

Angélica Patrícia da Silva Machado

Uso de técnicas de detecção rápidas de fungos filamentosos na água

Dissertação para Mestrado em Tecnologia do Ambiente
Escola de Engenharia da Universidade do Minho



Universidade do Minho

DEPARTAMENTO EM ENGENHARIA BIOLÓGICA

2006

DISSERTAÇÃO REALIZADA SOB A ORIENTAÇÃO DE:
Doutor Nelson Manuel Viana da Silva Lima
Professor Catedrático

Este trabalho insere-se no âmbito do Projecto Europeu: **Control of Mycological Contaminations in Bottled Water – COMBOW**. Angélica Patrícia da Silva Machado foi bolseira do Programa CRAFT (QLK1-2002-70843).

Agradecimentos

Antes de iniciar a presente dissertação gostaria de expressar os meus agradecimentos às pessoas e instituições que de algum modo contribuíram para a sua realização.

Agradeço em primeiro lugar ao meu orientador, Professor Doutor Nelson Lima, por me ter despertado a curiosidade para estes temas e para esta dissertação em especial. A sua constante disponibilidade, o seu incentivo e encorajamento foram factores decisivos ao longo de todo o trabalho.

Agradeço também ao Departamento de Engenharia Biológica e, em especial, à Micoteca da Universidade do Minho (MUM), por me ter disponibilizado as instalações e os meios necessários à realização desta dissertação.

Agradeço ainda o excelente ambiente de trabalho e ajuda que me proporcionaram todos os colegas de laboratório, e a amizade e disponibilidade por parte de todos do Departamento de Engenharia Biológica. Não posso deixar de agradecer em especial à Ana Ribeiro e Ana Bela Gonçalves (assim como ao Projecto Europeu SAFER - Surveillance and Control of Microbiological Stability in Drinking Distribution Networks) que muito contribuíram com trabalho árduo, conhecimentos e amizade para que esta dissertação fosse possível.

Por último agradeço a todos os meus amigos, aos meus pais e ao Miguel que partilharam das minhas alegrias e tristezas decorrentes deste trabalho.

A todos um sincero e profundo “Obrigada”.

Resumo

Na Carta Europeia da Água do Conselho da Europa, proclamada em Estrasburgo em 6 de Maio de 1968, encontra-se o seguinte item: “A investigação sobre a água, e especialmente sobre a água já utilizada, deve ser encorajada ao máximo. Os meios de informação devem ser ampliados e as trocas internacionais facilitadas, ao mesmo tempo que se impõe uma formação técnica e biológica de pessoal qualificado para as diferentes disciplinas que interessam.” Passados quase 40 anos e com o presente trabalho procurou-se acrescentar algo à investigação sobre a água, a qual foi o principal objecto desta dissertação.

As águas para consumo humano estão sujeitas a um apertado controlo de qualidade microbiológico. Esse controlo focaliza-se essencialmente nas análises bacteriológicas deixando a descoberto o controlo micológico. Os fungos sendo ubíquos, estão também presentes nestes sistemas ecológicos. Contudo, o conhecimento do seu papel ecológico bem como os métodos para a sua detecção, enumeração e isolamento não estão implementados, nem tão pouco regulamentados.

No presente trabalho o principal objectivo foi adaptar ou mesmo implementar novos métodos para a detecção, enumeração e isolamento de fungos filamentosos presentes na água. Para alcançar os objectivos inicialmente propostos partiu-se da análise de amostras de água engarrafada. A preocupação de tornar as práticas micológicas simples e acessíveis esteve presente durante o decorrer de todo o trabalho. Neste contexto adaptou-se um meio de cultura (NGRBA – Neopeptona Glucose Rosa de Bengala Agar) alterando-o quer na composição da fonte de carbono e de azoto, quer adicionando sais de tetrazólio (MTT, TTC e CTC). O uso de fluorocromos foi outra técnica utilizada para a detecção da presença de fungos filamentosos na água.

Os fungos filamentosos presentes na água em maior número pertencem aos géneros *Penicillium* (58%), *Cladosporium* (27%) e *Trichoderma* (6%). Por sua vez dentro do género *Penicillium* as três espécies mais representativas são: *P. brevicompactum* (33%), *P. glabrum* (23%) e *P. chrysogenum* (12%).

O meio NGRBA é um meio apropriado para enumerar e isolar fungos filamentosos. A sua composição pode ser alterada nas fontes de carbono e azoto tornando-o economicamente mais atractivo sem alterar as suas propriedades. Pode-se ainda encurtar o tempo de detecção / enumeração de fungos filamentosos pela adição do sal de tetrazólio MTT.

O uso de técnicas fluorescentes revelou-se uma ferramenta rápida e eficaz para a detecção de fungos em amostras de água. No entanto, a sua implementação requer um investimento avultado e formação técnica específica por parte do operador.

Abstract

The Water European Charter, approved in Strasbourg in 6th of May 1968, the following item is proclaimed: "the research about water, and in particular wastewater, must be encouraged. The information must be extended and the international exchanges facilitated, at the same time must be imposed a biological technique training of qualified staff." Passed almost 40 years, this item remain actual and the main aim of this work is to contribute for water research.

The water for human consumption is required to pass throughout a high microbiological quality control. This control is focused essentially in the bacteriological analyses leaving mycological control out. The fungi are present all around places, so they are also present in water ecological systems. However, the knowledge of the ecological role of fungi as well as their methods for its detection, enumeration and isolation are not yet implemented, nor regulated.

In the present work the main aim was adapt or even implement new methods for detection, enumeration and isolation of filamentous fungi present in the water. Initially only the analyses of bottled water samples were considered. To achieve our aim the simplicity of mycological procedures established was our main concern. Taking this into account the medium NGRBA (Neopeptone Glucose Rose Bengal Agar) was adapted and modified in its composition: the carbon and nitrogen sources were changed and it was also added tetrazolium salts like MTT, TTC and CTC. The use of fluorocroms it was used as another technique to detect the presence of filamentous fungi in the water.

The filamentous fungi were presented in water in high number which belongs to the genera *Penicillium* (58%), *Cladosporium* (27%) and *Trichoderma* (6%). In the *Penicillium* taxon the three more representative species were: *P. brevicompactum* (33%), *P. glabrum* (23%) and *P. chrysogenum* (12%). The NGRBA medium was the most appropriate one for enumeration and isolation filamentous fungi. Its composition could be modified in order to make it more economic. The time consumption for detection and enumeration could be shortened with the addition of tetrazolium salt MTT to the NGRBA medium. The use of fluorescent techniques have shown be a fast and efficient tool for the detection of fungi in water samples. Notwithstanding, its implementation requires a high capital investment and a very well trained staff.

Abreviaturas

a_w	actividade da água
CFW	Calcofluor white
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
COMBOW	Control of Mycological Contaminations in Bottled Water
CTC	cloreto de 5-Ciano-2,3-ditoliltetrazólio
Cy3	ficoeritrina cianina 3
CYA	agar de Czapek com extracto de levedura
G25N	glicerol nitrato agar
FISH	fluorescent in situ hybridization
MEA	meio de agar com extracto de levedura
MTT	3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difenil-tetrazólio
MUM	Micoteca da Universidade do Minho
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reduzido
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido Fosfato reduzido
NGRBA	meio de agar com Neopeptona, Glucose, Rosa de Bengala e Aureomicina
p/v	% peso por volume
TTC	cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
UV	ultravioleta
v/v	% volume por volume
λ	comprimento de onda

Índice

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO

1.1	Introdução geral.....	3
1.2	A água	6
1.2.1	Água engarrafada	7
1.3	Microbiologia da água	9
1.4	Micologia da água	10
1.5	Taxonomia	15
1.5.1	O género <i>Penicillium</i>	16
1.6	Nutrição e crescimento	19
1.6.1	MTT	21
1.6.2	TTC	22
1.6.3	CTC	23
1.7	Microscopia	23
1.7.1	Microscopia de epi-fluorescência	24
1.7.2	Microscopia Confocal	25
1.8	Fluorocromos	26
1.8.1	Calcofluor™ white M2R	27
1.8.2	FUN®1	28
1.8.3	Mag fura-2 AM	29
1.9	Fluorescent in Situ Hybridization (FISH)	29
1.10	Enquadramento e Objectivos	32

CAPÍTULO 2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1	Considerações gerais	35
2.2	Isolamento	36
2.2.1	Filtração	37
2.2.2	Zaragatoa	39
2.2.3	"Baiting"	39
2.3	Identificação	39
2.3.1	Observação das culturas por exame directo	41
2.3.2	Observação das culturas por exame ao microscópio	41
2.4	Microrganismo e condições de cultura	43

2.5	Reformulação do meio NGRBA	44
2.5.1	Alteração na composição da fonte de carbono e de azoto	44
2.5.2	Adição de sais de tetrazólio	45
2.5.2.1	Ensaio com MTT	46
2.5.2.2	Ensaio com CTC	46
2.5.2.3	Ensaio com TTC	46
2.6	Técnicas fluorescentes	47
2.7	Fluorescent in Situ Hybridization (FISH)	49
CAPÍTULO 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO		
3.1	Isolamento	53
3.2	Identificação	57
3.3	Reformulação do meio NGRBA	60
3.3.1	Alteração na composição da fonte de carbono e de azoto	60
3.3.2	Ensaio com MTT	62
3.3.3	Ensaio com TTC	65
3.3.4	Ensaio com CTC	66
3.4	Técnicas fluorescentes	67
3.5	Fluorescent in Situ Hybridization (FISH)	70
CAPÍTULO 4 CONCLUSÕES		
4	Conclusões	75
CAPÍTULO 5 BIBLIOGRAFIA		
5	Bibliografia	81
CAPÍTULO 6 ANEXOS		
	Anexo I - Questionário	93
	Anexo II - Resultados do Questionário	97
	Anexo III - Listagem das estirpes identificadas	99

Lista de Figuras

Figura 1.1 – As actividades dos fungos segundo uma perspectiva antropocêntrica (adaptado de Moss, 1987).

Figura 1.2 - Fungos e actinomicetes proeminentes e suas capacidades de crescer a diversas actividades de água e temperaturas. T. crust. = *Thermoascus crustaceus*; Sam. = *Saccharomonospora*; Stm. = *Streptomyces* (adaptado de Lacey *et al.*, 1991).

Figura 1.3 - *P. brevicompactum*. (A) Conidióforo corado com azul de algodão. (B) Representação das diferentes estruturas de um penicillia terverticilado.

Figura 2.1 – Representação esquemática do processo de engarrafamento de água com indicação dos pontos de amostragem na cor vermelha.

Figura 3.1 – Representação gráfica das unidades formadoras de colónias de fungos filamentosos isoladas nas amostras de água da nascente, ao longo de doze meses e em três meios distintos.

Figura 3.2 – Representação gráfica das colónias de fungos isoladas nas amostras de água armazenada num reservatório antes do processo de filtração, ao longo de doze meses e em três meios distintos.

Figura 3.3 – Representação gráfica das colónias de fungos isoladas nas amostras de água armazenada num reservatório depois do processo de filtração, ao longo de doze meses e em três meios distintos.

Figura 3.4 – Representação gráfica das colónias de fungos isoladas nas amostras de água engarrafada, ao longo de doze meses e em três meios distintos.

Figura 3.5 – Representação gráfica das colónias de fungos isoladas nas amostras de água engarrafada através da técnica de “baiting”, ao longo dos meses e em dois meios distintos.

Figura 3.6 – Representação gráfica das colónias de fungos isoladas nas amostras de biofilme, durante doze meses e em dois meios distintos.

Figura 3.7 – Diferentes estirpes identificadas provenientes dos isolamentos das amostras analisadas, representadas em percentagem.

Figura 3.8 – Diferentes estirpes isoladas em menor número representadas na Figura 3.7 pela classe “outros”, representam uma percentagem de quatro no total das estirpes identificadas.

Figura 3.9 – Percentagem das diferentes espécies isoladas dentro do género *Penicillium*.

Figura 3.10 – Diferentes espécies de *Penicillium* representadas na Figura 3.9 pela classe “outros”, representam uma percentagem de onze no total das estirpes de *Penicillium* identificadas.

Figura 3.11 – Diferentes estirpes identificadas provenientes dos isolamentos das amostras de “baiting” e zaragatoa, apresentadas em percentagem.

Figura 3.12 – Percentagem das diferentes espécies isoladas dentro do género *Penicillium*, nas amostras de água de “baiting” e zaragatoa.

Figura 3.13 – Recuperação das colónias de *P. brevicompactum* das amostras com concentração de esporos 10^3 L^{-1} nas 4 semanas, nos meios com diferente composição.

Figura 3.14 - Recuperação das colónias *P. brevicompactum* das amostras com concentração de esporos 10^4 L^{-1} nas 4 semanas, nos meios com diferente composição.

Figura 3.15 a) Ensaio com amostra de água engarrafada encubada por 36 horas em meio NGRBA com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de MTT; **b)** Ensaio com amostra de água estéril com uma concentração de 10^3 esporos. L^{-1} de esporos de *P. brevicompactum*, incubada por 24 horas em placas de NGRBA com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de MTT, os pontos mais escuros (seta) correspondem a leveduras.

Figura 3.16 – Recuperação das unidades formadoras de colónias de das amostras de água estéril com uma concentração de 10 esporos. L^{-1} de esporos de *P. brevicompactum* nos meios com diferentes concentrações de MTT, ao longo do tempo.

Figura 3.17 – Recuperação das colónias de fungos filamentosos das amostras de água estéril com uma concentração de 10^2 esporos. L^{-1} de esporos de *P. brevicompactum* nos meios com diferentes concentrações de MTT, ao longo do tempo.

Figura 3.18 – Recuperação das colónias de fungos filamentosos das amostras de água engarrafada nos meios com diferentes concentrações de MTT, ao longo do tempo.

Figura 3.19 a) Ensaio com amostras de água estéril com leveduras *S. cerevisiae* incubada por 36 horas em meio MEA com $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de TTC, imagem visualizada com lupa (Leitz) com ampliação 2,5 X; **b)** Ampliação do quadrado assinalado na imagem a), ampliação de 10X da imagem real.

Figura 3.20 a) Ensaio com amostras de água estéril com uma concentração de 10^2 esporos. L^{-1} de esporos de *P. brevicompactum* incubada por 72 horas em meio MEA com $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de TTC; **b)** Reverso das placas do ensaio a).

Figura 3.21 a) Ensaio com amostras de água estéril com uma concentração de 10^2 esporos. L^{-1} de esporos de *P. brevicompactum* incubada por 48 horas em meio NGRBA com $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ de TTC incorporado; **b)** Amostra igual à imagem a) com a diferença do TTC estar no soft agar, o qual se adicionou à placa pelo procedimento 4 (Tabela 2.6).

Figura 3.22 – Aspecto morfológico das estruturas de *P. brevicompactum* em cultura pura coradas com Calcofluor™ White M2R, observadas em microscópio de epifluorescência Axioskop (Carl Zeiss) usando objectivas 40X/0,30.

Figura 3.23 – Aspecto morfológico estruturas de *P. brevicompactum* em cultura pura corado com Calcofluor™ White M2R, observas em microscópio de epifluorescência Axioskop (Carl Zeiss) usando a objectiva 40X/0,30.

Figura 3.24 – Aspecto morfológico de secções com “cortes” com diferentes profundidades da estirpe *P. brevicompactum* em cultura pura corado com Calcofluor, observadas em microscópio confocal (Zeiss) usando a objectiva 40X.

Figura 3.25 - Aspecto morfológico estruturas de *P. brevicompactum* em cultura pura corado com Mag-fura-2 AM , observas em microscópio epifluorescência Axioskop (Zeiss) usando a objectiva 40X.

Figura 3.26 – Reconstrução das diferentes secções (Figura 3.24) da estirpe *P. brevicompactum* em cultura pura corado com Calcofluor , observadas em microscópio confocal (Zeiss) usando a objectiva 40X.

Figura 3.27 – Aspecto morfológico estruturas de *P. brevicompactum* em cultura pura corado com (A, D) Calcofluor, (B, E) Cy3, (C, F) imagem virtual com os dois corantes anteriores.

Figura I – Quantidade de fungos detectados na água de nascente durante a rotina microbiológica, nos últimos cinco anos.

Figura II – Frequência de devolução de garrafas de água já vendidas por apresentares problemas relacionados com a presença de fungos.

Figura III – Detecção de colónias de fungos usada como rotina laboratorial no controlo de qualidade.

Figura IV – Meios usados para detectar a presença de fungo na água.

Figura V – Percepção da contaminação fúngica como um problema.

Lista de Tabelas

Tabela 1.1 – Consumos *per capita* de águas engarrafadas, segundo dados da EFBW (2003).

Tabela 2.1 – Plano de amostragem.

Tabela 2.2 - Meios usados para o isolamento dos fungos filamentosos.

Tabela 2.3- Meios usados para a identificação dos fungos filamentosos.

Tabela 2.4 – Soluções de montagem usadas para a identificação dos fungos filamentosos.

Tabela 2.5 - Meio usado para o crescimento de fungos filamentosos.

Tabela 2.6 – Meio NGRBA alterado com diferentes combinações na concentração dos componentes Glucose e Neopeptona.

Tabela 2.7 - Diferentes procedimentos a que as placas foram sujeitas com respectivas concentrações de TTC adicionado.

Tabela 2.8 – Condições seguidas durante o processo de coloração com cada um dos reagentes.

Tabela 2.9 – Comprimentos de onda dos filtros de emissão e excitação de cada um dos fluorocromos.

Tabela 3.1 – Resultados de um ensaio onde foram utilizadas amostras de água estéril com uma concentração de 10^3 esporos.L⁻¹ de esporos de *P. brevicompactum*, incubadas em placas de NGRBA com diferentes concentrações de MTT.

Tabela I – Listagem das estirpes identificadas com respectivo código da amostra.

Capítulo 1

Introdução

1.1 Introdução geral

Os fungos constituem um grande grupo de seres vivos que podem ser encontrados em quase todos os nichos ecológicos. Hawksworth (1991) estima que, numa base mundial, deverão existir ca de 1,5 milhões de espécies de fungos na natureza, dos quais apenas 74 000 foram descritos. Anos mais tarde, Hawksworth (2001) estima que o número de espécies de fungos deverá situar-se entre 0,5 e 9,9 milhões. Esta grande discrepância é devida essencialmente ao grande desconhecimento que se tem das áreas tropicais e subtropicais, bem como à amostragem inadequada para estudos micológicos. Apesar desta situação desfavorável, verifica-se a descrição de aproximadamente 900 a 1 200 novas espécies por ano.

Das espécies descritas, apenas 11 500 (16%) estão conservadas em colecções de culturas, o que equivale a menos de 1% do número total de espécies estimado. Hawksworth (2001) aponta ainda o facto de um número surpreendente elevado de fungos estar representado por menos de cinco estirpes conservadas em colecção, o que indica a pouca frequência do seu isolamento da natureza e pode representar uma preocupação, na medida em que não se sabe ao certo quantas estirpes deveriam ser conservadas para representar de forma adequada a variabilidade genética intra-específica de um fungo. Se, adicionalmente, se tiver em consideração o facto de os metabolitos secundários só estarem documentados em cerca de 7% das espécies conhecidas (Hawksworth, 1991) e que as drogas e outros produtos químicos presentemente obtidos a partir de microrganismos são frequentemente o resultado de rastreios limitados (Smith, 2003), é fácil concluir que muitos produtos biologicamente activos estarão ainda por detectar e caracterizar. Na realidade, o mundo dos fungos ainda desconhecido, ou incompletamente caracterizado, representa um recurso biológico potencial incalculável, à espera de realização.

Os fungos são usados em numerosos processos industriais (*e.g.* alimentos fermentados); na produção industrial de ácidos orgânicos (*e.g.* ácido cítrico), enzimas (*e.g.* proteases); e na indústria farmacêutica, na produção de ergometrina, de cortisona, de antibióticos (*e.g.* penicilina, griseofulvina), e de substâncias imunossupressoras (ciclosporinas). Por outro lado, considerações de ordem ambiental, económicas e de saúde são um estímulo ao desenvolvimento de sistemas biológicos na protecção de plantas, de animais e do Homem, contra microrganismos potencialmente patogénicos. Para tal é essencial compreender a diversidade, distribuição e epidemiologia das populações microbianas, nas quais os fungos estão

englobados. O equilíbrio da vida no Planeta assenta em mecanismos de dinâmica das populações e nas múltiplas relações entre factores abióticos e bióticos, e são os microrganismos que, possuindo características próprias, completam os ciclos geobiológicos necessários à existência e à evolução da vida na Terra (Lopes, 2002).

O possível papel mais importante dos fungos na ecosfera não está ainda especificamente determinado (Alexopoulos *et al.*, 1996), mas é inquestionável que os fungos são extremamente importantes na Terra como agentes de degradação. Eles são dos principais microrganismos responsáveis pela decomposição da matéria orgânica, interferindo no ciclo do carbono, do azoto e de outros nutrientes. Isto significa que o equilíbrio ambiental está dependente da sua presença e será essencial não esquecer do papel dos fungos no ecossistema global. Em ecossistemas florestais, por exemplo, são os principais agentes decompositores da celulose e da lenhina, libertando nutrientes para o solo. A produção de biomassa no ecossistema florestal é fortemente controlada por fungos da podridão branca, pois estes organismos determinam a taxa a que os nutrientes voltam a estar disponíveis.

Os microrganismos do solo incluem bactérias, fungos, protozoários e algas. Em termos de biomassa (não de número) são os fungos que geralmente predominam entre os microrganismos do solo; podem ser simbioses de plantas, patogénicos de plantas e animais. Entre as espécies de fungos mais comuns no solo encontramos *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Trichoderma* (Oliveira, 1998).

A matéria orgânica que continuamente se forma na Terra não se acumula de forma progressiva, mas mantém-se mais ou menos constante através de um processo de equilíbrio entre acumulação e degradação. Sendo as formas mais comuns de carbono orgânico presente nos seres vivos as proteínas, os lípidos, os ácidos nucleicos (RNA e DNA), o amido, a celulose, as pectinas, a quitina e a lenhina, são estes os compostos mais importantes passíveis de serem degradados e/ou transformados pelos fungos filamentosos. Assim, o carbono ou é libertado para a atmosfera pelo catabolismo ou é incorporado nos seres vivos através do anabolismo. Os fungos, reconhecidos como biorreguladores, possuem um papel fundamental no desenrolar do ciclo do carbono. (Valente *et al.*, 2002).

Para além da mineralização do carbono e do azoto, os fungos desempenham ainda um papel importante na degradação de compostos orgânicos de enxofre e de fósforo. Estas capacidades, conjuntamente com a grande biomassa associada aos fungos, tornam estes

organismos dominantes na imobilização de nutrientes no solo, com óbvio significado ambiental nos ciclos biogeoquímicos (Wainwright, 1992).

Os interesses por este grupo de seres vivos prendem-se, para além de outros aspectos mais fundamentais, com as suas múltiplas actividades e características que os tornam únicos no relacionamento com o Homem. Por esta razão, nos últimos anos, tem-se verificado um crescente interesse por estes organismos nas suas duas vertentes: a benéfica e a prejudicial. Numa perspectiva antropocêntrica a actividade dos fungos pode esquematizar-se como se indica na Figura 1.1.

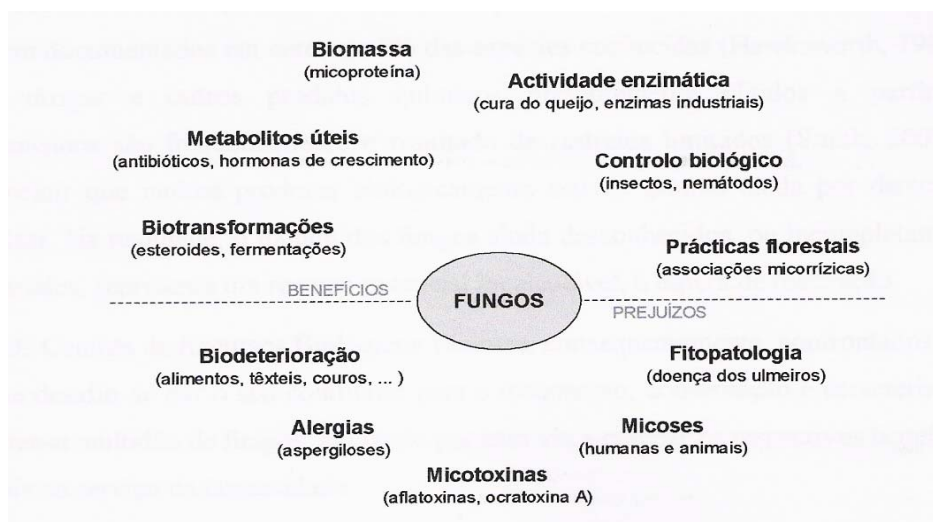


Figura 1.1 – As actividades dos fungos segundo uma perspectiva antropocêntrica (adaptado de Moss, 1987).

Em termos dos efeitos benéficos das actividades fúngicas, podem citar-se como grandes áreas de interesse:

- As biotransformações, associadas à produção de esteróides e às fermentações, nomeadamente na produção de álcool e outros compostos químicos, e na panificação;
- Os metabolitos úteis, com particular impacte na produção de antibióticos e de hormonas de crescimento de plantas;
- A produção de biomassa;
- A actividade enzimática, nomeadamente no processo de produção de alimentos fermentados e na produção de enzimas industriais;
- O controlo biológico de insectos e nemátodos, com aplicação na agricultura biológica;
- A transformação da biomassa renovável nos ecossistemas florestais;
- A capacidade de formar associações micorrízicas com efeitos benéficos para a saúde e o rendimento potencial de povoamentos florestais.

A biotecnologia explora as actividades fúngicas com capacidade de impacte industrial, desde as utilizações tradicionais a aplicações novas e inovadoras, existindo ainda um grande potencial económico para o seu desenvolvimento futuro (Wainwright, 1992).

Quanto a potenciais efeitos negativos das actividades fúngicas, são de destacar:

- A biodeterioração de alimentos e produtos de valor económico, como os têxteis, couros e derivados de petróleo;
- As alergias provocadas em seres humanos;
- A produção de micotoxinas;
- O aparecimento de micoses em humanos e animais (e.g. candidíases, dermatoses);
- Doenças em plantas (fitopatologia), como por exemplo a doença dos ulmeiros provocada por *Ophiostoma ulmi*.

Até muito recentemente, os fungos filamentosos eram apenas apontados como sendo sobretudo causadores de acidificação, fermentação ou mesmo desintegração dos alimentos tornando-os inestéticos até ao ponto de não se poderem consumir. Contudo, esta situação alterou-se quando se começou a relacionar algumas doenças (que vieram mais tarde a ser denominadas de micotoxicoses) com a presença de certas espécies de fungos em produtos alimentares. O ergotismo foi a primeira destas doenças a ser relacionadas com a ingestão de cereais contaminados por *Claviceps purpurea* (Sharma & Salunkhe, 1991). No entanto, só mais tarde se descobriu que a acção tóxica dos fungos se devia a determinados metabolitos sintetizados por estes. A descoberta destes metabolitos tóxicos (que vieram a ser denominados de micotoxinas) ocorreu por volta de 1960, quando se atribuiu a morte repentina de 100 mil perús à presença de aflatoxina nas rações que lhes eram dadas. Demonstrou-se que a aflatoxina era um metabolito sintetizado pelo fungo *Aspergillus flavus*, tendo a partir daí crescido o interesse na descoberta de outros metabolitos potencialmente tóxicos e nos fungos que os sintetizam (Pitt & Hocking, 1997)

1.2 A água

A água constitui um elemento indispensável à vida, não só na cobertura das necessidades hídricas do indivíduo, mas também por ser utilizada em muitas outras actividades,

igualmente indispensáveis à qualidade de vida do Homem, tais como fonte de energia, matéria-prima de produção, via de transporte e suporte das actividades recreativas que a vida moderna exige cada vez mais. O homem, necessita de ingerir, diariamente, um volume de água de 1,5 a 2,0 litros, no conjunto da sua dieta alimentar. As necessidades hídricas das populações não se limitam todavia a estes valores, podendo atingir consumos que podem variar de 100 a 200 litros ou mais, por habitante e por dia, de acordo com o seu estilo de vida.

O conceito de qualidade da água é relativo, uma vez que o que o caracteriza é função do seu utilizador ou do fim a que se destina. Nenhuma água é boa para todos os fins. Nesta perspectiva, não existe nenhuma água cuja qualidade seja boa, em valor absoluto. Uma água serve para determinados fins, e é para esses, e só para esses, que tem qualidade para ser utilizada. Na avaliação da qualidade da água recorre-se a um grande número de técnicas analíticas, físicas, químicas e microbiológicas, cujo número e complexidade têm aumentado ao longo das últimas décadas.

Os maiores riscos associados com a água, são devidos à contaminação, directa ou indirecta, pelos excrementos dos animais de sangue quente, incluindo o Homem. O destino adequado deste excreta é um pré-requisito para a existência de água potável, segura do ponto de vista da saúde pública. Os tratamentos das águas brutas e das águas residuais são, sem dúvida, os factores fundamentais que contribuem, de maneira decisiva, para a protecção e salvaguarda da qualidade da água, e logo, da saúde pública.

1.2.1 A água engarrafada

As vendas de águas minerais engarrafadas estão a registar um verdadeiro *boom*. A produção mundial de águas engarrafadas rondou os 140 mil milhões de litros em 2003, com um consumo *per capita* de 23 L. As águas engarrafadas registam um crescimento médio anual de 9%, o maior no segmento das “soft drinks”. Segundo a Canadean e a EFBW (European Federation of Bottled Waters), o consumo europeu atingiu em 2003 os 42 biliões de litros, com um consumo médio *per capita* de 106 L como se mostra na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 – Consumos *per capita* de águas engarrafadas, segundo dados da EFBW (2003).

País	Consumos <i>per capita</i> (L.hab⁻¹.ano⁻¹)
Itália	193
França	142
Bélgica	134
Espanha	133
Suiça	127
Alemanha	125
Média	106
Áustria	101
Portugal	88
Grécia	59
Irlanda	26
Reino Unido	23
Suécia	20
Holanda	19
Noruega	18
Dinamarca	17
Finlândia	16

Nos próximos três anos, as vendas de água engarrafada vão ultrapassar as vendas de refrigerantes com gás e de leite, prevê a Beverage Marketing Corporation. O consumo mundial poderá ultrapassar os 2 bilhões de litros em 2007, e chegar aos 2,2 bilhões em 2008.

No decorrer do Projecto Europeu COMBOW, numa tentativa de esclarecer a real situação da industria de engarrafamento de água, foi enviado um questionário (**Anexo I**) a 180 empresas europeias, seleccionadas aleatoriamente. As questões baseavam-se na estrutura organizacional da empresa, características da água engarrafada e questões referentes às análises realizadas em termos bacteriológicos e micológicos. Este último ponto encontrava-se mais aprofundado uma vez que as questões micológicas eram o principal objectivo.

A tentativa de conhecer os problemas, no que diz respeito as questões micológicas, foi defraudada pelo baixo número de questionário devidamente respondidos e devolvidos. A percentagem de questionários respondidos revela um possível desinteresse e falta de conhecimento por parte das empresas pelas questões relacionadas com os fungos. No entanto, os questionários devolvidos reforçam a necessidade de aprofundar os estudos e os

conhecimentos relacionados com estas questões, uma vez que 31% das empresas revelaram ter devoluções esporádicas da água já vendida por apresentarem problemas relacionados com a presença de fungos. Este facto é reforçado pela percentagem de 60% das empresas considerarem que a contaminação fúngica é de alguma maneira um problema dentro da empresa. As respostas revelaram ainda que 50% das empresas implementam como rotina laboratorial no controlo de qualidade a detecção de fungos. Na pergunta sobre quais os meios mais usados para a detecção da presença de fungos 45% refere o uso do meio NGRBA, 30% referem os usos de outros meios e 35% a não utilização de qualquer meio (utilização de uma técnica de detecção diferente). Quanto à quantidade de fungos detectados na água de nascente durante a rotina microbiológica, nos últimos cinco anos, 72% responderam nenhuma colónia, 19% de 1 a 10 colónias e somente 9% responderam de 21 a 50.

1.3 Microbiologia da água

Os indicadores mais correntemente utilizados como indicadores de poluição de origem fecal e designados por indicadores clássicos, são: o grupo de microrganismos designados por coliformes, totais e fecais, membros da família *Enterobacteriaceae*; microrganismos designados por estreptococos fecais (*Streptococci* fecais); e microrganismos designados por clostrídios anaeróbios. Outros organismos, por vezes presentes na água, como os helmitas ou os protozoários, podem representar igualmente riscos sanitários para o Homem. Entre os protozoários patogénicos para o Homem, destaca-se a *Giardia* e o *Cryptosporium*.

Um grande número de laboratórios e instituições considera que os indicadores biológicos de contaminação fecal clássicos não preenchem todos os requisitos necessários à definição de organismos indicadores. Tornando-se, assim, necessária a pesquisa de outros microrganismos designados correntemente por novos indicadores que, conjuntamente com os indicadores clássicos, possam fornecer indicações mais seguras acerca da poluição hídrica e da qualidade da água.

Os actinomicetas e os fungos podem ser utilizados como indicadores da eficiência de cloragem das águas. O actinomiceta *Rhodococcus coprophilus* tem sido apontado como um microrganismo susceptível de ser utilizado como indicador de contaminação hídrica por excreta de animais domésticos, já que não está presente no excreta humano. A bactéria *Mycobacterium*

fortuitium e a levedura *Cândida parapsilopsis*, presentes nas fezes humanas e nas águas residuais e com elevada resistência ao cloro, são organismos indicadores muito promissores.

1.4 Micologia da água

A produção copiosa de esporos, sexuados ou assexuados, e a existência de mecanismos e agentes de dispersão muito eficientes no transporte de propágulos fúngicos, fazem com que a maioria dos fungos sejam notavelmente ubíquos e cosmopolitas e, desde que exista um substrato ou hospedeiro adequado disponível, a colonização é geralmente rápida. A diversidade morfológica e comportamental dos fungos é reflectida no seu sucesso espectacular em termos de biomassa, número de espécies, variedade de habitats ocupados e capacidade para simbiose com outros microrganismos, plantas e animais (Hawksworth, 1991). Alguns dos ambientes onde vivem são extremos, por exemplo em relação ao frio (psicrófilos), calor (termófilos e termotolerantes), condições de humidade relativa baixa (xerófilos) ou conteúdos osmótico elevado (osmófilos). Certos fungos têm um crescimento oligotrófico, aumentando a biomassa em substratos extremamente pobres em nutrientes (Wainwright, 1993). Estas características fazem da água um ambiente onde a presença e propagação de fungos seja possível.

Em águas naturais, dois grupos dos fungos são considerados predominantes: os oomycetes e os hyphomycetes. No entanto, fungos dos grupos penicillia, aspergilli ou fusaria (fungos considerados “predominates” no solo e ar) são igualmente encontrados na água (Paterson & Lima, 2005). Os fungos podem ser capazes de se desenvolverem em sistemas de armazenamento/distribuição de água: no entanto, a sua tolerância aos poluentes é baixa e a sua capacidade em sobreviver aos processos de tratamento é desconhecida (Kelley *et al.*, 2003).

A falta de legislação abrangendo a qualidade das águas no que diz respeito à presença de fungos aliada há morosidade e dificuldade de implementação das técnicas micológicas resultam numa total inexistência destas práticas nos laboratórios de controlo de qualidade. Por outro lado, a contaminação fúngica ocorre frequente e simultaneamente com o aparecimento de outros microrganismos, que são mais fáceis de crescer e identificar e, portanto, isolados

preferencialmente aos fungos. Quando implementadas as técnicas micológicas tradicionais são morosas (são necessárias duas semanas para crescer e identificar um fungo), o que significa que os problemas relacionados com as contaminações fúngicas persistem desde a detecção do problema e ser encontrada uma resolução (Paterson & Lima, 2005).

Kelley *et al.* (2003) refere a falta ou quase inexistência de relatórios confirmando a contaminação fúngica na água. Apontando que existem alguns estudos da ocorrência de fungos em rios e lagos, especialmente relacionados com a poluição, mas poucos associados à água utilizada para consumo (efectuaram uma pesquisa onde foram encontrados somente treze relatórios com alguma relevância, em oito países). Os mesmos autores referem ainda que, os poucos estudos existentes derivam das tentativas de solucionar eventos isolados mais do que de estudos profundos, resultando uma variedade de métodos impossibilitando uma comparação directa dos resultados dos vários trabalhos

De seguida referem-se os estudos referentes à ocorrência de fungos em águas mais relevantes.

Nagy & Olson (1982) isolaram entre 15 a 40 unidades formadoras de colónias (ufc) de fungos por 100 mL de água para consumo humano, num período de monitorização de 12 meses. Dezanove géneros foram isolados de sistemas com cloragem e 14 em sistemas sem cloragem, a maioria eram géneros assexuados. *Acremonium*, *Paecilomyces*, *Penicillium* e *Sporocybe* predominaram em ambos os sistemas.

Nagy & Olson (1985) encontraram fungos em 75% das tubagens analisadas durante a rotina de manutenção. *Acremonium*, *Nomuraea*, *Penicillium* e *Sporocybe* eram os géneros predominantes. Leveduras do género *Cryptococcus* e *Rhodotorula* foram encontrados em 50% das amostras.

West (1986) obteve 17,6% de amostras positivas recolhidas no sistema de distribuição de água do Nevada, destes resultados positivos 71% referiam-se a fungos filamentosos e os restantes 29% a leveduras.

Noutro estudo foram analisados 5 sistemas de cloragem, alimentados por águas de proveniência subterrânea, Rosenzweig *et al.* (1986) isolaram fungos filamentosos dos géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Penicillium* e leveduras *Cryptococcus*, *Phaecoccus* e *Rhodotorula*.

Rosenzweig & Pipes (1988a) examinaram 5 poços de águas subterrâneas e 2 sistemas de águas superficiais depois de cloragem e encontraram poucas amostras positivas quanto à

presença de fungos, comparadas com amostras de água da chuva. Rosenzweig & Pipes (1988b) analisaram ainda três amostras de águas subterrâneas tratadas por cloragem (1-2 mg.L⁻¹) e duas amostras de águas superficiais tratadas por coagulação, sedimentação, filtração rápida em filtros de areia e desinfecção com cloro (0,8–1,5 mg.L⁻¹). *Cryptococcus*, *Peyronellaea*, *Phaeococcus*, *Phialophora*, e *Rhodotorula* predominavam nas três amostras de água subterrânea, enquanto que *Acremonium*, *Cladosporium* e *Phaeococcus* predominavam nas amostras de água superficial.

Nyström *et al.* (1992) na Suécia encontraram fungos em todas as amostras analisadas licenciadas para três instalações diferentes (duas com cloragem e uma sem) e em cada uma com três pontos de amostragem. A maioria dos fungos isolados pertencia aos géneros *Acremonium*, *Penicillium* e *Phialophora*.

Alvarez (1993) concluiu que o tratamento eliminava a maioria dos fungos filamentosos (só o género *Fusarium* persistia) presentes nas amostras de dois rios, na Costa Rica, no entanto a maioria das leveduras permanecia na água.

Gonçalves *et al.* (2005) relata que os géneros *Penicillium* (40,6%) e *Acremonium* (38,8%) são os géneros encontrados com maior incidência nas amostras de água da rede pública analisadas. Os restantes géneros dividem-se pelas famílias *Phialophora* sp. (4,1 %), *Cladosporium* sp. (3,5 %), *Rhizopus* sp. (2,9 %), *Chaetomium* sp. (0,6 %), *Alternaria* sp. (0,3 %), *Aspergillus* sp. (0,3 %), estipes não identificadas ou micélio estéril (8,8%).

A presença de fungos filamentosos em amostras colhidas na rede pública sugere que os fungos podem (Kelley *et al.*, 2003):

- Reduzir a eficácia dos desinfectantes;
- Causar alergias e produzir micotoxinas;
- Contaminar os géneros alimentícios durante o seu processamento e preparação;
- Potenciar infecções;
- Afectar a qualidade de água produzindo o mau gosto, os odores e ocasionalmente o aparecimento de biomassa.

Os fungos estão presentes em grande número no solo e no ar onde os esporos podem alcançar concentrações muito elevadas. Podendo entrar nos sistemas da distribuição durante a construção, contacto do ar com a água armazenada nos reservatórios, falhas no trabalho de reparo, entre outras possíveis causas de contaminação. É possível que os fungos se alojem nas superfícies da tubagem ou nos sedimentos, e então cresçam e produzam esporos atingindo todo o sistema de distribuição.

A formação de biofilmes resulta da adesão e do crescimento dos microrganismos em superfícies no sistema da distribuição. Pensa-se que os biofilmes ocorrerem em algum ponto dos sistemas da distribuição em temperaturas abaixo de 60 °C e podem proliferar mesmo na água, meio baixo em nutrientes (Keevil *et al.*, 1995). Nas superfícies de tubagens de condutas de água pode-se encontra-se um número de fungos superior ao encontrado na amostras de água, o que indica claramente a presença dos fungos nos biofilmes (Paterson & Lima, 2005). Gonçalves *et al.* (2005) analisaram coupons (de PVC e ferro) os quais provinham de um reactor onde corria água potável e confirmaram a presença e desenvolvimento dos fungos filamentosos no seio do biofilme formado.

Os biofilmes são conhecidos por serem compostos por comunidades complexas de microrganismos, incluindo as bactérias aeróbicas e anaeróbicas, as amibas, os protozoários, os nemátodos, e os fungos. Os biofilmes fornecem às suas populações microbianas protecção contra valores elevados no que se refere a químicos dissolvidas na água, a temperatura extremas e desinfectantes (especialmente desinfectantes com base cloro). A sua sobrevivência é realçada pela estrutura do próprio biofilme. Os microrganismos que vivem nas proximidades do biofilme e no próprio biofilme vivem de uma forma sinérgica. Nagy & Olson (1986) sugerem que os fungos podem servir de suporte ou de fonte de nutrientes para as bactérias, contribuindo assim para a formação de biofilmes. Algumas bactérias podem utilizar os compostos extracelulares produzidos por alguns fungos.

O número de bactérias nos biofilmes foi estimado encontrar-se na escala de 10^5 - 10^7 cm^{-3} , enquanto livres na água o número é somente de 10^2 - 10^3 mL^{-1} . Consequentemente, o biofilme representa um reservatório importante de microrganismos. O desprendimento destes biofilmes das tubagens, especialmente durante as actividades da limpeza, pode ser uma outra fonte de microrganismos (incluindo fungos) na água. A sua actividade metabólica consertada pode afectar a qualidade da água de formas imprevisíveis.

Mallevalle & Suffet (1987) referem que o mau odor e o mau sabor na água são normalmente associado a contaminação por metabolitos produzidos pelos microrganismos presentes nas paredes das tubagens (biofilmes). Os microrganismos associados a este tipo de problemas incluem os actinomicetes, cianobacterias e fungos. Monteil *et al.* (1999) atribuíram um cheiro desagradável no sistema de distribuição aos fungos.

A maioria dos 16 géneros isolados com maior frequência na água para consumo humano (*Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Candida*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Fusarium*,

Geotrichum, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phialophora*, *Phoma*, *Rhodotorula*, *Thichoderma* e *Verticillium*) produzem químicos que causam mau gosto (Kelley *et al.*, 2003).

Existem milhares de metabolitos secundários produzidos por fungos sendo o seu número total desconhecido (Paterson *et al.*, 2004). Alguns deles são tóxicos para humanos e animais, como tal são designados por micotoxinas. O termo “micotoxina” é normalmente restrito a um grupo de metabolitos produzido por fungos microscópicos que provocam um determinado efeito nos humanos ou num grupo restrito de animais domésticos e encontram-se principalmente em alimentos e restos dos mesmos. As micotoxinas provocam dois efeitos: um imediato e tóxico provocado por concentrações elevadas e um crónico provocado por pequenas concentrações e longos tempos de exposição. São atribuídas propriedades cancerígenas, neurotóxicas e antibacterianas (Kelley *et al.*, 2003).

As micotoxinas são resultantes do metabolismo secundário dos fungos, sendo a sua produção restrita a determinados grupos taxonómicos. Os fungos filamentosos são capazes de produzir um lote muito diversificado de metabolitos secundários, não implicando isso que todos eles tenham propriedades tóxicas. No entanto, a maior parte dos grupos taxonómicos mais relevantes dos fungos filamentosos são produtores de micotoxinas. A maioria das micotoxinas conhecidas são produzidas principalmente pelos géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Claviceps*, *Stachybotrys*, *Myrothecium*, *Phoma* e *Diplodia* (Betina, 1989). Mas, se nos limitarmos aos fungos capazes de contaminar produtos alimentares, verificamos que as principais espécies produtoras de micotoxinas se encontram nos primeiros quatro géneros citados anteriormente (Samson *et al.*, 1996). Estes géneros pertencem filogeneticamente ao subreino Ascomycotina e agrupam uma variedade enorme de espécies que são, na sua grande maioria, de difícil identificação (Pitt & Hocking, 1997). Este facto leva por vezes a que alguns investigadores com menos experiência cometam erros na identificação de alguns isolados, existindo casos em que a produção de determinadas micotoxinas foi atribuída de uma forma errada a certas espécies. Apesar destas situações, existe hoje em dia um panorama que se vai tornando cada vez mais claro e definido, que se relaciona alguns grupos taxonómicos com a produção de determinadas micotoxinas.

Dezoito géneros de fungos isolados nos sistemas de distribuição de água contem espécies produtoras de micotoxinas. Num projecto europeu a qualidade do ponto de vista micológico da água da rede pública detectou a presença de estirpes de fungos produtoras de micotoxinas (Paterson & Lima, 2005). Paterson, *et al.* (1997) detectaram a presença, embora em

pequenas quantidades, de aflotoxinas em água potável. Outras micotoxinas e metabolitos secundários foram detectadas em ensaios *in vitro* com água.

1.5 Taxonomia

Desde que o homem começou a conhecer melhor os seres vivos, sentiu a necessidade de os classificar, agrupar e organizar de maneira lógica e ordenada, de modo a facilitar o seu estudo e compreensão. Surgiu assim a taxonomia, hoje entendida como a ciência que inclui a *classificação* (“arrumação”), *nomenclatura* (designação ou nomeação) e a *identificação* (descrição e caracterização) dos seres vivos. Um organismo é formalmente conhecido pelos taxonomistas se for descrito de acordo com um conjunto de regras de nomenclatura. Assim, a partir dos trabalhos de Linneu (1707-1778), uma das principais regras é a atribuição de um nome binominal e latino, em que o primeiro nome se refere ao género – substantivo e iniciado por letra maiúscula – e o segundo é o seu restritivo específico – adjectivo e iniciado por letra minúscula. Por esta razão, os nomes científicos das espécies possuem dois nomes e são escritos em itálico (e.g. *Aspergillus niger* van Tieghem). As espécies são agrupadas em géneros, os géneros em famílias, as famílias em ordens, as ordens em classes e estas em divisões. Por último, estas agrupam-se em Reinos.

A primeira classificação formal dos seres vivos surgiu em 1735, a qual propunha que os seres vivos fossem repartidos em dois grupos ou Reinos: *Animalia* e *Plantae*. No primeiro, estariam incluídos os protozoários e animais superiores e no segundo as bactérias, fungos e plantas. Inseridos primeiro no Reino *Plantae* e mais tarde no Reino *Protista*, os fungos foram reconhecidos como organismos eucariontes e alocados num Reino próprio no sistema de classificação dos seres vivos de Whitaker (1969).

Os fungos constituem um grupo de organismos vasto, encontrado virtualmente em todos os nichos ecológicos. De facto, os fungos são um grupo de organismos distinto, quer no seu comportamento, quer na sua organização celular, possuindo uma grande variedade de estruturas e organização vegetativa. Podem ser unicelulares, leveduras, endoparasitas halocárpicas de plantas e animais, ou filamentosos. Os ciclos de reprodução dos fungos são

muito variados e podem ser inteiramente sexuados, ou ter fases sexuadas e fases assexuadas. Nutricionalmente, estes organismos são heterotróficos, alimentando-se por absorção de nutrientes solúveis simples através da parede e membrana celular. Mas degradam polímeros complexos, graças à acção de enzimas que excretam para o exterior das células.

Esta diversidade torna a sua identificação difícil e restrita a um grupo específico de estudiosos que se dedicam às questões da micologia. Toda a classificação dos fungos se prende essencialmente com as características morfológicas e reprodutoras. Actualmente o conhecimento da sua biologia molecular tem iniciado uma nova era na classificação deste grupo biológico.

1.5.1 O género *Penicillium*

O género *Penicillium*, juntamente com o género *Aspergillus*, é dos géneros que alberga maior número de espécies, sendo estes capazes de crescer nos mais diversos tipos de *habitats*. A maioria das espécies de *Penicillium* são saprófitos oportunistas, não são muito exigentes nutricionalmente e toleram uma grande gama de condições físico-químicas (i.e. actividade da água, temperatura, pH e potencial redox) o que lhes confere a capacidade de crescer em qualquer meio ambiente, onde exista um mínimo de sais minerais ou as mais diversas e complexas formas de carbono orgânico (Pitt & Hocking, 1997). Na Figura 1.2 encontram-se representadas alguns fungos e actinomicetes proeminentes e as suas capacidades a diversas actividades de água (a_w) e temperaturas.

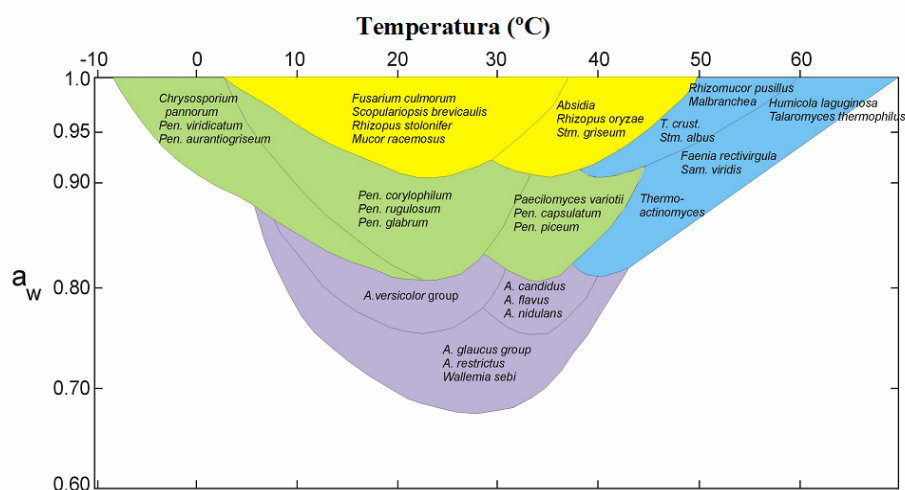


Figura 1.2 - Fungos e actinomicetes proeminentes e suas capacidades de crescer a diversas actividades de água e temperaturas. T. crust. = *Thermoascus crustaceus*; Sam. = *Saccharomonospora*; Stm. = *Streptomyces* (adaptado de Lacey *et al.*, 1991).

A maioria das suas espécies possui como *habitat* natural o solo, sendo a sua presença em alimentos mais ou menos um acaso ou acidente. Outras são naturalmente encontradas na vegetação morta, nalgumas plantas e nos seus frutos, nas sementes ou na madeira. Desempenham um papel importante no processo natural de reciclagem da matéria orgânica e devido à sua grande adaptabilidade aos mais variados nichos ecológicos, acabam por desempenhar um papel relevante na deterioração de diversos tipos de produtos alimentares (Pitt, J.I., *in* Robins, 2000).

A identificação do género *Penicillium* não é tarefa fácil. Trata-se de um género que agrupa elevado número de espécies, apresentando muitas delas grandes semelhanças entre si. Devido a este facto, a sua taxonomia tem sofrido ao longo dos anos algumas alterações e melhoramentos, que foram sendo introduzidos por diversos investigadores. Por exemplo, o número de espécies reconhecidas depende em grande parte do autor em causa ou do esquema taxonómico seguido por este. Raper & Thom (1949), os primeiros investigadores a criarem um esquema taxonómico para este género, consideram a existências de 137 espécies. Por seu lado, Pitt aumentou este número para 150 e Ramirez listou 227 em apenas um único subgénero (Pitt, 1988).

Segundo Pitt (1979) a identificação das espécies de *Penicillium* é levada a cabo através da observação das características microscópicas, do crescimento radial e do aspecto morfológico de colónias crescidas durante 7 dias e a 25 °C nos meios CYA (Czapek yeast extract agar) e MEA (Malt extract agar). Complementarmente, utilizam-se colónias crescidas a 25 °C em G25N (25% glicerol nitrato agar) e colónias crescidas em CYA a 5 °C e 37 °C. As principais características macroscópicas a ter em conta são o tamanho das colónias, a textura, cor, presença de exudado, pigmentos solúvel, e presença, tamanho e cor de esclerócios.(Pitt, 1988).

Nas característica microscópicas mais importante a ter em conta é a morfologia das estruturas reprodutoras assexuadas, pois permite determinar logo à partida o subgénero a que pertence o *Penicillium* em causa.

Recentemente, algumas técnicas bioquímicas têm sido também usadas como auxiliares de identificação e classificação. O perfil de metabolitos secundários tem-se revelado, por exemplo, uma preciosa ajuda para a distinção entre espécies muito próximas e para a diferenciação de variedades dentro de algumas espécies. O primeiro Workshop internacional sobre Taxonomia dos géneros *Penicillium* e *Aspergillus* recomendou, no caso de o metabolismo

secundário ser utilizado como critério taxonómico, que o deveria ser apenas para definir níveis subespecíficos (Samson & Pitt, 1985 in Betina, 1989). O termo quimiotipo foi recomendado para definir as tais subespécies, utilizando como auxiliar a numeração romana (e.g., *P. viridicatum* quimiotipo I) ou nomes derivados de alguma propriedade específica do quimiotipo (e.g., *P. chrysogenum* quimiotipo citrinina) (Pitt & Hawksworth, 1985 in Betina, 1989a).

No género *Penicillium*, os esporos assexuais produzem numa estrutura típica do género designada de penicillus (pl. penicilli, que em latim significa pincel). Os conidia nascem em cadeias produzidas pelas fiálides. As fiálides estreitam no ápice, e o pescoço designa-se collula (pl. collulae). As fiálides estão em verticilos no estipe, e assentam nele directamente ou com a intervenção de células de suporte especializadas conhecidas por metulae e rami (Figura 1.3). Nalgumas espécies, entre as metulae e os rami, podemos ter um nível adicional, os ramuli. O penicillus é toda a estrutura suportada pelo estipe. O conjunto do penicillus e do estipe designa-se por conidióforo. Os conidia são regra geral de cor verde, as fiálides têm pescoços curtos e paredes lisas.

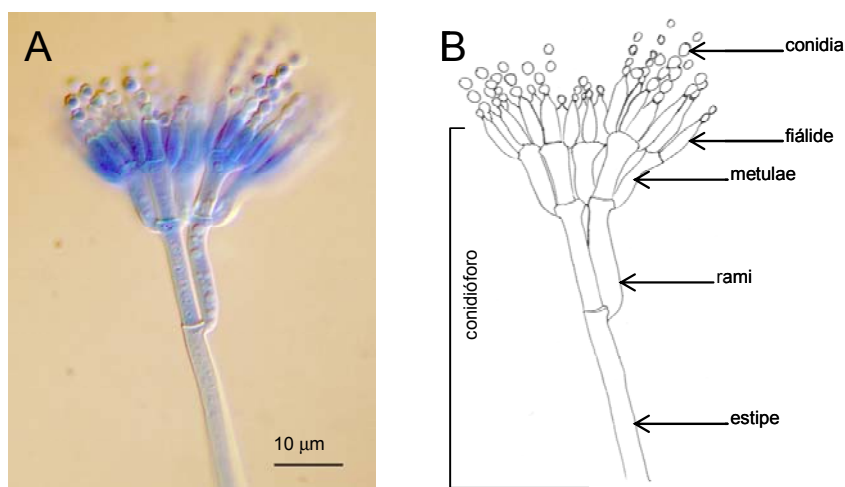


Figura 1.3 – *P. brevicompactum*. (A) Conidióforo corado com azul de algodão. (B) Representação das diferentes estruturas de um penicillia terveticilado.

Os tipos de penicilli distinguem-se pelo número de verticilos (pontos de ramificação) entre a fiálide e o estipe. O tipo de penicillus (Figura 1.3) mais simples designa-se monovertecilado, pois a fiálide assenta directamente no estipe. O penicillus diz-se bivertecilado se tem apenas métulas, e terveticilado se tem métulas e ramos. Quando existem ramulos, o penicillus designa-se quaterverticilado.

A classificação e identificação das espécies baseiam-se em caracteres microscópicos e culturais. Nos caracteres microscópicos, além do tipo de penicilli, são importantes a forma e

tamanho das fiálides, em particular das collulae, a forma, tamanho cor e ornamentação dos conídios, e a textura do estipe, ramos e métulas (que pode ser lisa ou rugosa). Existem dois tipos de fiálides: ampuliformes e acerosas. As ampuliformes são semelhantes a garrafas (Figura 1.3) e as acerosas são semelhantes a agulhas de pinheiro, com lados paralelos que convergem numa forma cónica para um orifício estreito. As fiálides acerosas são características do subgénero *Biverticillium*. As restantes espécies têm regra geral fiálides ampuliformes. Nos caracteres culturais, são importantes o tamanho das colónias, a textura, cor, presença de exudado, pigmento solúvel, e presença, tamanho e cor de esclerócios.

Este género é de taxonomia bastante complexa. A dificuldade de taxinomia e identificação prende-se com a variabilidade inerente do género. Admite-se que cerca de 70 a 80% das estirpes são identificáveis morfológicamente com bastante confiança. No entanto, espera-se sempre uma dada proporção de estirpes extremamente difíceis de identificar (Pitt, 1988).

1.6 Nutrição e Crescimento

Em qualquer ser vivo, o crescimento é um processo dinâmico que requer energia e nutrientes para a síntese dos componentes celulares e manutenção celular. De todos os organismos vivos, os microrganismos são os mais versáteis e diversificados nas suas exigências nutricionais. Os fungos, em particular, são organismos heterotróficos alimentando-se por absorção de nutrientes solúveis simples através da parede e membrana celulares.

Se as exigências desses microrganismos são conhecidas, é possível estabelecer um conjunto de condições (meios de cultura, valores de pH, temperaturas de incubação, tensão de oxigénio, a_w , etc.) que favoreçam o seu crescimento e desencorajem o crescimento de outros, permitindo assim o seu isolamento a partir de uma população mista, mesmo quando o organismo em causa é um componente menor dessa população.

Para ser eficiente, o meio de isolamento deve possuir algumas características que podem ser resumidamente aqui descritas (Pitt & Hocking, 1997):

- deve ser nutricionalmente adequado de forma a suportar o crescimento dos mais variados tipos de fungos;
- deve inibir completamente o crescimento das bactérias sem afectar o crescimento dos fungos a isolar;
- deve inibir o crescimento de fungos com capacidade para crescer muito rapidamente, como o caso do género *Mucor*, mas sem o suprimir completamente de forma a serem também eles isolados;
- deve diminuir o crescimento radial das colónias de forma a permitir contagens sem inibir a esporulação;
- finalmente, deve promover o crescimento dos fungos mais relevantes;

O isolamento de uma estirpe fúngica em cultura pura a partir de uma cultura mista, requer o uso de meios de cultura selectivos e/ou diferenciais. Num meio diferencial podem crescer vários tipos de microrganismos mas, devido ao diferente aspecto que tomam nesse meio, podem distinguir-se entre si as colónias microbianas. Esta diferenciação manifesta-se em variações, tais como: tamanho, cor da colónia, cor do meio de cultura, etc.

Os meios selectivos são formulados para suprimir o crescimento dos microrganismos que não interessam ao fim em vista, permitindo o crescimento dos microrganismos que se desejam isolar. O rosa de Bengala e a clorotetraciclina, referidos anteriormente, enquadram-se neste grupo.

Um dos meios mais apropriados para o isolamento e contagem de fungos é o NGRBA (meio de agar com neopeptona, glucose, rosa de Bengala e Aureomycina[®]). Este meio possui na sua composição clorotetraciclina (aureomicina) e rosa de Bengala.

A clorotetraciclina pertence à família das tetraciclina, antibióticos contendo um núcleo hidroxinaftaceno formado por quatro anéis benzénicos fundidos (quatro ciclos ligados) o que originou a sua designação. Estes antibióticos inibem a síntese proteica ao nível da subunidade 30S dos ribossomas, impedindo a ligação dos aminoacil-tRNA(s) aos ribossomas, impedindo a ligação codão-anticodão. É um antibiótico bacteriostático (Pampulha, 1998).

O rosa de Bengala (di-sódio de 4,5,6,7-tetracloro-2,3,5,7-tetraiodofluoresceína) é por sua vez um pigmento fotorreactivo que liberta, quando exposto à luminosidade, espécies de oxigénio reactivas que são tóxicas para os microrganismos (Chilvers *et al.*, 1998). Sendo assim, a função principal pela qual é utilizado nos meios de isolamento (retardar o crescimento radial das colónias dos fungos filamentosos) sobrepõe-se a sua toxicidade que pode provocar a

descaracterização, ou mesmo a inibição, das colónias a isolar. Para evitá-lo é aconselhado que o armazenamento e a incubação destes meios sejam feita em locais escuros.

Métodos bioquímicos, baseados na actividade das desidrogenases estão a ser desenvolvidos como alternativa à enumeração das unidades formadoras de colónias, para determinar a viabilidade de esporos de fungos. Esta alternativa consiste na utilização de sais de tetrazólio como corante de vital. (Stentelaire *et al.*, 2001).

A oxidação biológica de compostos orgânicos é um processo mediado por diferentes desidrogenases intracelulares e específicas. A determinação da actividade das desidrogenases é baseada no uso de um corante tetrazólio, o qual se reduz a um produto, formazano, colorido e insolúvel dentro das células durante a actividade respiratória (Praveen-Kumar, 2003).

Existem vários sais de tetrazólio referenciados por serem efectivos na avaliação da viabilidade celular, entre os quais se destacam o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difenil-tetrazólio), o TTC (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio) e o CTC (cloreto de 5-Ciano-2,3-ditoliltetrazólio).

1.6.1 MTT

O MTT, cujo composto é o brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difenil-tetrazólio, é um ensaio colorimétrico inicialmente concebido por Mossman (1983), onde se quantifica, a redução metabólica de um sal amarelo solúvel de tetrazólio num produto insolúvel azul - o formazano. Os ensaios de MTT têm sido utilizados há vários anos como teste preliminar para uma variedade de agentes, nomeadamente aditivos (Cote *et al.*, 1993), micotoxinas (Hanelt *et al.*, 1994) ou materiais para implantes (Carvalho *et al.*, 1996), permitindo testar várias concentrações em simultâneo. No entanto, o processo enzimático de redução do MTT em formazano bem como a localização subcelular desta actividade redutora ainda não estão totalmente esclarecidos. (Liu *et al.*, 1997).

Ainda antes do ensaio colorimétrico ser implementado por Mossmann (1983), Slater *et al.* (1963) levaram a cabo uns estudos sobre a clivagem do sal tetrazólio, na presença do succinato, em mitocôndrias activas de células de fígado de rato. Ficou assim demonstrado o envolvimento da cadeia respiratória no processo de conversão do tetrazólio em formazano. Vistica *et al.* (1991) defenderam a hipótese da redução do MTT ocorrer em vários locais da

célula, não estando apenas confinado o processo à mitocôndria. Berridge & Tan (1993), colocando a hipótese do succinato não ser o único dador de electrões a contribuir na redução do MTT. Estes autores investigaram a localização subcelular de vários substratos que actuariam como dadores de electrões e relacionaram o desenvolvimento da mitocôndria com cada um dos substratos, através da adição de inibidores da cadeia respiratória. Os resultados obtidos sugerem um fraco envolvimento da cadeia respiratória na redução celular do MTT e um fraco desempenho do succinato como agente redutor, em relação a outros substratos, nomeadamente os nucleótidos reduzidos NADH e NADPH. Sugerindo que a biorredução celular do MTT estará então associada a desigrogenases presentes no retículo endoplasmático, ocorrendo o processo principalmente através da via glicolítica (Berridge *et al.*, 1996).

Ainda que os resultados mais recentes sobre a conversão dos sais de tetrazólio em formazano tenham sido publicados em 1996, trabalhos mais recentes, sobretudo na área da toxicologia (Malich *et al.*, 1997; Dias *et al.*, 1998; Sasaki & Passaniti, 1998; York *et al.*, 1998), ainda atribuem a redução do MTT às enzimas mitocôndriais.

No caso particular dos fungos, Levitz & Diamond (1985) utilizaram uma variedade de estirpes fúngicas (*C. albicans*, *A. fumigatus*, *S. cerevisiae* entre outras) nas formas de conídios e hifas verificando que todas as células fúngicas metabolicamente activas convertem o MTT no seu derivado formazano. Verificaram ainda que as mesmas células quando mortas através de processos físicos (100 °C durante 1 hora) ou químicos (formaldeído a 10%, etc) a conversão do MTT em formazano não ocorre. Os mesmos autores concluíram que o uso do MTT constitui um novo, rápido, simples e barato método para determinar a viabilidade de fungos. Por sua vez Freimoser *et al.* (1999) reforçam que o MTT constitui um método rápido, simples e exacto na determinação da densidade celular de pequenos volumes de culturas de fungos.

1.6.2 TTC

O TTC, cujo composto é o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio. O TTC é um indicador redox que é colorido no estado oxidado. O TTC é reduzido a um formazano trifenílico insolúvel pela acção de actividade respiratória, resultando uma coloração vermelha na presença de crescimento aeróbio (Bochner & Savageau, 1977).

Praveen-Kumar & Tarafdar (2003) vaporizaram colónias de bactérias, actinomicetas e fungos com uma solução de TTC (3% p/v) com esta experiência verificaram o número de colónias que adquiram cor vermelha foi maior no caso das bactérias (90,9 %) seguida das colónias de actinomicetes (85,7 %) e de somente 4,9 % no caso dos fungos.

1.6.3 CTC

O cloreto de tetrazólio 5-ciano-2,3-ditolil (CTC) é um corante redox monotetrazólio que produz um formazano fluorescente (CTF) quando é reduzido biológica ou quimicamente, o qual é depositado intracelularmente. Até recentemente, o CTC era usado somente como um indicador celular redox da actividade respiratória (isto é, transporte de electrões). Rodriguez (1992) descreve a primeira aplicação do CTC para a visualização microscópica da actividade respiratória de bactérias em amostras crescidas em meio nutricionalmente reforçado, em amostras ambientais e em biofilmes bacterianos crescidos em lâminas de vidro.

Este composto quando iluminada por luz UV (>350nm) emite um vermelho fluorescente brilhante. O CTC não reduzido não absorve luz acima de 400 nm, enquanto que o CTC reduzido (formazano) apresenta um máximo de excitação de 450 nm e um máximo de emissão de 630 nm.

1.7 Microscopia

O nascimento da Microbiologia deu-se quando começou a ser possível a observação de seres de dimensões microscópicas. Revestem-se de particular importância as observações de Antony van Leeuwenhoek (1632-1723), um mercador de tecidos de Delft, na Holanda, que usava já lentes para observar as fibras dos seus tecidos. Microscopista amador, van Leeuwenhoek construiu, durante a sua vida, mais de 250 microscópios e conseguiu, pela primeira vez, ver e descrever microrganismos. O microscópio por ele utilizado era constituído por uma simples lente biconvexa e era capaz de ampliar cerca de 200 vezes, possuindo uma resolução de 1 mm.

Actualmente, os microscópios vêm equipados com diversas objectivas montadas sobre um tambor rotativo, chamado revólver, o que permite mudar comodamente de ampliação no decurso do trabalho. Sendo que as oculares mais comuns possuem uma ampliação de 10x e a objectiva de maior ampliação, é de 100x, a ampliação máxima raramente ultrapassa o limiar útil de 1000x nos microscópios de rotina existentes nas bancadas.

1.7.1 Microscopia de epi-fluorescência

Cada vez mais a fluorescência aliada à microscopia tem-se tornado uma ferramenta importante em biologia celular. Os corantes fluorescentes ligam-se a uma molécula alvo sem alterar a sua conformação inicial de modo a que possam ser localizadas e analisadas na célula ou até mesmo num órgão multicelular. Devido à sua elevada sensibilidade e especificidade, os marcadores fluorescentes actuam sem interferências para as estruturas vizinhas ou para outras substâncias (Giloh & Sedat, 1982).

As moléculas marcadas com fluorescência representam a forma mais comum de detecção por métodos não radioactivos (Howard, 1993). Um marcador fluorescente pode ser apenas uma molécula de fluorocromo, ou pode estar conjugado a um material biológico (e.g. anticorpo monoclonal) ou não. O sinal fluorescente emitido indica a localização e fornece informações sobre a quantidade de marcador que está ligado à estrutura de interesse. Se o fluorocromo é suficientemente sensível ao meio em que se encontra, pode dar informações acerca do pH, ou da concentração de determinados iões (Arndt-Jovin 1989, Wagoner *et al.* 1989). Cada fluorocromo tem a sua gama espectral.

A fluorescência é um tipo de luminescência que consiste na emissão de luz, após a absorção, através de moléculas durante um curto período de tempo. Se o tempo decorrido entre a absorção e a emissão é na ordem dos 10^{-8} s ou menos, designa-se por fluorescência a luz emitida. A fluorescência é o resultado do retorno ao estado fundamental de um electrão excitado por um *quantum* de luz (Taylor & Salmon, 1989). Geralmente a emissão de luz, respeitando a lei de Stoke, corresponde a um espectro com maiores valores de comprimento de onda do que o espectro de absorção, que corresponde à energia perdida aquando da excitação da molécula. Quanto mais separados estiverem os espectros de dois fluorocromos mais eficaz vai ser a sua

deteção sem ocorrência de contaminação da fluorescência de um com o outro (Taylor & Salmon, 1989).

O termo epi-fluorescência refere-se à iluminação da excitação que incide directamente no objecto através da objectiva. O mesmo sistema óptico recolhe a luz emitida fluorescente. A separação da luz emitida daquela que não foi absorvida realiza-se através de um filtro barreira cromático (Tanke, 1998).

Uma vantagem da epi-fluorescência em relação à microscopia óptica convencional reside na possibilidade de visualizar até ao momento quatro fluorocromo simultaneamente na mesma amostra; a hibridação *in situ* e a imunofluorescência directa ou indirecta são exemplos de aplicação de fluorescência múltipla. A interpretação de várias colorações em microscópio óptico é mais complexa, especialmente quando se verificam estruturas co-localizadas. Como desvantagem, refere-se o facto de que se o espécime em estudo é autofluorescente, pode verificar-se uma redução drástica do contraste da amostra.

Ainda que em princípio qualquer microscópio possa ser adaptado para trabalhar em fluorescência, os melhores resultados obtêm-se com microscópios especialmente concebidos para este fim, nos quais as ópticas de vidro são substituídas por lentes de quartzo, a fonte luminosa consiste numa lâmpada de vapor de mercúrio e, antes da ocular, se insere um filtro protector, para remover as radiações ultravioletas, indesejáveis pelos danos que poderiam causar aos olhos do observador.

1.7.2 Microscopia confocal

O microscópio confocal combina o microscópio de fluorescência com a análise electrónica da imagem, proporcionando imagens a três dimensões. Mesmo nos cortes histológicos mais delgados, quando observados através de um microscópio comum, não é possível visualizar nitidamente toda a espessura do corte. Na prática, as lâminas são observadas usando-se o artifício de variar o plano de focagem através do botão micrométrico. Ao focar um plano da célula ou do tecido, desfocam-se os outros planos. Este método tem o inconveniente de se sobrepor à imagem nítida, da célula, proveniente do plano focado, as imagens desfocadas de outros planos. O microscópio confocal soluciona este inconveniente.

No microscópio confocal, a iluminação é realizada por um delgado feixe de raios laser, que varre o corte, iluminando, ponto por ponto, apenas um determinado plano da célula. A imagem é formada apenas pelas estruturas que se encontram no plano de varrimento, sem que os componentes celulares situados noutros planos contribuam para a formação da imagem. Não só a imagem é muito nítida, como também a célula pode ser "cortada" opticamente em vários planos. Geralmente as células são submetidas a um composto fluorescente e a luz emitida é captada por um sistema de vídeo, digitalizada em computador e acessível num monitor. As imagens dos "cortes ópticos" assim obtidas podem ser armazenadas em suporte informático e utilizadas posteriormente para reconstituição da imagem tridimensional, ou para cálculos biométricos (áreas, volumes, etc.).

O uso de um microscópio confocal apresenta como vantagem a eliminação da fluorescência que é emitida pela amostra fora do plano de focagem, o que reduz substancialmente a interferência de objectos não focados que se localizem nas imediações do plano de focagem. Isto permite ainda um subsequente aumento da resolução das imagens obtidas, comparando com um sistema de fluorescência convencional. A utilização de um poderoso laser de argon como fonte de luz luminosa, possibilita a observação de estruturas como tecidos, uma vez que o seu poder de penetração é superior ao da lâmpada de mercúrio (Zucker & Price, 1999). Sendo uma fonte de luz cujo foco luminoso é extremamente reduzido e dirigido, a iluminação ponto por ponto de um espécime permite fazer um varrimento ou *scanning* das estruturas com um detalhe incomparável. O sistema CLSM (*Confocal Laser Scanning Microscopy*) permite ainda fazer o seccionamento do espécime em cortes sequenciais horizontais (ao longo do eixo x, y) e/ou verticais (ao longo do eixo óptico z). Todas estas secções podem ser novamente "empilhadas" virtualmente, proporcionando a reconstrução e posterior projecção do espécime num monitor de computador acoplado.

1.8 Fluorocromos

Os fluorocromos são substâncias que têm a propriedade de emitir um fóton de uma frequência de onda determinada quando são excitados por um fóton de uma frequência de onda característica. Estes fluorescem em qualquer cor na gama da luz visível, desde o vermelho até

ao azul. Também podem ser detectados na gama dos infravermelhos mas necessitam de um microscópio com equipamento adequado para este tipo de detecção.

Um dos problemas da utilização de fluorocromos em microscopia de fluorescência é a perda desta devido às grandes intensidades de luz empregues. As amostras analisadas por esta técnica não podem ser observadas durante longos períodos de tempo devido ao desaparecimento da fluorescência. Uma amostra que perdeu parte da fluorescência apresenta regiões “escuras”. No entanto, existem métodos que permitem reduzir este efeito, dentro dos quais se destacam:

- O uso de substâncias protectoras da fluorescência - “antifading reagents” (Os reagentes “antifading” são moléculas que cedem ao fluorocromo aqueles electrões que este perdeu durante a emissão fluorescente. Estes reagentes são específicos do fluorocromo pois os electrões só serão dados se se encontrarem em níveis de energia ligeiramente superiores aos do próprio fluorocromo.);
- O uso de fluorocromos com pouco “fading”;
- O uso de luz de excitação de menor intensidade;
- A redução da concentração de oxigénio no espécimen;
- Direccionando 100% da luz para o dispositivo de registo (câmara, película, ...) para reduzir ao máximo o tempo de exposição;
- O uso de mecanismos de medição da exposição óptima (automática) para reduzir a iluminação ao máximo.

O uso de fluorocromos seguida da microscopia de fluorescência, para determinar a viabilidade das células, pode tornar-se tóxica para o material a analisar devido: à toxicidade do próprio fluorocromo, ao efeito da radiação e ainda do efeito da excitação do fluorocromo durante a radiação. Para prevenir falsos resultados convém precaver todas as possíveis interferências de corante e técnica.

1.8.1 Calcofluor™ white M2R

O Calcofluor white (CFW) é um agente branqueador amplamente utilizado nas indústrias têxteis e de papel, que se liga naturalmente à celulose e à quitina. A parede celulares dos fungos

é composta por uma estrutura composta principalmente por polissacarídeos, quitina e β -glucanos. Neste microrganismos o calcofluor tem capacidade de se ligar às ligações β -1-4 da quitina tornando a parede celular corada de azul quando sujeita a radiações UV.

Desde 1984 é utilizado em laboratórios de patologia e microbiologia clínica como uma coloração não específica para fungos em amostras clínicas. O CFW quando adicionado ao hidróxido de potássio em partes iguais cria uma solução que clarifica e cora os elementos fúngicos quando observados em microscópio de fluorescência, facilitando a interpretação dos resultados. Este método é considerado, por Brasil *et al.* (2003), rápido, de fácil leitura, e um dos mais específicos e sensíveis.

O uso deste fluorocromo é amplamente usado no diagnóstico de micoses superficiais e cutâneas; ele está a ser amplamente utilizado em estudos de micoses sistêmicas e oportunistas, bem como marcador no estudo de biologia molecular de fungos (Brasil, Pinheiro & Pimentel, 2003).

O corante CFW cora a parede celular num 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.

1.8.2 FUN[®]1

O FUN[®]1 é um corante de viabilidade que explora os mecanismos bioquímicos endógenos, os quais parecem ser bem conservados entre as diferentes espécies de leveduras e outros fungos. A conversão do reagente cora as estruturas intracelulares de um verde fluorescente difusamente distribuído, por sua vez as estruturas intravacuolares coram num fluorescentes laranja-vermelho ou amarelo-laranja. Para tal requerem a integridade da membrana plasmática e a actividade metabólica, respectivamente. Somente as células metabolicamente activas são marcadas claramente com estruturas intravacuolar fluorescentes, enquanto que as células comprometidas exibem uma fluorescência extremamente brilhante, difusa, verde-amarelo. Por sua vez, as células com membranas intactas mas com quase nenhuma actividade metabólica apresentam um fluorescente citoplasmático verde difuso e faltam corpos intravacuolar fluorescentes.

Para visualizar fungos corados com FUN®1 é necessário um microscópio de fluorescência com um filtro de excitação perto dos 480 nm e um filtro de emissão maior ou igual a 530 nm.

O composto FUN®1 pode ser usado sozinho ou conjuntamente com o Calcofluor para determinar as actividades metabólicas das células de fungos por microscopia fluorescente, ou por qualquer outra técnica. Pode ser usado para detectar fungos em misturas complexas ou em culturas puras.

1.8.3 Mag fura-2 AM

Mag fura-2 AM é um corante fluorescente que pode ser usado para identificar as partes dos fungos filamentosos que possuem membrana celular activa. Este composto cora a quitina presente na parede celular. A coloração é resposta ao fluxo dos iões divalentes exportados do interior da hifa pela acção dos transportadores de ATPase, os quais só estão funcionais em membranas activas. Como a parede celular restringe a difusão das espécies carregadas, isto causa uma elevada concentração de catiões e consequentemente alta grau de fluorescência. Cox & Thomas (1999) sugerem que a totalidade da parede pode ficar impregnada com o corante e que isto restringe a difusão dos catiões através da parede celular causando a sua acumulação fora da membrana activa, e é a interacção localizada ião/corante que é significativa para identificar a actividade metabólica.

O corante Mag fura-2 AM cora a parede celular num azul fluorescente, quando a amostra é visualizada num microscópio de fluorescência com filtro de excitação perto dos 358 nm e um filtro de emissão perto dos 461 nm.

1.9 Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)

Na década de 80, Carl Woese e colaboradores classificaram a subunidade menor do RNA ribossomal (16S) como sendo um marcador molecular poderoso a nível de identificação e classificação filogenético, desenvolvendo as primeiras árvores reflectindo a relação filogenética entre os procariotas baseadas na análise do 16S. Nos anos seguintes o desenvolvimento e

aplicação de técnicas de sequenciação de oligonucleotídeos e amplificação de DNA através da técnica de PCR expandiram drasticamente a base de dados de sequências de RNA (Strunk *et al.*, 2000). Através da comparação e análise das sequências de rRNA arquivadas e classificadas na base de dados, uma pesquisa comparativa das potenciais zonas alvo permite efectuar o desenho de sondas específicas de determinado grupo, género ou espécie de microrganismos. Este facto, associado à existência de grandes quantidades de rRNA na maior parte das células, a aparente inexistência de transferência lateral de genes, a grande variedade de diferentes zonas específicas e com uma sequência estável, conferem boas razões para a utilização destes biopolímeros como molécula alvo no desenvolvimento de sondas de oligonucleotídeos (Woese, 1987). Uma sonda “standard” é constituída por um oligonucleotídeo com uma sequência, de tamanho variável entre 16-20 bases, complementar de determinada região específica do RNA ribossomal alvo, à qual se encontra ligado um marcador fluorescente na extremidade 5'. 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. São vários os tipos de marcadores existentes, nomeadamente: fluoresceína (FLUOS), tetrametilrodamina, “texas red”, e os fluorocromos CY3, CY5 e CY7 (Amann *et al.*, 1995). Devido à sua relativa fotoestabilidade o fluorocromo CY3 tornou-se o marcador mais usual melhorando as gamas de detecção FISH (fluorescent in situ hybridization) em amostras ambientais (Glöckner *et al.*, 1996).

O uso de sondas de oligonucleotídeos apresenta, no entanto, algumas limitações teóricas básicas inerentes à molécula alvo. O RNA ribossomal tem de se encontrar devidamente preservado de modo a possibilitar a correcta distinção entre populações intimamente relacionadas. A heterogeneidade por vezes existente entre operões de rRNA presentes no mesmo organismo (Mylvaganam & Dennis, 1992; Nübel *et al.*, 1996), bem como a grande semelhança entre as sequências de 16S rRNA presente em espécies diferentes (Fox *et al.*, 1992) podem conduzir a resultados erróneos.

Outra limitação advém do facto de que a diversidade do rRNA se encontra ainda parcialmente descrita (Amann *et al.*, 1998). Mesmo que uma sonda seja desenhada para ser específica de uma determinada gama de microrganismos testados pode, contudo, hibridizar com organismos ainda não identificados que apresentam a mesma sequência alvo, ou não contabilizar os que não possuem zonas alvo com a complementaridade perfeita para a sonda, apesar de pertencentes ao mesmo grupo filogenético em estudo.

No desenho de sondas específicas para determinado grupo podem também surgir algumas limitações na determinação de uma zona alvo comum. Nestes casos, a população pode

ser monitorizada com mais de que uma sonda com diferentes marcadores, os quais permitem verificar a existência de “hibridização cruzada” nas populações presentes (Amann *et al.*, 1996).

Há também que ter em conta que a especificidade e sensibilidade das sondas depende fortemente das condições exactas de hidridização (Stahl & Amann, 1991). Parâmetros tais como a temperatura de hibridização e lavagem, a concentração de catiões monovalentes e agentes desnaturantes têm de ser devidamente optimizados, de modo a garantir a suficiente permeabilização da célula e a acessibilidade da zona alvo. Só após verificação do seu correcto funcionamento e aplicabilidade na identificação dos organismos para os quais foi desenhada, esta pode ser aplicada com confiança em ambientes complexos (Amann, 1995).

Convém ainda referir a existência de uma certa imprecisão a nível quantitativo subjacente à impossibilidade do estabelecimento de uma relação directa entre a intensidade da hibridização e o número de células existente, uma vez que a quantidade de RNA celular depende do estado fisiológico da célula. Por outro lado, a contagem de células pode ser subestimada quando o conteúdo em RNA se encontra abaixo dos limites de detecção ou ocorrem limitações de permeabilidade celular (Amann *et al.*, 1995). No entanto, dado que um aumento da actividade de uma determinada população se encontra directamente relacionado com um maior conteúdo de ribossoma celular e numero de células, a monitorização de parâmetros que sumarizem os dois efeitos poderá fornecer uma correlação razoável entre a dinâmica da população e uma determinada função, particularmente no estudo de ambientes complexos.

Actualmente só um número limitado de amostras pode ser processado com um grupo restricto de sondas. Automatização e paralelização de ensaios de hibridização é um objectivo para desenvolvimento futuro. O desenvolvimento da tecnologia de microarray/chips de DNA (Guschin *et al.*, 1997) providenciará em breve a possibilidade de utilização de centenas a milhares de diferentes sondas numa única hibridização reversa (múltiplas sondas específicas para cada sequência de rRNA conhecida immobilizadas em determinado tipo de suporte), para aplicação a ambientes complexos de comunidades microbianas ambientais, o que possibilitará a obtenção de uma enorme quantidade de informação em simultâneo.

Uma outra tendência é o uso combinado da análise da composição da comunidade microbiana com sondas para o rRNA através da combinação da análise FISH com microsensores (Schramm *et al.*, 1999) e microautorradiografia (Lee *et al.*, 1999), possibilitando a

obtenção de importante informação a nível do ambiente físico-químico e gama de substratos utilizados para cada célula microbiana identificada.

Estudos combinados das comunidades a nível da estrutura/função das espécies microbianas presentes permitirão uma melhor compreensão das interações entre as mesmas e com o seu ambiente biótico e abiótico independentemente de ser possível o seu cultivo.

A ecologia microbiana dos biofilmes e microbiologia ambiental avançou muito na década passada com o desenvolvimento de novas ferramentas moleculares e microscópicas, que permitiram aos investigadores caracterizar e localizar os microrganismos no seu ambiente, ultrapassando os limites subjacentes à inevitável selectividade dos métodos tradicionais cultivo-dependentes. Permitiram elucidar a diversidade de ecossistemas com grande complexidade de relações de competição e simbiose.

1.10 Enquadramento e Objectivos

A falta de legislação abrangendo a qualidade das águas no que respeita à presença de fungos filamentosos aliada há morosidade e dificuldade de implementação das técnicas micológicas resultam numa total inexistência destas práticas nos laboratórios de controlo de qualidade de água. Por outro lado, como as contaminações fúngicas ocorrem frequente e simultaneamente com o aparecimento de outros microrganismos, que são mais fáceis de crescer e identificar e, portanto, isolados preferencialmente aos fungos. Quando implementadas as técnicas micológicas tradicionais são morosas (são necessárias duas semanas para crescer e identificar um fungo) o que significa que os problemas relacionados com as contaminações fúngicas persistem desde a detecção do problema até ser encontrada uma solução.

O objectivo deste estudo foi tentar minimizar alguns dos problemas associados a detecção dos fungos filamentosos. Com este trabalho pretendeu-se adaptar, ou mesmos implementar, métodos para a detecção, enumeração e isolamento de fungos filamentosos em amostras de água. A preocupação de encontrar práticas micológicas simples e acessíveis esteve sempre presente.

Capítulo 2

Material e Métodos

2.1 Considerações gerais

A natureza filamentosa dos fungos e a fácil disseminação dos esporos leva a metodologias um pouco diferentes das praticadas em microbiologia. Como em qualquer laboratório de microbiologia deve trabalhar-se em condições de assépsia e a área de trabalho deve ser limpa com etanol a 70% antes de executar uma tarefa. Os utensílios de metal e vidro são mergulhados em álcool e flamejados para esterilizar. As ansas e as agulhas são levadas ao rubro no bico numa chama e arrefecidas na extremidade do agar.

Um dos requisitos a que deve obedecer um laboratório de micologia bem gerido é que o ar não contenha uma população de esporos significativa. As placas devem ser abertas com cuidado, deverão ser utilizados inóculos pequenos e as ansas e agulhas de inoculação devem ser previamente humedecidas. Para esse efeito serve uma solução TWS.

Solução TWS:

Tween 80	0,025 g
NaCl	0,8 g
Água destilada	100 mL

A solução é esterilizada em autoclave a 121 °C durante 15 min.

As placas de Petri devem ser transportadas com cuidado, evitando oscilações e colisões entre culturas. É prática usual selar as placas com fita isoladora ou parafilme. No caso de abertura incorrecta ou acidental de uma placa deve fazer-se imediatamente a pulverização da área afectada com lixívia 4 %.

Sinais como rastos de colónias de bactérias nas placas, contaminações na periferia do agar e a cultura parecer ter sido roída são indicadores de uma infestação de ácaros. Neste caso as culturas afectadas têm de ser imediatamente removidas e esterilizadas e todas as placas ou tubos vizinhos minuciosamente examinadas. Se uma cultura não é substituível pode submeter-se a congelamento (-20 °C) durante 24 a 48 horas. Os ácaros e os seus ovos são destruídos, no entanto, algumas espécies de fungos são afectadas por este tratamento.

2.2 Isolamento

Durante um período de 12 meses procedeu-se à recolha e tratamento das amostras provenientes de uma empresa de água engarrafada. Na Figura 2.1 representa-se esquematicamente o processo de engarrafamento de água, as amostras recolhidas encontram-se representadas no esquema com a cor vermelho.

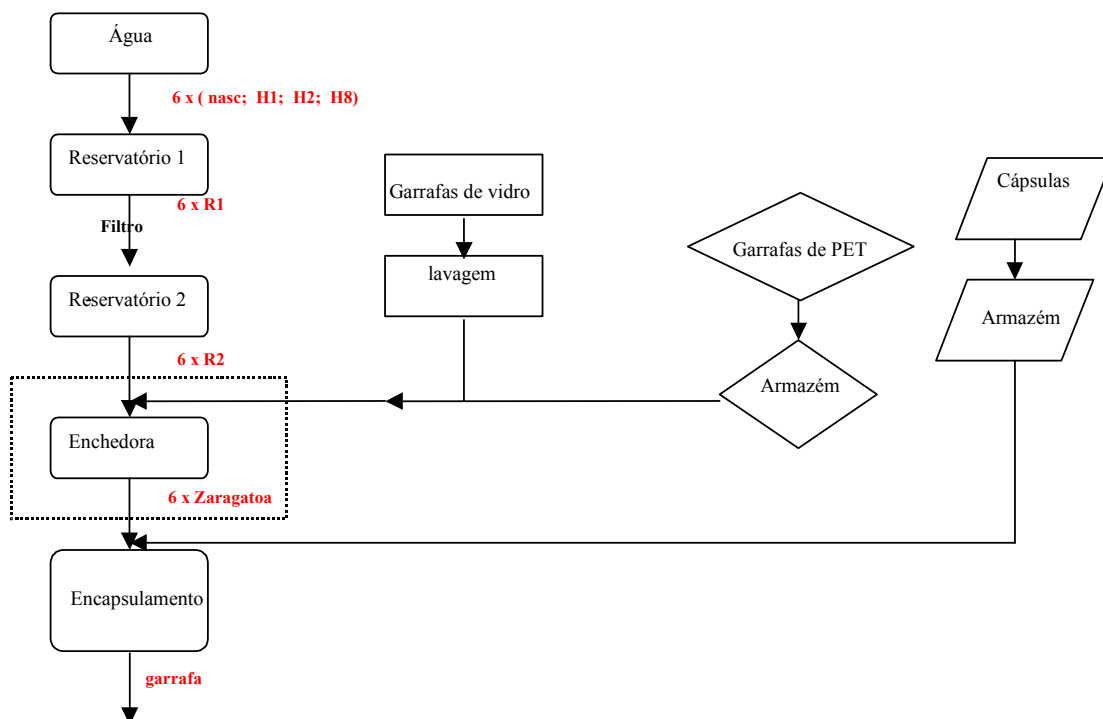


Figura 2.1 – Representação esquemática do processo de engarrafamento de água com indicação dos pontos de amostragem na cor vermelha.

Cada amostra foi colhida duas vezes por mês nos meses compreendidos entre Maio a Setembro e com periodicidade mensal nos restantes (na Tabela 2.1 encontra-se o plano de amostragem). As amostras foram colhidas em quatro pontos de amostragem distintos do sistema de engarrafamento: água da nascente, entrada e saída do filtro e água engarrafada (produto final). Foram ainda colhidas amostras de biofilme formado nos bicos da linha de enchimento, estas amostras recolheram-se com ajuda de uma zaragatoa.

Tabela 2.1 – Plano de amostragem.

Amostras 6 x 1 litro	13 Maio	27 Maio	12 Junho	26 Junho	8 Julho	22 Julho	1 Agosto	26 Agosto	9 Setembro	30 Setembro	21 Outubro	11 Novembro	5 Dezembro	13 Janeiro	17 Fevereiro	2 Março	21 Abril	Total Amostras	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	R		
Água nascente	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	17	
furo_H1																		0	
furo_H2							✓											1	
furo_H8					✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓			9	
Água reservatório antes do filtro	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	17	
Água reservatório depois do filtro	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	17	
Água enrragafada 6 x 1 litro	PET	0.33 L			✓			✓				✓		✓				4	
		0.5 L		✓	✓			✓		✓	✓		✓					7	
		1.5 L	✓		✓		✓		✓									5	
		5 L	✓				✓				✓	✓	✓			✓	✓	✓	8
	vidro	0.25 L			✓		✓			✓						✓	✓		5
		0.5 L		✓											✓				2
		1 L			✓				✓			✓		✓					4
Zaragatoa 6x		✓	✓	✓	✓	✓		✓		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	14	
“baiting” 6x	✓		✓		✓				✓				✓				✓	14	

2.2.1 Filtração

Amostras de 1 litro foram filtradas em membranas de nitrocelulose com porosidade de 0,45 µm e diâmetro 47 mm (Millipore HAWG047S1) utilizando para o efeito uma bomba de vácuo (MILLIPORE) e uma rampa de filtração (MILLIPORE). As membranas foram colocadas directamente sobre diferentes meios de agar: NGRBA, ½ CMA e YMA. A formulação de cada um destes meios encontra-se descrita na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Meios usados para o isolamento dos fungos filamentosos.

Meio	Composição	Quant.	pH
NGRBA: meio de agar com neopeptona, glucose, rosa de Bengala e Aureomicina®	Neopeptona Glucose Solução de Clorotetraciclina (1,0 g/100 mL) Solução rosa de Bengala (1,0 g/150 mL) Agar Água destilada	5 g 10 g 14 mL 3,5 mL 20 g 1000 mL	6,5 ± 0,2
½ CMA: meio de agar com meia força de extracto de milho	Extracto de milho Agar Água destilada	2 g 15 g 1000 mL	6,0 ± 0,2
YMA: meio de agar com extracto de levedura e malte	Extracto de levedura Extracto de malte Peptona Glucose Agar Água destilada	3 g 3 g 5 g 10 g 20 g 1000 mL	6,0 ± 0,2

As placas foram incubadas a 25 °C durante 7 dias e efectuaram-se contagens diárias das colónias de fungos filamentosos existentes. Passados os sete dias, ou quando o crescimento de uma colónia comprometia outra, procedia-se ao seu isolamento em meio de agar com extracto de malte (MEA) (Tabela 2.3) para posterior identificação.

2.2.2 Zaragatoa

As amostras colhidas nos bicos da linha de enchimento recolheram-se com ajuda de uma zaragatoa. As zaragatoas foram mergulhadas numa solução salina (0,9 % de NaCl) ou em substituição água desionizada. Esta solução depois de agitada serviu de solução mãe para uma série de diluições. Diluições estas que permitiram que as colónias formadas posteriormente nas placas de meio agarizado fossem contáveis, entre 30 a 300.

Às soluções diluídas tiram-se 100 µL para com a ajuda da técnica do espalhamento serem postos em contacto com os meios NGRBA e ½ CMA. As placas foram incubadas a 25 °C durante 7 dias e efectuaram-se contagens diárias das colónias de fungos filamentosos, as quais foram posteriormente isoladas e identificados.

2.2.3 “Bating”

A amostras de um litro de água foram adicionados pequenos pedaços de celofane com área 0,5 cm², previamente esterilizados, as quais foram incubadas a 25 °C durante 15 dias. Passados os 15 dias as amostras foram filtradas e os pedaços de celofane isolados foram postos em contacto com meio NGRBA. As placas foram incubadas no escuro a 25 °C durante 7 dias, efectuaram-se contagens diárias das unidades formadoras de colónias de fungos filamentosos existentes. As colónias foram isoladas e identificados.

2.3 Identificação

A identificação dos géneros consistiu na análise das características macroscópicas e microscópicas de culturas crescidas em meio MEA e CYA (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 - Meios usados para a identificação dos fungos filamentosos.

Meio	Composição	Quant.	pH
MEA: meio de agar com extracto de malte	Extracto de malte Peptona Agar Água destilada	20 g 5 g 20 g 1000 mL	5,4 ± 0,2
CYA: agar de Czapek com extracto de levedura	K ₂ HPO ₄ Extracto de levedura Sacarose Concentrado de Czapek (a) Solução de metais traço (b) Agar Água destilada	1 g 5 g 30 g 10 mL 1 mL 30 g 1000 mL	6,0 ± 0,2
(a) Concentrado de Czapek	NaNO ₃ KCl MgSO ₄ .7H ₂ O FeSO ₄ .7H ₂ O Água destilada	30g 5 g 5 g 0,1 g 100 mL	
(b) Solução de metais traço	CuSO ₄ .5H ₂ O ZnSO ₄ .4H ₂ O Água destilada	0,5 g 1g 100 mL	

Ao meio de cultura agarizado foram inoculadas suspensões de conídios em agar semi-sólido (Pitt, 1979), em três pontos equidistantes na placa de Petri, formando os vértices de um triângulo. As culturas foram incubadas a 25 °C e observadas ao fim de 7 dias de incubação. Estas observações foram comparadas com descrições publicadas por Pitt & Hocking (1997) e Samson *et al.* (1996).

A identificação ao nível da espécie só foi efectuada para os géneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Esta identificação foi feita recorrendo aos guias de Pitt *et al.* (1991) e Pitt *et al.* (1994) e ao guia de cor Methuen (Kornerup & Wanscher, 1967). As culturas para identificação

foram incubadas nos meios recomendados (CYA e MEA), como descrito anteriormente. A formulação destes meios encontra-se na Tabela 2.3.

2.3.1 Observação das culturas por exame directo

No exame directo das placas serve para se determinarem as principais características macroscópicas das colónias que são tidas em conta: produção e cor dos conídeos, do micélio e do exudado; a sua textura; a cor do seu reverso e do meio de cultura. Este foi feito à luz do dia. Os resultados comparado com uma paleta de padrões de cor e confrontados com as descrições de bibliografia adequada (Kornerup & Wanschler, 1967; Pitt, 1979; Pitt *et al.*, 1991; Pitt *et al.*, 1994, Samson *et al.*, 1996; Pitt & Hocking, 1997).

2.3.2 Observação de culturas por exame ao microscópio

As placas foram examinadas à lupa para determinar características como o tipo e a localização de estruturas reprodutoras e a extensão da esporulação.

Transferiu-se uma pequena quantidade de material para o líquido na lâmina com uma agulha de inoculação sobre uma gota de solução líquido de montagem (Tabela 2.4). Pôs-se uma lamela com cuidado sobre a preparação e limpou-se o excesso de corante em redor da lamela com papel absorvente pressionando ligeiramente. As preparações foram etiquetadas, selada e levada ao microscópio para observação.

Os procedimentos genéricos atrás descritos necessitam de se adequar a determinadas características especiais de cada espécie. Por exemplo, as espécies de *Penicillium* e *Aspergillus* produzem normalmente número elevado de conídios que podem obscurecer detalhes da estrutura a observar, pelo que ao fazer a preparação convém remover os esporos em excesso. Para o efeito, recolheu-se uma pequena quantidade de material da periferia da colónia com cuidado para não danificar as estruturas e utilizou-se álcool para remover os esporos em excesso.

Outra situação que necessita de cuidados especiais é quando o micélio aéreo é raro, ou quando as estruturas reprodutoras não devem ser perturbadas, utilizou-se um pequeno

quadrado de fita-cola que se pressionou ligeiramente sobre o fungo. A fita-cola foi colocada sobre uma gota de líquido de montagem na lâmina, com a face que cola virada para cima e cobriu-se com uma lamela. Este método é muito útil em espécies de *Cladosporium*.

Tabela 2.4 – Soluções de montagem usadas para a identificação dos fungos filamentosos.

Soluções de montagem	Preparação	Comentários
Eritrosina	Adicionar 1 g de eritrosina a 100 ml de uma solução 10% de amónia. Guardar em frasco escuro.	<ul style="list-style-type: none"> - Vermelho, - Adequado para uma vasta gama de fungos; - Útil para preparações temporárias; - Dá uma boa diferenciação entre parede celular e citoplasma.
Ácido Láctico	--	<ul style="list-style-type: none"> - Transparente; - Útil para preparações semi-permanentes; - Utilizado em fungos naturalmente pigmentados.
Azul de algodão	<p>Solução mãe: Adicionar 5 g de azul de algodão a 30 mL de ácido láctico, deixar levantar fervura e mexer. Arrefecer e filtrar para remover qualquer sedimento. Guardar num frasco escuro.</p> <p>Líquido de montagem: Adicionar algumas gotas da solução a 20 mL de ácido láctico.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Azul; - Utilizado para uma gama alargada de fungos em especial aqueles com pouco ou nenhum pigmento natural; - Cora o citoplasma.
Lactofucsina	Dissolver 0,1 g de fucsina em 100 mL de ácido láctico. Misturar partes iguais desta solução com água destilada. Guardar num frasco escuro.	<ul style="list-style-type: none"> - Vermelho; - Utilizado para uma gama alargada de fungos em especial aqueles com pouco ou nenhum pigmento natural.

2.4 Microrganismo e condições de cultura

Para simplificar os procedimentos partiu-se de ensaios preliminares utilizando uma cultura pura de *Penicillium brevicompactum*. Esta foi a estirpe escolhida uma vez que este fungo foi o isolado em maior número.

A estirpe utilizada para nos ensaios seguintes foi um *P. brevicompactum* isolada da água engarrafada identificado na Coleção da Micoteca da Universidade do Minho (MUM) pelo código MUM 01.05. A cultura de trabalho manteve-se conservada em tubo inclinado com meio de cultura MEA a 4° C. Para rejuvenescer a cultura de trabalho inoculou-se em placas com meio de cultura MEA à temperatura de 25°C durante 7 dias, no escuro.

Nos ensaios descritos nos pontos seguintes utilizaram-se conídeos e hifas da cultura de *P. brevicompactum*. Para obter os conídeos retirou-se uma porção da cultura rejuvenescida em MEA com o auxílio de uma ansa para um Eppendorf com 1 mL de solução de TWS. A esta solução retiraram-se 100 µL para diluir em 2 mL de água destilada estéril. Desta solução procedeu-se à contagem dos conídeos, para tal utilizou-se uma câmara de contagem e um microscópio. Com este procedimento determinou-se a concentração da suspensão. Para determinar a percentagem de conídeos viáveis inoculou-se a mesma solução previamente diluída em placas de MEA. Estas placas foram incubadas a 25 °C durante 7 dias, observadas diariamente para contagem das unidades formadoras de colónias de fungos filamentosos.

Por sua vez, na obtenção de hifas a cultura rejuvenescida de *P. brevicompactum* foi posta a crescer em meio líquido de extracto de malte durante 48 horas a 25 °C, com agitação. A formulação deste meio encontra-se na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 - Meio usado para o crescimento de fungos filamentosos.

Meio	Composição	Quant.	pH
MEA: meio líquido com extracto de malte	Extracto de malte Peptona Água destilada	20 g 5 g 1000 mL	5,4 ± 0,2

O procedimento seguinte consistiu em lavar o micélio com água destilada. Para tal a suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 5000 rpm, sendo o sobrenadante retirado e substituído por água destilada estéril, este procedimento foi repetido por duas vezes para retirar qualquer resíduo do meio de crescimento. O micélio foi desagregado e diluído.

2.5 Reformulação do meio NGRBA

Um dos meios mais apropriados para o isolamento e contagem de fungos é o NGRBA (meio de agar com Neopeptona, Glucose, Rosa de Bengala e Aureomicina[®]). No entanto, mesmo neste meio a incubação necessita de ser feita numa média de sete dias, isto é muito tempo em comparação com a média de algumas horas para as bactérias.

Neste sub-capítulo pretende-se adequar a formulação do meio NGRBA para que este meio fosse nutricionalmente mais adequado, mais selectivo e diferencial. Pretende-se igualmente que os métodos a implementar sejam pouco morosos e simples.

2.5.1 Alteração na composição da fonte de carbono e de azoto

Os microrganismos isolados provinham de um ambiente muito fraco em nutrientes, a água, e numa tentativa de lhe proporcionar um ambiente nutricionalmente mais adequado alterou-se o meio no que diz respeito à composição da fonte de carbono e de azoto.

O procedimento implementado é descrito em seguida. Esterilizaram-se frascos contendo amostras (1 litro) de água engarrafada, a metade foram adicionados esporos de *P. brevicompactum* numa concentração final de 10^3 esporos.L⁻¹ e aos restantes foram adicionados na concentração de 10^4 . Durante 4 semanas (semana 0, semana 1, 2, 3 e 4 respectivamente) uma garrafa de cada concentração foi filtrada usando membranas de porosidade 0.45 μ m e diâmetro 47 mm (Millipore HAWG047S1) utilizando para o efeito uma bomba de vácuo (MILLIPORE) e uma rampa de filtração (MILLIPORE). As membranas, após filtração, foram colocadas directamente sobre os meios de cultura NGRBA, com diferente composição dos

componentes glucose e neopeptona. As alterações da formulação inicial do meio NGRBA apresentam-se na Tabela 2.6.

As placas foram incubadas no escuro a 25 °C, durante 7 dias, durante os quais se efectuaram contagens diárias das unidades formadoras de colónias de fungos filamentosos.

Tabela 2.6 – Meio NGRBA alterado com diferentes combinações na concentração dos componentes Glucose e Neopeptona.

Meio	Componente (g.L ⁻¹)	
	Glucose	Neopeptona
A	10	5
B		2
C		1
D	5	5
E		2
F		1
G	2	5
H		2
I		1
J	1	5
K		2
M		1

2.5.2 Adição de sais de tetrazólio

Para detectar a presença de crescimento de fungos mais rapidamente adicionou-se ao meio NGRBA os composto MTT, TTC e CTC com esta adição pretendia-se tornar a detecção de crescimento fúngico mais rápida. As técnicas e procedimentos implementadas diferiram de composto para composto. Em seguida descreve-se o procedimento implementado para cada sal de tetrazólio adicionado ao meio NGRBA.

2.5.2.1 Ensaios com MTT

O procedimento implementado foi o seguinte: esterilizaram-se frascos contendo 1 litro de água destilada ao qual foram adicionadas quantidades de esporos de *P. brevicompactum* previamente conhecidas (10, 10² e 10³ esporos.L⁻¹). Foram filtrados volumes predefinidos, de forma a se obterem unidades formadoras de colónias contáveis, em membranas de porosidade 0.45 µm (Millipore HAWG047S1). Após filtração as membranas foram colocadas directamente sobre meio NGRBA nutricionalmente alterado identificado pela letra “M” (ver tabela 2.4), estas placas serviram de controlo. Para o ensaio propriamente dito, utilizaram-se placas com meio NGRBA nutricionalmente alterado (“M”) com diferentes concentrações do reagente MTT: 0,05, 0,10, 0,25, 0,50 mg.mL⁻¹. As placas foram incubadas no escuro a 25 °C e efectuaram-se contagens, de 6 em 6 horas, das unidades formadoras de colónias de fungos filamentosos durante um total de 72 horas.

Realizaram-se ensaio com amostras de água engarrafada, as quais foram filtradas e sujeitas ao procedimento supra citado.

2.5.2.2 Ensaios com CTC

A amostras de água estéril (1 litro) foram adicionadas quantidades de esporos de *P. brevicompactum* (10, 10² e 10³ esporos.L⁻¹). As membrana (Millipore HAWG047S1), após filtração foram colocadas directamente sobre meio NGRBA (letra “M”), com diferentes concentrações do reagente CTC: 0, 5, 10, 25, 50, 100 e 150 mM.

As placas foram sujeitas a dois procedimentos diferentes:

Procedimento 1: incorporação do reagente no meio de NGRBA; **Procedimento 2:** adição de uma solução de soft agar (solução R) sobre o filtro posto em NGRBA logo após filtração.

Depois de incubadas as placas foram iluminadas por uma luz ultravioleta ($\lambda=285$ nm) e efectuaram-se contagens das unidades formadoras de colónias de fungos filamentosos.

2.5.2.3 Ensaios com TTC

Filtraram-se amostras de água destilada estéril (1 litro) contendo esporos de *P. brevicompactum* (10, 10² e 10³ esporos.L⁻¹). As membranas foram colocadas directamente sobre meio NGRBA nutricionalmente alterado (letra “M”), as quais foram sujeitadas a quatro

procedimentos diferentes como descrito na Tabela 2.7. Todas as placas foram incubadas a 25 °C e efectuaram-se observações e contagens periódicas de 6 em 6 horas durante um total de 72 horas.

Tabela 2.7 - Diferentes procedimentos a que as placas foram sujeitas com respectivas concentrações de TTC adicionado.

Procedimento	Concentração de TTC (mg.mL ⁻¹)		Comentários
Procedimento 1: incorporação do reagente no meio de NGRBA.	0	0,10	- O reagente TTC tem que ser adicionado quando o meio NGRBA se encontra aproximadamente a 50 °C, pois a temperaturas superiores o reagente pode degradar; - O procedimento também foi testado em leveduras <i>S. cerevisiae</i> como controlo do método.
	0,25	0,50	
	0,75	1,00	
	1,25	1,50	
	1,75	2,00	
	2,50	5,00	
	7,50	10,00	
Procedimento 2: adição de uma solução de soft agar (solução R) sobre o filtro posto em NGRBA no tempo de amostragem.	0	0,10	Solução R: Agar 0,6 g TTC 0,5 g Água destilada 100 mL O agar é dissolvido na água e esterilizado em autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Quando a solução estiver a uma temperatura inferior a 50 °C é adicionado o TTC.
	0,25	0,50	
	0,75	1,00	
	1,25	1,50	
	1,75	2,00	
	2,50	5,00	
	7,50	10,00	
Procedimento 3: adição da solução R sobre o filtro posto em NGRBA após 24 horas da filtração.	0	0,10	- A solução R tem que ser adicionada o mais fria possível para não inactivar os microrganismos;
	0,25	0,50	
	0,75	1,00	
	1,25	1,50	
	1,75	2,00	
Procedimento 4: adição da solução R sobre o filtro posto em NGRBA imediatamente após filtração.	0	0,10	- O procedimento também foi testado em leveduras como controlo do método.
	0,25	0,50	
	0,75	1,00	
	1,25	1,50	
	1,75	2,00	

2.6 Técnicas fluorescentes

Neste sub-capítulo pretende-se tornar a detecção de fungos filamentosos mais rápida, recorrendo para tal ao uso de técnicas fluorescentes. Para tal recorreu-se a três fluorocromos: Calcofluor White M2R, FUN® 1 e Mag-fura-2 AM. As condições optimizadas utilizadas nos ensaios de cada um dos reagentes encontram-se sistematizadas na Tabela 2.8.

Tabela 2.8 – Condições seguidas durante o processo de coloração com cada um dos reagentes.

Reagente	Condições de coloração			
	Conc. final	Temp. (°C)	Tempo (min)	Solução de lavagem
Calcofluor White M2R ⁽¹⁾ (Sigma)	25 µM	25	5 – 10	Água destilada
LIVE/DEAD® yeast viability kit (Molecular Probes Incorporated):				
- Calcofluor™ white M2R	25 µM	25	5 – 10	Água destilada
- FUN® 1	5 - 20 µM	30	30	
Mag-fura-2 AM (Molecular Probes Incorporated)	1 - 5 mM	37	15-60	Tampão citrato (2)

(1) Às amostras coloradas com CFW pode ser adicionado uma gota de KOH 40% para limpar o background.

(2) Tampão citrato composto por ácido cítrico (0,1M) e Na₂HPO₄ (0,2 M) a pH 5,0.

Para otimizar as condições apresentadas na tabela anterior realizou-se uma bateria de ensaio onde se variou cada um dos parâmetros (concentração de corante, temperatura e tempo de incubação) de cada um dos corantes. Foram utilizados igualmente ensaios de controlo onde foram utilizadas espécimes mortos a 121 °C durante 15 minutos.

Depois de optimizadas as condições de ensaio filtraram-se amostras em membrana filtrante Isopore™ (MILLIPORE), com porosidade 0,45 µm e diâmetro 13 mm, com o auxílio de um sistema de filtração para epifluorescência (MILLIPORE). Um ou mais corantes foram adicionados sobre o filtro e quando necessário procedeu-se à lavagem do filtro. Após incubação o filtro foi colocado entre lâmina e lamela e observado em microscópio de epifluorescência Axioskop (Carl Zeiss), utilizando filtros de emissão e excitação para os comprimentos de onda específicos de cada um dos corantes. Os comprimentos de onda dos filtros de emissão e excitação de cada um dos fluorocromos encontram-se descritos na Tabela 2.9. Algumas amostras também foram observadas recorrendo a um microscópio confocal.

Os procedimentos descritos também foram testados em amostras de água engarrafada.

Tabela 2.9 – Comprimentos de onda dos filtros de emissão e excitação de cada um dos fluorocromos.

Fluorocromo	Comprimento de onda (nm)	
	Emissão	Excitação
CFW	≈ 461	≈ 358
FUN® 1	≥ 530	480
Mag-fura-2 AM	≈ 461	≈ 358

2.7 Fluorescent In Situ Hybridization (FISH)

O marcador usado neste procedimento foi a sonda EUK 516, 5'-ACCAGACTTGCCCTCC-3' (MWG Biotech), à qual se encontra ligado o marcador fluorescente vermelho Cy3 na extremidade 5'. Este marcador tem como alvo a sequência dos nucleotídeos 548-563 da molécula rRNA da subunidade ribossomal 18S da *Saccharomyces cerevisiae*, sequência esta que é idêntica em todos os organismos eucariotas.

O procedimento foi implementado usando hifas da mesma estirpe de *P. brevicompactum* usada nos restantes ensaios.

Uma questão crucial, na técnica de FISH, é a fixação da amostra. Esta deve maximizar a difusão da sonda através da matriz citoplasmática. As amostras (1 mL) foram centrifugadas, o

sobrenadante retirado e substituído por 750 μL de uma solução de etanol a 90% (v/v). As amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 10 minutos, passado este tempo agitaram-se no vortex durante 2 minutos.

A hibridização das amostras desidratadas foram levadas a cabo com o descrito de acordo com Manz *et al.* (1992). Verteram-se 10 μL da amostra resultante do passo anterior numa lâmina e deixou-se secar. Sobre a amostra verteu-se 6 μL de uma solução de hibridização (0,9 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, 0,02% (p/v) SDS, 35% (v/v) formamida, pH 8) e aplicaram-se 5 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de sonda. Deixou-se incubar durante 3 horas a 46 °C.

Os excessos foram removidos pela adição de 2 mL de uma solução de lavagem (0,9 M NaCl, 20mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, 0,02% (p/v) SDS, pH 8), a qual se deixou actuar durante 20 minutos a 48 °C. Depois foi lavada com água destilada.

Em alguns casos a coloração com Calcofluor foi efectuada em simultâneo. Para tal adicionou-se 10 μL de Calcofluor (25 μM) e deixou-se a incubar no escuro à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após coloração retiraram-se excessos de corante pela adição de 100 μL de água destilada estéril. Cobriu-se com lamela e observou-se no microscópio de epifluorescência Axioskop (Carl Zeiss). O comprimento de onda de excitação para o CWF usado foi de 346 nm (sinal azul), por sua vez para o Cy3 o comprimento de onda de excitação foi de 543 nm (sinal vermelho).