência. Estes métodos permitem contagens diretas, maior especificidade, hibridização fluorescente *in situ* (FISH) e discriminação entre viáveis e não viáveis, (Kator, *et al.*, 2003).

As sondas oligonucleotídicas fluorescentemente marcadas para moléculas alvo como rRNA, 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 *et al.*, 1997)

Para minimizar as desvantagens das metodologias cultivo dependentes, o desenvolvimento de técnicas que utilizam corantes fluorescentes específicos para determinado grupo de microrganismos ou até mesmo gênero e espécie estão sendo constantemente aplicadas em estudos médicos, ambientais e biotecnológicos (Kempf, *et al.*, 2000; Doggett, 2000; Li *et al.* 2003; Bishop, 2010).

Gonçalves e colaboradores (2006) empregaram uma combinação de duas técnicas fluorescentes para detecção *in situ*, de biofilmes com fungos filamentosos na água: (I) coloração com o corante fluorescente Calcofluor White MR2 que tingem as paredes dos fungos e (II) FISH, usando uma sonda oligonucleotídica rRNA universal EUK516, específica para eucariotos, associadas a microscopia de epifluorescência.

### **2.8.1. Coloração com Calcofluor White MR2**

Calcofluor White MR2 (CW), cuja estrutura encontra-se na figura 11, é um fluorocromo capaz de formar pontes de hidrogênio com ligações  $\beta$ -(1-4) e  $\beta$ -(1-6) de polissacarídeos. A parede celular fúngica é composta principalmente de quitina que tem ligações  $\beta$ -(1-4) e glicanos que possuem  $\beta$ -(1-3) e  $\beta$ -(1-6). Desta forma o CW exibe 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).

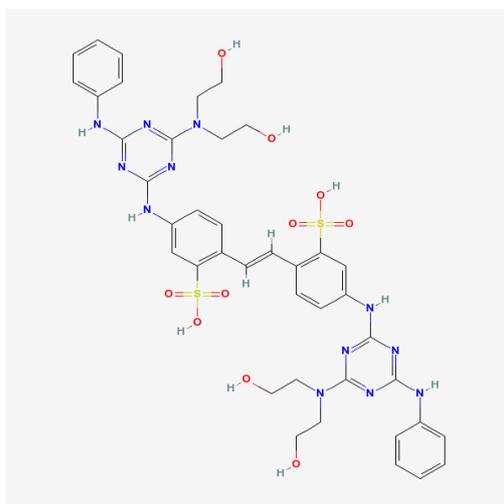


Figura 11. Estrutura química do CW.

Atualmente CW é amplamente usado no diagnóstico de micoses superficiais e cutâneas (Andreas *et al.* 2000) e como marcador no estudo de biologia molecular de fungos. Este método é considerado rápido, de fácil leitura, e um dos mais específicos e sensíveis (Brasil *et al.*, 2003).

### 2.8.2. Hibridização Fluorescente “*in situ*” - FISH

FISH é uma é um método de investigação molecular e citogenético que foi desenvolvido há duas décadas e aprimorado continuamente até os dias atuais. Ao longo do seu aprimoramento, novas etapas e modificações foram introduzidas para otimizar a detecção de DNA e RNA. A ampla utilização desta técnica é devida em parte à sua grande variedade de aplicações, da relativa facilidade de implementação e desempenho em estudos *in situ*. (Li *et al.*, 1997)

A técnica permite a marcação seletiva de todo cromossomo ou regiões cromossômicas definidas e, além disso, permite a marcação de genes com sondas específicas (Levsky e Singer, 2003). Moléculas de RNA são os alvos principais na maioria das aplicações de FISH. As sondas oligonucleotídicas utilizadas têm geralmente de 15 a 30 nucleotídeos de comprimento e têm como alvo regiões 16s ou 18s do rRNA, os quais são subunidades dos grupos Bacteria ou Arquea e Eucaria, respectivamente (Amann *et al.*, 1997). Estas sondas estão ligadas covalentemente no terminal 5' a moléculas de fluorocromos. Durante a hibridização as sondas entram nas células e ligam-se à sua sequência alvo (caso esta esteja presente), tornando a célula detectável por microscopia de epifluorescência devido à existência do marcador fluorescente. Os fluorocromos mais comumente utilizados incluem fluoresceína, tetramethylrodamina, “texas red” e carbocianinas (Cy3 e Cy5) (Gonçalves *et al.*, 2006).

A utilização de sondas de oligonucleotídeos apresenta algumas limitações inerentes à molécula alvo. O RNA ribossomal tem de estar preservado de modo a possibilitar a correta

distinção entre populações intimamente relacionadas. Além disso, o fato de que a diversidade do rRNA se encontrar ainda parcialmente descrita, apesar da sonda desenhada ser específica para um determinado grupo de microrganismos, pode acontecer uma hibridização com organismos que ainda não foram identificados mas que apresentam a mesma sequência alvo (Amann *et al.*, 2001).

Em ambiente oligotróficos os organismos são tipicamente pequenos com baixo conteúdo celular de rRNA. Nestes casos, a aplicação de sondas oligonucleotídicas marcadas com fluoróforos para moléculas alvo rRNA, tem sido dificultada por baixas taxas de detecção possivelmente devidas ao pouco crescimento e baixo conteúdo ribossomal de moléculas alvo. Limitações também podem ser inerentes às condições de hibridização, visto que a especificidade e sensibilidade das sondas dependem fortemente de parâmetros como a temperatura de hibridização e lavagem e a concentração de agentes desnaturantes que garantam permeabilização suficiente da célula e assim acessibilidade da zona alvo (Amann, 1997. 2001).

Como tentativa de melhorar a detecção por FISH, pode-se aumentar o conteúdo celular de ribossomos antes da fixação. Um pré-incubação num coquetel de substâncias e antibióticos, teoricamente deve resultar em ativação celular e síntese de rRNA sem divisão celular.

Um melhor sinal de fluorescência foi relatado para um sistema de oligotrófico de resfriamento de água após o tratamento da amostra com glicose e cloranfenicol (Mac.Donald e Brozel, 2000).

### 2.8.3. FUN<sup>®</sup>1

Uma característica importante a ser avaliada quando se realiza estudos microbiológicos *in situ* é a viabilidade celular. Uma vez que as técnicas cultivo dependentes permitem apenas o isolamento daqueles microrganismos que são capazes de crescer em meios de cultura, a utilização de corantes que detectam a viabilidade celular *in situ* permite uma diferenciação de todas as células presentes na amostra (cultiváveis ou não cultiváveis) como células viáveis ou não viáveis.

Em 1997 uma nova família de sondas fluorescentes foi desenvolvida com a finalidade de avaliar a atividade metabólica de leveduras. Este classe de corantes pode ser exemplificada pelo FUN<sup>®</sup>1 ([2-cloro-4-2,3(-diidro-3-metil-(benzo-1,3-tiazol-2-il)metilidene)-1 iodetofenilquinolinium] o qual 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 (Millard *et al.*, 1997).

Em células metabolicamente ativas, estruturas intravacuolares cilíndricas (CIVS) são formadas após coloração com FUN<sup>®</sup>1. Estas estruturas coram num fluorescente laranja-vermelho ou

amarelo-laranja, enquanto que as estruturas intracelulares se coram de um verde fluorescente difusamente distribuído (quando excitadas sob feixe de luz com 470 nm a 590 nm). Somente em células metabolicamente ativas são visualizadas claramente as estruturas intravacuolares vermelho-alaranjadas fluorescentes, enquanto que as células comprometidas exibem uma fluorescência verde-amarelada extremamente brilhante e difusa por todo o citoplasma.

### 3. FUNGOS EM UM SISTEMA DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA POTÁVEL EM RECIFE, PE

## RESUMO

As 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. Fungos filamentosos podem sobreviver ao tratamento e desinfecção e contaminar a água que chega ao consumidor. Algumas espécies de fungos isolados da água de abastecimento são potencialmente alergênicas ou toxigênicas. A legislação brasileira, assim como legislações da maioria de outros países, não determina a pesquisa de fungos, nem estabelece limites para a presença destes microrganismos na água de abastecimento. Este trabalho aborda ocorrência de fungos filamentosos e bactérias heterotróficas na rede de distribuição de um sistema de abastecimento em Recife-PE. Amostras de água foram coletadas de fevereiro a agosto de 2010, em 4 pontos representativos do sistema Alto do Céu: reservatório da estação de tratamento de água, início, meio e fim de rede. Foram feitas determinações de pH, temperatura, cloro residual e análises microbiológicas da água. Fungos e bactérias heterotróficas foram quantificados por filtração em membrana, utilizando peptona glicose rosa Bengala agar - PGRBA com antibióticos e R2A (Difco) respectivamente. As condições de incubação foram: 30 °C até 10 dias (para fungos) e 35°C por 48h (para bactérias). Os resultados mostraram que as bactérias atenderam à legislação brasileira. 180 amostras de fungos foram selecionadas para identificação dos gêneros. Os mais abundantes foram *Penicillium* e *Aspergillus*, seguido de *Phoma*, *Curvularia*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Nigrospora*, *Pestalotiopsis* e *Cunninghamella*. Como a água pode veicular a disseminação de patógenos, espera-se com estes registros, contribuir para subsidiar um possível estabelecimento de limites de fungos na legislação brasileira de água potável.

**Palavras chave:** fungos filamentosos, rede distribuição, contaminantes, qualidade microbiológica da água

## ABSTRACT

The main potential issues related to fungi in drinking water include blockage of water pipes, changes of odour, taste and pigments, dissemination of pathogenic fungi and the mycotoxin production. Filamentous fungi can survive in water treated and disinfected, contaminating the water that reaches the consumers. The Brazilian law, similarly to many other countries, does not require fungi testing, nor establishes limits for presence of these microorganisms in drinking water. The present research concerns about occurrence of filamentous fungi and heterotrophic bacteria in the water distribution system of Recife city, in Brazilian state of Pernambuco. Water samples were collected from February to August 2010, in four locations: water reservoir of treatment plant, beginning, middle and end of the supply network. pH temperature, residual chlorine were measured and microbiological water analysis were performed. Fungi and heterotrophic bacteria were determined by membrane filtering, using peptone-glucose rose Bengal agar - PGRBA with antibiotics and R2A (Difco) respectively. Results showed bacteria population obeyed the limits established by Brazilian law. 180 fungal samples were selected to identification. The most abundant taxa were *Penicillium* and *Aspergillus*, followed by *Phoma*, *Curvularia*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Nigrospora*, *Pestalotiopsis* and *Cunninghamella*. Since water can be a source of pathogens with these results it is expected make a contribution to support a possible establishment limits for fungi in drinking water in Brazilian law.

**Key words:** filamentous fungi, distribution network, microbiological water quality

## INTRODUÇÃO

A água é o alimento mais fundamental e imprescindível, pois todos os outros alimentos sejam os de origem animal ou vegetal, dependem da mesma para serem produzidos. Com o baixo percentual de água doce disponível, o suprimento no mundo está em crise e a situação tende a piorar porque o volume de água doce superficial é fixo, mas as populações crescem e cada vez mais se tem menos água disponível por pessoa. A escassez de água é a maior barreira para o desenvolvimento e uma das razões para continuidade da pobreza no mundo (Clarke e King, 2004).

Pernambuco localiza-se dentro do semi-árido brasileiro, onde as reservas de água são insuficientes com taxas negativas de balanço hídrico (ANA, 2009). O abastecimento para consumo humano é normatizado com padrões de qualidade rigorosos visando garantir fornecimento de água segura. A contaminação da água é uma preocupação mundial, por causar transmissão de doenças e mortalidade, principalmente em populações sem saneamento básico. No Brasil, o Ministério da Saúde regulamenta água de abastecimento público através da Portaria 518/2004. O sistema de abastecimento Alto do Céu é responsável por 10 % do volume distribuído na Região Metropolitana do Recife, e capta água de quatro mananciais de superfície. Fungos do solo, do ar, matéria orgânica, etc., podem entrar nos sistemas de água por diversas vias, embora este seja um ambiente considerado não natural para eles (Hageskal *et al.*, 2009). Fungos do ar e do solo como *Aspergillus* e *Penicillium* foram isolados em águas superficiais por (Pereira *et al.* 2009), e tanto nas superficiais como subterrâneas em (Hageskal *et al.*, 2006). Os fungos são menos susceptíveis ao tratamento pelo cloro do que as bactérias. Evidências sugerem que os fungos sobrevivem e se multiplicam nos sistemas de distribuição em biofilmes e nos sedimentos, particularmente em temperaturas mais quentes, ou onde o fluxo é restrito (Kinsey *et al.*, 2003). Kelley *et al.*, (1997), isolaram fungos em sistemas de distribuição de água nos Estados Unidos da América, e os mais comuns foram *Aspergillus niger*, espécies de *Cladodporium* e de *Penicillium*. Hageskal *et al.* (2006) isolaram *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Paecilomyces* da água de abastecimento da Noruega.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem

Amostras de água tratada foram coletadas de fevereiro a agosto de 2010, para o monitoramento microbiológico e físico-químico (pH, temperatura e cloro residual). Quatro pontos foram estabelecidos: reservatório da estação de tratamento de água (RETA) e rede de distribuição

com amostragem no início (IR), meio (MR) e fim (FR). Após coleta inicial em fevereiro, a demais foram feitas com 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias e processadas em triplicatas.

As amostras de água para análises microbiológicas foram coletadas em recipientes plásticos de 5L, previamente esterilizados, contendo tiosulfato de sódio para neutralização do cloro residual. Para análise físico-química foram usados recipientes plásticos limpos.

As coletas de água foram realizadas segundo procedimento indicado no “Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water” e transportadas em caixas de isopor com gelo rígido, levadas ao laboratório e mantidas sob refrigeração até o processamento, num prazo máximo de 24 h.

### **Análises físico-químicas**

O pH foi determinado na água com potenciômetro portátil, a temperatura foi medida com termômetro de mercúrio e a determinação de cloro residual livre foi feita por comparação visual em kit DPD Hach modelo CN-70, conforme instrução do fabricante.

### **Análises microbiológicas**

As bactérias heterotróficas e fungos foram quantificados em sistema de filtração – Microfil Millipore (MIAC03P01 com manifold) que permite filtração simultânea de três amostras, com funis de polipropileno (MIHAWG072) esterilizados, com capacidade para 100 mL e filtros de membrana (HAWG047S6). Este sistema de filtração funcionou ligado a uma bomba de vácuo FABBE modelo 141. Para detecção de bactérias após a filtração as membranas foram colocadas sobre meio R2A (Difco) e incubadas a 35 °C por 48 h. As contagens foram efetuadas sob microscópio estereoscópico (KYOWA 892739) os resultados foram expressos em UFC/L.

Para fungos filamentosos, os volumes filtrados variaram entre 500 a submúltiplos de 10 mL, quando diluição era necessária. Após filtração as membranas foram cultivadas em PGRBA (peptona 0,5 g%, glicose 1%, rosa Bengala 0,0035%, cloranfenicol 0,005%, tetraciclina 0,005%, Agar 1,5%, em água destilada), incubadas a 30 °C e observadas até dez dias para contagem em UFC/L.

### **Isolamento e identificação de fungos filamentosos**

As colônias crescidas em membrana sobre PGRBA foram transferidas para placas de Petri contendo Agar extrato de malte (extrato de malte 1,5%, Agar 1,5 % em água destilada) para isolamento.

Os fungos isolados foram identificados fenotipicamente ao nível de gênero com base nas características morfológicas macroscópicas e microscópicas de cultivo em MEA segundo Blakeslee, 1915 (extrato de malte 2%, peptona 0,1%, glicose 2%, Agar 1,5% em água destilada), CYA – Czapek Yeast Extract Agar segundo Pitt, 1973 (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 água destilada), CZ – Czapek Dox solution Agar, formulado por Czapek em 1902, modificado por Dox, 1910 (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%, Agar 1,5% em água destilada). Empregou-se incubação a 30 °C e o crescimento foi acompanhado até 7 dias. As características, observadas em microscópio de luz Leica DMR, foram comparadas com as descritas na literatura especializada (Pitt e Hocking 1997, Barnet e Hunter, 1972; Samson *et. al.* 2004 ).

### Tratamento estatístico

Para a determinação da relação entre as UFC de fungos filamentosos e bactérias heterotróficas encontrados nos pontos de coleta foi utilizado o teste *t* utilizando o software Statistica 7.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Análises físico-químicas da água

#### pH

O pH variou entre 3,2 e 5,9 (Figura 1) com média de 4,0. Os resultados indicam que o pH na água manteve-se na faixa ácida durante todo o experimento.

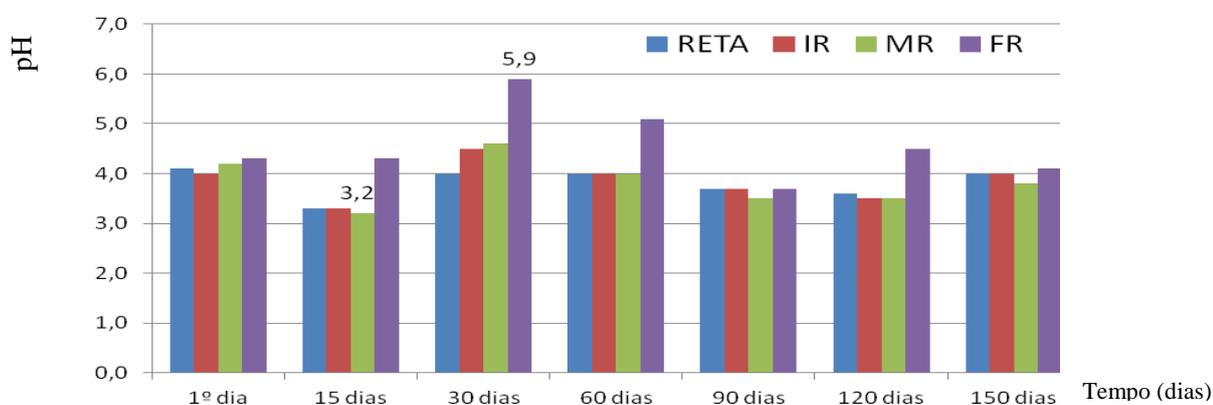


Figura 1. Valores de pH da água nos pontos de coleta (RETA, IR, MR e FR) por período.

No reservatório da ETA, o pH variou de 3,3 a 4,1 com média de 3,8. No início de rede a variação de pH foi de 3,3 a 4,5 e no meio de rede de 3,2 a 4,6 com médias de 3,9 e 3,8, respectivamente. Este três pontos apresentaram valores de pH relativamente próximos enquanto os valores mais altos ocorreram no final da rede, com variação entre 3,7 e 5,9, com média 4,6. Esses resultados apontam para um aumento de pH à medida que a água se afasta da ETA. A norma de potabilidade brasileira recomenda o valor de pH entre 6,0 e 9,5 pra água de consumo humano (Portaria 518/2004 MS).

Os fungos preferem ambientes ácidos com pH entre 4,0 – 6,0, e se desenvolvem na faixa de pH 2,5 – 9, sendo favorecidos em pH < 6,5 (Lessard e Le Bihan, 2003; Côrte -Real, *et al.*, 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. Quando se usa cloro e seus derivados (hipoclorito ou isocianuratos clorados) a espécie desinfetante ativa é o ácido hipocloroso. A divisão dessas formas é função do pH, tendo-se 96,5 % do cloro na forma ácido hipocloroso (HOCl) em pH 6 e 78,5 % na forma de  $OCl^-$  em pH 8 em geral as formas ativas de cloro são predominantes em pH abaixo da neutralidade (Morató *et al.*, 2003).

## Temperatura

Os resultados (Figura 2) indicam que a temperatura da água oscilou entre mínima de 23,5 °C e máxima de 29,5 °C.

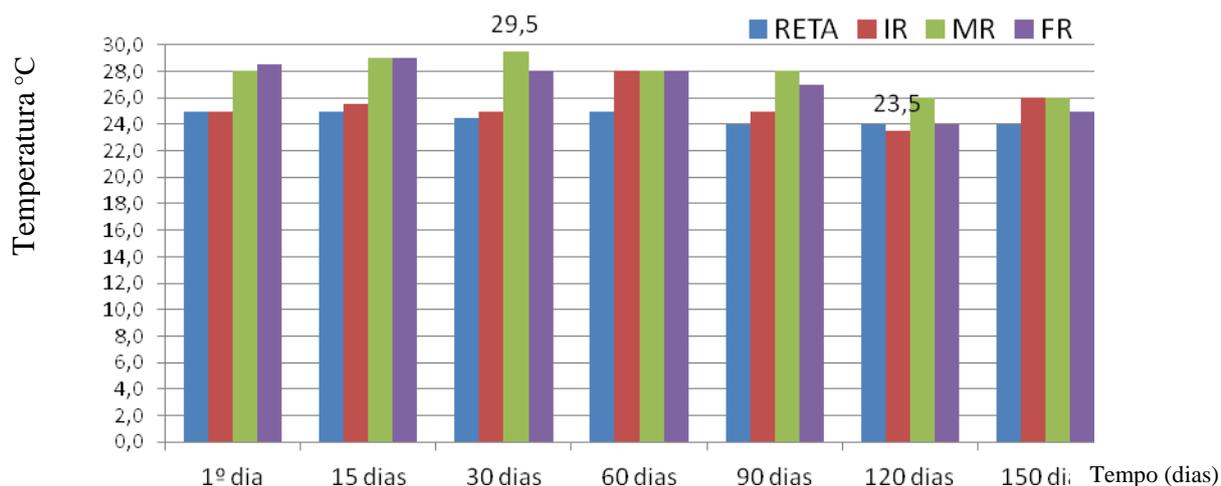


Figura 2. Temperatura da água nos ponto de coleta (RETA, IR, MR e FR) por período.

A temperatura da água no Reservatório mostrou valores mais baixos que os demais pontos, (com exceção de IR -120 dias), com média (24,5 °C), uma vez que é semi-enterrado (não incide luz solar em toda extensão das paredes). Já a rede de distribuição, principalmente nos pontos MR e FR,

que são torneiras de jardins e mais sujeitos a influências do calor e do sol, apresentou temperaturas mais elevadas, com médias de 27,8 °C e 27,1 °C, respectivamente.

Os microrganismos 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 (Côrte -Real *et al.*, 2010). As temperaturas da água medidas neste experimento foram propícias ao crescimento de microrganismos mesófilos. Podemos concluir que a temperatura na rede de distribuição foi um fator predisponente para o crescimento tanto de bactérias como de fungos mesófilos.

### Cloro residual livre

O residual de cloro livre (Figura 3) variou entre 0 e 4,6 mg/L ao longo do sistema, com maiores valores no reservatório, decrescendo à medida que se direciona ao final da rede. O consumo de cloro residual na rede pode ter vários fatores determinantes possíveis: presença de substâncias orgânicas, inorgânicas, ou de microrganismos na água, pH, temperatura e tempo de reação (Meyer, 1994). É previsível que no reservatório (RETA) próximo ao ponto de cloração, encontrem-se as maiores concentrações de cloro. Porém quando a água segue pela tubulação este cloro pode ser consumido em decorrência do maior tempo de contato que permite a ocorrência de todas as possíveis reações do cloro com a água e as substâncias e microrganismos nela contidas.

No ponto de coleta MR (60 e 90 dias) o cloro chegou a zero mg/L. Além dos fatores já citados que levam ao consumo do cloro residual, vale salientar que o regime de intermitência no fornecimento de água, com alterações de fluxo e pressão na rede, contribuem marcadamente para perda de cloro residual, prejudicando a eficiência da desinfecção.

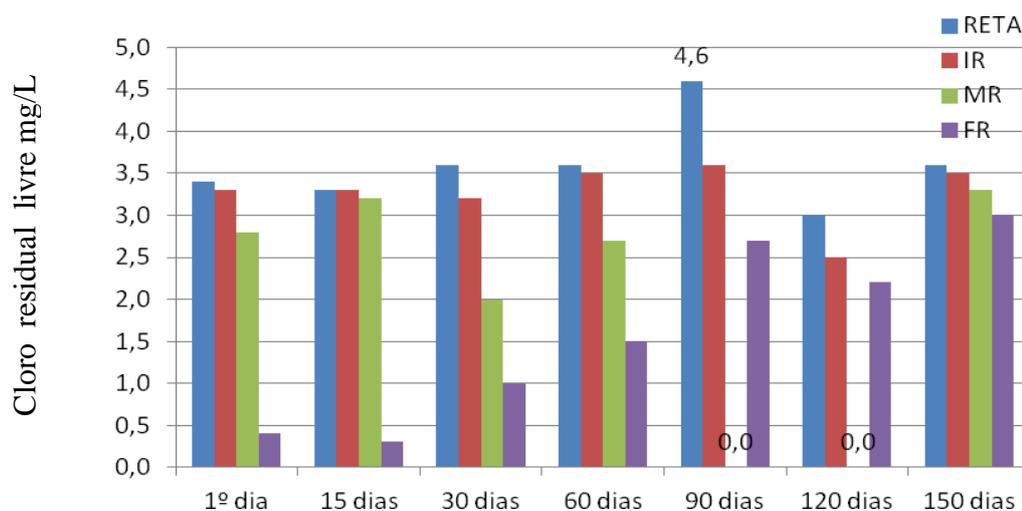


Figura 3. Valores de Cloro residual livre nos ponto de coleta (RETA, IR, MR e FR) por período.

O cloro presente na forma de cloraminas é denominado cloro combinado enquanto cloro na forma de ácido hipocloroso (HOCl) e o íon hipoclorito (OCl<sup>-</sup>) é chamado cloro livre. A ação

desinfetante do cloro é controlada pelo ácido hipocloroso. Em pH acima de 4 e menor que 6 predomina HOCl, em pH < 4 a reação se desloca para formar Cl<sub>2</sub> e em pH < 2 predomina Cl<sub>2</sub> (Meyer, 1994).

Aos 15, 60, 90, 120 e 150 dias o pH esteve inferior a 4 (exceto para FR), o que segundo Meyer (1994) favorece a predominância de Cl<sub>2</sub>, e pouca formação de HOCl que tem maior ação desinfetante. Pode-se supor que mesmo presente, o residual na forma Cl<sub>2</sub> possivelmente esteve mais disponível para reagir com substâncias presentes na água do que para exercer ação desinfetante. Já no ponto de coleta FR, exceto aos 90 dias, o pH esteve superior a 4 e menor que 6, propiciando que o cloro residual livre tenha estado principalmente na forma HOCl que é mais eficiente como desinfetante. Entretanto, neste trabalho o cloro residual livre não impediu a presença de fungos e bactérias na rede. Além das causas já mencionadas para deficiência da desinfecção a presença de substâncias orgânicas e formação de biofilmes são outras possibilidades que explicariam a ocorrência de microrganismos na presença de cloro residual.

### Quantificação de bactérias heterotróficas

Na Figura 4 pode-se verificar que as maiores ocorrências se deram aos 60 dias no início de rede (195,17 UFC/L x 10<sup>2</sup>) e aos 150 dias no final da rede (3316,67 UFC/L x 10<sup>2</sup>). Interessantemente nestes piques de bactérias o cloro residual livre foi ≥ 3,0 mg/L. A legislação brasileira determina a quantificação de bactérias heterotróficas em 20 % das amostras coletadas mensalmente para análise de coliformes e estabelece um limite máximo de 500 UFC/mL (Portaria 518/2004). É importante salientar que mesmo a maior contagem de bactérias heterotróficas, ainda atende a citada norma e, portanto, estes níveis de heterotróficas não são interpretados como contaminação.

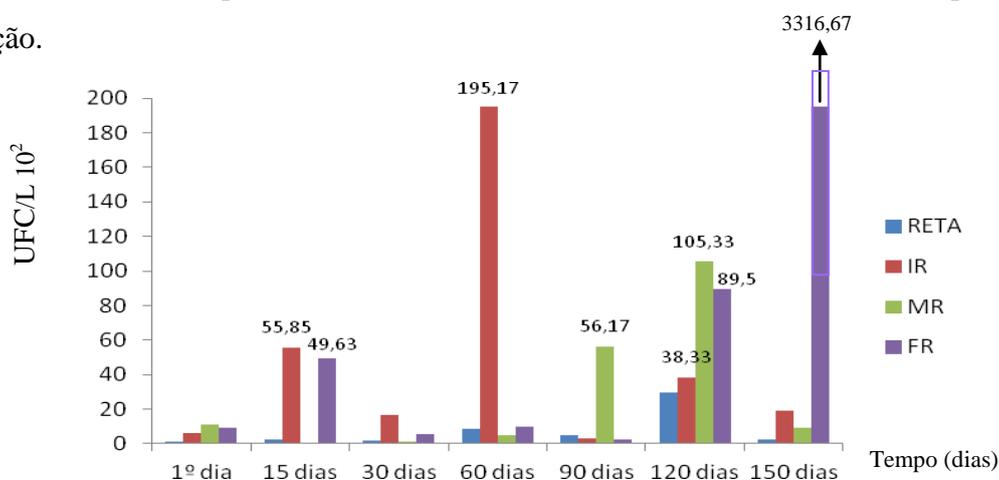


Figura 4. Bactérias heterotróficas (x10<sup>2</sup> UFC/L) nos pontos de coleta (RETA, IR, MR,FR) por período.

A contagem das bactérias heterotróficas foi usada como referência, para comparação da população de fungos e também para uma indicação das condições operacionais da rede de

distribuição. A contagem de bactérias heterotróficas é um parâmetro auxiliar na avaliação da qualidade da água, quer indicando a condição higiênica geral da rede quer a eficiência do processo de tratamento (WHO, 2003).

### Quantificação de fungos

A Figura 5 mostra em UFC/L a quantificação dos fungos totais (filamentosos e leveduras), encontrados neste experimento. O reservatório da ETA apresentou menores contagens (exceto em 60 dias) possivelmente porque neste ponto a água apresenta melhor qualidade, pouco material em suspensão. Um fato particular ocorreu na coleta de 60 dias: o reservatório encontrava-se com um nível baixíssimo de água, muito próximo ao fundo, apresentando uma maior concentração de microrganismos, possivelmente influenciada por arraste de sedimentos do reservatório. Nos demais pontos as principais ocorrências foram IR (15 e 150 dias) e FR (15, 30, 60 e 150 dias). A maior frequência de ocorrência de fungos no final de rede aponta para uma crescente proliferação desses organismos à medida que a água flui para o final da rede.

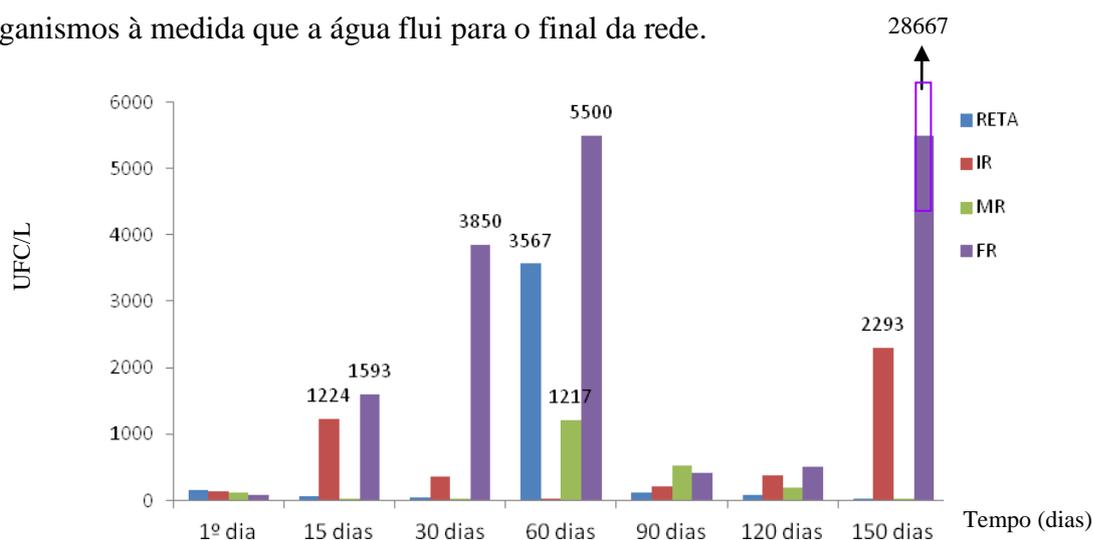


Figura 5. Fungos totais UFC/L nos pontos de coleta (RETA, IR, MR e FR) por período.

Os fungos ocorreram em todas as amostras coletadas, de forma relevante como já relatado (Göttlich *et al.*, 2002, Gonçalves *et al.*, 2006, Yamaguchi *et al.*, 2007, Hageskal *et al.*, 2009, Sammon *et al.*, 2010) e em quantidades variáveis nos diferentes pontos e tempos de coleta, com maiores ocorrências em FR (15, 30, 60 e 150 dias). As UFC/L contrastaram bastante entre os pontos como, por exemplo, em FR cresceram gradativamente nos 15, 30 e 60 dias em relação ao 1º dia, decrescendo aos 90 e 120 a atingindo um máximo em 150 dias. Também podemos verificar oscilações entre os dias de coleta. De modo geral as maiores ocorrências de UFC/L se deram aos 15, 30, 60, 150 dias, comparativamente ao 1º dia de coleta. Fatores relacionados com tipo e concentração de desinfetante, pH, temperatura, presença de substâncias orgânicas, formação de

biofilmes e intermitência de fornecimento, podem ter conjuntamente contribuído para estes resultados.

De acordo com Hageskal *et al.* (2009), estudos sobre ocorrência de fungos em água potável, apresentam resultados gerais com recuperação de 7,5 – 89 % de amostras positivas e com grande variação entre as amostras. Os resultados obtidos estão de acordo com estes relatos.

### Comparação bactéria heterotróficas e fungos filamentosos

No reservatório da estação de tratamento (Figura 6) a relação entre as densidades de bactérias heterotróficas e de fungos totais ao longo do experimento, de acordo com teste *t*, apenas nos períodos 30 e 150 dias os resultados não apresentaram variações estatisticamente significativas, enquanto os demais apresentaram.

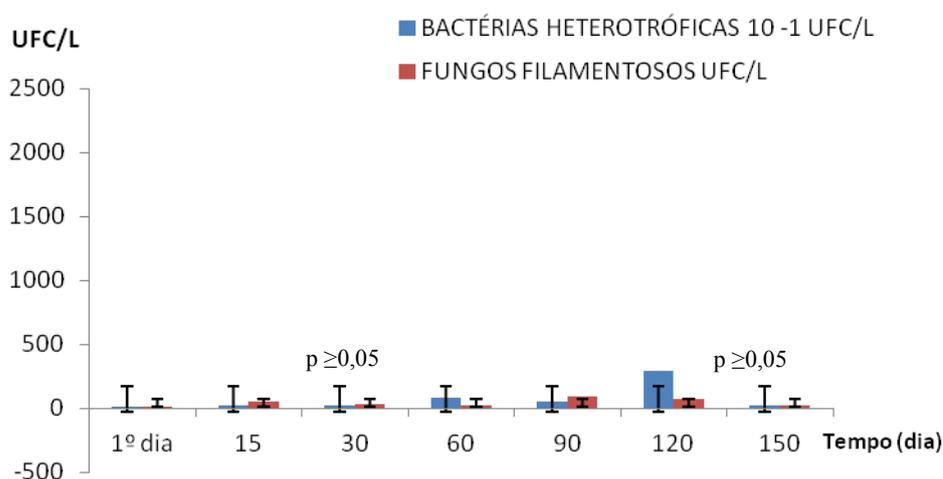


Figura 6. Concentração de bactérias heterotróficas  $10^{-1}$  UFC/L x fungos filamentosos UFC/L no Reservatório de água tratada da estação de tratamento de água - RETA.

Considerando que durante todo experimento o pH, a temperatura e o cloro residual neste ponto não oscilaram tão fortemente, as variações estatisticamente significativas podem estar relacionadas ao aporte de microrganismos na água bruta e ao tempo de contato do cloro com a água. Este tempo de contato por sua vez depende do tempo de detenção da água no reservatório, que está relacionada às flutuações diárias de consumo e operações de distribuição.

No início da rede (Figura 7) as densidades de heterotróficas e fungos não tiveram diferenças estatísticas significativas apenas no período 30 dias. Os demais apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Este é o ponto da rede mais próximo, tendo resultados de pH e cloro bem próximos dos da ETA, entretanto apresentando  $>1950 \cdot 10^{-1}$  UFC/L de heterotróficas no tempo 60 dias.

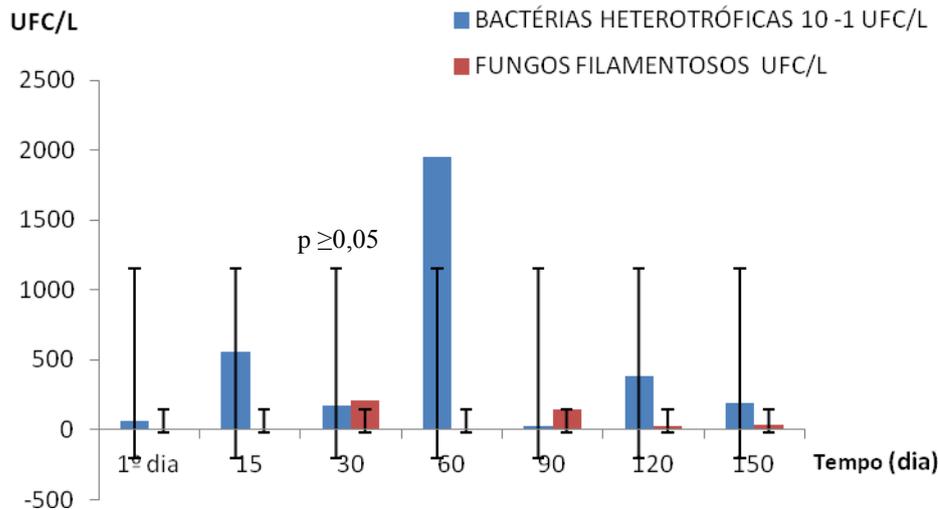


Figura 7. Concentração de bactérias heterotróficas  $10^{-1}$  UFC/L e fungos filamentosos UFC/L no início da rede de distribuição - IR.

Os resultados do meio de rede (Figura 8) em relação à concentração de bactérias e fungos não diferenciaram estatisticamente nos tempos 30 e 90 dias. Os demais foram estatisticamente significativos. Nos tempos 30, 60 o cloro residual esteve abaixo de 3 mg/L seguido de ocorrências de cloro zero nos tempos 90 e 120, associados a temperaturas um pouco mais elevadas que são fatores que propiciam crescimento microbiano.

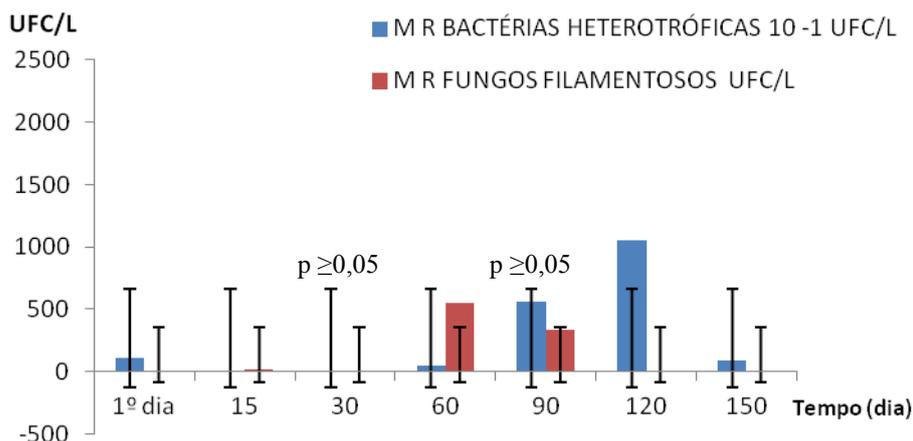


Figura 8. Concentração de bactérias heterotróficas  $10^{-1}$  UFC/L e fungos filamentosos UFC/L no meio da rede de distribuição - MR.

O final de rede (Figura 9) as ocorrências de bactérias e fungos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nos somente nos tempos 15 e 30 dias. Nos períodos restantes, fatores

como pH e temperaturas, entre outros, podem ter favorecido o crescimento microbiano. Vale ressaltar que nestes períodos, no FR as UFC/L variaram estatisticamente mesmo na presença de cloro residual. Nestas ocorrências possivelmente fatores relacionados à presença substâncias e maior concentração de partículas e microrganismos, decorrentes de arraste pela intermitência de fluxo e pressão (característicos do fornecimento local), tenham contribuído.

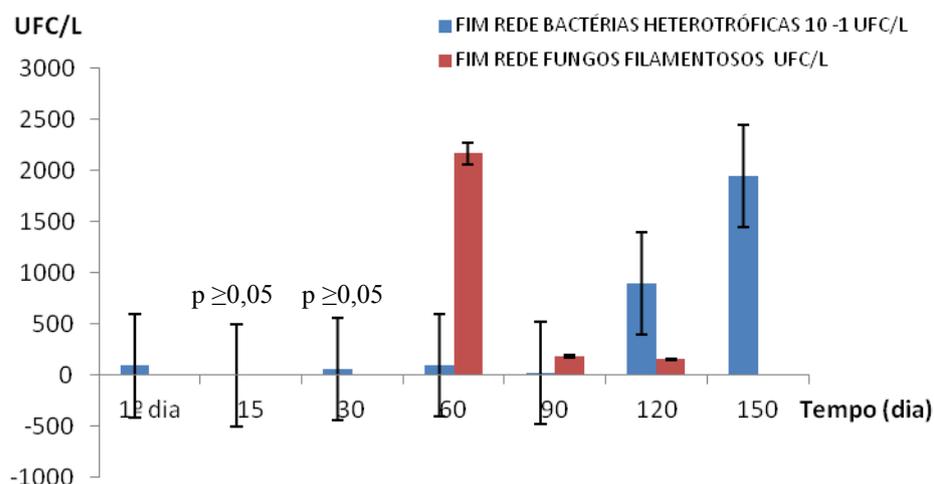


Figura 9. Concentração de bactérias heterotróficas  $10^{-1}$  UFC/L e fungos filamentosos UFC/L no fim da rede de distribuição - FR.

Os resultados deste estudo exibem grande variação em tempo de UFC/L nos diversos pontos e tempos de coleta, predominando as maiores contagens no final da rede de distribuição, atingindo valores máximos de  $3316,67 \cdot 10^2$  UFC/L (bactérias heterotróficas) de 28.667 UFC/L (fungos totais).

Göttlich *et al.* 2002 estudaram sistemas públicos de águas subterrânea na Alemanha e encontraram 1000 UFC/L de fungos em 68% das amostras e 2000 UFC/L em 13%. Em estudo conduzido na rede de distribuição em Braga – Portugal, em quinze amostras analisadas foram encontrados valores de UFC/L de fungos filamentosos  $\leq 5$  em onze amostras,  $> 5$  e  $\leq 15$  em três e apenas uma amostra próxima de 20 UFC/L (Gonçalves *et al.*, 2006). Recentemente, um estudo realizado na Austrália subtropical, sobre a incidência de microfungos num sistema municipal de água tratada, os maiores valores encontrados na rede foram cerca de 50 UFC/L (Sammon *et al.*, 2010).

Entretanto, Yamaguchi *et al.* (2007), compararam a ocorrência de leveduras e fungos filamentosos entre águas engarrafadas e municipais, encontrando 43000 UFC/L de fungos totais nas águas engarrafadas e 9000 UFC/L nas águas do abastecimento municipal.

Comparando-se na figura 10, as densidades  $10^2$  UFC/L de bactérias heterotróficas e de fungos totais neste trabalho, observa-se que não há proporcionalidade direta entre estes organismos.

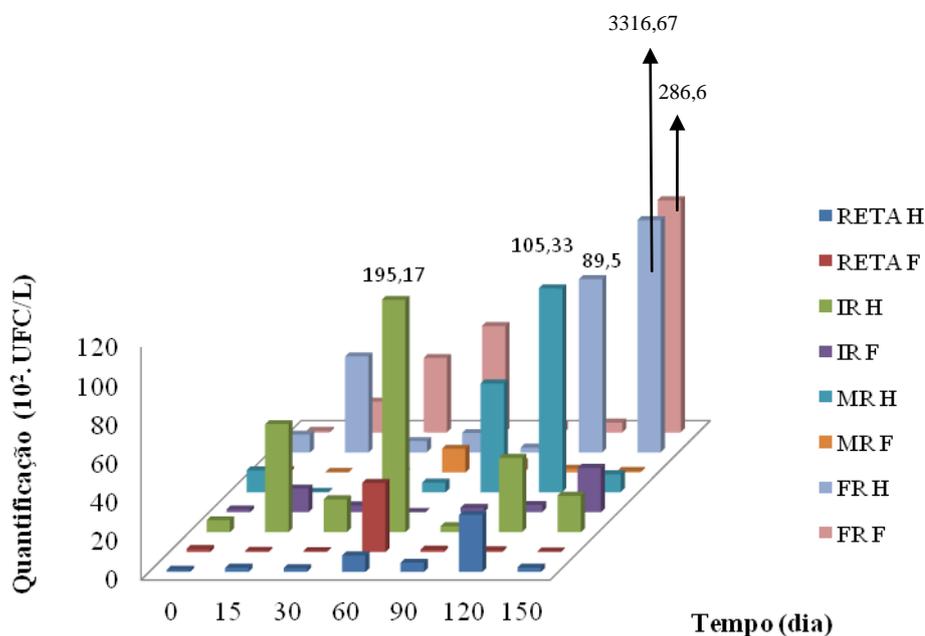


Figura 10. Concentração  $10^2$  UFC/L de bactérias heterotróficas e fungos totais

Entre as possíveis explicações para esta ocorrência podemos citar as elevadas temperaturas encontradas em nossa rede de distribuição, concentração e espécie de cloro residual, resistência dos microrganismos ao desinfetante, uma relação com estagnação na rede nos períodos sem fornecimento de água, alterações de fluxo e pressão, disponibilidade de nutrientes e eventos de quebra de integridade da rede de distribuição.

Uma limitação crucial no estudo dos fungos é a carência de informação com relação ao nível aceitável ou normal em água potável. As normas para limites de ocorrências de fungos em água quase não existem. (Hageskal *et al.*, 2009). Nem as orientações da Organização Mundial da Saúde para qualidade de água potável nem as legislações da Austrália estabelecem padrões para contaminação de fungos na água (Sammon *et al.*, 2010). A legislação brasileira igualmente não estabelece padrões para fungos na água (Portaria 518/2004). A Suíça é o único país no mundo que especifica um número máximo de 100 UFC de fungos por 100 mL para água potável em sua norma (Hageskal *et al.*, 2009, Sammon *et al.*, 2010). Com base neste limite, 28,5% das amostras deste estudo, estariam fora do padrão.

O estudo de fungos num sistema de abastecimento de água apresenta uma complexidade muito grande em virtude da quantidade de fatores intervenientes que vão desde a qualidade da água

do manancial, às práticas operacionais de tratamento e manutenção de rede. Associados a isto tem as questões climáticas e ambientais como o nível de degradação ambiental e poluição dos recursos hídricos

### Isolamento e identificação de fungos filamentosos

Foram isoladas da água, 333 amostras de fungos totais (filamentosos e leveduras), das quais 218 são de fungos filamentosos. Destes 180 foram conduzidos para identificação.

Na Tabela 1, constam os gêneros mais abundantes identificados

Tabela1. Gêneros de fungos isolados da água

Gênero	Nº amostras	% do total
<i>Penicillium</i>	34	18,9
<i>Trichoderma</i>	9	5,0
<i>Aspergillus</i>	26	14,4
<i>Curvularia</i>	13	7,2
<i>Phoma</i>	16	8,9
<i>Alternaria</i>	2	1,1
<i>Nigrospora</i>	3	1,7
<i>Fusarium</i>	4	2,2
<i>Pestalotiopsis</i>	4	2,2
<i>Cunninghamella</i>	2	1,1
<i>Cladosporium</i>	4	2,2
<i>Lasiodiplodia</i>	2	1,1
Outros < 1%	11	6,1
<i>Micelia sterilia</i>	28	15,6
Não identificados	22	12,2

Algumas limitações metodológicas dificultam a comparação entre os diferentes estudos e podem explicar as variações nos resultados obtidos (Hageskal *et al.*, 2009). Entre os gêneros identificados, o que apareceu em maior proporção foi *Penicillium*, seguido por *Aspergillus*. *Phoma*, *Trichoderma* e *Curvularia* foram ainda relevantes, mas ocorreram também *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Nigrospora*, *Pestalotiopsis*, *Cunninghamella* e *Lasiodiplodia*.

Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* podem ser encontrados em qualquer amostra ambiental (solo, água, rizosfera, ar, e alimentos) e são aptos a produzir esporos viáveis. São xerofílicos, crescendo em atividade de água igual ou inferior a 0,85. Estes organismos causam deterioração de alimentos ao crescerem sobre cereais, pão, sementes, defumados etc. (Webster, 2007).

Os gêneros mais abundantes encontrados neste trabalho estão de acordo com os mais frequentes identificados em águas de abastecimento pelos autores Gonçalves, *et al.* (2006), Hageskal *et al.* (2006) e Varo *et al.* (2007). Entretanto, *Aspergillus*, o segundo gênero em abundância neste trabalho, foi relatado como o mais freqüente nos estudos de Paterson *et al.* (1997) e Hussain *et al.* (2010). Diferentemente Sammon *et al.* (2010), encontraram maior abundância de *Cladosporium* num sistema municipal da Austrália subtropical.

De modo semelhante ao encontrado neste trabalho, a ocorrência em menor freqüência de *Alternaria*, *Curvularia*, *Nigrospora*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, também é apresentada nos estudos de Gonçalves *et al.* (2006), Varo *et al.* (2007), Hussain *et al.* (2010) e Sammon *et al.* (2010).

Diferentemente, Göttlich *et al.* (2002), relatam como mais abundantes *Phialophora*, *Acremonium*, *Exophiala* e *Penicillium*, e *Aspergillus* raramente isolados.

Apesar da importância dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* do ponto de vista da aplicação biotecnológica (produção de alimentos, enzimas, ácido cítrico, antibióticos etc.), nestes gêneros encontram-se os mais importantes produtores de micotoxinas, assim como *Fusarium* e *Claviceps*. Outros potenciais produtores de micotoxinas são do gênero *Alternaria*, e *Chaetomium*. (Paterson *et al.*, 2005, 2009). Exceto *Claviceps* e *Chaetomium*, os demais gêneros também foram isolados no presente estudo.

Paterson e colaboradores (2005) alertam tanto para a ação direta quanto para os efeitos crônicos das micotoxinas (na morte de animais, câncer e doenças imunológicas em humanos, principalmente nos mais susceptíveis). Eles observam que a presença de micotoxinas na água (principalmente água estocada) e que a ingestão das toxinas na água, ou pela manipulação e preparação de alimentos (podendo concentrar as micotoxinas no cozimento) pode afetar diretamente pessoas animais domésticos, ou secundariamente humanos que os consumam.

Para Hageskal *et al.* (2009), a ocorrência de fungos filamentosos em águas de abastecimento ainda divide as opiniões dos investigadores, com relação a se de fato a contaminação por fungos tem importante implicação pra saúde. Autores associam fungos veiculados por água ao risco potencial de infecções, alergias e toxicoses principalmente para imunocromprometidos (Paterson *et al.*, 2005, Hussain, *et al.* 2010). Entretanto, esse ponto de vista é contestado por Hunter, P. R. (2003). A real contribuição dos fungos veiculados pela água para problemas de saúde e para qualidade da água, ainda não está completamente esclarecida (Paterson *et al.*, 2009).

A água pode servir como veículo de disseminação de organismos e vários gêneros de fungos encontrados na água foram aqui detectados, sendo importante consultar na literatura quais dentre eles são citados com capacidade de afetar a saúde de humanos ou de animais e plantas.

Schwab & Straus (2004) relatam as espécies *Penicillium chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. revicompectum*, *P. oxalicum*, e *Aspergillus fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. sydowii*, *A. versicolor*, *A. flavipes*, *A. candidus*, and *A. ustus*, como importantes causadores de doenças respiratórias tais como alveolite e asma alérgica, provocadas tanto pelos esporos como pelas toxinas dos fungos. *Aspergillus fumigatus* foi isolado das torneiras de um Hospital em Oslo por Warris *et al.* (2001). Os gêneros *Phoma* e *Curvularia* podem atuar como patógenos de plantas dependendo da espécie e do hospedeiro. *Alternaria sp* é associada a doenças de culturas, com certo grau de especificidade para hospedeiro, outras são patógenos de insetos. Numerosas toxinas são também produzidas por este gênero, as quais se acumuladas em alimentos para humanos ou em ração de animais, pode ser fatal. Algumas espécies de *Alternaria* como *A. alternata*, *A. infectoria* e *A. longipes* são patógenos oportunistas raros de humanos associados com doenças nos ossos, tecido cutâneo, trato urinário, etc.(Webster, 2007).

Outras implicações dos metabólitos secundários de fungos (pigmentos, micotoxinas, compostos que dão sabor e odor) podem causar problemas organolépticos na água, mas em circunstâncias normais, possivelmente as concentrações devem ser baixas (Paterson *et al.*, (2005).

Os parâmetros microbiológicos da maioria das legislações vigentes baseiam-se em indicadores fecais, como coliformes e *Escherichia. coli*, que pressupõem a transmissão pela rota oral fecal.envolvendo ingestão e eliminação pelas fezes. Possivelmente pelo fato dos fungos serem propagados por outras vias, ainda se dê pouca importância à transmissão de fungos pela água e ao risco potencial desta via de disseminação pra saúde.

A legislação brasileira, assim como de outros países não estabelece critério para fungos em água (Portaria 518/2004). A legislação Suíça para água potável estabelece um limite para microfungos 100 UFC/100 mL (Hageskal *et al.*, 2007).

Se for considerada a norma suíça, 28,5% das amostras analisadas neste estudo, estariam fora do padrão.

## CONCLUSÕES

Confirmando a hipótese os fungos ocorreram na água distribuída pelo sistema Alto do Céu em Recife-PE em quantidades variáveis e relevantes.

O pH e temperaturas da água durante o experimento foram favoráveis ao crescimento de fungos e bactérias heterotróficas e influenciaram na espécie de cloro residual, interferindo na eficiência da desinfecção.

O regime de fornecimento intermitente de água, muito provavelmente forneceu condições de estagnação, pressão negativa, áreas mortas, etc., propiciando um ambiente favorável ao crescimento microbiano comprometendo a integridade da rede e a qualidade da água.

Fungos e bactérias heterotróficas sobreviveram às concentrações de cloro residual livre encontrado na água.

A maior concentração de fungos e de bactérias heterotróficas se deu no fim de rede, sendo as bactérias mais numerosas.

A concentração de bactérias heterotróficas na água, não mostrou relação direta com a concentração de fungos e em certos pontos quando uma apresentou-se elevada, a outra mostrou-se baixa. Deste modo, as bactérias heterotróficas, como indicadoras de condição higiênica da rede, apresentaram densidade dentro dos limites estabelecidos, atestando uma condição de normalidade; entretanto, não foram capazes de evidenciar as maiores concentrações de fungos que ocorreram simultaneamente.

Considerando que dentre gêneros de fungos encontrados alguns são conhecidos produtores de toxinas ou de metabólitos, outros apontam como patógenos oportunistas de humanos, além dos problemas organolépticos, uma maior atenção deve ser dada à presença desses organismos na água de abastecimento.

Espera-se que as informações geradas neste trabalho possam contribuir para o conhecimento da população de fungos do sistema de abastecimento de água tratada, e para um possível estabelecimento de limites na legislação brasileira de água potável.

#### 4. FUNGOS EM BIOFILMES NA REDE DE DISTRIBUIÇÃO DE ÁGUA POTÁVEL EM RECIFE, PE

## RESUMO

Fungos filamentosos são um grupo de organismos eucarióticos ubíquos e diversificados. Sua ocorrência em água potável é conhecida há muitos anos, entretanto estudos sistemáticos sobre o assunto estão apenas começando a crescer. Existem várias questões potenciais associadas ao fenômeno incluindo obstrução das canalizações, problemas organolépticos como odor, sabor e pigmentos, disseminação de patógenos e produção de micotoxinas. Além disso, fungos filamentosos podem contribuir, junto com bactérias, leveduras, protozoários e vírus, para formação de biofilmes nos sistemas de distribuição de água. Todavia, o papel dos fungos nos biofilmes ainda não foi demonstrado claramente (Paterson & Lima, 2005; Paterson *et al.*, 2009). O presente trabalho trata da investigação e detecção *in situ* de fungos filamentosos em biofilmes na rede de distribuição de parte da região metropolitana de Recife, Pernambuco – Brasil. Os biofilmes foram coletados em amostras reais de canos e em amostradores instalados em pontos da rede de distribuição. Para detecção dos biofilmes foi utilizada uma combinação de duas técnicas fluorescentes: coloração com Calcofluor White CW e hibridização *in situ* com sondas oligonucleotídicas rRNA EUK516 e FUN1429. Nos amostradores e nos canos reais foi possível evidenciar *in situ* filamentos fúngicos formando biofilmes na rede de distribuição e a atividade foi detectada com o corante FUN 1, comprovando viabilidade celular. Concluiu-se que no sistema Alto do Céu – Recife, fungos foram encontrados formando biofilmes.

**Palavras chave:** biofilmes, fungos filamentosos, rede distribuição, contaminantes, detecção *in situ*

## ABSTRACT

The many potential issues related to fungi in drinking water include blockage of water pipes, changes of odour, taste and pigments, spreading of pathogenic fungi and the mycotoxin production. Filamentous fungi (FF) are a ubiquitous and diverse group of eukaryotic organisms and their occurrence in tap drinking water has been known for many years. However, systematic studies on the subject are only beginning to increase. There are various potential issues associated with the phenomenon, including blockage of water pipes, organoleptic problems such as odours, tastes and pigments, spread of pathogenic fungi, and mycotoxin production. Furthermore, filamentous fungi may also contribute, along with bacteria, yeasts, protozoa and viruses, to the formation of biofilms in water distribution systems. However, fungal role in biofilms has not been demonstrated unambiguously (Paterson and Lima, 2005; Paterson *et al.*, 2009). The present work concerns the surveillance and *in situ* detection of filamentous fungi in water distribution biofilms in real tubes and also in samplers placed in the distribution system of part of Recife metropolitan region, Pernambuco - Brazil. Biofilms were collected in real samplers of pipes and also in samplers installed at points of distribution network. To detecting biofilms a combination of two fluorescent techniques: staining with Calcofluor White CW and *in situ* hybridization with oligonucleotide probes rRNA EUK516 and FUN1429, was used. In samplers and real pipes it was observed fungal filaments forming biofilms in distribution network and the activity was detected with the dye FUN 1, indicating cell viability. It was concluded that in Alto do Céu System - Recife fungi forming biofilms were found.

**Key words:** biofilms, filamentous fungi, distribution network, contaminants, detection *in situ*

## INTRODUÇÃO

Os microrganismos crescem normalmente na água e nas superfícies em contato com a água e podem formar biofilmes. Para formação dos biofilmes os fatores predisponentes são temperatura, disponibilidade de nutrientes, deficiência de residual desinfetante, regime hidráulico e característica do substrato (WHO, 2002; Kerr, 2003).

Um biofilme pode ser descrito como uma comunidade microbiana caracterizada por células irreversivelmente aderidas a um substrato ou interface, embebidas numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que elas produzem e exibem alteração fenotípica com relação à taxa de crescimento e transcrição de genes (Donlan & Costerton, 2002). Esta matriz é importante tanto para a formação e estrutura do biofilme como para proteção das células, porque previne o acesso de antimicrobianos e xenobióticos às células dentro do biofilme, conferindo proteção contra estresses ambientais como radiação UV, variação de pH, choque osmótico e dessecação (Davey, 2000). A formação de um biofilme é precedida pelo surgimento de um filme condicionante, influenciado pelas propriedades da superfície e por moléculas de matéria suspensa (orgânica e inorgânica), depois ocorre adsorção de microrganismos na superfície condicionada, inicialmente adesão reversível, devida a forças de van der Waals, movimento Browniano, sedimentação, forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas e movimento convectivo da água, além de interações na superfícies poliméricas celulares (capsulas, fimbrias ou pili e EPS). Em seguida a adesão se torna irreversível, se as condições locais forem favoráveis, tem início um conjunto de mudanças inclusive expressão de genes conhecidos por serem transcritos nas células crescendo em biofilmes (Kerr 2003).

Um biofilme pode ser iniciado na presença de forças de turbulência, possivelmente o fluxo turbulento melhora a adesão por empurrar as bactérias planctônicas sobre a superfície, mas qualquer que seja o mecanismo, os biofilmes se formam preferencialmente em locais de forte turbulência nos sistema naturais e industriais. Quando se forma em regime de baixa turbulência ele apresentam baixa resistência e quebram facilmente (Donlan & Costerton, 2002)

A despeito dos baixos níveis de nutrientes na água potável, da provável presença de desinfetantes e de turbulência, os microrganismos ainda estão aptos a aderirem nas canalizações e proliferarem como biofilmes (Kerr 2003).

Numerosos estudos mostram que organismos em biofilmes exibem uma complexa diferenciação e comportamento coletivo que tornam a vida em biofilmes mais vantajosa que a forma planctônica. Entre as principais vantagens estão proteção, aumento da resistência aos microbicidas, comunicação intercelular entre e intra-espécies (quorum sensing) densidade

controlada, mecanismos de dispersão, interações metabólicas (cooperatividade, sintrofismo) e transferência de genes (Davey, 2000, Donlan e Costerton, 2002, Kerr, 2003, Krupa *et al.*, 2004; Harding *et al.*, 2009).

Dois aspectos dos biofilmes são de particular importância: (1) estabilidade mecânica da matriz de exopolissacarídeos, porque é esta que tem de ser superada nos processos de limpeza, e (2) o aumento da tolerância aos desinfetantes pelos organismos dos biofilmes, que pode ser duas ou três vezes maior que a das células livres (Flemming, 2002).

Em 2003, Batté e colaboradores relatam que o cloro residual resultante do tratamento de águas, que é usualmente menor que 1 mg Cl<sub>2</sub>/L, é insuficiente para eliminar e remover toda biomassa. Os autores ainda relatam que mesmo grandes dosagens e drásticos tratamentos são ineficazes para erradicar biofilmes. A biomassa imobilizada em forma de biofilmes pode ser responsável por limitações nos processos industriais (transferência de massa e calor) e fonte de contaminação e proliferação de infecções nos sistemas de abastecimento de água e dispositivos médicos hospitalares (Carvalho, 2007).

Harding *et al.* (2009), compilaram vários trabalhos sobre biofilmes e concluíram que as mesmas características de expressão diferencial de genes observadas em biofilmes de bactérias e leveduras indicam que os critérios estruturais e fenotípicos para biofilmes podem ser completamente atendidos por fungos filamentosos.

É difícil estudar *in situ* as paredes das canalizações e a maioria das informações sobre desenvolvimento de biofilmes foram derivadas de modelos de laboratório onde as condições podem ser facilmente reguladas (Kerr, 2003).

Muitos estudos, frequentemente, usam técnicas que confiam na remoção dos biofilmes (ou de organismos associados aos biofilmes) do substrato por algum tipo de força mecânica, como agitação em vortex, ultra-som, para então proceder à análise e medição. O procedimento mais comumente usado para medição é contagem em placa, no qual as células ressuspendidas e dispersadas do biofilme são plaqueadas sobre um meio sólido, incubadas e contadas. Antissoros fluorescentes e sondas de hibridização *in situ*, permitem identificar organismos específicos dentro de uma comunidade mista de um biofilme (Donlan, 2002).

Métodos que não dependem de cultivo empregam várias combinações de corantes fluorescentes, anticorpos marcados com fluorocromos, ou sondas moleculares desenhadas para moléculas alvo como rRNA e microscopia de epifluorescência. Estes métodos permitem contagens diretas, maior especificidade, discriminação entre viáveis e não viáveis, e hibridização fluorescente *in situ* (Kator & Rhodes, 2003). A necessidade de identificação rápida e específica de células microbianas individuais em seu ambiente natural, reforçada pela demora dos métodos tradicionais de cultivo, que funcionam apenas com organismos cultiváveis, levou ao surgimento de

metodologias de detecção *in situ* que fossem tão sensíveis quanto técnicas já bem estabelecidas de imunofluorescência, mas ao invés de antígenos marcados baseiam-se em ácidos nucleicos e podem ser observadas através de microscopia de fluorescência (Amann *et al.*, 2001).

As sondas oligonucleotídicas fluorescentemente marcadas para moléculas alvo como r RNA, são ferramentas eficientes para muitas áreas da ecologia microbiana uma vez que pode monitorar populações específicas em amostras ambientais baseadas nas características genótípicas 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, ou gênero e populações (Amann *et al.*, 1997).

O sistema de abastecimento Alto do Céu é responsável por 10 % do volume distribuído na Região Metropolitana do Recife, e capta água de quatro mananciais de superfície. Na região metropolitana de Recife o abastecimento (incluindo o sistema Alto do Céu) é feito em regime de intermitência, de acordo com o calendário de abastecimento, divulgado pela COMPESA, onde constam dias e horários em que cada localidade vai receber água. Deste modo a rede passa por flutuações de fluxo e pressão, que vão de ausência de fluxo/pressão negativa a fluxo /pressão positiva (COMPESA, 2010).

Este trabalho teve como objetivo propor e testar um modelo de amostrador para detecção *in situ* de biofilmes em sistema de distribuição de água potável e detectar fungos filamentosos em biofilmes nos amostradores e em amostras reais da rede de distribuição de água potável no sistema Alto do Céu, Recife – Pernambuco, BR.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostradores**

Foram construídos amostradores (Figura 1) em canos de policloreto de vinila - PVC, com uma placa inserida transversalmente, para servir de suporte para a formação de biofilmes. As placas testadas foram de polietileno, PVC e de acetato.

Nas extremidades dos canos foram abertas roscas (Figura 1 C - setas) que permitem conectar vários amostradores (Figura 1 E) ou tampar após sua remoção da rede de distribuição durante as coletas (Fig 1 D). Os amostradores foram instalados em quatro pontos representativos do sistema Alto do Céu: reservatório de água tratada da estação de tratamento – RETA; e rede de distribuição:

início - IR, meio - MR e final – FR. Paralelamente foram coletadas amostras de canos substituídos da rede de distribuição, suprida pelo sistema alto do Céu.

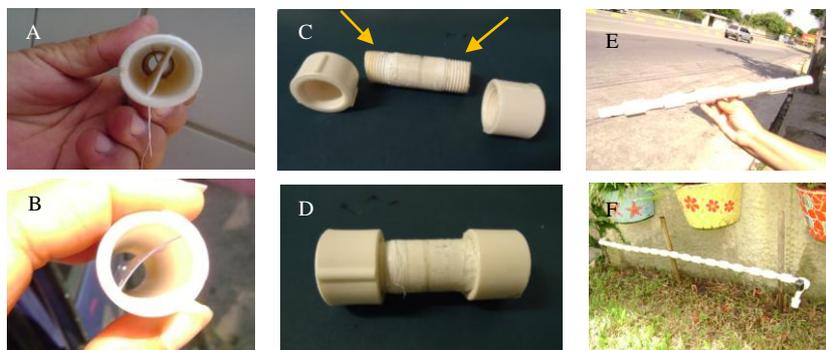


Figura 1. Amostradores em PVC: placas de polietileno (A) e acetato (B) inseridas transversalmente; extremidades e tampas rosqueadas (C); tampados após serem retirados (D); vários amostradores conectados (E) e instalados num ponto de coleta da rede de distribuição (F)

### Coleta dos amostradores

De fevereiro a agosto de 2010, foram coletados amostradores nos tempos: 0 (momento da instalação), 15, 30, 60, 90, 120 e 150 dias. As amostras de canos substituídos da rede foram coletadas em períodos aleatórios de acordo com a programação de serviços de manutenção da rede. Todo ensaio foi realizado em triplicata.

### Transporte e conservação das amostras

Imediatamente após serem desconectados da rede, os amostradores foram preenchidos com a água da rede local, tampados com tampas rosqueáveis de PVC e transportados sob refrigeração até o laboratório. As amostras de canos substituídos foram transportadas dentro de bolsas plásticas em temperatura ambiente. Após chegarem ao laboratório foram procedidas: a higienização das superfícies externas, e assepticamente, consecutivas lavagens com água estéril. Após escorrer foram acondicionadas em plásticos limpos.

Após higienização os canos foram serrados em pedaços de 1x1 ou 1x2 cm, cada fragmento foi novamente lavado com água destilada esterilizada, para posterior análise. Igualmente as placas de acetato foram cortadas em três pedaços. Para armazenamento e conservação as amostras (canos e placas) foram colocadas em tampão PBS a 4°C.

## Detecção *in situ*

A detecção *in situ* foi realizada empregando metodologias que associam fluorocromos, biologia molecular e microscopia de epifluorescência. Foram empregados os fluorocromos: Calcofluor White M2R (CW), FUN<sup>®</sup>1, além das sondas oligonucleotídicas **EUK516**: 5'-ACCAGACTTGCCCTCC-3' (MWG Biotech, Ebersberg - Germany)- para Eukarya e **FUN1429**: 5'-GTGATGTACTCGCTGGCC-3' (MWG Biotech, Ebersberg - Germany) marcada com Oregon-Green no terminal 5'-específica para Eumycota.

De cada amostra acondicionada em tampão PBS a 4°C, três pedaços foram escolhidos aleatoriamente para a detecção de fungos filamentosos em biofilmes, com (CW). A coloração com CW foi aplicada em todas as amostras presuntivamente, para visualização de filamentos fúngicos. As amostra que apresentaram filamentos com fluorescência azul típica de CW, foram consideradas positivas para biofilmes com fungos filamentosos. As amostras positivas, no CW, foram então utilizadas para análise com Hibridização Fluorescente *in situ* - FISH e FUN<sup>®</sup>1 (corante para análise de viabilidade) As amostras em que não foram visualizados filamentos corados com Calcofluor foram consideradas negativas para biofilmes com fungos filamentosos.

## Coloração com Calcofluor

As amostras retiradas do tampão PBS, foram lavadas com água destilada esterilizada, para remover sedimentos e células não aderidas. Em seguida, sobre cada amostra, foram colocados 50 µL de uma solução 25 µM de Calcofluor White e postas no escuro, à temperatura ambiente, por 30 minutos. Após este tempo, cada amostra foi lavada com água destilada esterilizada, e levada para microscopia de epifluorescência, usando fonte de excitação de 358 nm e o sinal obtido é azul.

## Hibridização Fluorescente *In Situ* – FISH

Para que ocorra hibridização *in situ*, é necessário previamente que a morfologia das células seja estabilizada e as paredes e membranas permeabilizadas para penetração das sondas (por meio de fixadores usualmente baseados em aldeídos ou alcoóis). As sondas são aplicadas em um tampão de hibridização e incubadas numa temperatura adequada. A técnica é realizada em três etapas: fixação, hibridização e microscopia de epifluorescência. (Amann *et al.* 1997).

- **Fixação:** As amostras retiradas do tampão PBS foram secas em estufa a 46° C por 10 minutos. Depois desidratadas com álcool numa série crescente de concentrações (70 %, 80

% e 90 %) sobre a superfície de cada amostra por 10 minutos, seguida de secagem em estufa a 46° C por 10 min.

- **Pre-hibridização:** Adicionou-se tampão de hibridização sobre a superfície das amostras, e na placa colocou-se um papel de filtro embebido com tampão de hibridização, e deixou-se em estufa a 46° por 30 minutos.
- **Hibridização:** Sobre o tampão da etapa anterior foram adicionados 8 µL das sondas EUK516 e FUN1429 em cada amostra, e cuidadosamente, sem tocar na superfície fez-se a homogeneização das sondas com o tampão de hibridização. As amostras foram levadas pra estufa a 46° C por 3 horas, ao abrigo da luz. Durante a hibridização as sondas covalentemente ligadas pelo terminal 5' ao fluorocromo entram nas células e ligam-se à sua sequência alvo (caso esta esteja presente), tornando a célula detectável por microscopia de epifluorescência devido à existência do marcador fluorescente. Passado este tempo, cada amostra foi lavada com tampão de lavagem, colocada em tubo de Falcom contendo solução de lavagem, e posta em banho-maria por 20 minutos a 30 °C. A solução de lavagem foi removida com água destilada esterilizada a 4°C, depois se fez a secagem com ar quente (secador) e a amostra seguiu imediatamente para observação sob microscopia de epifluorescência, com fontes de excitação de 543 nm para sonda EUK 516 e 480 para FUN1429, dando sinais vermelho e verde respectivamente.

### **Coloração com FUN 1**

As amostras retiradas do tampão PBS foram lavadas com água destilada esterilizada e secadas a 30 °C. Em seguida foram adicionados 30 µL do corante sobre cada amostra, seguido de incubação no escuro a 30 °C por 30 minutos. Após este período, as amostras foram observadas com um microscópio de epifluorescência com fonte de excitação de 480 nm e sinal obtido verde/vermelho.

### **Microscopia de epifluorescência**

As amostras foram observadas sob microscópio epifluorescente 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<sup>®</sup>

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Deteção *in situ* de biofilmes com Calcofluor**

## Amostradores com placas de polietileno

As placas de polietileno, após 100 dias de instalação dos amostradores, apresentaram formação de biofilmes em desenvolvimento nos quais foram visualizados filamentos por coloração CW, em microscopia de epifluorescência, porém as placas mostram uma auto-fluorescência bem evidente (Figura 2). A auto-fluorescência é uma fluorescência de fundo devida à interação do material com a luz de excitação usada na epifluorescência que pode interferir na percepção da imagem. Fez-se necessário testar outros materiais como PVC e acetato.

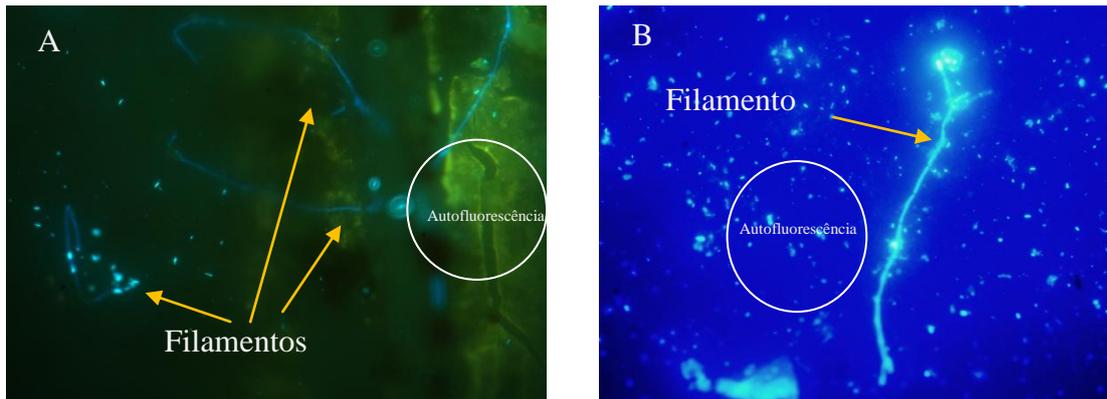


Figura 2. Microscopia de epifluorescência de filamentos fúngicos corados com CW nos biofilmes formados sobre placas de polietileno dos amostradores, exibindo auto-fluorescência (círculos) e filamento (setas) (A e B).

## Teste da auto-fluorescência

Para testar a auto-fluorescência um fragmento de cada material (PVC e acetato) foi submetido à iluminação usada na microscopia de epifluorescência, com diferentes filtros. A auto-fluorescência foi detectada nas placas de PVC e acetato (Figura 3) nos filtros azul, verde e vermelho. O acetato exibiu a menor auto - fluorescência.

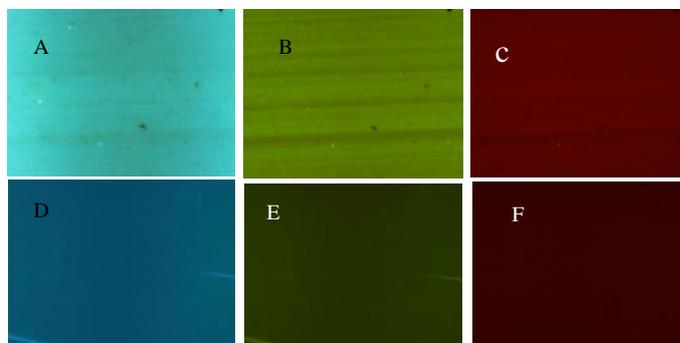


Figura 3. Imagens de microscopia de epifluorescência, mostrando auto-fluorescência em placa de PVC (A,B,C) e em placa de acetato (D,E,F) usando respectivamente nos filtros azul(A,D), verde(B,E) e vermelho(C e F)

Estes resultados são corroborados por Gonçalves *et al.* (2006) que relatam a ocorrência de auto-fluorescência em PVC no canal vermelho e que esta foi acentuada nas maiores ampliações. Neste trabalho a auto-fluorescência foi mais forte em PVC nos canais azul e verde.

### Amostradores com placa de acetato

Amostradores com placas de acetato foram instalados na rede de distribuição, no entanto apesar de apresentarem menor fluorescência, a formação de biofilme nestas placas não foi detectável e não apresentou adesão consistente que pudesse ser visualizada em coloração com CW, possivelmente o tempo de residência foi insuficiente. Estas amostras foram consideradas negativas para biofilmes com fungos filamentosos.

### Amostras de canos substituídos da rede de distribuição

Um total de nove amostras de canos da rede de distribuição foram analisadas para detecção *in situ*, das quais cinco foram positivas para biofilmes com fungos filamentosos. Na figura 4, são mostrados os resultados positivos para detecção de biofilmes com filamentos fúngicos nos tubos da rede de distribuição.

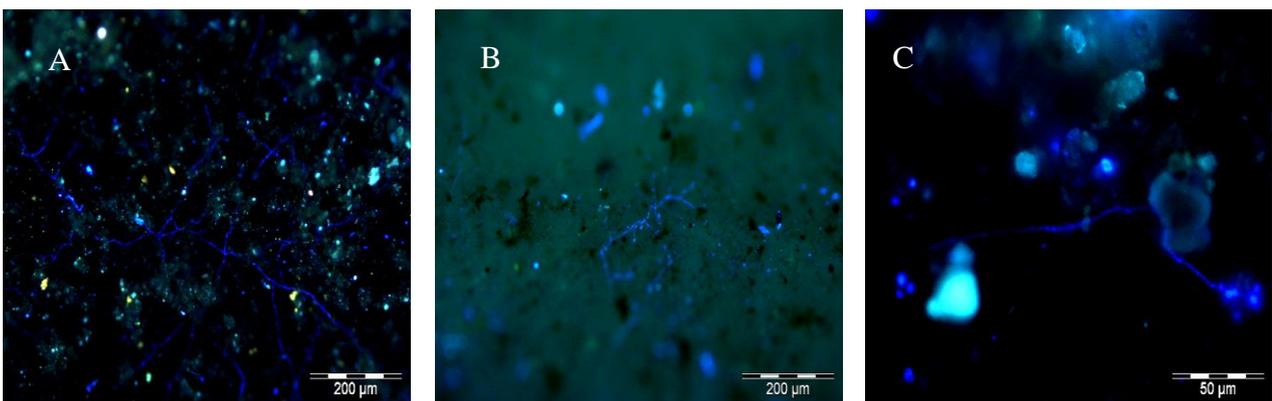


Figura 4. Imagens de epifluorescência de tubos da rede com resultados positivos para detecção de biofilme com filamentos fúngicos com CW (A), (B) e (C).

Os canos que apresentaram filamentos com baixo sinal de fluorescência (Figura 4) quando corados com calcofluor, foram posteriormente tratados com solução esterilizada de glicose 1% para melhorar a detecção por FISH.

Na figura 5 podemos evidenciar os filamentos fúngicos imersos nos biofilmes por entre as partículas de sedimentos dos canos. Estes resultados confirmam dados já anteriormente encontrados na rede de distribuição da região metropolitana de Recife Oliveira *et al.* (2008) e estão de acordo com os resultados de Gonçalves *et al.* (2006).

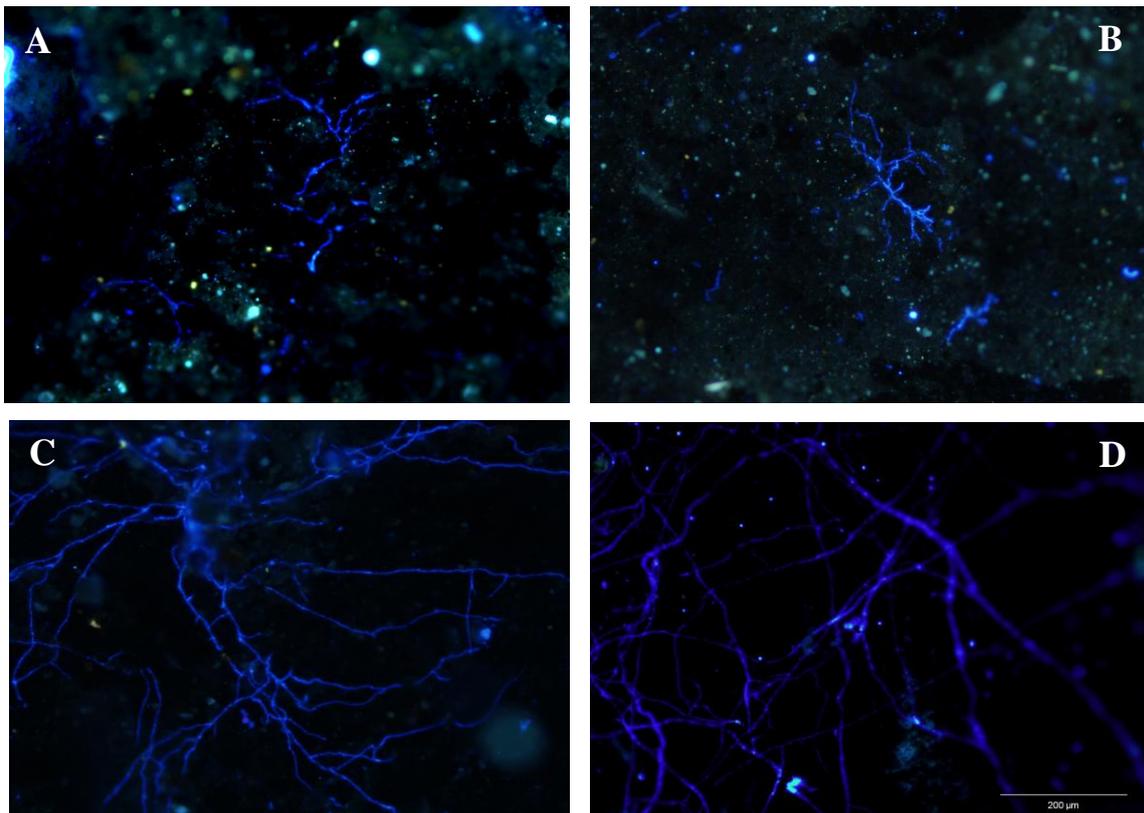


Figura 5. Imagens de epifluorescência de tubos da rede, corados após tratamento com glicose 1% para melhorar o sinal de fluorescência

A detecção *in situ* nos canos reais da rede foi mais bem sucedida tendo em vista que essas amostras são de canos antigos que foram retirados para substituição e, por isto, com biofilmes bem estabelecidos pelo longo tempo de permanência na rede.

## Detecção e tipificação com FISH

Na figura 6 imagens de epifluorescência de amostras positivas na coloração com calcofluor (Fig. 6 A, D, G e J), as quais foram em seguida submetidas à hibridização *in situ* com sondas para tipificação e detecção dos fungos. A sonda FUN 1429 (Oregon Green 488) de sinal verde amarelado é específica para fungos e a EUK516 (CY3) de sinal vermelho é específica para eucariotos. Os mesmos filamentos detectados em azul pelo CW (Fig. 6 A, D, G e J), podem ser visualizados em vermelho pela sonda EUK516 (Fig. 6 C, F, I e L), constatando serem eucariotos e em verde-amarelado pela sonda FUN 1429 (Fig.6 B, E, H e K) confirmando serem Eumycota; logo, são filamentos fúngicos.

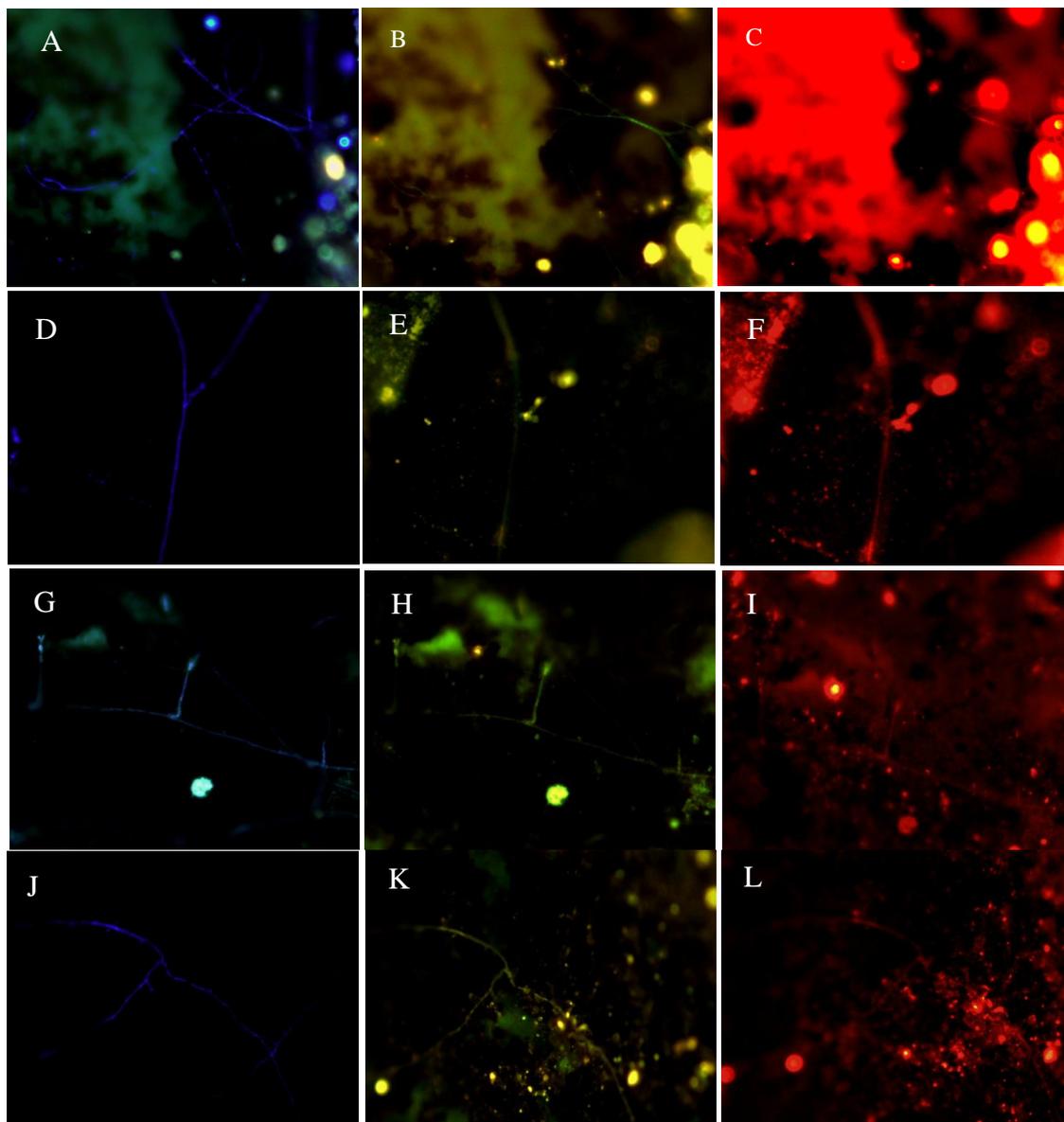


Figura 6. Imagens de epifluorescência de tubos da rede, submetidos a FISH. Ensaio presuntivo: filamentos corados com CW em A, D, G, J. Tipificação: filamentos hibridizados com sonda EUK 516 para eucariotos em C, F, I, L, e com sonda FUN1429 específica para fungos em B, E, H, K.

Estes resultados estão diretamente relacionados às técnicas escolhidas, empregando corantes e sondas moleculares específicos para fungos, a técnica FISH forneceu uma rápida informação, revelando de forma direta a participação de fungos nos biofilmes da rede de distribuição de água potável, no sistema Alto do Céu.

### **Detecção com FUN 1**

Os tubos submetidos à coloração com FUN1 para detecção de viabilidade celular, como mostra o exemplo da figura 7, exibiram fluorescência vermelho-laranja (setas) ou amarelo-laranja compatível com as estruturas intravacuolares cilíndricas (CIV's – Cilindric intravacuolar structures) relacionadas com atividade celular

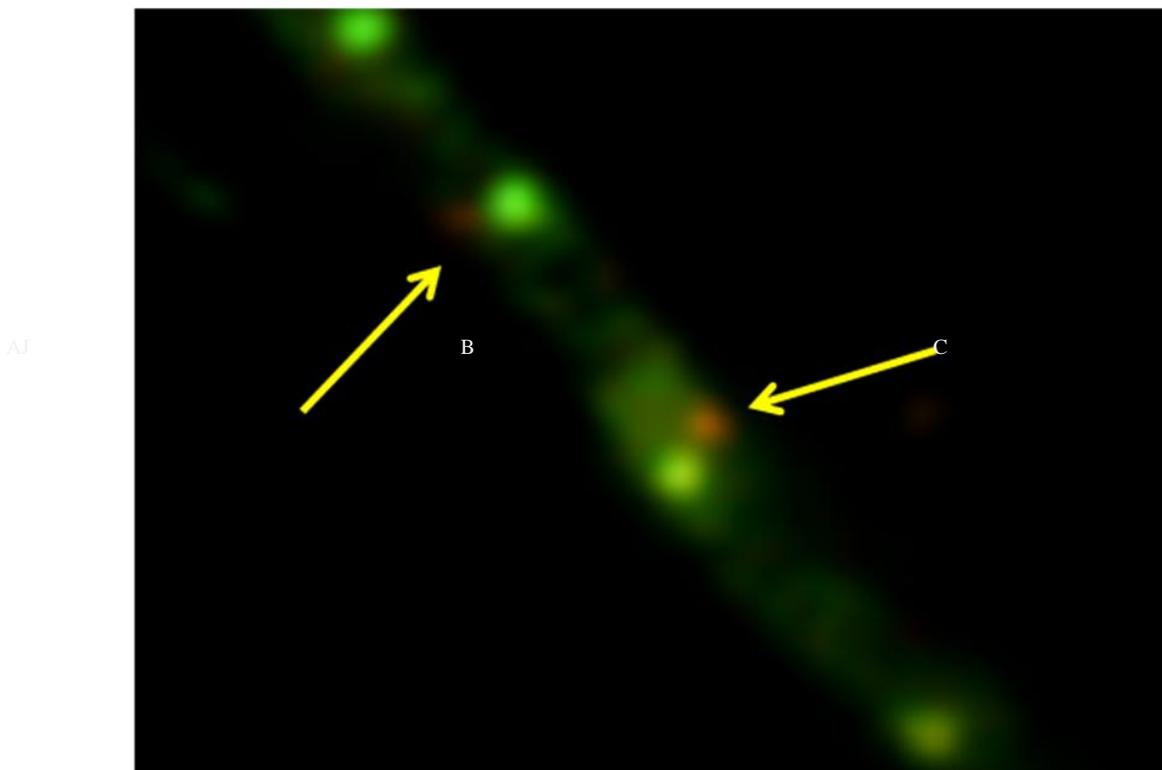


Figura 7 Imagen ampliada de epifluorescência do tub 6 da rede, submetido a coloração com FUN 1 exibindo fluorescência vermelho – laranja (B e C), típica de células viáveis.

Este resultado mostra que mesmo após os canos serem retirados da rede e submetidos a um período de desidratação e ausência de nutrientes, os fungos ocorreram nos biofilmes e tiveram a habilidade de manterem a viabilidade celular nestas condições adversas. Sob este aspecto pode-se supor que a intermitência de água na rede não atuou como fator limitante; ao contrário, por gerar áreas de estagnação e deposição de sedimentos favoreceu a o crescimento fúngico e formação de

biofilmes. Harding *et al.* (2009) reuniram evidências da capacidade dos fungos filamentosos participarem da formação de biofilmes.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos confirmam a hipótese de que os biofilmes ocorrem no sistema de distribuição Alto do Céu – Recife, Pernambuco, a exemplo de outra área da rede na região metropolitana, já relatada em Oliveira *et al.* (2008) e com participação de fungos, conforme relatos de Doggett, (2000) e de Gonçalves *et al.*(2006),

Um dos maiores desafios no estudo dos biofilmes é tornar possível sua investigação no seu ambiente natural com técnica rápida, específica, que não destrua sua estrutura. A detecção *in situ* de microrganismos é agora uma técnica bem estabelecida (Amann *et al.*, 2001) e indicada para este fim com vantagens em relação ao métodos cultivo dependentes tradicionais.

Apesar da autofluorescência nas placas de polipropileno, ficou evidente o desenvolvimento de biofilmes nos amostradores, o que possibilitará um estudo mais pormenorizado, de sua estrutura e ecologia, e mecanismos de formação, entre outros.

Neste sentido o sistema de amostradores usados neste trabalho foi muito importante porque permitiu a detecção *in situ* em placas submetidas às mesmas condições, encontradas no sistema de distribuição de água, às quais estiveram expostos os canos de substituição; ou seja: as mais próximas possíveis da real situação da uma rede de água potável. Aliada à especificidade das técnicas moleculares, a detecção *in situ* neste sistema de amostragem propiciou a conservação da estrutura e composição dos biofilmes.

Na literatura a maioria dos estudos de biofilmes é conduzida em laboratórios, usando reatores e sob condições controladas. Por outro lado o estudo diretamente na rede implica em maior complexidade. Para Dogget *et al.* (2000) o crescimento microbiano pode estar associado à grande complexidade da rede de distribuição que envolve as características físico-químicas da água particularmente relevantes como temperatura, pH, níveis de cloro residual, além de fatores relacionados à eficiência do tratamento e rotinas de manutenção da .rede.

Este trabalho acrescentou ao estudo dos biofilmes novos dispositivos para detecção *in situ* e gerou informações iniciais sobre a ocorrência de fungos e biofilmes na água de abastecimento do sistema Alto do Céu – Recife, PE.

## 5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

Neste trabalho a contaminação da água por bactérias e fungos foi evidenciada em todos os pontos de coleta. A densidade das bactérias heterotróficas atendeu à norma de potabilidade brasileira em todos os pontos de coleta. Com base neste indicador a água seria considerada dentro das condições de higiene aceitáveis. Como foi relatado, no mesmo período a população de fungos várias vezes ultrapassou 1000, 2000, 3000, chegando a um máximo de 28667 UFC/L. Entretanto a citada norma não estabelece qualquer limite para ocorrência de fungos na água de consumo.

Algumas características regionais como dificuldade de mananciais de qualidade, eutrofização, pouca disponibilidade hídrica, são uma realidade constante, e fatores predisponentes ao crescimento como temperatura, e aporte destes e de outros microrganismos aos mananciais, estão fora dos limites de atuação das empresas de água. Portanto, um trabalho preventivo envolve políticas públicas responsabilidades partilhadas.

Uma rede de distribuição envolve uma gama de fatores intervenientes tanto com características ecológicas, tendo a rede de canalização como um nicho bem particular, como características de processo, uma vez que o fornecimento de água potável é antes de tudo um processo de transformação de uma matéria prima preciosa – água *in natura*, em um produto – a água tratada. Há também as implicações operacionais do sistema de tratamento e da manutenção da rede de distribuição.

Mesmo neste complexo e oligotrófico ambiente aquático onde a visualização de células com baixo número de ribossomos tem sido problemática, as sondas fluorescente melhoradas estão aptas a identificar mais de 50% das células. Comparando-se este percentual com o usualmente menor que 1 % de microrganismos que podem ser caracterizado pelos métodos cultivo dependentes, decide-se favoravelmente pela detecção *in situ* (Amann *et al.*, 1997)

A ocorrência de biofilmes nas canalizações, mesmo com desinfetante residual, mostrou neste como em diversos estudos mencionados, que é uma condição bastante encontrada. A participação de fungos nos biofilmes onde ficam mais protegidos e resistentes aos biocidas é relevante, não só sob aspecto sanitário, como tem, para empresas de saneamento, implicação econômica uma vez que recursos são gastos com desinfetantes, porém não atingem a principal finalidade - garantir a segurança microbiológica.

A ocorrência de fungos na água de abastecimento precisa ser tratada na perspectiva da prevenção, já que a cada dia emergem novas etiologias e considerando os mecanismos de dispersão dos fungos, o papel da água como veículo disseminador, deve ser revisto levando em conta outras vias diferentes da rota oral-fecal, que podem igualmente afetar a saúde como contato e inalação. Além disso maiores informações epidemiológicas são necessárias.

Como perspectivas futuras, uma maior padronização metodológica nesta área de pesquisa, para que os dados gerados possam subsidiar informações, que auxiliem nas definições de parâmetros de qualidade e limites relativos a fungos na água de consumo humano.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aaron T. W. 2010. *Sharing Water, Sharing Benefits: working towards effective transboundary water resources management*. Paris: Unesco Cld.
- Amann, R., Fuchs, B.M., Behrens, S. 2001. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization. *Current Opinion in Biotechnology*. 12: 231-236.
- Amann, R., Glöckner F., Neef A. 1997. Modern methods in subsurface microbiology: *in situ* identification of microorganisms with nucleic acid probes. *FEMS Microbiology Reviews* 20: 191-200.
- American Public Health Association (APHA) 1998. Microbiological Examination, in: *Standard Methods for The Examination of Water and Wastewater* 20<sup>th</sup> ed. Washington : APHA, AWWA, WEF.
- Andreas, S., Heindl, S., Watzky, C., Möller, K., Ruchel, R., 2000. Diagnosis of pulmonary aspergillosis using optical brighteners. *European. Respiratory. Journal* 15: 407– 411.
- Arvanitidou, M., Kanellou, K., Constantinides, T.C., Katsouyannopoulos, V. 1999. The occurrence of fungi in hospital and community potable Waters. *Applied Microbiology*. 29: 81-84
- Barnett, H.L.; Hunter, B.B. Illustrated genera of imperfect fungi. Minnesota: Burgess Publishing Company, 1972. 241p.
- Bartram, J. Howard, G. 2003. Drinking-water standards for the developing world. In: Mara, D., Horan, N.(eds) *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Academic Press, pp 221-240.
- Batté, M., Appenzeller, B.M.R., Grandjean, D., Fass, S., Gauthier, V., Jorand, F., Mathieu, L., Boulam, M., Saby, S. & Block, J.C. 2003. Biofilms in drinking water distribution systems. *Environmental Science and Bio/Technology* 2: 147-168.
- Bishop, R. (2010) Applications of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. *Bioscience Horizons* 0: 1 – 11.
- Blakeslee, A. F. 1915. Lindner's roll tube method of separation cultures. *Phytopathology* 5:68-69.
- Baselski, V.S., Robison, M.K., Pifer, L.W. Woods, D.R.1990. Rapid detection of *Pneumocystis carinii* in bronchialveolar lavages samples by using Cellufluor staining. *Journal of Clinical Microbiology* 28:393-394.
- Brasil, K.W., Pinheiros, R.L., Pimentel, I.C. 2003. Diagnóstico laboratorial de micoses superficiais e cutâneas: comparação dos métodos do hidróxido de potássio e do *calcofluor White*. In: *Investigação Clínica, Laboratorial e Terapêutica* Rio e Janeiro 78. Anais Brasileiro de Dermatologia: 547-571.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Agência Nacional das Águas. 2009. Conjuntura nacional dos Recursos Hídricos no Brasil. Disponível em: <[www.ana.gov.br](http://www.ana.gov.br)>. Acesso em 25 outubro 2010.
- BRASIL. Ministério da Integração Nacional, Secretaria de Políticas de desenvolvimento Regional 2005. Cartilha Nova delimitação do Semi-Árido Brasileiro, disponível em:<http://www.integracao.gov.br/desenvolvimentoregional/publicacoes/delimitacao>>. Acesso em: 23 de outubro de 2010.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, 2005. Conselho Nacional do meio Ambiente , Resolução 357- disponível em : <http://www.mma.gov.br>. Acesso em: 20 de outubro de 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. 2005. PortariaMS nº 518/2004/Ministério da Saúde, Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental – Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 28 pp.
- Carvalho, C.C.C.R. 2007. Biofilms: recent developments on a old battle. *Recent Patents on Biotechnology* I: 49-57.
- Clarke, R., King, J. 2004. *The Atlas of Water: mapping the world's most critical resource*. Londres: Earthscan Publications Ltd, 2004.

- COMPESA- Companhia Pernambucana de Saneamento. 2010. disponível em: [www.compesa.com.br](http://www.compesa.com.br), Acesso em 16 outubro 2010
- Côrte-Real, M., Johansson, B., Saraiva, L. 2010. Nutrição e crescimento microbiano. In: Ferreira, W.F.C.; Sousa, J.C.F; Lima, N.(ed) *Microbiologia*. Lidel Edições Técnicas Ltda, pp 166-195.
- Davey, M.E., O'Toole, G.A. 2000. Biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics* 64: 847-867.
- Doggett, M.S. 2000. Characterization of fungal biofilms within a municipal water distribution system. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1249–1251.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology* 15: 167-193.
- EPA. US. Environmental Protection Agency, Office of Ground Water and Drinking Water, Standards and Risk Management Division 2006. Distribution system indicators of drinking water quality. *Total Coliform Rule Issue Paper 1-96*
- Esteves, F.A. 1998. Fundamentos de Limnologia. 2ªed. Ed. Interciência. RJ. pp601
- Flemming, H.C. 2002. Biofouling in water systems – cases, causes and countermeasures. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 59: 629-640.
- Gonçalves, A.B., Santos, I.M., Paterson, R.R.M., e Lima, N. 2006. FISH and Calcofluor staining techniques *in situ* filamentous fungal biofilms in water. *Revista Iberoamericana de Micologia* 23: 194-198.
- Gonçalves, A.B., Santos, I.M., Paterson, R.R.M., e Lima, N. 2006a. Survey and significance of filamentous fungi from tap water. *International Journal of Higiene and Environmental Health*. 209: 257-264
- Göttlich, E., Van der Lubbe, W., Lange, B., Fiedler, S., Melchert, I., Reifenrath, M., Flemming, H., de Hoog, S. 2002. Fungal flora in groundwater-derived public drinking water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 205: 269-279.
- Grabinska-Loniewska, A., Konillowicz-Kowalska, T., Wardzynska, G., Boryn, K. 2007. Occurrence of fungi in water distribution System. *Polish Journal of Environmental Stud*. 16 (4): 539-547.
- Hageskal, G., Knutsen, A.K., Gaustad, P., de Hoog, G.S., Skaar, I. 2006. Diversity and significance of mold species in Norwegian drinking water. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7586-7593.
- Hageskal, G., gaustad, P., Heier, B.T., Skaar, I. 2007. Occurrence of molds in drinking water. *Journal of Applied microbiology* 102: 774-780.
- Hageskal, G., Lima, N., Skaar, I. 2009. The study of fungi in drinking water. *Mycological research* 113: 165-172.
- Harding, M.W., Marques, L.L.R., Howard, R.J., Olson, M.E. 2009. Can filamentous fungi form biofilms?. *Trends in Microbiology* 17: 475-480.
- Hu, J.Y., Yu, B., Feng, Y.Y., Tan, X.L., Ong, S.L., NG, W.J. and Hoe, W.C. 2005. Investigation into biofilms in a local drinking water distribution system. *Biofilms* 2: 19-25.
- Hunter, P.R. 2003. National disease burden due to waterborne transmission of nosocomial pathogens is substantially over-estimated. *Archives of Internal medicine* 163: 1974
- Hussain, T., Ishtiaq, C.M., Hussain, A., Mahmood, T., Sultana, K., Ashraf, M. 2010. Incidence of fungi in water springs of Samahni Valley, District Bhiimber, Azad Kashmir, Parkistan. *International Journal of Biology* 2: 94-101.
- ISA. Instituto Socioambiental. 2010. Disponível em: <[www.socioambiental.org](http://www.socioambiental.org)>. Acesso em: 4 novembro 2010.
- Kator, H., Rhodes, M. 2003. Detection, enumeration and identification of environmental microorganisms of public health significance. In: Mara, D., Horan, N.(eds) *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Academic Press, pp 113-144.
- Kelley, J. 1997. Identification, significance and control of fungi in water distribution systems. In: *Water Quality technology Conference Proceedings*. Denver, CO. Public American Water Works Association, 1-20.

- Kempf, V.A. J., Trebesius, K., Autenrieth, I.B. 2000. Fluorescent *in situ* hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *Journal Of Clinical Microbiology* 38: 830–838.
- Kerr, J.C., Osborn, S.K., Rikard, A.H., Robson, G.D., Handley, P.S. 2003. Biofilms in water distribution systems. In: Mara, D., Horan, N.(eds) *The Handbook of water and wastewater microbiology*, London, Academic Press, pp 757- 755
- Kinsey, G. Paterson, R., Kelley, J.2003. Filamentous fungi in water systems. In: Mara, D., Horan, N.(eds) *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Academic Press, pp 77-98
- Kruppa, Krom, B.P., Chauhan, N., Bambach, A.V., Cihlar, R.L. and Calderone, R.A. 2004. The two-component signal transduction protein Chk1p regulates quorum sensing in *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*. 3:1062–1065
- Leclerck, H., 2003. Relationships between common water bacteria and pathogens in drinking-water. In: J. Bartram (Ed.) *Heterotrophic Plate Counts and drinking water safety: The Significance of HPCs for Water Quality*. London, Iwa publishing, PP 80-118. Disponível em: [www.who.int](http://www.who.int)> . Acesso em: 22 de out. 2010.
- Lessard, P., Le Bihan, Y. 2003. Fixed film processes. In: Mara, D., Horan, N.(eds) *The Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Academic Press, pp 317-336
- Levsky, J.M. and Singer, R. H. 2003. Fluorescence in situ hybridization: past, present and future. *Journal of Cell Science* 116:2833-2838.
- Li, Y., Dick, W.A., Tuovinen, O.H. 2003. Evaluation of fluorochromes for imaging bacteria in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 35:737–744
- Li, S.,Spear, R.N., Andrews, J.H. 1997. Quantitative fluorescent *in situ* hybridization of *Aureobasidium pullulans* on microscope slides and leaf surfaces. *Applied and Environmental Mac.Donald R., Brozel, V.S., 2000. Community analysis of bacterial biofilm in a silulated recirculating cooling-water system by fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. Water Research. 34:2439-2446.*
- Meyer, S.T. 1994. O Uso de Cloro na Desinfecção de Águas, a Formação de Trihalometanos e os Riscos Potenciais à Saúde Pública. *Cadernos de Saúde Pública* 10 (1): 99-110.
- Millard, P.J., Roth, B.L., Thi, H-P. T., Yue, S.T., and Haugland, R.P. 1997. Development of the FUN-1 Family of Fluorescent Probes for Vacuole Labeling and Viability Testing of Yeasts. *Applied And Environmental Microbiology* 63: 2897–2905.
- Morató, J., Mir, J., Codony, F., Mas, J., Ribas, F. 2003. Microbial response to disinfectants. In: Mara, D., Horan, N.(eds) *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Academic Press, pp 657-693.
- Oliveira, H.M.B., Gonçalves, A.B., Siqueira, V.M., Carneiro-da-Cunha, M.G., Lima, N. 2008. *1<sup>st</sup> International Workshop on Biotechnology, 3<sup>rd</sup> Alfa-Val Natura Meeting, 3<sup>rd</sup> Scientific Journey of LIKA , Recife-PE-Brasil, 2008. 1: 423-424.*
- Organização Pan-Americana da Saúde. 2000. A desinfecção da Água, da série “Autoridades locais, saúde”. Avaliação de Meados da Década sobre Água Potável.
- Paterson R.R.M., Kelley, J. Gallagher, M. 1997. Natural occurrence of aflatoxins and *Aspergillus flavus* (LINK) in water. *Lett. Appl. Microbiol* 25: 435-436.
- Paterson R.R.M., Lima N. 2005. Fungal contamination of drinking water. In.: Lehr J, Keeley J, Lehr J, Kingery TB (Eds.) *Water Encyclopedia: Water Quality Control*. New Jersey, Hoboken.
- Paterson R.R.M., Hageskal G., Skaar I., Lima N. 2009. Occurrence, problems, analysis and removal of filamentous fungi in drinking water. In.: DeCosta, P, Bezerra P (Eds.) *Fungicides: Chemistry, environmental impact and health effects*. New York, Nova Biomedical.Books, PP 379-399.
- Pereira, V.J., Basilio, M.C., Fernandes, D., Domingues, M., Paiva, J.M., Benoliel, M.J., Crespo, M.T., San Romão, M.V. 2009.Occurrence of filamentous fungi and yeast in three different drinking water sources. *Water Res*, 44 , 4850-4859.
- Pitt, J.I & Hocking, A.D. *Fungi and Food Spoilage*. Second edition. London: Black Academic & Professional - Chapman & Hall, 1997, 593p.

- Rede das Águas, 2010. Disponível em: <www.rededasaguas.org.br>. Acesso em: 1 novembro 2010.
- Ribeiro, A., Machado, A.P., Kozakiewicz, Z., Ryan, M., Luke, B., Buddie, A.G., Venâncio, A., Lima, N., Kelley, J. 2006. Fungi in bottled water: a case study of a production plant. *Revista Iberoamericana de Micologia* 23: 139-144.
- Sammon, N.B., Harrower, K.M., Fabbro, L.D., Reed, R.H. 2010. Incidence and distribution of microfungi in a treated municipal water supply system in sub-tropical Australia. *International Journal of Environmental research and Public Health* 7(4): 1597-1611.
- Samson, R.A., Frisvad, J.C. 2004. *Penicillium* Subgenus *Penicillium*: new Taxonomics 210 Schemes, Mycotoxins and Others Extralites. *Studies in Micology* 49, 1 – 260.
- Schwab, C.J., Straus, D.C. 2004. The roles of *Penicillium* & *Aspergillus* in sick buildings syndrome. *Adv. Appl. Microbiol* 55: 215-237.
- Taylor, H. 2003. Surface water. In: Mara, D., Horan, N.(eds) *Handbook of Water and Wastewater Microbiology*. Academic Press,
- Varo, S.D., Martins, C.H.G., Cardoso, M.J.O., Sartori, F.G., Montanari, L.B., Gonçalves, R.H.P. 2007. Isolamento de fungos filamentosos em água utilizada em uma unidade de hemodiálise. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40 (3): 326-331.
- Xavier, J.B., Picioreanu, C., Almeida, J.S., van Loosdrecht, M.C.M. 2003. Monitorização e modelação da estrutura de biofilmes. *Boletim de Biotecnologia*. 76: 1-12.
- Warris, A., Gaustad, P., Meis, J.F.G.M., Voss, A., Verweij, P.E., Abrahamsen, T.G. 2001. Recovery of filamentous fungi from water in a paediatric bone marrow transplantation unit. *Journal of Hospital Infection* 47: 143-148.
- Webster, J., Weber, R.W.S. 2007. *Introduction to fungi*. 3<sup>rd</sup> edition. Cambridge, Cambridge University Press.
- Wetzel, G.R., Likens, E.G. 1995. *Limnological Analyses*. 2<sup>nd</sup> Ed. Springer-Verlage. pp391
- WFN, Waterfootprint Network. Disponível em: <www.waterfootprint.org>. Acesso em 29 outubro 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2003. *Heterotrophic Plate Counts and: The Significance of PCs for Water Quality*. Cornwall: Iwa Publishing, . 271 p. Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241562269.pdf>>. Acesso em: 24 de outubro de 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2002. *Heterotrophic Plate Count Measurement in Drinking Water Safety Managemen*. Cornwall: Iwa Publishing, . 171 p. Disponível em: <<http://whqlibdoc.who.int/publications/2003/9241562269.pdf>>. Acesso em: 24 de outubro de 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (Suíça). *Guidelines for Drinking Water Quality: Recomendações*. 3<sup>a</sup> Genebra, 2008.
- Yamaguchi, M.U., Rampazzo, R.C.P., Yamada-Ogatta, S.F., Nakamura, C.V., Ueda-Nakamura, T., Filho, B.P.D. 2007. Yeasts and filamentous fungi in bottled mineral water and tap water from municipal supplies. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50 (1), 1e 9.

## ANEXO

Trabalho publicado no International Journal of Environmental Research and Public Health.

### Filamentous Fungi in Drinking Water, Particularly in Relation to Biofilm Formation

Virgínia M. Siqueira<sup>1</sup>, Helena M. B. Oliveira<sup>2</sup>, Cledir Santos<sup>1</sup>, R. Russell M. Paterson<sup>1</sup>,  
Norma B. Gusmão<sup>2</sup> and Nelson Lima<sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> IBB-Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal;  
E-Mails: virginiamedeiros@deb.uminho.pt (V.M.S.); cledir.santos@deb.uminho.pt (C.S.); russell.paterson@deb.uminho.pt (R.R.M.P.)
- <sup>2</sup> Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil; E-Mails: helenambo@yahoo.com.br (H.M.B.O.); normagusmao@gmail.com (N.B.G.)

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: nelson@ie.uminho.pt;  
Tel.: +351-253-604-403; Fax: +351-253-604-429.

Received: 30 December 2010; in revised form: 25 January 2011 / Accepted: 25 January 2011 /  
Published: 9 February 2011