

Capítulo 4

Conclusões

4 Conclusões

Entre as espécies de fungos mais comuns no solo encontramos *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*; *Fusarium*, *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Trichoderma* (Ferreira *et al.*, 1998). Como a maioria das espécies isoladas possuem com *habitat* natural o solo supõem-se que a sua presença na água seja mais ou menos um acidente. Os fungos dispersam-se no ar onde os esporos podem alcançar concentrações muito elevadas. Podendo entrar nos sistemas de distribuição e engarrafamento de água durante a construção e trabalhos de reparo, contacto do ar com a água armazenada em reservatórios, entre muitas outras causas possíveis. No caso particular dos sistemas de engarrafamento para além do meio ambiente também materiais como garrafas e cápsulas necessitam de ser rigorosamente controlados para não contaminarem a água com microrganismos entre os quais os fungos.

Kelley *et al* (2002) refere que os 16 géneros isolados com maior frequência na água para consumo humano são: *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cândida*, *Cladosporium*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phialophora*, *Phoma*, *Rhodotorula*, *Thichoderma* e *Verticillium*.

No decorrer deste trabalho os géneros mais isolados em maior número foram: *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%. 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. roquefortii* (4%), *P. aurantiogriseum* (2%), *P. crustosum* (2%), *P. minioluteum* (2%), *P. paxilli* (2%) e todas as outras espécies por 11%.

O *P. brevicompactum* foi a estirpe escolhida para servir de padrão para simplificar a implementação dos diferentes protocolos. Esta escolha deveu-se ao facto desta estirpe ser a isolada em maior número e ainda por a sua presença dentro de uma empresa da área alimentar representar um estado de higiene algo precário.

O método “Baiting” é utilizado para isolar fungos zoospóricos incluindo os oomycetes. No entanto, nenhum deste tipo de fungos foi isolado, só se isolaram estirpes do género *Penicillium*.

Os resultados referentes as amostras de biofilme recolhidas nos bico de enchimento revelam que os fungos filamentosos estão presentes nos biofilmes. No entanto, nada nos revelam acerca da sua integração e desenvolvimento dentro do mesmo.

As alterações efectuadas no meio NGRBA no que diz respeito à 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. Por isso, optou-se por utilizar nos restantes ensaios o meio nutricionalmente mais fraco, representado pela letra M (concentrações de glucose e neopeptona de 1 g.L⁻¹). Esta escolha deveu-se ao facto deste meio ser economicamente mais favorável e por outro lado 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.

Pode-se considerar, por isso, o meio NGRBA é dos três o melhor meio para a enumeração e isolamento de fungos filamentosos. As suas características devem-se aos compostos clorotetraciclina (aureomicina) e rosa de Bengala. A clorotetraciclina é um antibiótico bacteriostático (Ferreira *et al.*, 1998), por sua vez o rosa de Bengala retarda o crescimento radial das colónias dos fungos filamentosos que pode provocar a descaracterização ou mesmo a inibição de todas as colónias presentes na placa de crescimento.

O sal de tetrazólio MTT quando adicionado ao meio NGRBA revelou-se como uma melhoria no mesmo permitindo reduzir em metade do tempo a detecção e enumeração de fungos filamentosos em amostras de água. No entanto os ensaios com outros dois reagentes, CTC e TTC, não permitiram uma implementação de sucesso.

Praveen-Kumar & Tarafdar (2003) sugerem que o sistema de desidrogenase da maioria dos fungos filamentosos não é capaz de usar o TTC como aceitador de electrões. No entanto, a hipótese de uma fraca difusão deste composto dentro da parede e membrana celular deste tipo de organismos também é ponderada para explicar a não redução de TTC pelos fungos. Esta última hipótese também foi ponderada no decorrer deste trabalho e ponderou-se a possibilidade de recorrer a um agente permeabilizante. No entanto, a limitação do tempo não permitiu testar este método mas poderá ser um bom ponto de partida para trabalhos futuros.

O uso de fluorocromos permite a detecção de fungos filamentosos em amostras de água em poucas horas. Para além disso o uso de um corante de viabilidade (FUN[®]1) permite ainda saber o seu estado metabólico. No entanto, é uma técnica que necessita de um forte

investimento para a sua implementação e formação por parte do operador da técnica. Por esse motivo não é de fácil implementação na rotina laboratorial num laboratório de controlo de qualidade.

No presente trabalho o principal objectivo era 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 a 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.

O meio NGRBA é um meio apropriado para enumerar e isolar fungos filamentosos. A composição do mesmo ao ser alterada na composição das fontes de carbono e azoto tornando economicamente mais atractivo ser 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 por parte do operador.

Os principais objectivos foram atingidos e este trabalho pode servir de suporte para posterior desenvolvimento e implementação destas técnicas como parte integrante na detecção de fungos filamentosos num laboratório “comercial”.

