

Capítulo 3

Resultados e Discussão

3.1 Isolamento

Os gráficos apresentados em seguida (Figuras 3.1 à 3.6) representam as unidades formadoras de colónias (ufc) de fungos crescidas nos meios NGRBA, ½ CMA e YMA, após incubação a 25 °C durante 7 dias. As amostras possuem como origem uma empresa de água engarrafada e representam quatro pontos de amostragem diferenciados. Na Figura 3.1 estão apresentadas as unidades formadoras de colónias de fungos filamentosos provenientes da água da nascente, crescidas nos três meios de cultura, no intervalo temporal de doze meses.

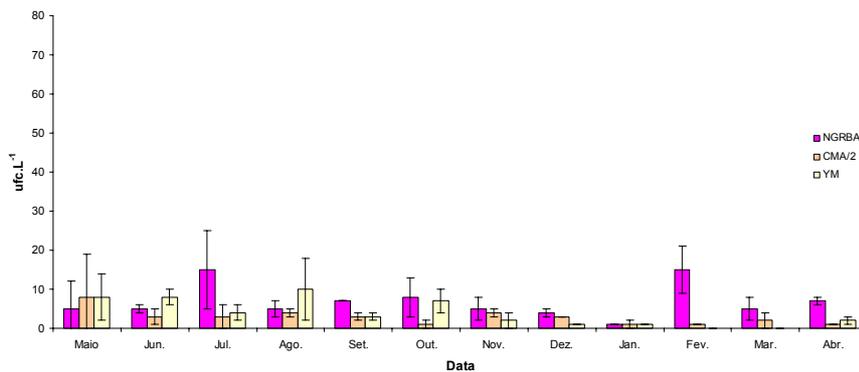


Figura 3.1 – Representação gráfica das unidades formadoras de colónias de fungos filamentosos isoladas nas amostras de água da nascente, ao longo de doze meses e em três meios distintos.

Nas Figuras 3.2 e 3.3 apresentam-se as unidades formadoras de colónias de fungos filamentosos provenientes de dois pontos de amostragem distintos: antes e depois do processo de filtração, respectivamente.

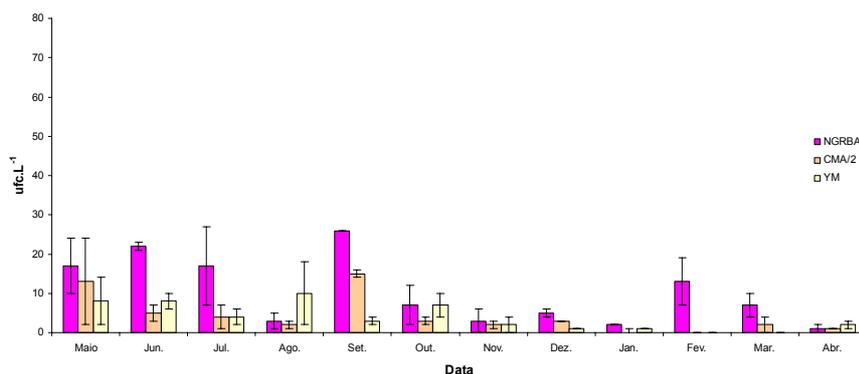


Figura 3.2 – Representação gráfica das colónias de fungos isoladas nas amostras de água armazenada num reservatório antes do processo de filtração, ao longo de doze meses e em três meios distintos.

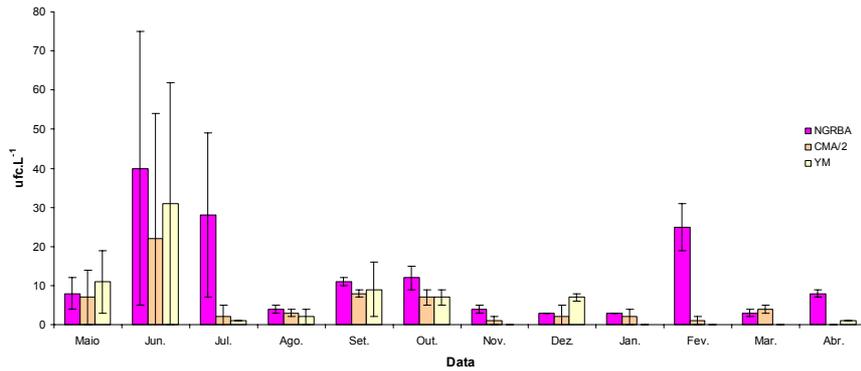


Figura 3.3 – Representação gráfica das colónias de fungos isoladas nas amostras de água armazenada num reservatório depois do processo de filtração, ao longo de doze meses e em três meios distintos.

Nas Figuras 3.4 e 3.5 estão apresentadas as unidades formadoras de colónias de fungos filamentosos provenientes de um mesmo tipo de amostra, água engarrafada.

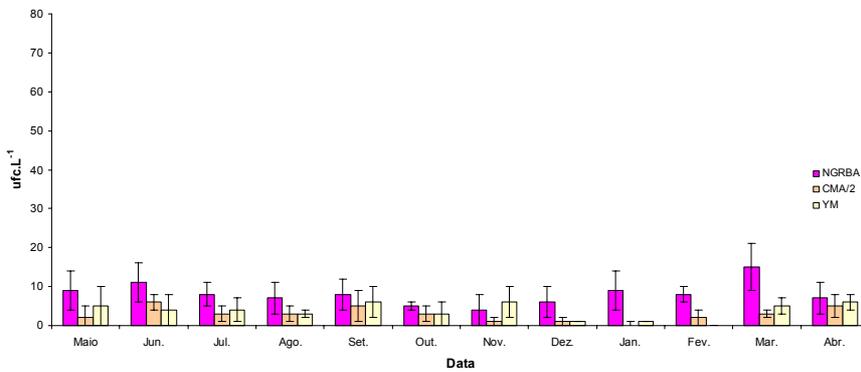


Figura 3.4 – Representação gráfica das colónias de fungos isoladas nas amostras de água engarrafada, ao longo de doze meses e em três meios distintos.

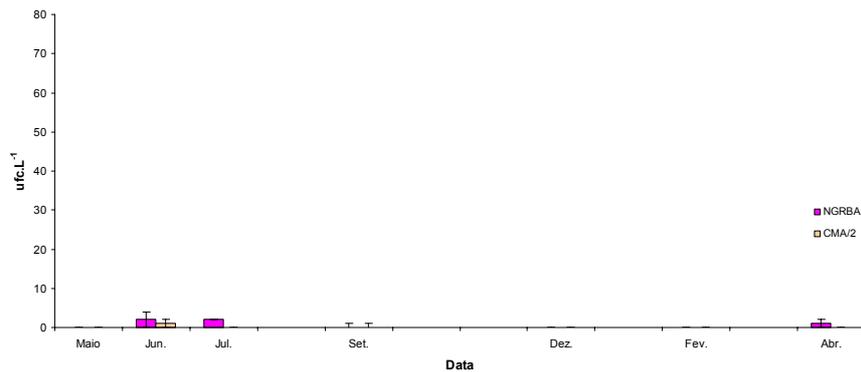


Figura 3.5 – Representação gráfica das colónias de fungos isoladas nas amostras de água engarrafada através da técnica de “baiting”, ao longo dos meses e em dois meios distintos.

Por sua vez, a Figura 3.6 apresenta as unidades formadoras de colónias de fungos filamentosos provenientes das amostras de biofilme, colhidas utilizando a técnica de zaragatoa, formado nos bicos das enchedoras que enchem as garrafas de água.

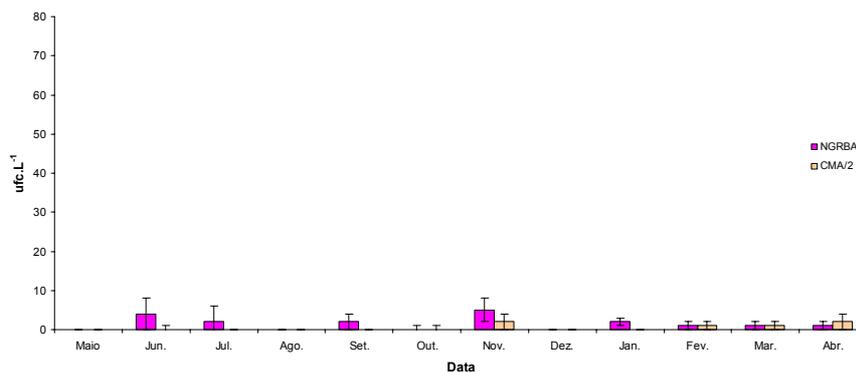


Figura 3.6 – Representação gráfica das colónias de fungos isoladas nas amostras de biofilme, durante doze meses e em dois meios distintos.

Em todas as amostras analisadas, com raras excepções, foi detectada a presença de fungos filamentosos. No entanto, o seu número difere do tipo e da data de recolha das amostras.

Nas amostras recolhidas na nascente (Figura 3.1), antes (Figura 3.2) e após filtração (Figura 3.3) verifica-se que nos meses mais quentes (meses compreendidos entre Maio e Outubro, inclusive) apresentaram maior número de fungos, atingindo-se um pico máximo no mês de Julho. Estes resultados devem-se, em parte, pelo facto de nestes meses a temperatura ambiente ser a mais favorável ao crescimento dos fungos filamentosos, mas também estão relacionados com factores inerentes à própria empresa de água engarrafada. Ou seja, nos meses mais quentes o consumo de água engarrafada é mais acentuado e as reservas de água da nascente não respondem a todas as necessidades e por isso a empresa teve que recorrer a água proveniente de dois “furos” (furo_H2 e furo_H8) suplementares (ver Tabela 2.1), os quais parecem estar mais sujeitos a contaminação fúngica. No mês de Fevereiro verificou-se outro pico máximo no que diz respeito ao número de fungos filamentosos enumerados. Mais uma vez se verifica que neste mês se procedeu à recolha de água proveniente de um dos furos (furo_H8), este facto foi agravado pela acentuada precipitação ocorrida durante este mês. Em contra ponto, os meses de Dezembro e Janeiro foram os meses que nas amostras se verificou menor número de colónias de fungos filamentosos isoladas.

Através dos mesmos resultados verificou-se ainda que, em alguns meses pontuais (nos meses de Junho e Julho é mais notório) o número de fungos enumerados foi maior nas amostras recolhidas no reservatório depois do processo de filtração do que nas amostras recolhidas antes do mesmo. Este facto sugere uma acumulação de fungos nos filtros e uma limpeza dos filtros insuficiente, ocorrendo assim uma transferência dos fungos retidos no filtros para a água que passa através deles.

Fazendo uma média dos doze meses para a água da nascente verificou-se uma média anual por litro de amostra de oito unidades formadoras de colónias de fungos filamentosos para o meio NGRBA e de três e quatro para os meios 1/2CMA e YM, respectivamente. No questionário efectuado no decorrer do Projecto Europeu COMBOW os resultados, à questão “Qual a quantidade de fungos filamentosos detectados nas amostras de água de nascente durante a rotina microbiológica, nos últimos cinco anos?”, fora de 72% para nenhuma colónia, 19% de 1 a 10 colónias e somente 9% responderam de 21 a 50. Estes resultados reflectem os 50% das empresas que referiram não estabelecer qualquer controlo para detectar a presença de fungos no decorrer das análises microbiológicas. Por sua vez, as restantes empresas, que afirmaram implementar como rotina laboratorial no controlo de qualidade a detecção de fungos, provavelmente praticam técnicas micológicas em períodos pontuais ou mesmo técnicas inadequadas.

O número de fungos filamentosos isolados nas amostras de água engarrafada (Figura 3.4) permanece muito similar ao longo dos meses, não se verificando grandes oscilações (só no mês de Março é que se verificou um número de unidades formadoras de colónias de fungos filamentosos um pouco mais elevado, quando foi utilizado o meio NGRBA).

O método “Baiting” (Figura 3.5) só se efectuou nos meses de Maio, Junho, Julho, Setembro, Dezembro, Fevereiro e Abril. No entanto a presença de fungos só foi detectada nos meses de Junho, Julho, Setembro e Abril, e em número nunca superior a três colónias por litro de amostra analisada.

Os resultados referentes as amostras de biofilme recolhidas nos bico de enchimento (Figura 3.6) revelam que os fungos filamentosos estão presentes nos biofilmes.

Pela observação dos resultados verifica-se que o meio NGRBA é o meio com o qual conseguimos isolar maior número de colónias de fungos. Nos meios ½ CMA e YMA para além de crescerem colónias de fungos também crescem bactérias as quais como possuem um crescimento mais rápido impossibilitam a enumeração e o isolamento das colónias de fungos filamentosos. No questionário efectuado os resultados à pergunta sobre quais os meio mais usados para a detecção da presença de fungos 45% refere o uso de meio Rosa de Bengala Clorofenicol Agar, 30% referem os uso de outros meios e 35% a não utilização de qualquer meio (utilização de uma técnica de detecção diferente)

3.2 Identificação

Nas Figuras 3.7 e 3.8 apresentadas em seguida estão representadas em percentagem os diferentes géneros isoladas num total de 1 144 estirpes isoladas.

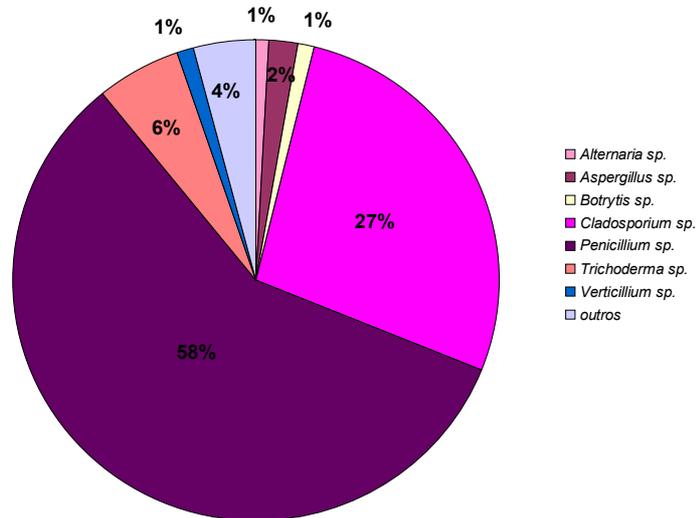


Figura 3.7 – Diferentes estirpes identificadas provenientes dos isolamentos das amostras analisadas, representadas em percentagem.

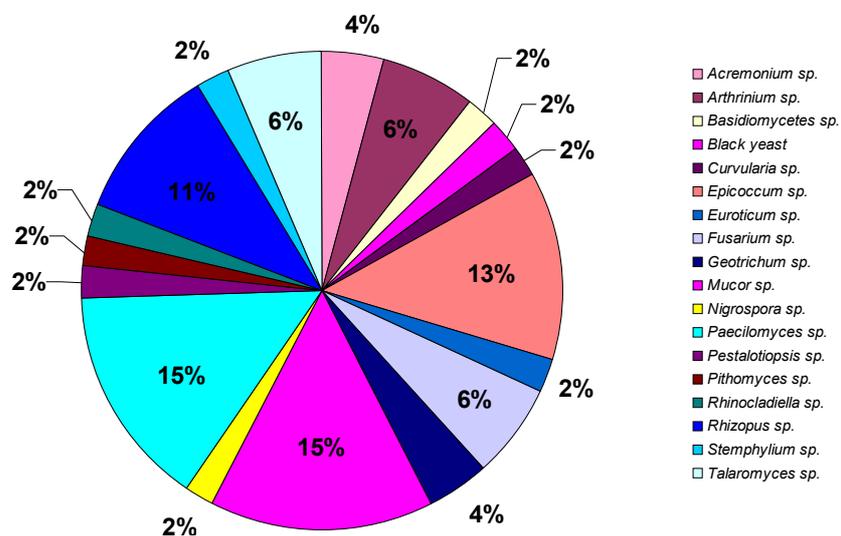


Figura 3.8 – Diferentes estirpes isoladas em menor número representadas na Figura 3.7 pela classe “outros”, representam uma percentagem de quatro no total das estirpes identificadas.

Nas Figura 3.9 e 3.10 apresentam-se as 662 estirpes pertencentes ao género *Penicillium* agrupadas pelas diferentes espécies identificadas.

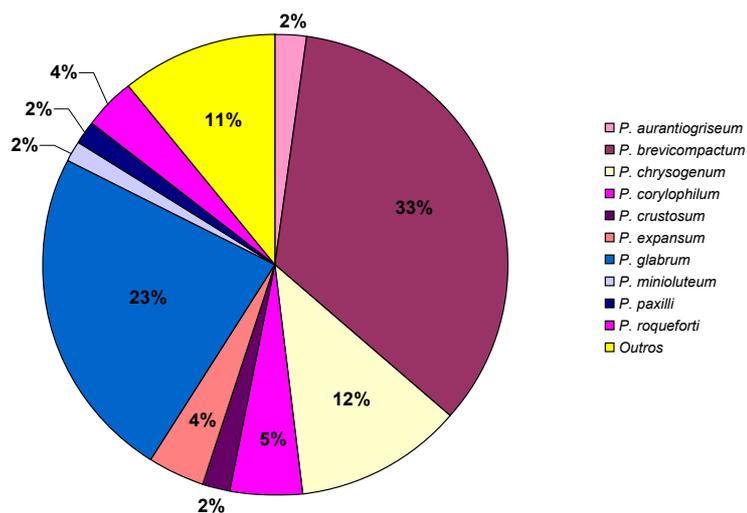


Figura 3.9 – Percentagem das diferentes espécies isoladas dentro do género *Penicillium*.

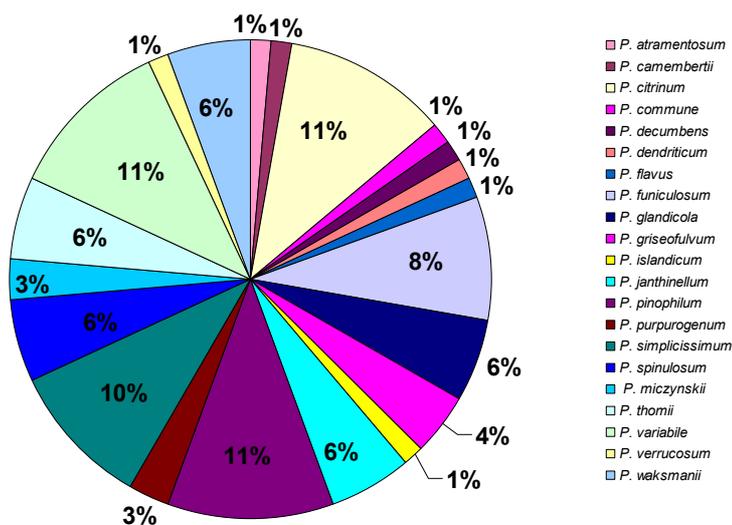


Figura 3.10 – Diferentes espécies de *Penicillium* representadas na Figura 3.9 pela classe “outros”, representam uma percentagem de onze no total das estirpes de *Penicillium* identificadas.

Na Figura 3.11 apresentada em seguida estão representadas em percentagem os diferentes géneros isoladas nas amostras de água analisadas pelas técnicas de “baiting” e zaragatoa. Por sua vez, Figura 3.12 apresentam-se as diferentes espécies pertencentes ao género *Penicillium*.

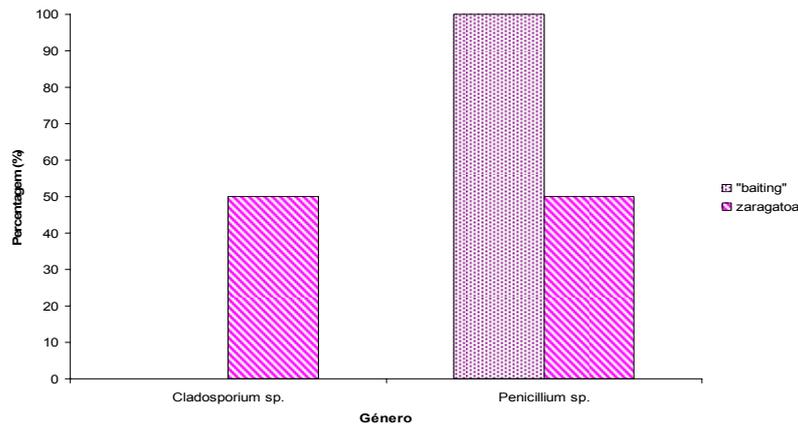


Figura 3.11 – Diferentes estirpes identificadas provenientes dos isolamentos das amostras de “baiting” e zaragatoa, apresentadas em percentagem.

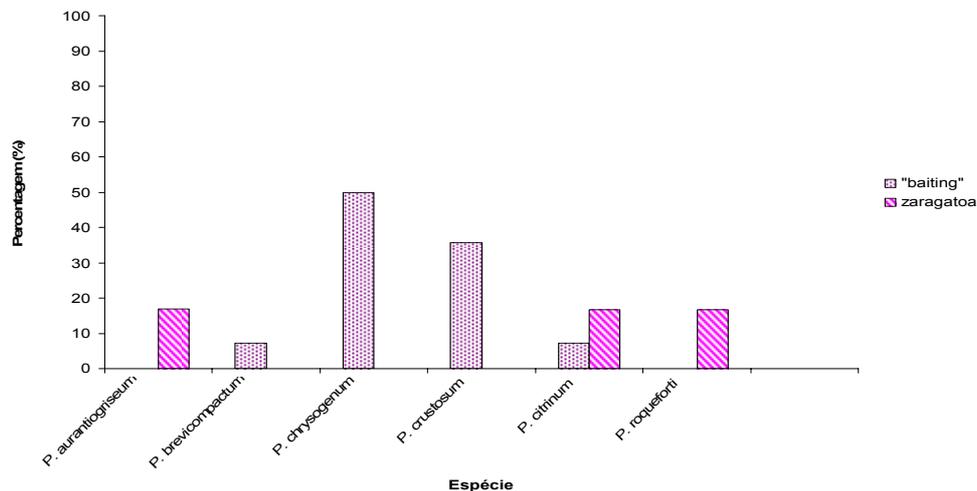


Figura 3.12 – Percentagem das diferentes espécies isoladas dentro do género *Penicillium*, nas amostras de “baiting” e zaragatoa.

Por observação dos resultados apresentados nas Figuras 3.7 e 3.8 verifica-se que nas amostras analisadas foram isolados espécimes dos géneros: *Acremonium*, *Alternaria*, *Arthrinium*, *Aspergillus*, *Basidiomycetes*, “Leveduras Negras”, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Epicoccum*, *Euroticum*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Nigrospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Pithomyces*, *Rhinochadiella*, *Rhizopus*, *Stemphylium*, *Talaromyces*, *Trichoderma* e *Verticillium*. No entanto os géneros mais representativos são: *Penicillium* (58%), *Cladosporium* (27%), *Trichoderma* (6%), *Aspergillus* (1,8%), *Verticillium* (1,2%), *Alternaria* (1%), *Botrytis* (1%) e todos os restantes géneros por um total de 4,1%.

Dentro do género *Penicillium* (Figura 3.9 e 3.10) identificaram-se as seguintes espécies: *P. atramentosum*, *P. aurantiogriseum*, *P. brevicompactum*, *P. camembertii*, *P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. commune*, *P. corylophilum*, *P. crustosum*, *P. decumbens*, *P. dendriticum*, *P. expansum*, *P. flavus*, *P. funiculosum*, *P. glabrum*, *P. glandicola*, *P. griseofulvum*, *P. islandicum*, *P. janthinellum*, *P. minioluteum*, *P. paxilli*, *P. pinophilum*, *P. purpurogenum*, *P. roqueforti*, *P. simplicissimum*, *P. spinulosum*, *P. miczynskii*, *P. thomii*, *P. variabile*, *P. verrucosum* e *P. waksmanii*. Por sua vez, dentro do género *Penicillium* as espécies mais representativas são: *P. brevicompactum* (33%), *P. glabrum* (23%), *P. chrysogenum* (12%), *P. chrysogenum* (12%), *P. corylophilum* (5%), *P. expansum* (4%), *P. roqueforti* (4%), *P. aurantiogriseum* (2%), *P. crustosum* (2%), *P. minioluteum* (2%), *P. paxilli* (2%) e todas as outras espécies por 11%.

Através da análise das Figuras 3.11 e 3.12, amostras sujeitas ao método “Baiting”, verifica-se que só se isolaram estirpes do género *Penicillium*: *P. brevicompactum* (7%), *P. chrysogenum* (50%), *P. crustosum* (36%) e *P. citrinum* (7%). Pela observação das mesmas figuras verifica-se ainda que no biofilme identificaram-se estirpes dos géneros *Cladosporium* (50%) e *Penicillium* (50%). Dentro deste último género as percentagens dividem-se em partes iguais pelas espécies: *P. auritiogriseum*, *P. citrinum*, *P. roqueforti*.

3.3 Reformulação do meio NGRBA

Um dos meios mais apropriados para o isolamento e contagem de fungos é o NGRBA, o qual é selectivo pois possui na sua composição um antibiótico (aureomicina) e o composto rosa de Bengala.

3.3.1 Alteração na composição da fonte de carbono e de azoto

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

Nas Figuras 3.13 e 3.14 estão apresentadas as percentagens de recuperação das colónias de *P. brevicompactum* das amostras de água estéril com concentrações de esporos de 10^3 L^{-1} e 10^4 L^{-1} . Estas amostras cresceram em meio NGRBA nutricionalmente alterado nas percentagens dos componentes glucose e neopeptona como apresentado na Tabela 2.4. As percentagens de recuperação foram calculadas subtraindo as unidades formadoras de colónias crescidas em meio MEA (placas de controlo) às unidades formadoras de colónias crescidas em meio NGRBA com diferentes concentrações de glucose e neopeptona, este valor foi multiplicado por 100.

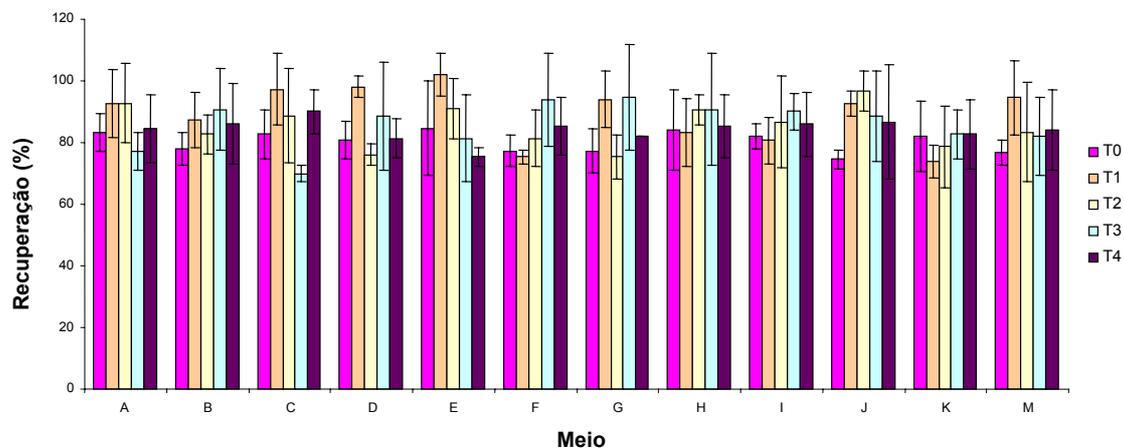


Figura 3.13 – Recuperação das colónias de *P. brevicompactum* das amostras com concentração de esporos 10^3 L^{-1} nas 4 semanas, nos meios com diferente composição (T0=controlo; T1 a T4 = 1 a 4 semanas, respectivamente).

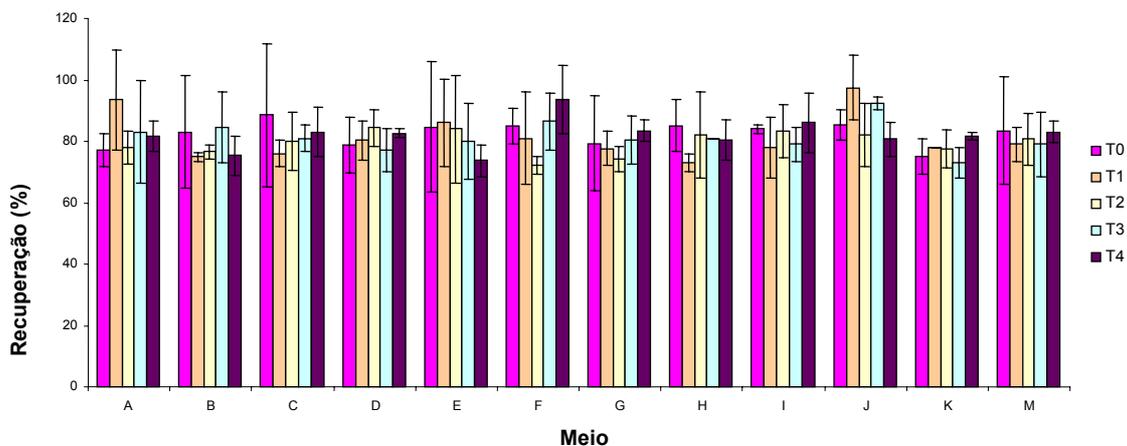


Figura 3.14 - Recuperação das colónias *P. brevicompactum* das amostras com concentração de esporos 10^4 L^{-1} nas 4 semanas, nos meios com diferente composição (T0=controlo; T1 a T4 = 1 a 4 semanas, respectivamente).

As alterações efectuadas no meio NGRBA no que diz respeito há composição da fonte de carbono e azoto, ou seja Glucose e Neopeptona respectivamente, não afectaram a recuperação dos esporos representados em unidades formadoras de colónias (Figuras 3.13 e 3.14). Como os fungos isolados da água provêm de um ambiente muito fraco em nutrientes um meio nutricionalmente fraco elimina uma possível causa de “stress” no desenvolvimento dos fungos filamentosos.

3.3.2 Ensaios com MTT

A acção das desidrogenases quebra o anel tetrazólio do MTT formando um formazano insolúvel púrpura. O crescimento de microrganismos é detectado precocemente pela formação de uma mancha púrpura no meio. A Figura 3.15 ilustra um ensaio onde se visualizam a acção do MTT. As imagens correspondem a uma ampliação de 2 X do tamanho real, e foram visualizadas através de uma lupa (Leitz).

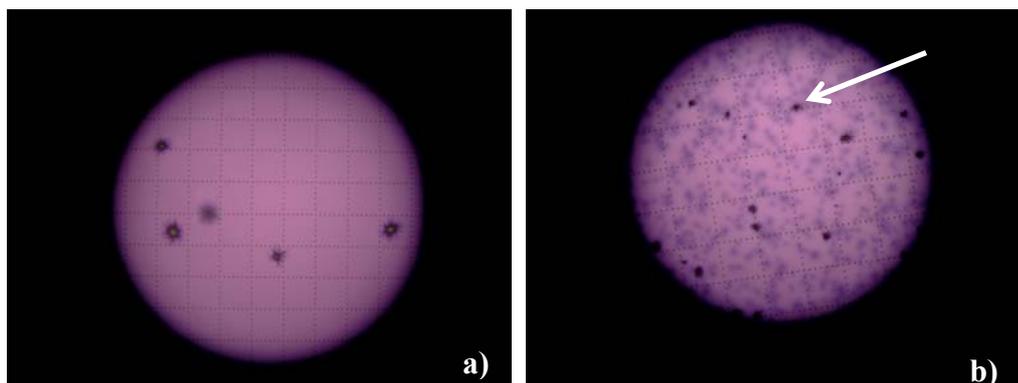


Figura 3.15 a) Ensaio com amostra de água engarrafada encubada por 36 horas em meio NGRBA com 0,1 mg.L⁻¹ de MTT; b) Ensaio com amostra de água estéril com uma concentração de 10³ esporos.L⁻¹ de esporos de *P. brevicompactum*, incubada por 24 horas em placas de NGRBA com 0,1 mg.L⁻¹ de MTT, os pontos mais escuros (seta) correspondem a leveduras.

Nas Figuras 3.16 e 3.17 apresentam-se as percentagens de recuperação unidades formadoras de colónias de *P. brevicompactum* formadas ao longo do tempo. As percentagens de recuperação foram calculadas subtraindo as unidades formadoras de colónias crescidas em meio MEA (placas de controlo) às unidades formadoras de colónias crescidas em meio NGRBA com diferentes concentrações de MTT, este valor foi multiplicado por 100.

Na Figura 3.18 apresentam-se as percentagens de recuperação unidades formadoras de colónias de fungos filamentosos presentes em amostras de água engarrafada.

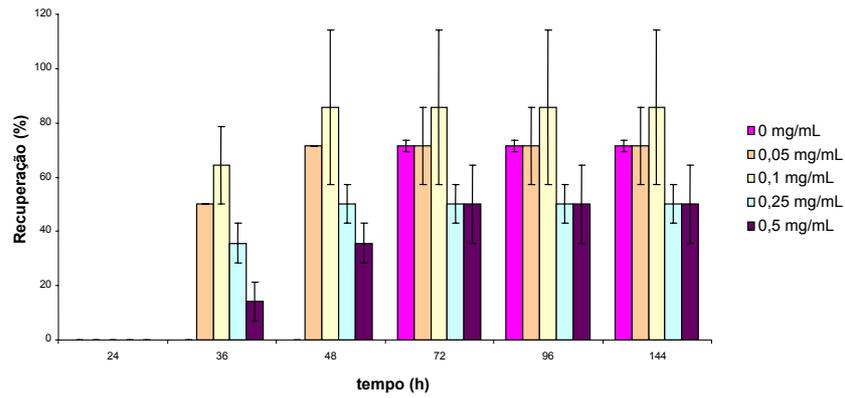


Figura 3.16 – Recuperação das unidades formadoras de colônias de das amostras de água estéril com uma concentração de 10^5 esporos.L⁻¹ de esporos de *P. brevicompactum* nos meios com diferentes concentrações de MTT, ao longo do tempo.

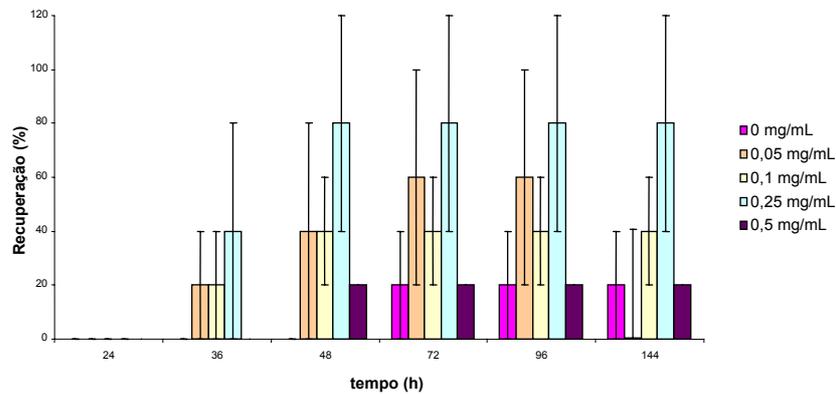


Figura 3.17 – Recuperação das colônias de fungos filamentosos das amostras de água estéril com uma concentração de 10^2 esporos.L⁻¹ de esporos de *P. brevicompactum* nos meios com diferentes concentrações de MTT, ao longo do tempo.

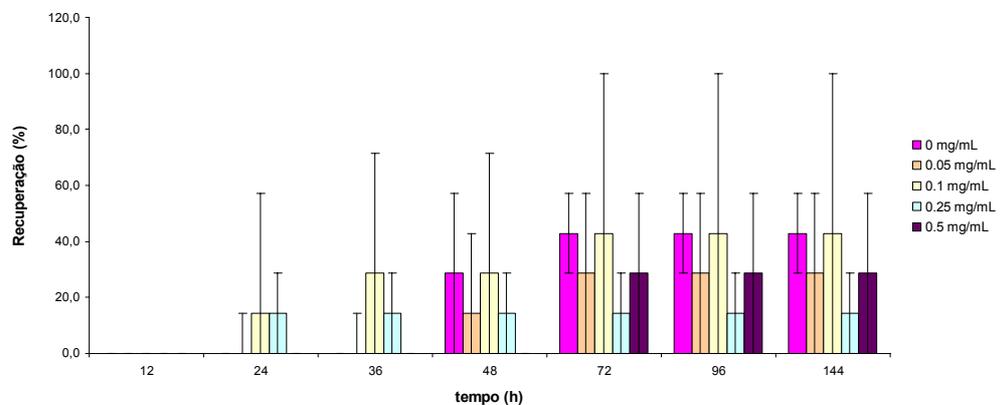
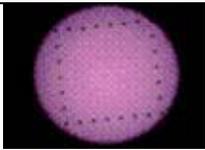
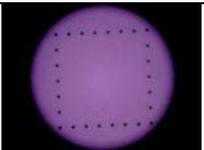
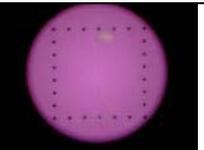
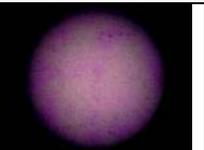
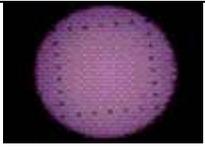
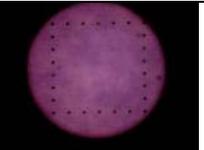
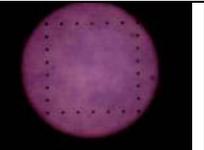
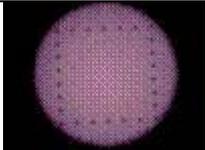
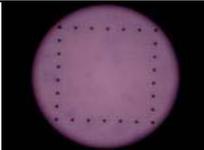
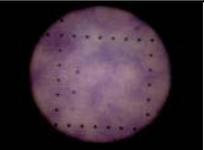
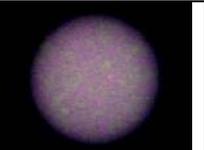
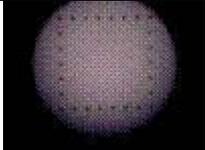
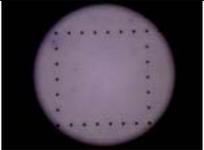
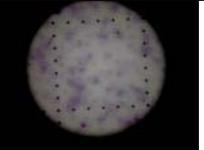
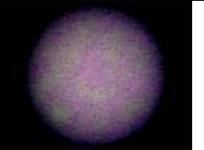
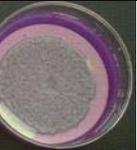
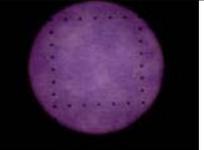
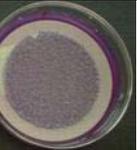


Figura 3.18 – Recuperação das colônias de fungos filamentosos das amostras de água engarrafada nos meios com diferentes concentrações de MTT, ao longo do tempo.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3.1 são apresentados, através de fotografias, os resultados de um ensaio onde foram utilizadas placas de meio NGRBA com diferentes concentrações do composto MTT. As imagens, com excepção das correspondentes às 48 horas, referem-se a uma ampliação de 10 X do tamanho real, e foram visualizadas com o auxílio de uma lupa.

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.

	24 horas	30 horas	36 horas	42 horas	48 horas
NGRBA					
NGRBA + [0,05 mg.mL ⁻¹] MTT					
NGRBA + [0,1 mg.mL ⁻¹] MTT					
NGRBA + [0,25 mg.mL ⁻¹] MTT					
NGRBA + [0,5 mg.mL ⁻¹] MTT					

A aplicação do sal de tetrazólio MTT revelou-se um bom método como alternativa à enumeração das unidades formadoras de colónias em meios tradicionais, para detectar a presença de fungos filamentosos. Com este método podem-se efectuar contagens das unidades formadoras de colónias em 36 horas enquanto que a enumeração através do método tradicional só é possível com um mínimo de 72 horas e sujeito a alguma incerteza.

3.3.3 Ensaio com TTC

O TTC é um composto solúvel em água, o qual é reduzido num formazano trifenílico, um composto insolúvel de cor vermelha. A presença de microrganismos é detectada pela formação de uma mancha de cor vermelha no meio. A figura 3.19 ilustra um ensaio onde se pode visualizar a acção do reagente TTC, num ensaio onde foram utilizadas leveduras *S. cerevisiae*.

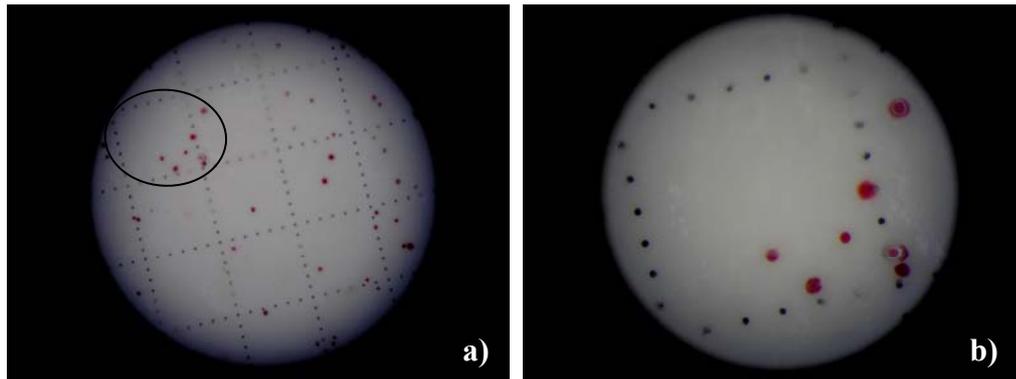


Figura 3.19 a) Ensaio com amostras de água estéril com leveduras *S. cerevisiae* incubada por 36 horas em meio MEA com 0.1 mg.L^{-1} de TTC, imagem visualizada com lupa (Leitz) com ampliação 2,5 X; b) Ampliação do quadrado assinalado na imagem a), ampliação de 10X da imagem real.

Os resultados apresentados na figura 3.20 referem-se a um ensaio com água estéril com 10^2 esporos. L^{-1} de esporos de *P. brevicompactum* incubada por 72 horas em meio MEA com $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de TTC incorporado.

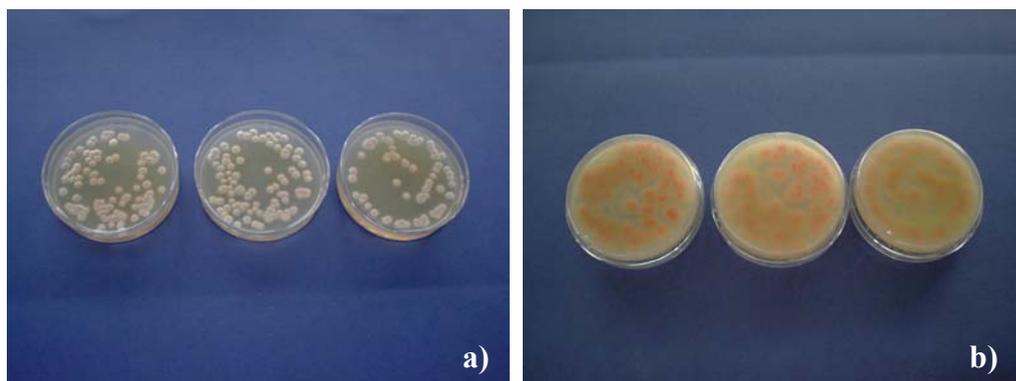


Figura 3.20 a) Ensaio com amostras de água estéril com uma concentração de 10^2 esporos. L^{-1} de esporos de *P. brevicompactum* incubada por 72 horas em meio MEA com 0.1 mg.L^{-1} de TTC; b) Reverso das placas do ensaio a).

Os resultados apresentados na figura 3.21 referem-se a um ensaio com água estéril com 10^2 esporos.L⁻¹ de esporos de *P. brevicompactum* incubada por 48 horas em meio NGRBA com 0,1 mg.L⁻¹ de TTC, com uma ampliação de 2 X.

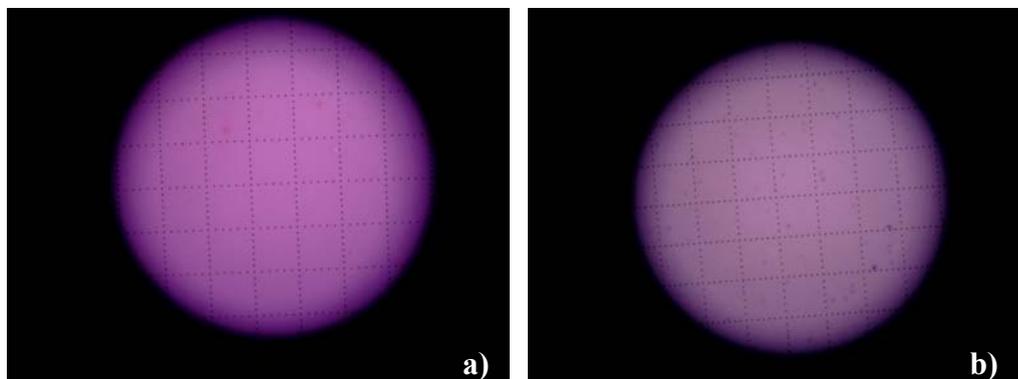


Figura 3.21 a) Ensaio com amostras de água estéril com uma concentração de 10^2 esporos.L⁻¹ de esporos de *P. brevicompactum* incubada por 48 horas em meio NGRBA com 0,1 mg.L⁻¹ de TTC incorporado; b) Amostra igual à imagem a) com a diferença do TTC estar no Soft Agar, o qual se adicionou à placa pelo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

Nos ensaios com o reagente TTC partiu-se de uma concentração de 1 mg/100 mL, este valor teve por base um meio comercializado pela Difco (HYcheck para leveduras e bolores) que possui na sua composição Rosa de Bengala, Clorofenicol e TTC (1 mg/100 mL). Como com esta concentração não se obtinham resultados significativos e outros estudos (Praveen-Kumar & Tarafdar, 2003; Lima, 1996) testaram-se outras concentrações e métodos (ver Tabela 2.5). No entanto e de acordo com Praveen-Kumar & Tarafdar (2003) (que obteve resultados positivos de 90,9 % para o caso das bactérias, de 85,7 % para os actinomicetes e de somente 4,9 % no caso dos fungos) não se obtiveram resultados satisfatórios para os diferentes métodos e concentrações de TTC. Em contraponto, utilizou-se uma cultura pura de *S. cerevisiae* com a qual se obteve resultados positivos satisfatórios com os mesmos métodos e concentrações de TTC utilizados com os fungos.

3.3.4 Ensaios com CTC

O CTC é um monotetrazólio que quando reduzido produz um formazano fluorescente (CTF), o qual quando iluminado por uma luz ultravioleta (> 350 nm) emite uma cor intensa

vermelho fluorescente. Este mecanismo de acção permite identificar precocemente o crescimento de microrganismos pois a actividade celular é detectada.

Não são apresentados resultados pois com este método não conseguimos obter qualquer tipo de resultados.

O uso do reagente CTC é referido como um método eficaz e rápido para detectar o crescimento em aplicações com bactérias por alguns autores (Yu *et al.*, 1995; Kawai *et al.*, 1999; Bhupathiraju *et al.*, 1999; Gruden *et al.*, 2003; Nielsen., 2003). No entanto, neste trabalho não se conseguiu implementar um método eficaz para detectar o crescimento de fungos filamentosos.

3.4 Técnicas Fluorescentes

O uso de fluorocromos permite a detecção da presença de fungos de forma quase imediata. Com o uso de técnicas tradicionais de isolamento só é possível a detectar a presença de fungos em alguns dias enquanto que com o uso de fluorocromos o conseguimos em apenas alguns minutos.

O Calcofluor™ White M2R é um corante fluorescente que cora a parede celular dos fungos filamentos em azul. Este corante pode ser utilizado em simultâneo com o corante de viabilidade FUN®1, o qual sendo um corante de viabilidade no permite obter informações adicionais sobre o estado metabólico do espécimen.

Na Figura 3.22 apresenta-se amostras de *Penicillium brevicompactum* crescido em meio MEA liquido coradas com Calcofluor™ White M2R. Para a observação utilizou-se um microscópio de epifluorescência Axioskop (Carl Zeiss) equipado com objectiva 40X/0,30 usando luz UV.

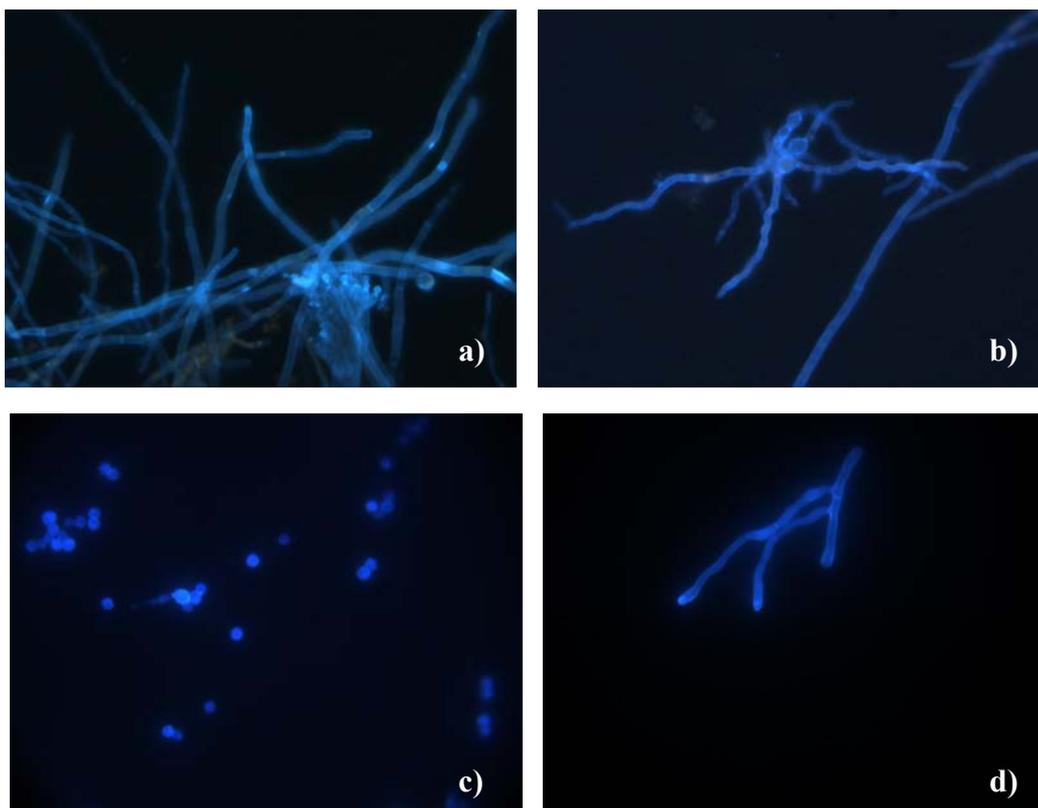


Figura 3.22 – Aspecto morfológico estruturas das de *P. brevicompactum* em cultura pura corado com Calcofluor™ White M2R, observadas em microscópio de epifluorescência Axioskop (Carl Zeiss) usando a objectiva 40X/0,30.

Na Figura 3.23 apresenta-se amostras de *Penicillium brevicompactum* crescido em meio MEA líquido coradas com FUN®1. Para a observação utilizou-se um microscópio de epifluorescência Axioskop (Carl Zeiss) equipado com objectiva 10X/0,65 e 40X/0,30 usando filtros adequados (EX 450/490 nm).

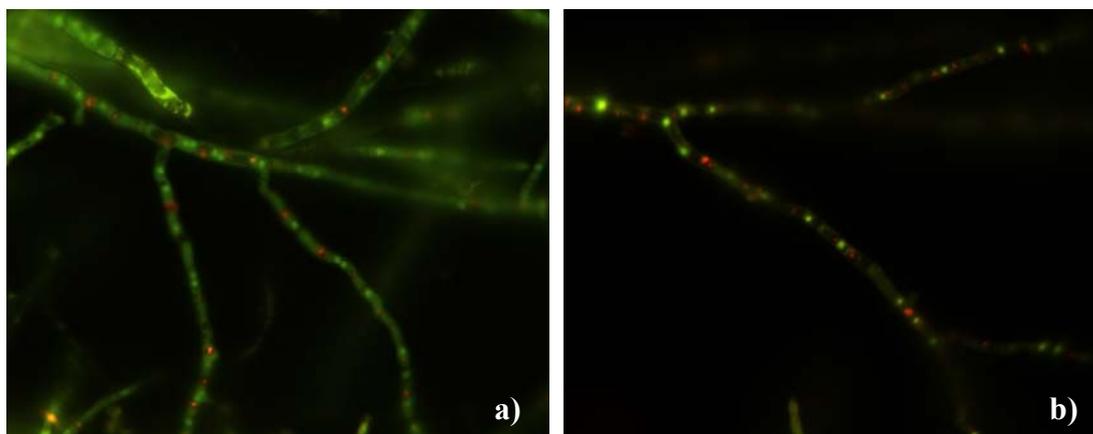


Figura 3.23 - Aspecto morfológico estruturas de *P. brevicompactum* em cultura pura corado com Calcofluor™ White M2R, observas em microscópio de epifluorescência Axioskop (Carl Zeiss) usando a objectiva 40X/0,30.