

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

Danielle Machado Pagani

**METATAXONOMIA, PERFIL DE VIRULÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE A
ANTIFÚNGICOS DE LEVEDURAS VERDADEIRAS E FUNGOS SEMELHANTES A
LEVEDURAS EM UM AMBIENTE AQUÁTICO EM REGIÃO SUBTROPICAL DA
AMÉRICA DO SUL**

**Porto Alegre
2021**

Danielle Machado Pagani

**METATAXONOMIA, PERFIL DE VIRULÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE A
ANTIFÚNGICOS DE LEVEDURAS VERDADEIRAS E FUNGOS SEMELHANTES A
LEVEDURAS EM UM AMBIENTE AQUÁTICO EM REGIÃO SUBTROPICAL DA
AMÉRICA DO SUL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patricia Valente
Co-orientadores: Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia
Scroferneker; Prof. Dr. Ng Haig They

**Porto Alegre
2021**

CIP - Catalogação na Publicação

Machado Pagani, Danielle

METATAXONOMIA, PERFIL DE VIRULÊNCIA E
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE LEVEDURAS
VERDADEIRAS E FUNGOS SEMELHANTES A LEVEDURAS EM UM
AMBIENTE AQUÁTICO EM REGIÃO SUBTROPICAL DA AMÉRICA DO
SUL / Danielle Machado Pagani. -- 2021.

121 f.

Orientadora: Patricia Valente da Silva.

Coorientadores: Maria Lúcia Scroferneker, Ng Haig
They.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e
do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Ambiente. 2. Fungos . 3. Leveduras. 4.
Resistência a antifúngicos. 5. Metataxonômica. I.
Valente da Silva, Patricia, orient. II. Lúcia
Scroferneker, Maria, coorient. III. Haig They, Ng,
coorient. IV. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“...we don't get to choose our warts. They are part of us, and we have to live with them.”

- Max, 2009.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à orientadora Professora Patrícia Valente pela confiança em mim e no meu trabalho, por ter me aceitado no laboratório, ter me dado liberdade para desenvolver o trabalho e por sempre se mostrar solícita em ajudar. A Professora Maria Lúcia Scroferneker, minha co-orientadora, por sempre ter acompanhado meu trabalho, dia-a-dia e pelo suporte durante todo o tempo. Minha amiga e mãe do coração. Ao meu co-orientador Ng Haig They pelos ensinamentos, por ser sempre tão atencioso com as necessidades do trabalho, por ser um professor/pesquisador humano e empático.

Aos meus pais Jorge Pagani, Marione Machado Pagani e minha vó Cenira Zambarda Machado por todo o suporte, apoio e torcida! Ao meu namorado/noivo/marido Wagner Massayuki Nakasuga por ser essa pessoa maravilhosa, iluminada e companheira. Grata ao universo que permitiu esse encontro e a Skylar que nos uniu. Agradeço a minha amiga Fernanda Gomes que sempre esteve comigo e foi tão importante nessa trajetória.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento do projeto e com conversas e desabafos acompanhados de café como as colegas Daiane Heidrich, Belize Leite, Audren Monteiro, Iasmin Rios, Carine Tavares, ao MAPA e ajuda de Louise Jank, ao CECLIMAR. Agradeço as técnicas do Laboratório de análises químicas e biologia do pescado: Gabriela Millani e Cacinele Rocha, e ao Loreci pelas ajudas com as coletas de barco. Sou grata por todo o apoio recebido e que foi essencial dos colegas Amanda Ribeiro, Fabiana Tormente, Mariane Lobato, Paulo Cezar Moraes, Alessandra Koehler e Micaela Federizzi pela troca maravilhosa. E a todos que passaram pelo Laboratório 325 - Laboratório de Micologia durante o desenvolvimento da tese. Agradeço ao pessoal da limpeza, agradeço a Eladir, secretária do PPGMAA por sempre ser atenciosa com todas as necessidades que tive. E agradeço a mãe UFRGS pelos quase dez anos de casa e todas as oportunidades que me ofereceu e foram muitas desde a graduação! Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida nesses anos de doutorado no Brasil e também pela bolsa PDSE.

Metataxonomia, perfil de virulência e susceptibilidade a antifúngicos de leveduras verdadeiras e fungos semelhantes a leveduras em um ambiente aquático em região subtropical da América do Sul ¹

Autor: Danielle Machado Pagani

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patricia Valente

Co-orientadores: Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Scroferneker

Prof. Dr. Ng Haig They

RESUMO

As Lagoas são um ecossistema frágil, utilizado por várias espécies como refúgio e zona de reprodução, sendo também local de desenvolvimento da pesca em certas comunidades. Com a crescente urbanização em torno desse ecossistema, os pesticidas usados na agricultura e as águas residuais urbanas não tratadas são drenados para a bacia do rio, dispersando a matéria orgânica e os antifúngicos usados pela população e pelos agricultores. Esse fato pode favorecer a seleção de patógenos diretamente no meio ambiente e fazendo com que diversos fungos resistentes tenham surgido nas últimas décadas. Para investigar a presença de leveduras potencialmente patogênicas e entender a sua presença no ambiente, amostras de água de 4 pontos em 4 coletas sazonais, nas estações seca e chuvosa, foram analisadas para a presença de pesticidas através do sistema SPE-LC-ESI-MS / MS, e as leveduras ambientais foram isoladas da lagoa. Um meio seletivo contendo antifúngicos foi utilizado para isolar leveduras com possível resistência aos antifúngicos. Isolados com concentração inibitória mínima elevada e perfil enzimático de virulência foram recuperados, além da identificação de agentes antifúngicos como triciclazol, carbendazim, azoxistrobina, tiabendazol e tebuconazol na lagoa em amostras de água. Caracterizando o ambiente como reservatório de possíveis genes de resistência e fonte de infecção fúngica. Amostras de duas coletas foram utilizadas para a análise de metataxonômica utilizando o gene ITS como marcador. A primeira análise foi realizada com Íon Torrent em amostras compostas de cada um dos quatro pontos analisados. A segunda análise foi realizada através da plataforma Illumina em triplicata para cada uma das amostras. Através de análises das sequências obtidas, em ambas as abordagens podemos perceber a grande diversidade de fungos ainda não descritos em ambientes aquáticos e a sua variação sazonal.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (166 p.) dez, 2021.

Metataxonomy, virulence profile and antifungal susceptibility of true yeasts and yeast-like fungi in an aquatic environment in a subtropical region of South America ¹

Autor: Danielle Machado Pagani

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patricia Valente

Co-orientadores: Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Scroferneker

Prof. Dr. Ng Haig They

ABSTRACT

Lagoons are a fragile ecosystem, used by several species as a refuge and breeding area, and are also a place for fishing development in certain communities. With increasing urbanization around this ecosystem, pesticides used in agriculture and untreated urban wastewater are drained into the river basin, dispersing organic matter and antifungals used by the population and farmers. This fact may favor the selection of pathogens directly in the environment and cause several resistant fungi to have emerged in recent decades. Water samples from 4 points in 4 seasonal collections in the dry and rainy seasons were analyzed for the existence of pesticides in the environment using the SPE-LC-ESI-MS system. / MS and environmental yeasts were isolated from the pond. A selective medium containing antifungals was used to isolate yeasts with possible antifungal resistance. Isolates with high minimum inhibitory concentration and enzymatic virulence profile were recovered. Also, antifungal agents such as tricyclazole, carbendazim, azoxystrobin, thiabendazole, and tebuconazole were identified in the lagoon in water samples. These findings characterize the environment as a reservoir of possible resistance genes and a source of fungal infection. Samples from two field sampling were used for metataxonomic analysis using the ITS gene as a marker. The first analysis was performed with Ion Torrent in composed samples of each of the four analyzed points. The second analysis was performed using the Illumina platform in triplicate for each sample. Through analysis of the sequences obtained, we can perceive the great diversity of fungi not yet described in aquatic environments and their seasonal variation.

¹Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (166 p.) Dez, 2021.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1. AMBIENTES LAGUNARES.....	19
3.2 LEVEDURAS EM AMBIENTE AQUÁTICO.....	20
3.2.1 Diversidade	21
3.2.1.1 Filo Ascomycota.....	23
3.2.1.1.1 <i>Subfilo Saccharomycotina</i>	24
3.2.1.1.2 <i>Subfilo Pezizomycotina</i>	24
3.2.1.1.3 <i>Subfilo Taphrinomycotina</i>	25
3.2.1.2 Filo Basidiomycota.....	25
3.2.1.2.1 <i>Subfilo Pucciniomycotina</i>	25
3.2.1.2.2 <i>Subfilo Agaricomycotina</i>	26
3.2.1.2.3 <i>Subfilo Ustilaginomycotina</i>	26
3.3 FUNGOS EMERGENTES.....	27
3.4 RESISTÊNCIA A DROGAS ANTIFÚNGICAS.....	28
3.4.1. Azois	30
3.4.2 Alilaminas	32
3.4.3 Polienos	33
3.4.4 Equinocandinas	35
3.5 RESISTÊNCIA CRUZADA ENTRE ANTIFÚNGICOS.....	36
3.6 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	37
3.7 METAGENÔMICA.....	39
3.7.1 Sequenciamento de alto rendimento	39
3.7.1.1 Íon Torrent.....	39
3.7.1.2 Illumina.....	40
3.8. PESTICIDAS E IMPACTO AMBIENTAL.....	40
3.9 ABORDAGEM <i>ONE HEALTH</i>	41
4. MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 COLETAS.....	43
4.2 ISOLAMENTO DE LEVEDURAS.....	44
4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS ISOLADAS.....	44
4.4 ENSAIO DE RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA ..	46
4.5 ANÁLISE DE PESTICIDAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA.....	47
4.6 TESTES ENZIMÁTICOS.....	48
4.6.1 Meio gelatinase em tubo	48

4.6.2 Meio DNase	49
4.6.3 Meio lipase	49
4.6.4 Meio urease	50
4.6.5 Meio fosfolipase	50
4.6.6 Meio protease	51
4.6.7 Meio queratinase	51
4.7 COLETA E PROCESSAMENTO DE DADOS META-TAXONÔMICOS	52
4.7.1 Plataforma Íon Torrent: processamento e análises	52
4.7.2 Plataforma Illumina: processamento e análise	53
4.9 CITÔMETRO DE FLUXO NA IDENTIFICAÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO	55
4.10. TESTES BIOQUÍMICOS PARA DESCRIÇÃO DE POSSÍVEL ESPÉCIE NOVA	55
4.11 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, COLONIAL E CELULAR	56
4.12 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA	56
4.12.1 Fermentação	57
4.12.2 Fontes de carbono	57
4.12.3 Fontes de nitrogênio	58
4.12.4 Teste de urease	58
4.12.5 Teste de crescimento a diferentes temperaturas	58
4.12.6 Teste de tolerância a NaCl 10%	58
4.12.7 Produção de compostos amilóides	59
5. ARTIGOS	60
5.1. ARTIGO 1	60
5.2. ARTIGO 2	61
5.3 RESULTADOS NÃO APRESENTADOS NA FORMA DE ARTIGO	79
5.3.1 Análise de pesticidas em amostras de água	79
5.3.2 Citômetro de fluxo na identificação de bombas de efluxo	80
5.3.3 Caracterização para a descrição de possível espécie nova de levedura	81
5.3.3.1 Caracterização molecular.....	81
5.3.3.2 Morfologia colonial e celular.....	83
5.3.3.3 Caracterização bioquímica.....	84
5.3.4 Metataxonômica por Íon Torrent	87
6. DISCUSSÃO GERAL	92
7. CONCLUSÃO	99
8. REFERÊNCIAS	100
APÊNDICE A	117
APÊNDICE B	118
APÊNDICE C	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos pesticidas encontrados por ponto e coleta.....	79
Tabela 2. Resultados dos testes de caracterização bioquímica para assimilação de fontes do isolado LT49.....	85
Tabela 3. Resultados dos testes de caracterização bioquímica do isolado LT49.....	86
Tabela 4. Número de reads e OTUs obtidos por estação amostrada.....	87
Tabela 5. Número de OTUs identificados por ponto e diversidade compartilhada entre os pontos.....	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diversidade em nível de filo estimado de acordo com o ambiente. Retirada e traduzida do artigo de James et al. (2020).....	23
Figura 2. Estruturas dos agentes antifúngicos. Fonte: Ghannoum et al. (1999).....	30
Figura 3. Mecanismo de 14 α -desmetilação do lanosterol pela 14 α -desmetilase dependente de CYP51. Fonte: Emami et al. 2017.....	31
Figura 4. Gráfico gerado pelo citômetro de fluxo onde verde representa o inóculo controle, azul representa o inóculo acrescido de terbinafina, laranja representa o inóculo acrescido de clorexidina e preto é o inóculo com terbinafina acrescido de verapamil.....	80
Figura 5. Árvore filogenética utilizando a região D1/D2 do LSU rDNA pelo algoritmo de <i>maximum likelihood</i>	82
Figura 6. Árvore filogenética utilizando a região ITS rDNA pelo algoritmo de <i>maximum likelihood</i>	82
Figura 7. Morfologia colonial. A. Cultivo em ágar YPD marcado em vermelho; B. Cultivo em ágar batata após exposição ao frio.....	83
Figura 8. Microscopia a fresco, aumento 100x. A. Morfologia celular; B. Célula com brotamento (marcado).....	84
Figura 9. Identificação da riqueza de OTUs por estação.....	88
Figura 10. Porcentagem total dos filós encontrados na laguna nas duas estações.....	89
Figura 11. Abundância dos principais grupos encontrados na laguna Tramandaí dividido por estação.....	89
Figura 12. Diversidade relacionada com os dados físico-químicos mais importantes.....	91

ARTIGO 2:

Figura 1. Localização da área de estudo no mapa e pontos de amostragem da laguna Tramandaí.....	63
Figura 2. Número de OTUs e reads por ponto após a filtragem e alinhamento com o UNITE.....	66
Figura 3. Diagrama de Venn das OTUs presentes nos pontos amostrados.....	67
Figura 4. Prevalência de filo da laguna Tramandaí.....	68
Figura 5. Relação da diversidade alfa com a salinidade.....	70
Figura 6. Relação da diversidade alfa com a DBO.....	70
Figura 7. Relação da diversidade alfa com a temperatura da água.....	71
Figura 8. <i>Heatmap</i> relacionado à classe e parâmetros físico-químicos, com destaque para os pontos 1 e 2.....	72
Figura 9. <i>Heatmap</i> relacionando família e parâmetros físico-químicos. Pontos 1(S01, S02 e S03) e 2 (S04, S05 e S06).....	73
Figura 10. Dendrograma dos pontos amostrados. Índice de similaridade de Bray-Curtis.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMB	Anfotericina B
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CAS	Caspofungina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FLZ	Fluconazol
ITS	Internal Transcribed Spacer
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatograph - Mass Spectrometer/Mass Spectrometer</i>
LSU	<i>Large Subunit</i>
M	Molar
mL	Mililitro
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
OD	Oxigênio Dissolvido
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
rDNA	<i>Ribosomal DNA</i>
RNA	Ribonucleic acid
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute (medium)</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBZ	Tebuconazol
x g	Força g
µL	Microlitro

1. INTRODUÇÃO

As atividades humanas e a crescente urbanização nas zonas costeiras exercem pressão sobre corpos d'água como estuários e lagoas. Esses ecossistemas desempenham um papel ecológico fundamental por apresentarem alta produtividade primária e funcionar como berçário para muitas espécies, apoiando a pesca e proporcionando áreas de lazer. Essas pressões antrópicas podem causar efeitos cumulativos no meio ambiente, afetando negativamente o ecossistema e suas espécies em diferentes graus.

Grandes esforços vêm sendo dedicados para compreender a resistência bacteriana aos antimicrobianos, e a resistência dos fungos surgiu como uma preocupação mais recente, uma vez que se reconhece que mais de 2 milhões de pessoas foram afetadas por doenças fúngicas invasivas e morte anualmente. O número já superou o câncer de mama e a malária como causas de morte, e as taxas de mortalidade podem ser comparadas às taxas de HIV e da tuberculose. Esse fato causa preocupação ambiental, principalmente porque há cerca de nove vezes mais compostos antifúngicos usados na agricultura do que para tratar infecções médicas. Portanto, os ecossistemas fortemente impactados pela agricultura podem apresentar o maior potencial para abrigar fungos resistentes a antifúngicos.

Localizada na planície costeira do sul do Brasil, a bacia do rio Tramandaí é composta por 41 lagos, muitos deles interligados por rios e canais, que drenam para uma única desembocadura no Oceano Atlântico através da lagoa de Tramandaí. Essa bacia é amplamente impactada pelo escoamento da agricultura, principalmente do cultivo de arroz, cultura que emprega fungicidas relacionados a medicamentos antifúngicos, o que pode resultar em pressão seletiva por alguns patógenos resistentes a medicamentos (SNELDERS et al., 2012). A lagoa Tramandaí, localizada no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, tem sofrido impactos humanos, como lavoura (pastagem e agricultura), urbanização, mineração e também descarte de esgoto urbano não tratado e agrotóxicos de toda a bacia hidrográfica

(LOITZENBAUER e MENDES, 2012), sendo um ambiente adequado para investigar a presença de resistência entre espécies de fungos.

A resistência a antifúngicos tem sido considerada um *hot topic* na micologia médica devido a patógenos emergentes (MORIO, 2017). Considerando que o conhecimento da ecologia das leveduras de água doce ainda é incipiente e apresenta lacunas (MEDEIROS et al., 2012), neste estudo, nos concentramos na resistência a antifúngicos por leveduras.

É importante ressaltar que os neotrópicos são uma das regiões de espécies mais ricas do globo (ANTONELLI et al., 2018). No entanto, ainda permanece a região menos explorada quando o assunto é microbiologia (NOUHRA et al., 2018). Com o uso de novas abordagens moleculares, estima-se que existam 0,6 a 5,1 milhões de espécies de fungos em todo o mundo (BLACKWELL, 2011; KHOMICH et al., 2018). Mas mesmo com o avanço das ferramentas moleculares, a região Neotropical permanece menos explorada do que outras áreas ao redor do globo. O sequenciamento de alto rendimento demonstrou uma grande diversidade de fungos não cultivados e não descritos, que foram chamados de *dark matter* fúngica (GROSSART et al., 2016). Essa diversidade de fungos pode ser extinta antes mesmo de ser descrita, uma vez que as ameaças atuais à biodiversidade, causadas por mudanças climáticas e perda de habitat, têm ocorrido rapidamente (TRUONG et al., 2017).

O conceito One Health refere-se à indissociabilidade da saúde humana, animal e ambiental. Onde a qualidade de vida das populações e a sua saúde dependem de um meio ambiente ecologicamente equilibrado (COUTO e BRANDESPIM, 2020). Uma das consequências da mudança desse equilíbrio é o surgimento da resistência antimicrobiana, sua disseminação na cadeia alimentar e no meio ambiente. Compreender o papel que os setores de alimentos, da agricultura e do meio ambiente desempenham na resistência antimicrobiana é crucial na prevenção de infecções e no futuro desenvolvimento e disseminação da resistência antimicrobiana (WALSH, 2018). Os custos dessa vigilância integrada são compensados pelos custos da resistência descontrolada e os benefícios decorrentes de intervenções e resultados (QUEENAN et al., 2016). Este estudo investigou a

resistência a antifúngicos de leveduras ambientais e seu perfil de virulência, relacionando com a presença de antifúngicos nas águas naturais. Por fim, avaliamos a diversidade de leveduras por metagenômica, com a finalidade de obter um retrato mais abrangente sobre a comunidade fúngica local.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a resistência a antifúngicos de leveduras ambientais e seu perfil de virulência, relacionando com a presença de antifúngicos pesticidas nas águas naturais. E avaliar a diversidade de fungos por metagenômica, com a finalidade de obter um retrato mais abrangente sobre a comunidade fúngica local.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Caracterizar a diversidade de leveduras através de cultivo e técnica de metagenômica durante inverno e verão.

2.2.2 Caracterizar os pontos amostrados quanto aos parâmetros físico-químicos.

2.2.3 Caracterizar a laguna quanto a presença de pesticidas agrícolas.

2.2.4 Caracterizar enzimaticamente o perfil de virulência das leveduras isoladas.

2.2.5 Caracterizar as leveduras presentes na laguna quanto à resistência a antifúngicos durante duas estações: inverno e verão.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. AMBIENTES LAGUNARES

As lagoas são onipresentes e representam cerca de 13% dos litorais no mundo todo (BARNES, 1980). A produtividade dos ecossistemas lagunares, dada às suas funções biogeoquímicas insubstituíveis (CHEN et al. 2021), é historicamente reconhecida mundialmente. Seus recursos naturais têm sido explorados há muitos séculos, sustentando a vida humana a partir da pesca, da coleta de plantas e algas, da extração de sal e da aquicultura. A zona costeira possui alta densidade populacional, conseqüentemente bastante vulnerável à pressão humana (SOUZA e VAL, 2016). Aproximadamente 17% da população global vive na zona costeira de baixa elevação (<10 m de elevação e em um raio de 100 km da costa) e, aproximadamente, 50% da população global vive a menos de 200 km da costa (UNITED NATIONS, 2017). Portanto, é inquestionável a relevância do ambiente aquático e seu papel de suporte do processo sócio-econômico (CHEN et al. 2021).

No Sul do Brasil, o conjunto de lagoas da Planície Costeira faz parte de um ecossistema com grande diversidade, que integra áreas terrestres em sintonia com uma riqueza de corpos de água doce próximos ou que nelas deságuam. Como espaço de transição entre a terra e o mar, as lagoas costeiras são consideradas alguns dos ecossistemas mais frágeis, particularmente expostas aos efeitos das mudanças climáticas (LLORET et al., 2008; DE WIT et al., 2011). No Oceano Atlântico, juntos formam uma paisagem bastante distinta (SCHÄFER et al., 2009).

Localizada na planície costeira do sul do Brasil, a bacia do rio Tramandaí é composta por 41 lagos, muitos deles interligados por rios e canais, que drenam para uma única desembocadura no Oceano Atlântico através da lagoa de Tramandaí, que se originou durante transgressões marinhas no Holoceno (SCHWARZBOLD e SCHÄFER, 1984; HOLZ, 1999). Essa bacia é amplamente impactada pelo escoamento superficial da agricultura, principalmente do cultivo de arroz, cultura que emprega fungicidas quimicamente relacionados a medicamentos antifúngicos, o que pode resultar em pressão seletiva cruzada por alguns patógenos

resistentes a medicamentos (SNELDERS et al., 2012). As bacias hidrográficas em áreas costeiras podem ter sua população humana duplicada durante o verão. A lagoa de Tramandaí tem sofrido impactos humanos, como lavoura (pastagem e agricultura), urbanização, mineração, também recebe águas residuais urbanas não tratadas e agrotóxicos de toda a bacia hidrográfica (LOITZENBAUER e MENDES, 2012).

3.2 LEVEDURAS EM AMBIENTE AQUÁTICO

Os fungos aquáticos são cosmopolitas e podem ser encontrados nas mais variadas condições ambientais de temperatura, pressão, pH e disponibilidade de nutrientes. Sabe-se que as populações de leveduras podem ser diretamente afetadas pela disponibilidade de matéria orgânica e a distribuição das espécies é afetada também pela temperatura e a salinidade (FELL e VAN UDEN, 1963; PÉTER e ROSA et al., 2006). Assim como no ambiente marinho, leveduras presentes em corpos de água doce pertencentes ao filo Ascomycota predominam sobre leveduras do filo Basidiomycota. Mas o conhecimento da ecologia de leveduras de água doce ainda é incipiente e apresenta lacunas quanto à diversidade e padrões de distribuição (MEDEIROS et al., 2011). As leveduras em ambiente aquático ocorrem de forma planctônica na coluna de água, ou aderidas a substratos como animais e plantas. São um grupo pouco estudado quanto a sua riqueza e padrões de distribuição. Fazer a distinção entre leveduras verdadeiramente aquáticas e aquelas ocasionais ainda é um desafio, principalmente pela falta de estudos nos fatores limitantes de distribuição dos táxons (LIBKIND et al., 2017). Embora muitas das espécies de levedura coletadas dos corpos d'água possam ser verdadeiramente espécies aquáticas, também é concebível que algumas espécies tenham atingido o ambiente aquático através do escoamento da bacia hidrográfica circundante. Essa distinção para leveduras recuperadas de ambientes aquáticos é sempre difícil, devido à falta de entendimento dos fatores limitantes da distribuição dos táxons (BUZZINI et al., 2017). A presença de leveduras foi reconhecida em todos os

oceanos do mundo, de regiões costeiras a ambientes *offshore* (incluindo superfície oceânica, águas profundas e sedimentos) (MOUTON et al., 2012). A primeira observação de leveduras na água do mar foi relatada por Fischer e Brebeck (1894).

A diversidade e a densidade populacional das leveduras estão intimamente relacionadas a condições físico-químicas da água (DEAK, 2009). A riqueza em ambiente tropical é normalmente maior do que em zonas temperadas e frias, o que está relacionado diretamente com a riqueza de animais e plantas desse ambiente. Poucos estudos foram feitos em estuários preservados. Os principais representantes de leveduras marinhas e costeiras pertencem ao filo Ascomycota e *Candida* é um dos gêneros mais comuns em zonas costeiras. Além dele, gêneros pertencentes ao filo Basidiomycota também podem ser encontrados, como *Rhodotorula* e *Cryptococcus* (KACHALKIN, 2014; HAGLER et al., 2017).

Embora membros do Basidiomycota também ocorram em água doce, apenas cerca de 40 espécies exclusivas desse ambiente foram descritas até o momento (EI-ELIMAT et al., 2021). As espécies frequentemente isoladas de Basidiomycota são *Aureobasidium pullulans*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Vishniacozyma victoriae* (antigo *Cryptococcus victoriae*). Em ambiente de transição, como os estuários, as espécies comumente isoladas são *Debaryomyces hansenii*, *Pichia membranifaciens*, *Candida* spp., *Papiliotrema laurentii*, *Naganishia albida* e *Rhodotorula mucilaginosa* (BUZZINI et al., 2017).

3.2.1 Diversidade

Atualmente, são reconhecidos 19 filos dentro do reino Fungi: Aphelidiomycota, Ascomycota, Basidiobolomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota, Calcarisporiellomycota, Caulochytriomycota, Chytridiomycota, Entomophthoromycota, Entorrhizomycota, Glomeromycota, Kickxellomycota, Monoblepharomycota, Mortierellomycota, Mucoromycota, Neocallimastigomycota, Olpidiomycota, Rozellomycota e Zoopagomycota (TEDERSO et al., 2018; WIJAYAWARDENE et al., 2020).

As leveduras pertencem ao subreino Dikarya, são microrganismos eucariontes e unicelulares. São classificadas em dois filos: Ascomycota e Basidiomycota (HITTINGER et al., 2015). A principal característica distinguível morfológicamente entre Ascomycota e Basidiomycota é o tipo de corpo de frutificação das formas sexuais (WYJAYAWARDENE et al., 2020).

Existem os fungos leveduriformes ou *yeast-like*, que são fungos filamentosos que se comportam morfológicamente como leveduras em temperaturas elevadas ou meios de cultivo abundantes em açúcares. A reprodução assexuada das leveduras dá-se por brotamento ou fissão binária. No grupo das leveduras marinhas, são conhecidos cerca de 35 gêneros e 138 espécies pertencentes ao filo Ascomycota, já o filo Basidiomycota contém 26 gêneros e 75 espécies (JONES et al., 2015). A diversidade de fungos varia conforme o ambiente, como podemos observar na figura 1 (JAMES et al., 2020).

A identificação de leveduras tem sido realizada através do sequenciamento da região D1/D2 do rDNA (LSU) e/ou região ITS. A região D1/D2 do genoma das leveduras é altamente conservada, mas apresenta diferenças suficientes para diferenciar indivíduos ao nível de espécie (FELL et al., 2000).

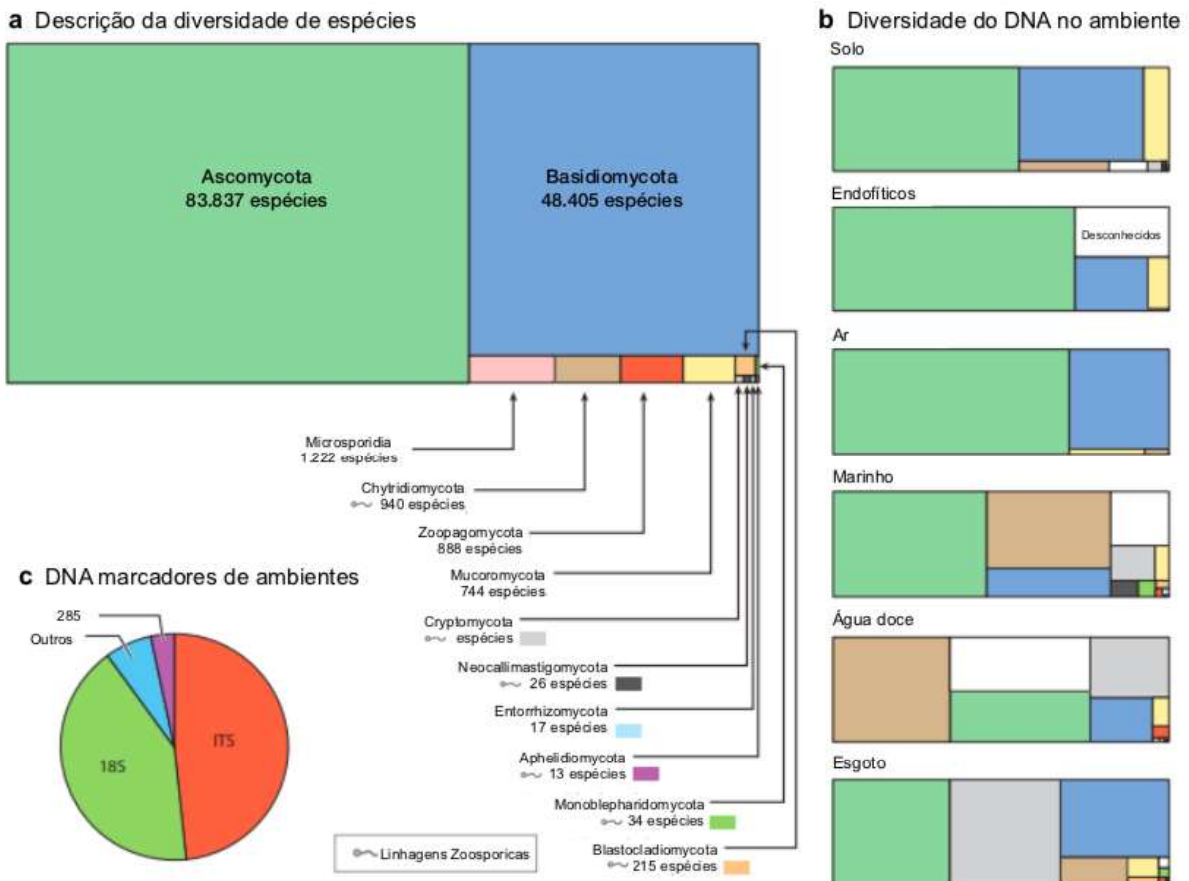


Figura 1. Diversidade em nível de filo estimado de acordo com o ambiente. Retirada e traduzida do artigo de James et al. (2020).

3.2.1.1 Filo Ascomycota

Os ascomicetos compõem um grupo monofilético, incluindo os fungos dimórficos conhecidos como *yeast-like* pertencentes ao filo Ascomycota. É considerado o maior filo do reino Fungi e o mais diverso e cosmopolita filo de eucariotos, podendo ser encontrado em ambientes extremos. Atualmente, é composto por 9.000 gêneros e 83.837 espécies descritas (WIJAYAWARDENE et al., 2020; JAMES et al., 2020).

Atuam na decomposição de diversos substratos e podem ser encontrados em mutualismo e parasitismo, podendo agir como patógenos em outros organismos. A sinapomorfia que diferencia os ascomicetos dos demais filós baseia-se na formação de ascósporo, onde esporos são produzidos através de meiose e

normalmente estão presentes oito esporos dentro das ascas. O filo Ascomycota é composto pelos subfilos Taphrinomycotina, Saccharomycotina e Pezizomycotina (SCHOCH et al., 2009). As leveduras marinhas dentro desse filo correspondem a 138 espécies e 35 gêneros. É o filo mais abundante em ambientes marinhos e costeiros (JONES et al., 2015).

3.2.1.1.1 Subfilo Saccharomycotina

O subfilo Saccharomycotina é uma linhagem que contém mais de 1000 espécies conhecidas. O subfilo Saccharomycotina é composto por uma única ordem (Saccharomycetales), representa os micro-organismos utilizados em atividades humanas, como fermentação de bebidas. Possui gêneros como *Kluyveromyces*, *Kodamea*, *Pichia*, *Meyerozyma*, *Yarrowia*, *Candida* e *Cyberlindnera*. Possuem crescimento unicelular e podem apresentar pseudo hifa ou hifa verdadeira, reprodução assexuada por fissão binária, brotamento ou por conidia. Nesse subfilo são classificadas as chamadas leveduras verdadeiras (JAMES et al., 2006; HIBBETT et al., 2007) e vários patógenos, como *Candida albicans* e o patógeno emergente multirresistente *Candida auris* (SHEN et al., 2020). Membros desse subfilo ocupam ambientes que possuem alta concentração de matéria orgânica (BLACKWELL et al., 2010).

3.2.1.1.2 Subfilo Pezizomycotina

Pezizomycotina é o maior subfilo dentro de Ascomycota e inclui a maioria dos fungos filamentosos. Contém 82.000 espécies descritas e 16 classes (SHEN et al., 2020). Apresenta elevada diversidade ecológica, tendo espécies que exibem função em diversos processos ecológicos e relações de simbiose (SPATAFORA et al., 2006). Contém a maioria dos patógenos de animais e plantas, como *Fusarium* e *Aspergillus* (SHEN et al., 2020). Também inclui as chamadas *black yeasts*, como *Hortaea werneckii* e espécies do gênero *Aureobasidium* (JAMES et al., 2006).

3.2.1.1.3 Subfilo Taphrinomycotina

Taphrinomycotina é considerado o mais antigo clado a divergir evolutivamente dentro do filo Ascomycota. Possui aproximadamente 140 espécies descritas em cinco classes (SHEIN et al., 2020). Inclui grupos diversificados de espécies de leveduras, *yeast-like* e fungos filamentosos. O grupo inclui táxons que têm sido centrais para as teorias evolutivas da origem de Ascomycota e Basidiomycota (JAMES et al., 2006; SUGIYAMA et al., 2006).

3.2.1.2 Filo Basidiomycota

O filo Basidiomycota contém uma grande diversidade de fungos e leveduras, estando dividido em três subfilos: Ustilaginomycotina, Pucciniomycotina e Agaricomycotina. A relação entre os três subfilos ainda pode ser considerada incerta e até o momento já foram descritas 48.405 espécies (JAMES et al., 2020).

A característica individualizante do filo baseia-se na formação de esporos sexuais, os basidiósporos e cada basídio possui dois esporos (ORTIZ-CASTELLANOS e RUIZ-HERRERA, 2015; BRONDZ, 2014). Basidiomycota é o filo menos representativo no ambiente marinho, mas é capaz de colonizar uma ampla gama de substratos (JONES e CHOYEYKLIN, 2008). Existem 75 espécies e 26 gêneros de leveduras marinhas conhecidas pertencentes a esse filo (JONES et al., 2015)

3.2.1.2.1 Subfilo Pucciniomycotina

O subfilo Pucciniomycotina engloba principalmente leveduras produtoras de compostos carotenóides, como por exemplo espécies do gênero *Rhodotorula*. Já foram descritas mais de 8.400 espécies (AIME et al., 2014). Foi considerado o subfilo ancestral de Agaricomycotina e Ustilaginomycotina. Possui o menor número de leveduras verdadeiras. Já foram recuperadas de solos, habitats de água doce e marinhos e dos ambientes ártico e tropical. A maioria das espécies são

caracterizadas como parasitas, tanto de plantas e insetos, como micoparasitas. Estão associados ao filoplano e a associações micorrízicas com orquídeas (AIME et al., 2014). Entretanto, a forma de vida sapróbia também é encontrada em linhagens como Microbotryomycetes. Como exemplo, existem as espécies *Rhodosporidium* sp., *Rhodotorula mucilaginosa* e *Sterigmatomyces halophilus* (AIME et al., 2006).

3.2.1.2.2 Subfilo Agaricomycotina

O subfilo Agaricomycotina é composto por espécies nutricionalmente distintas como: saprófitas, parasitas e espécies fúngicas. A classe Agaricomycetes abriga a maioria das espécies do filo Basidiomycota, com aproximadamente 30.143 espécies, distribuídas em 22 ordens, 128 famílias e 1434 gêneros (CAO et al., 2021). A maioria das espécies são dimórficas, mas existem algumas exceções, como *Cryptococcus*, *Bullera*, *Trichosporon* e *Fellomyces*. O subfilo Agaricomycotina possui um grande número de decompositores de madeira, lixo e fungos ectomicorrízicos, e algumas leveduras patogênicas a animais e humanos (HIBBET, 2006; MILLANES et al., 2011).

3.2.1.2.3 Subfilo Ustilaginomycotina

O subfilo Ustilaginomycotina apresenta-se composto principalmente por patógenos de plantas. Ainda existem espécies sapróbias dentro do subfilo (BOEKHOUT et al., 2011). São agrupadas em aproximadamente 115 gêneros e mais de 1700 espécies e estão restritas à distribuição de seu hospedeiro em regiões tropicais, temperadas e árticas (BEGEROW et al., 2014). Espécies de leveduras com potencial patogênico, como *Malassezia* spp., também são encontradas nesse subfilo (SILVA et al., 2018).

3.3 FUNGOS EMERGENTES

Uma característica comum entre os fungos é a capacidade de alterar sua morfologia em resposta a estímulos ambientais. Alguns exemplos bem conhecidos são os fungos termicamente dimórficos. Algumas espécies podem ainda produzir uma variedade de formas no hospedeiro que parecem ter funções no processo de infecção. Contudo, esse fenômeno não foi tão estudado como o dimorfismo térmico, mas pode ser importante para a compreensão da progressão e do desfecho da doença. Alguns fungos podem também alterar tamanho e forma das células, podendo variar entre as cepas e até mesmo entre as células individuais em populações geneticamente uniformes, fornecendo muitos níveis de variação dentro das espécies (FERNANDEZ e CARTER, 2020). As múltiplas estratégias evolutivas, para citar apenas estas ligadas à reprodução, como a moldabilidade genômica, a capacidade de transferência horizontal de genes e de recombinações dos mesmos, bem como a possibilidade de hibridização, índices reprodutivos acelerados e ciclos de dispersão resilientes, aceleram as habilidades adaptativas dos microrganismos (BALL et al, 2020). Essas características aumentam a sobrevivência dos fungos em diferentes nichos ambientais, aumentando a capacidade desses patógenos sobreviverem e causarem doenças em seu hospedeiro (FERNANDEZ e CARTER, 2020).

As influências das atividades humanas criam fatores subjacentes e moldam as adaptações dos fungos. Interferências potencialmente relacionadas às mudanças na temperatura global e à mobilidade humana na terra induzem fenômenos como o ocorrido com a espécie *Cryptococcus gattii*, comumente localizada em regiões tropicais e subtropicais, mas que causou um surto no Noroeste do Pacífico com virulência agressiva contra hospedeiros saudáveis e se espalhou continuamente pelo Norte Ocidental (MAZIARZ e PERFECT, 2018). Ao mesmo tempo não param de surgir desafios relativos ao controle de surtos de fungos perigosos, seja na área agrícola ou na área clínica. Supõe-se que as doenças fúngicas invasivas causem mais de 1,6 milhão de mortes anualmente e

infecções fúngicas superficiais epidérmicas acometem mais de 1 bilhão de pessoas globalmente. A frequência de cepas resistentes aos antifúngicos é inquietante e põe em evidência a necessidade de pesquisas eficazes, por vezes relacionada à falta de verba, o repertório terapêutico limitado e à ausência de vacinas disponíveis (ALMEIDA et al., 2019).

Houve um aumento preocupante no número de doenças fúngicas que afetam as populações de animais selvagens nas últimas décadas. Embora associadas principalmente a infecções oportunistas e autolimitadas em humanos, as doenças fúngicas da vida selvagem causaram algumas das crises de conservação mais importantes dos tempos modernos (FISCHER et al., 2012). Como exemplos, tivemos a perda global da diversidade de anfíbios devido à quitridiomicose, o declínio maciço da população de algumas espécies de morcegos devido à síndrome do nariz branco e uma severa infecção cutânea fatal em cobras *Crotallus horridus* causadas pelo fungo *Ophidiomyces ophiodiicola* nos Estados Unidos (LORCH et al., 2016).

3.4 RESISTÊNCIA A DROGAS ANTIFÚNGICAS

Em algumas condições, as leveduras ambientais e comensais podem causar infecções superficiais, invasivas e até letais ao ser humano e animais. Apesar de sua importância para a saúde humana, pouco se sabe sobre a ecologia desses patógenos oportunistas (OPULENTE et al., 2019). Polienos (Figura 2), azóis e equinocandinas representam as três classes mais comuns de antifúngicos usados na clínica, cada um com suas próprias vantagens e limitações. As alilaminas, como a terbinafina, normalmente são utilizadas para o tratamento de micoses superficiais. No geral, a toxicidade do hospedeiro, a reatividade cruzada com outros medicamentos e o desenvolvimento de resistência aos medicamentos representam grandes desafios para os antifúngicos atuais (POLVI et al., 2015).

Existem poucas classes de antifúngicos e os mecanismos de resistência dos fungos são complexos: bombas de efluxo, mutações pontuais (SNPs),

aneuploidia, rearranjos gênicos, entre outros. A ploidia e ciclo de vida dos fungos aumentam a complexidade dos estudos de mecanismos genéticos de resistência, com a existência de espécies com diferentes graus de ploidia, com alternância de estágios haploide e diploide, aneuploides naturais, híbridos naturais, etc. A aneuploidia e a perda de heterozigosidade são mudanças de genoma em grande escala envolvendo cromossomos inteiros ou os braços do cromossomos, normalmente ocorrem com maior frequência do que as mutações pontuais e têm o potencial de mediar a sobrevivência ao estresse. A exposição dos fungos a antifúngicos pode induzir níveis elevados de aneuploidia e alterar o número de cópias de genes que melhoram a sobrevivência a um determinado estresse ou medicamento. A seleção atua para aumentar a proporção de aneuploides adaptativos na população (WERTHEIMER et al., 2016). Atualmente, foram realizados alguns avanços na compreensão da relevância natural da reprodução assexuada e sexual, que podem levar ao alongamento repetido em tandem no gene alvo dos azóis: o gene *cyp51A* (ZHANG et al., 2021).

A recombinação parassexual em fungos, ou seja, a recombinação fora do ciclo sexual, foi sugerida como uma alternativa ao sexo na natureza para gerar diversidade em *Aspergillus fumigatus*, por exemplo (ZHANG et al., 2021). A aneuploidia em isolados clínicos de *C. albicans*, por exemplo, pode resultar em resistência aos azóis devido à superexpressão de *erg11* e das bombas de efluxo *cdr1* e *cdr2*, causadas pelo aumento no número de cópias do cromossoma 5, que contém o gene *ERG11* e o gene do fator de transcrição *TAC1*, regulador da expressão de *CDR1* e *CDR2* (SELMECKI et al., 2006).

O número de alvos exclusivos a serem explorados em fungos para desenvolvimento de drogas antifúngicas é limitado e isso se explica devido à relação evolutiva estreita entre fungos e humanos. Devido aos fatos relatados, mesmo as novas drogas antifúngicas de terceira geração como posaconazol e voriconazol tiveram sucesso modesto na redução das altas taxas de mortalidade associadas a doenças invasivas. Além disso, essas drogas também sofrem de restrições na via de administração, espectro de atividade e biodisponibilidade em tecidos-alvo (BROWN et al., 2012). Além dos problemas biológicos que se enfrenta ao tratar infecções

fúngicas, que limita o número de drogas antifúngicas, existe também a problemática do baixo retorno financeiro às empresas farmacêuticas (POLVI et al., 2015). As estimativas mostram que a infecção fúngica afeta cerca de 300 milhões de pessoas anualmente, seguida por 1,6 milhão de mortes (BEARDSLEY et al., 2018).

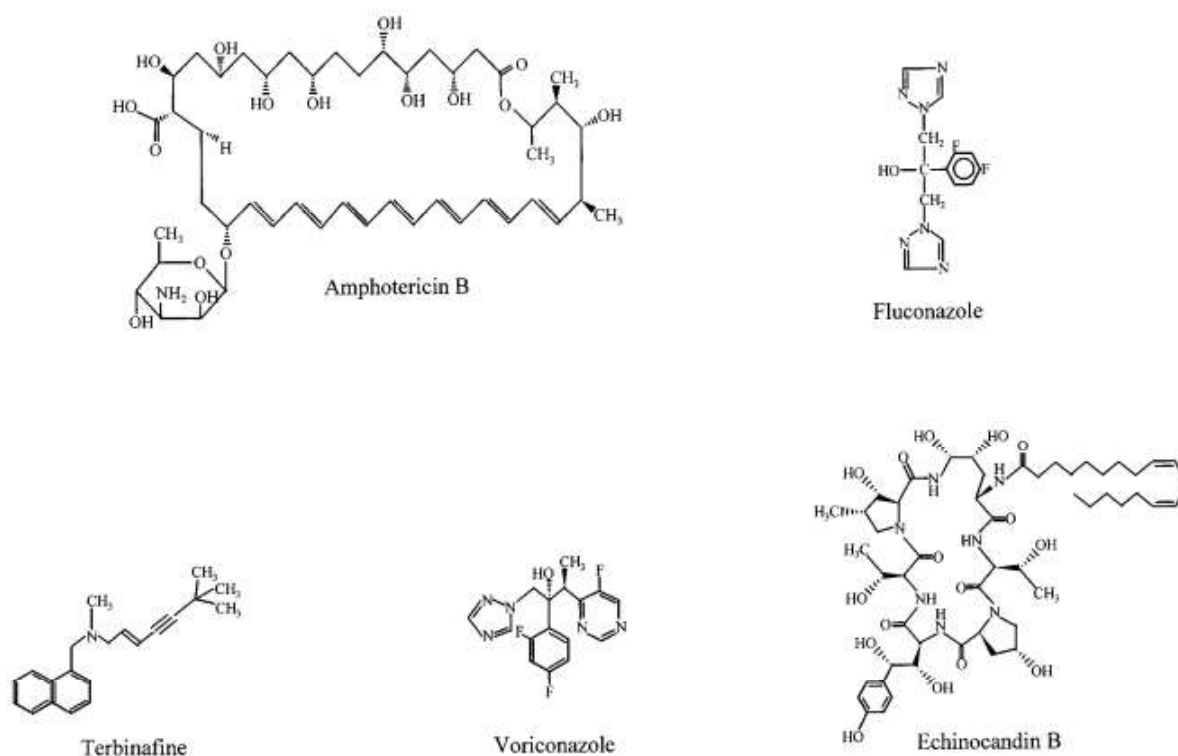


Figura 2. Estruturas dos agentes antifúngicos. Fonte: Ghannoum et al. (1999).

3.4.1. Azois

Azois são compostos sintéticos fungistáticos que foram introduzidos pela primeira vez como antifúngicos no final da década de 1980 e início da década de 1990 (GHANNOUM et al., 1999). A atividade antifúngica dos azois inibe dois citocromos P450 envolvidos na biossíntese de ergosterol, nomeadamente o P450, que catalisa a etapa de 14 α -desmetilação e lanosterol 14 α -desmetilase, codificado por ERG11 (CYP51) em fungos por atividade de uma monooxigenase (Figura 3).

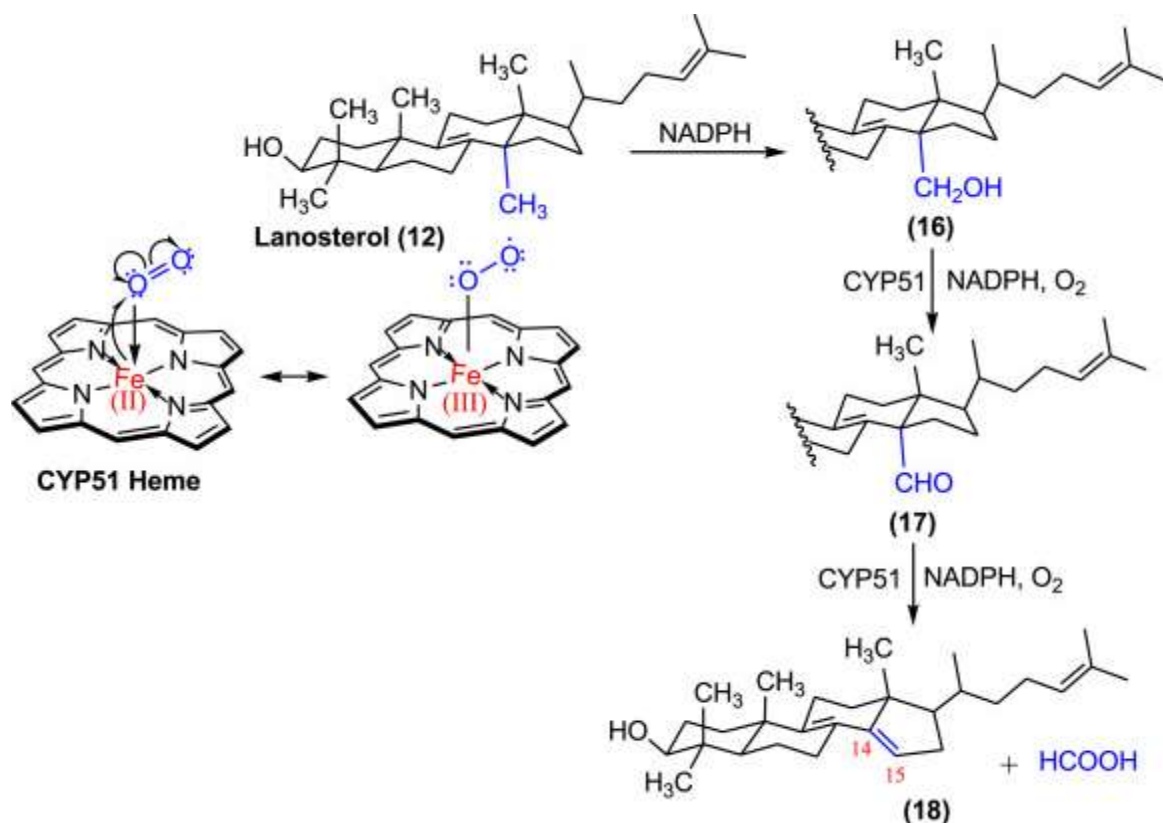


Figura 3. Mecanismo de 14 α -desmetilação do lanosterol pela 14 α -desmetilase dependente de CYP51. Fonte: Emami et al. 2017.

O cofator heme desta proteína contém uma porção de protoporfirina de ferro localizada no sítio ativo. O nitrogênio desimpedido do anel de imidazol ou triazol dos antifúngicos azóis se liga ao ferro de ERG11p como um sexto ligante, inibindo assim a reação enzimática. A afinidade dos derivados de imidazol e triazol para ERG11p não é apenas dependente desta interação, mas também é determinada pelo substituinte N-1, que é realmente responsável pela alta afinidade dos agentes antifúngicos azóis para seu alvo. A natureza precisa da interação entre cada antifúngico azol e cada tipo de P450 lanosterol 14 α -desmetilase determina a extensão do efeito inibitório do azol em diferentes espécies de fungos. A ação do azol no gene ERG11 leva a um bloqueio na produção de ergosterol e a ao aumento da produção de um esteroide intermediário tóxico pela enzima biossintética de ergosterol Δ -5,6-dessaturase, codificada pelo gene ERG3. Os azóis também inibem

o P450, que catalisa a D22-dessaturase, codificada por ERG5 (CYP61) (MOUNT et al., 2018).

O tratamento com azol resulta na inibição da enzima esterol-14- α -desmetilase e na inibição das reações subsequentes. Com o ergosterol esgotado e substituído por esteróis incomuns, a permeabilidade e fluidez normais da membrana são alteradas. A eficácia antifúngica dos azóis é atribuída a sua maior afinidade pela enzima fúngica do que para a enzima de mamíferos (FRANÇOIS et al., 2006)

Os azóis possuem baixa toxicidade quando comparados a outros antifúngicos, o que acabou levando ao seu uso excessivo na clínica. Os antifúngicos azólicos podem entrar no meio ambiente através da descarga de águas residuais urbanas, industriais e hospitalares, também através de escoamentos agrícolas e como lixiviados em locais de descarte de resíduos. A presença de antifúngicos azóis apresenta riscos potenciais de toxicidade para organismos não-alvo e desempenha um papel crítico na seleção de cepas de fungos resistentes a azóis no ambiente. Importante chamar a atenção que os efeitos dos azóis no ambiente vão além da seleção de fungos resistentes, a sua toxicidade pode causar desregulação endócrina em animais aquáticos, afetando a modulação da diferenciação sexual, afetar taxas de crescimento e inibir o crescimento algal (ASSRESS et al., 2021).

Os azóis continuam sendo a droga de escolha como terapia inicial para a maioria das infecções fúngicas e são frequentemente recomendados como profilaxia para pacientes de alto risco. O uso generalizado tem levado a um aumento de casos de resistência aos azóis na clínica e, conseqüentemente, a maiores dificuldades de tratamento e mortalidade dos pacientes (POLVI et al., 2015).

3.4.2 Alilaminas

A classe alilaminas foi descoberta ao acaso durante uma pesquisa para novos fármacos do sistema nervoso central. O nome desta nova classe química de agentes antifúngicos é baseado na presença em sua estrutura molecular de uma função da amina terciária, isto é, um átomo de nitrogênio com uma ligação

dupla vizinha (BIRNBAUM, 1990).

A classe inclui a terbinafina e a naftifina. Esses agentes fungicidas sintéticos bloqueiam a biossíntese do ergosterol, já que são inibidores reversíveis e não competitivos da esqualeno epoxidase (ERG1). Essa enzima catalisa a conversão do esqualeno em epóxido de 2,3-esqualeno e a sua inibição leva ao acúmulo de esqualeno, que pode aumentar a permeabilidade da membrana, levando à perturbação da organização celular (CAMPOY e ADRIÓ, 2017). Pode ser usada topicamente ou por via oral e é considerada droga de primeira linha na terapia de infecções por dermatófitos.

A resistência à terbinafina foi atribuída predominantemente a mutações pontuais no gene alvo da esqualeno epoxidase (ERG1p), uma enzima chave na via biossintética do ergosterol, levando a substituições de aminoácidos individuais (SINGH et al., 2018). No entanto, pode ocorrer resistência cruzada por azóis, como já relatado em espécies de *Candida* após o tratamento com fluconazol (NIGAM, 2015). Isso se deve à regulação positiva das enzimas-alvo. Genes transportadores envolvidos na resistência a azóis em *Candida albicans*, como CDR1, CDR2 e BENr, já foram identificados, os quais conferem resistência a azol e à terbinafina, configurando assim um mecanismo potencial para resistência cruzada parcial de azol-alilamina (SANGLARD et al., 1996).

3.4.3 Polienos

Polienos são antifúngicos de amplo espectro, descobertos no início dos anos 1950 a partir do gênero bacteriano *Streptomyces*. Polienos ligam-se ao ergosterol na membrana fúngica, gerando poros na membrana que resultam em vazamento de conteúdo de células fúngicas e, eventualmente, morte celular. Existem mais de 200 antifúngicos pertencentes a essa classe já descobertos e os que se destacam são anfotericina B, nistatina e natamicina. Anfotericina B é considerada como padrão-ouro no tratamento de infecções fúngicas graves (CAROLUS et al., 2020). Contudo, os polienos também se ligam ao colesterol, mas em um grau muito

menor do que ao ergosterol. A ligação aos esteróis em humanos é a base de sua toxicidade (BARDAL et al., 2011).

Embora os polienos tenham sido usados por muitas décadas, a resistência ao polieno ainda é rara em comparação com a resistência a outros antifúngicos (VINCENT et al., 2013). O mecanismo mais comum de resistência adquirida à anfotericina B é atribuído a alterações na composição de esteróis da membrana celular do fungo. As mutações da via de biossíntese (genes ERG), têm sido associadas a este mecanismo. Em *C. albicans*, a perda de função dos genes ERG11 e ERG3 (lanosterol 14 α -desmetilase e C-5 esterol desaturase, respectivamente) leva à troca de ergosterol por esteróis alternativos, como lanosterol, eburicol e 4,14-dimetil-zimosterol na membrana (VINCENT et al., 2013, CAROLUS et al., 2020).

Já foi visto que mecanismos de resistência independentes de ergosterol existem. Algumas espécies de *Candida* demonstraram possuir uma membrana celular com um perfil de esterol alterado, semelhante a espécies resistentes à anfotericina B, com mutações ERG11, ERG3, ERG2 e ERG6. Mas a resistência a esse antifúngico raramente é encontrada em combinação com a resistência a outras drogas antifúngicas, embora certas mutações de ERG que induzem resistência ao polieno possam resultar em resistência cruzada aos compostos azólicos. Um exemplo disso é o que ocorre após a inativação do alvo dos azóis (ERG11 e ERG3), resultando na inibição da biossíntese de ergosterol e inibição da síntese do esterol tóxico 14-metil-3,6-diol, respectivamente (Dalhoff, 2018). Além disso, bombas de efluxo até o momento não foram relatadas como sendo importantes na resistência a polienos (O'SHAUGHNESSY et al., 2009; CAROLUS, 2020).

3.4.4 Equinocandinas

Echinocandinas entraram pela primeira vez no mercado em 2001, representando a mais nova classe de antifúngicos a chegar à clínica. As equinocandinas são grandes lipopeptídeos semissintéticos que foram originalmente derivados de caldos fermentados de diversos fungos (FERA, 2009). Inibem o

complexo enzimático da parede celular β -1,3-D-glicano sintase, diminuindo assim a concentração de β -(1,3)-glicano na parede celular do fungo e causando a perda subsequente da integridade da parede celular (MUNRO, 2010). As equinocandinas são geralmente bem toleradas, com poucos ou nenhum efeito colateral, e isso, associado ao fato de serem de amplo espectro, as torna os compostos mais importantes (MOURAD e PERFECT, 2018; MROCZYNSKAE e BRILLOWSKA-DABROWSKA, 2020). As equinocandinas atualmente disponíveis incluem caspofungina, anidulafungina e micafungina. Todas as três não são biodisponíveis por via oral e precisam ser administradas por via intravenosa (MOURAD e PERFECT, 2018). A caspofungina (figura 6) é derivada da pneumocandina B, produzida pelo fungo *Glarea lozoyensis*. Foi o primeiro agente da classe a ser sintetizado e foi aprovado pelo United States Food and Drug Administration (FDA) em 2001. A micafungina foi aprovada em 2005 e anidulafungina em 2006 (FERA, 2009). São indicados no tratamento de candidemias (LOH e ANG, 2020).

A resistência à equinocandina já foi relatada na clínica (TROVATO et al., 2021), surge normalmente durante a terapia e está associada à exposição repetida ou crônica ao medicamento, embora a resistência também possa ocorrer após uma breve exposição ao medicamento (HEALY e PERLIN, 2018). Mecanismos de resistência já foram relatados, como as respostas adaptativas ao estresse que resultam em elevado teor de quitina na parede celular e mudanças naturais de aminoácidos que conferem elevados valores de CIM (concentração inibitória mínima). Análises moleculares identificaram mutações em dois diferentes pontos do gene FKS1, que codifica parcialmente a funcionalidade de regiões redundantes de 1,3-beta-D-glicana sintase, em espécies de *C. albicans* e diversos outros patógenos (DOUGLAS et al., 1997; CUENCA-ESTRELLA, 2014).

3.5 RESISTÊNCIA CRUZADA ENTRE ANTIFÚNGICOS

Embora não sejam quimicamente relacionados, os azólicos podem

selecionar resistência aos polienos, uma vez que ambos são dependentes do ergosterol em seu modo de ação (DALHOFF, 2018). As alterações podem ocorrer na enzima alvo codificada por ERG11 (ocorre mudança conformacional do alvo e reduz a afinidade de ligação das moléculas de azol) e/ou ERG3 (esterol-lanosterol-14- α desmetilase, e podem levar à redução do ergosterol e ao acúmulo de esteróis alternativos na membrana celular do fungo) (XU et al., 2015). O polieno, como a anfotericina B, por sua vez, tem seu modo de ação afetado devido a sua ação direta no ergosterol, afetando a formação de canais que levariam à permeabilidade e extravasamento do conteúdo intracelular (REVIE, 2018; CAROLUS et al., 2020).

A multirresistência parece onipresente no ambiente e nos hospitais, provavelmente causada pelo uso de azólicos em plantações, que também selecionam resistência ao polieno (DALHOFF, 2018). As mutações já foram relatadas, por exemplo, em *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Algumas outras alterações no gene ERG, como a mutação de ERG2 podem levar a perda de sua função e a resistência a polienos (MARTEL et al., 2010; FORASTIERO et al., 2013; BHATTACHARYA et al., 2018; AL-BAQSAMI et al., 2020).

Além disso, a resistência cruzada pode ocorrer entre azóis e equinocandinas. A resistência cruzada entre equinocandinas resulta de mutações no gene *fkp1*, os altos CIMs para equinocandinas reduzem a sensibilidade de β -(1,3)D-glicana sintase, o componente estrutural mais abundante da parede celular em fungos (PRISTOV e GHANNOUM, 2019). Em 2017, Rybak et al. (2007) demonstraram que uma substituição de aminoácido em ERG3p (G111R) demonstrou ser responsável pelas suscetibilidades alteradas ao azol e equinocandina observadas em um isolado de *C. parapsilosis*. O mecanismo de resistência também pode envolver a regulação positiva dos transportadores ABC (SPETTEL et al., 2019). A resistência cruzada também já foi relatada em *C. albicans* e *C. glabrata* (SPETTEL et al., 2019; HATWIG et al., 2019).

3.6 FATORES DE VIRULÊNCIA

A virulência é a capacidade que organismos patogênicos possuem de infectar um determinado hospedeiro. É o resultado de uma interação, por exemplo, hospedeiro-fungo específica, e mudanças no hospedeiro ou no fungo podem afetar o grau de virulência, incluindo a presença ou ausência dela (GABALDON e CARRETE, 2016).

A expressão de fatores de virulência em leveduras patogênicas / oportunistas permite que elas causem doenças (POLVI et al., 2015). O conhecimento detalhado sobre esses fatores em leveduras é limitado. Algumas das características virulentas em leveduras patogênicas são crescimento em alta temperatura, adaptação ao pH, superexpressão de melanina, limitação de nutrientes, transição morfológica, secreção de enzimas extracelulares, indução da formação de cápsulas e formação de biofilmes (POLVI et al., 2015). Sabe-se que algumas enzimas permitem a degradação de proteínas e desestabilização das membranas celulares do hospedeiro aumentando a virulência (MONTROYA et al., 2015).

Para patógenos oportunistas, a virulência é expressa apenas em certas condições, como, por exemplo, ao entrar em contato com um possível hospedeiro debilitado. Contudo, o sucesso dessa colonização está sujeito à seleção no contexto da população e história evolutiva da espécie, ao contrário dos patógenos verdadeiros, onde essa característica faz parte do seu ciclo de vida e sobrevivência. Em patógenos oportunistas, a virulência é um efeito secundário, o seu arsenal enzimático nos casos de espécies ambientais pode ser consequência da sua adaptação a um ambiente natural ou interação comensal com um hospedeiro (GABALDON e CARRETE, 2016).

Nas últimas três décadas, as micoses oportunistas vêm aumentando de maneira considerável e isso pode ser explicado pelo aumento da frequência de uso de antibióticos de amplo espectro, dispositivos invasivos e nutrição parenteral. Esses fungos oportunistas adquiriram relevância crescente alcançando altas taxas de mortalidade em pacientes imunocomprometidos. Fatores de virulência já foram

detectados em alguns estudos em leveduras ambientais (ZUZA-ALVES et al., 2016; MACIEL et al., 2019), contudo, os padrões de virulência e suscetibilidade a agentes antifúngicos desses microrganismos ainda são pouco investigados (MONTROYA et al., 2019)

3.7 METAGENÔMICA

A metagenômica foi um grande avanço em ecologia microbiana. É uma técnica utilizada para o estudo do DNA total que pode ser obtido de uma amostra ambiental, por exemplo. A primeira vez que o termo foi utilizado foi no trabalho de Handelsman e colaboradores (1998) a fim de estudar compostos químicos produzidos por microrganismos do solo para o desenvolvimento de produtos naturais. Essa ferramenta utilizada na microbiologia molecular revelou que o microbioma é muito mais diverso do que pode ser revelado por técnicas microbiológicas tradicionais (COUGHLAN et al., 2015)

Essa ferramenta identifica não só as espécies presentes, mas também pode fornecer informações sobre as atividades metabólicas e fornecer informações funcionais dos microrganismos presentes em uma determinada população (LANGILLE et al., 2013). As duas principais abordagens da metagenômica são *shotgun* e amplicons. A abordagem *shotgun* sequencia trechos dos DNAs presentes na amostra de maneira aleatória utilizando, diretamente, o DNA total extraído da amostra. Já a abordagem por amplicon é realizada através da extração do DNA total de uma amostra e do sequenciamento de um gene alvo, como o ITS para fungos, por exemplo, com a realização prévia da reação em cadeia da polimerase (PCR) (THOMAS et al., 2012). A abordagem de amplicons também é conhecida como metataxonômica, um termo proposto por Marchesi e Ravel em 2015. A metataxonômica é conceituada pelos autores como um processo de alto rendimento usado para caracterizar a microbiota total através da construção de uma árvore metataxonômica que relaciona todas as sequências obtidas entre si.

3.7.1 Sequenciamento de alto rendimento

NGS é uma tecnologia de sequenciamento de DNA que revolucionou a pesquisa genômica, sendo possível analisar um volume muito grande de dados no sequenciador e obter o sequenciamento em poucas horas. Existem diversas plataformas de NGS (BEHJATI e TARPEY, 2013).

Existem dois paradigmas principais na tecnologia de sequenciamento de última geração (NGS): sequenciamento de leitura curta e sequenciamento de leitura longa. As abordagens de sequenciamento de leitura curta fornecem dados de baixo custo e maior precisão, que podem ser úteis para pesquisa em nível de população e descoberta de variantes clínicas. Em contraste, as abordagens de leitura longa fornecem comprimentos de leitura que são adequados para aplicações de montagem de genoma de novo e sequenciamento de isoformas de comprimento total (GOODWIN et al., 2016).

3.7.1.1 Íon Torrent

Segundo Gupta e Gupta (2014), a tecnologia do Ion Torrent funciona com base no princípio de detecção da liberação de íons de hidrogênio durante a incorporação de novos nucleotídeos na fita de DNA em crescimento. Na natureza, quando um nucleotídeo é incorporado a uma fita de DNA por uma polimerase, um íon de hidrogênio é liberado como um subproduto. A Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM™), usa uma matriz de alta densidade de poços microusinados para realizar a incorporação de nucleotídeos de uma maneira paralela. Cada poço contém abaixo uma camada sensível a íons. O íon altera o pH da solução, que é detectado por um sensor. Se houver duas bases idênticas na fita de DNA, a voltagem de saída é duplicada e o chip grava duas bases idênticas.

Em vez de detectar a luz como no pirosequenciamento 454, a tecnologia Ion Torrent cria uma conexão direta entre os eventos químicos e digitais. Os íons de hidrogênio são detectados em chips de sequenciamento de íons semicondutores. Um circuito multicamada é formado a partir da repetição de 20 vezes ou mais do

mesmo processo. Ion torrent PGM gera uma saída de dados total de cerca de 10–1.000 MB, dependendo do tipo de chip de sequenciamento e do semicondutor de íon usado. Ion Torrent gera comprimentos de leitura de cerca de 200 pb, que são usados para preencher lacunas na montagem produzida por outras tecnologias. Embora o comprimento de leitura seja muito menor do que o de outras plataformas, possui um custo mais baixo e pode ser uma boa escolha em alguns casos (Gupta e Gupta, 2014).

3.7.1.2 Illumina

A plataforma HiSeq ou MiSeq possui a tecnologia de sequenciamento por síntese. Ocorre a ligação de uma fita do DNA a adaptadores da placa (*flowcell*), que passa a ser amplificada clonalmente em fase sólida por PCR em ponte. Essa ligação e amplificação formam grupos conhecidos como *clusters*. Cada um desses grupos contém milhões de cópias do mesmo fragmento de DNA. Após, a enzima de linearização é aplicada e as fitas duplas de DNA (*double stranded* - dsDNA) são convertidas em fitas simples (*single stranded* - ssDNA). Então, são adicionados às placas uma região bloqueadora removível e deoxinucleotídeos contendo diferentes marcadores fluorescentes cliváveis. Esse processo permite a síntese de uma nova fita e o sequenciamento realizado base a base. Gera sequências complementares de 150 pares de base cada uma (ILLUMINA, 2021).

3.8. PESTICIDAS E IMPACTO AMBIENTAL

Os antifúngicos têm sido amplamente utilizados como alternativa no manejo de doenças fúngicas que afetam diversas culturas (BRAUER et al., 2019). A ameaça de doenças fúngicas é um fardo econômico de longa data para as safras de alimentos (BALL et al., 2020). Para a produção de safras de alta qualidade e rendimento, os agricultores utilizam fertilizantes sintéticos e pesticidas. É parte integrante da agricultura moderna e é uma das principais razões para o aumento

dramático da produtividade. O uso de herbicidas, inseticidas e fungicidas vem causando problemas crescentes de resistência nos organismos alvo (HAHN, 2014).

Contudo, o uso não regulamentado de antifúngicos pode prejudicar a saúde pública. O uso excessivo de agrotóxicos também pode causar problemas ambientais, como o acúmulo no meio ambiente e consequente desequilíbrio ecológico, dando origem à seleção de microrganismos patogênicos resistentes aos pesticidas. É importante que a aplicação de fungicidas na agricultura esteja sob regulamentação estrita a fim de garantir que os alimentos comercializados sejam seguros para consumo, apresentem riscos insignificantes de toxicidade aguda e para tentar minimizar a emergência de patógenos (BRAUER et al., 2019)

O uso excessivo e indevido de drogas antifúngicas é um dos principais responsáveis pelo surgimento de patógenos resistentes. Além da utilização de antifúngicos na criação de gado, plantações e aquicultura, outros vetores desses compostos para o ambiente são os resíduos de hospitais e esgoto urbano não tratado. Isso pode afetar as populações microbianas de ambientes aquáticos e terrestres, comumente envolvendo hospedeiros sem história prévia de exposição a antifúngicos (ROCHA et al., 2016).

Um exemplo de resistência em leveduras induzida por fungicidas agrícolas é o aumento da resistência em *Candida albicans*, e a emergência de espécies oportunistas de *Candida*, como *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, que têm sido comuns em infecções invasivas. Um dos motivos para isso é a grande semelhança dos antifúngicos utilizados na clínica e na agricultura, como no caso dos compostos azólicos. A utilização na agricultura, faz com que esses fungos tenham exposição prolongada, levando à seleção desses microrganismos e resistência cruzada aos medicamentos (FARIAS-RAMOS et al., 2014).

3.9 ABORDAGEM ONE HEALTH

O conceito *One Health*, também conhecido como Saúde Única, foi lançado em 2008 pela Organização Mundial da Saúde, junto com a Organização

Mundial para a Saúde Animal e a Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas. Representa a indissociabilidade da saúde humana, animal e ambiental, onde a qualidade de vida das populações e a sua saúde dependem de um meio ambiente ecologicamente equilibrado (COUTO e BRANDESPIM, 2020).

Nos últimos 30 anos, a maioria das novas doenças infecciosas emergentes se originaram no ambiente e a principal causa da emergência desses patógenos são as atividades humanas que causam alterações nos ecossistemas e a ocupação e uso da terra sem um planejamento adequado, como a intensificação da agricultura, urbanização, viagens e comércio internacional. Alguns exemplos de doenças que tiveram origem ambiental foram os vírus SARS e o vírus influenza H5N1 (MACKENZIE e JEGGO, 2019). Além desses, fungos patogênicos emergentes representam uma ameaça crescente aos ecossistemas, à segurança alimentar e à saúde pública (GOSH et al., 2018).

O conceito propõe uma abordagem holística que integra a saúde humana, animal e ambiental na tomada de decisões de políticas de saúde pública, envolvendo uma abordagem multidisciplinar que reconhece essa interdependência (DESTOUMIEUX-GARZÓN et al., 2018).

MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETAS

Foram realizadas quatro coletas ao longo de dois anos, entre agosto de 2017 a março de 2019, em quatro diferentes pontos da laguna Tramandaí. Em conjunto com o Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos (CECLIMAR) em Imbé, utilizamos uma embarcação de porte pequeno com o auxílio de um barqueiro. O Ponto 1 (29°58'34.7"S 50°07'18.8"W) localizado no estuário da laguna, ponto 2 (29°58'10.4"S 50°08'20.7"W) próximo a um condomínio de casas, ponto 3 (29°58'12.2"S 50°09'19.7"W) no centro da laguna e ponto 4 (29°57'05.8"S 50°10'41.7"W) próximo a margem preservada. Os quatro pontos da laguna Tramandaí foram amostrados em triplicata. Cada ponto com pelo menos 3 km um do outro, exceto as amostras de pontos P3 e P2, que estão próximos, com 1,56 km de distância um do outro, e P4 distantes 7 km de P1.

Foram coletados, 350 mL de amostras de água em triplicata, utilizando garrafas plásticas brancas estéreis, para o isolamento de leveduras e outras três amostras de 350 mL em garrafas plásticas brancas estéreis de cada ponto para a realização da extração de DNA para a realização de metagenômica nas coletas de agosto de 2017 e fevereiro de 2018. Em todas as coletas também foram amostrados 1000 mL de água para realização da determinação de pesticidas. Ao todo, 500 mL de amostras de água superficiais (5-10 cm de profundidade) também foram coletadas para a análise físico-química da água em vidraria estéril realizado pelo Laboratório de Análise de Águas, Sedimento e Biologia do Pescado localizado no CECLIMAR. Os parâmetros analisados pelo laboratório foram oxigênio dissolvido (OD mg/L), demanda bioquímica de oxigênio (DBO5 mg/L)), salinidade (‰), cloretos (mg/L). Em campo, foram coletados dados de temperatura (°C), pH e condutividade (µs/cm) utilizando equipamento multiparâmetro. Todos os pontos foram marcados por GPS durante a primeira coleta e mantidos nas demais.

4.2 ISOLAMENTO DE LEVEDURAS

As amostras foram mantidas em caixa térmica para o deslocamento até o Laboratório de Micologia no Instituto de Ciências Básicas da Saúde, pertencente à UFRGS em Porto Alegre, para processamento. Foram realizadas diluições seriadas e alíquotas das diluições 10^1 , 10^2 e também da amostra bruta (10^0) foram semeadas nos meios de cultura descritos a seguir. Na primeira coleta, essas diluições foram semeadas em triplicata em caldo YM (pH 4) e caldo YM contendo antifúngicos incubados por 24-48h e, posteriormente, uma alíquota de 100 μ L foi semeada em ágar YM contendo o respectivo antifúngico e incubada por até 30 dias a 25°C. Uma alíquota de 100 mL de cada amostra foi filtrada utilizando membrana de 0,45 μ m. A membrana foi então lavada com solução de tween 20 a 0,5% em shaker a 180 RPM durante 15 minutos. O caldo resultante foi inoculado em triplicata em ágar YM acidificado contendo antifúngicos e incubado por até 30 dias a 25°C. A membrana também foi colocada em ágar YM acidificado e incubada a fim de avaliar a melhor metodologia para o isolamento das leveduras.

A partir da segunda coleta, a metodologia adotada foi a de diluição seriada, seguida por semeadura de 100 μ L de amostra, em triplicata, em placas de ágar YM pH 4 com e sem antifúngico. Os antifúngicos utilizados foram fluconazol (8 μ g/mL), terbinafina (1 μ g/mL), anfotericina B (0,5 μ g/mL) e caspofungina (1 μ g/mL). As concentrações utilizadas foram subinibitórias a fim de isolar leveduras com potencial de exibir um perfil de resistência.

4.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DAS LEVEDURAS ISOLADAS

O DNA genômico total foi obtido a partir de células cultivadas em ágar YPD, incubadas a uma temperatura de 25 °C durante 48-72 h. As células foram ressuspensas em 600 μ L de tampão de lise (0,15 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 2% SDS pH 8,0) e incubadas a 65°C por 1 hora. Após a incubação, 200 μ L

de acetato de potássio (5 M, pH 4,8) foi imediatamente adicionado e novamente incubadas por 30 minutos em banho de gelo e centrifugadas a 18440 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 2 mL e centrifugado novamente. Novamente o sobrenadante foi transferido para outro tubo tipo Eppendorf de 2 mL e cerca de 1 volume de isopropanol absoluto foi adicionado às amostras para precipitar o DNA, incubadas por, pelo menos, 30 minutos em uma temperatura de -20°C. Após, realizou-se uma centrifugação a 18440 xg durante 20 minutos, seguida de lavagem do DNA álcool 70%. O álcool foi retirado e o DNA genômico foi seco à temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora, em seguida foram adicionado 50 uL de tampão TE (Tris-EDTA pH 7,4) para ressuspender o material. Foi realizada eletroforese com o material, utilizando gel de agarose 1% em solução tampão TBE (Tris, Borato e EDTA) a uma concentração de 1 X. Para a visualização do DNA, foram utilizados 1 µL de tampão de corrida, 1 µL de GelRed (1:500) e 2 µL de amostra de DNA.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi baseada na amplificação da região D1/D2 do LSU rDNA e foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') e NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') (O'Donnell, 1993). Para a reação de amplificação em um volume final de 25 µL, foram utilizados 12,5 uL de Master Mix (Invitrogen), 0,6 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (20 pmol/µL) e 10,3 µL de água ultra-pura. O programa utilizado no termociclador foi composto de um passo de desnaturação inicial a 95°C durante 5 minutos, seguido de um passo de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 56 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto durante 30 ciclos, e adicionalmente um passo de extensão final de 72 °C por 6 minutos. A qualidade da amplificação foi averiguada por eletroforese, utilizando gel de agarose 1,5% corado com corante GelRed, conforme descrito acima. A purificação foi realizada com 2 uL de ExoSAP-IT® (Affymetrix, USA) para cada 5 µL de cada reação, segundo as instruções do fabricante. O sequenciamento das amostras foi realizado empregando sequenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer(Applied Biosystems, USA), pelo método de Sanger, realizado junto ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Para aquelas espécies consideradas novas ou com identificação dúbia através da região D1/D2, realizou-se o sequenciamento da região ITS da SSU rDNA. Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a amplificação foram ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (PÉTER et al., 2009) e as condições de reação para amplificação foram as mesmas que as utilizadas para a região D1/D2, descritas acima. A amplificação consistiu em um passo de desnaturação a 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de 45 segundos a 95 °C, 30 segundos a 56 °C e 1 minuto a 72 °C e extensão final com duração de 7 minutos a 72 °C. As sequências foram analisadas através do programa Staden Package (STADEN et al., 2003), comparadas com as sequências das cepas “tipo” no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando a ferramenta BLAST com ponto de corte para a identificação acima de 99%, cobertura maior ou igual a 98% com erro próximo a zero (ALTSCHUL et al., 1990).

4.4 ENSAIO DE RESISTÊNCIA A ANTIFÚNGICOS DE IMPORTÂNCIA MÉDICA

As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas pela técnica de microdiluição, de acordo com o protocolo M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), com pequenas modificações. Os inóculos foram padronizados em $0,5 - 2,5 \times 10^3$ UFC/mL em espectrofotômetro (Spectrum METER SP-2000UV), controlados por contagem de colônia em meio ágar Sabouraud dextrose em placa de Petri. Os antifúngicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich, Missouri, EUA e foram realizados testes pilotos utilizando valores mínimos e máximos preconizados para a espécie *Candida albicans*, conforme o protocolo M27-A3 do CLSI. Após a avaliação dos resultados no teste piloto, as leveduras foram testadas no intervalo de concentração final 0,25 - 128 µg / mL de anfotericina B (AMB) e caspofungina (CAS), 0,50 - 256 µg / mL de terbinafina (TRB) e 4 - 2.048 µg / mL de fluconazol (FCZ). A incubação foi a 25 °C por 48 h e as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinadas quando havia 100%

de inibição visual por comparação do crescimento nos poços isentos do fármaco (controle de crescimento) (CLSI, 2008).

4.5 ANÁLISE DE PESTICIDAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA

As amostras foram analisadas através de um sistema SPE-LC-ESI-MS / MS, em parceria com o Laboratório Nacional Agrícola, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento em Porto Alegre. Inicialmente, um volume de 250 mL de cada amostra foi processado usando um protocolo de extração em fase sólida. Foi utilizado cartucho Strata-X, com 200 mg de solvente e capacidade de 6 mL (Phenomenex). O condicionamento foi realizado com 3 mL de acetona com ácido acético a 0,3%, seguido de 3 mL de metanol com ácido acético a 0,3% e depois 3 mL de água ultrapura com 5% de metanol. Em seguida, 250 mL da amostra foram carregados no cartucho. Após a carga, os cartuchos foram secos durante 5 minutos, sob vácuo. A eluição foi realizada usando 6 mL de acetona com 0,3% de ácido acético, seguido de 6 mL de metanol com 0,3% de ácido acético. O sobrenadante foi evaporado sob corrente de N₂ a 45 °C até a secura, e então reconstituído com água: acetonitrila (98: 2) com 0,1% de ácido fórmico. Cada amostra foi processada em triplicata.

As análises foram realizadas usando um cromatógrafo líquido Agilent Series 1260 Infinity II (Agilent Technologies) acoplado a um espectrômetro de massa triplo quádruplo API 5000 (Sciex). A coluna cromatográfica usada foi uma Zorbax SB-C18 Rapid Resolution, 4,6 × 150 mm, 3,5-Micron (Agilent Technologies). Um volume de 5 µL da amostra processada foi injetado no sistema. A fase móvel foi (A) água com 0,1% ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio (B) acetonitrila com 0,1% ácido fórmico e 5 mM de formiato de amônio, em modo gradiente, com tempo de análise de 20 minutos e tempo de equilíbrio entre corridas de 3 minutos. O gradiente inicia com 5% de fase B, que aumenta linearmente até atingir 95% aos 10 minutos. Essa condição é mantida até os 18 minutos, quando a concentração de B retorna a condição inicial (5%), aos 18,5 minutos, e mantida assim até os 20

minutos, e durante o tempo de equilíbrio. Os resultados obtidos foram qualitativos. A detecção qualitativa para detectar a presença de pesticidas nas amostras, baseou-se em um banco de dados contendo o perfil de 171 compostos (DIAZ et al., 2013). A lista desses compostos encontra-se no Apêndice A.

4.6 TESTES ENZIMÁTICOS

Suspensões padrão com $1-5 \times 10^6$ células / mL foram obtidas para cada isolado previamente cultivado em ágar Sabouraud dextrose por 48 h a 25° C, e 10 µL de suspensões foram inoculadas no meio de cultura específico para cada enzima a ser testado (lipase, albuminase, gelatinase, fosfolipase, urease e DNase). Os resultados foram obtidos após a incubação a 25° C por 7 dias, e a zona de precipitação (Pz) foi calculada, a menos que especificado de outra forma. Pz foi expresso como a razão entre o diâmetro médio da colônia e o diâmetro médio da colônia mais o halo de degradação (HANKIN e ANAGNOSTAKIS, 1975; BUZZINI e MARTINI, 2002).

4.6.1 Meio gelatinase em tubo

O meio gelatina foi utilizado para caracterizar as leveduras quanto à produção da enzima capaz de degradar a gelatina. O meio é composto por 3g de extrato de carne, 5 g de peptona, 120 g de gelatina incolor, 1 L de água destilada. O meio foi distribuído em tubos de ensaio com tampa e autoclavado a 1 ATM durante 15 minutos. Após, as leveduras crescidas em meio YPD por 48h a 25 °C foram inoculadas, com o auxílio de agulha microbiológica, no meio gelatinase em triplicata, juntamente com o controle positivo *Nocardia brasiliensis* 553 e incubadas a 25° C durante 48-72h. Após esse período, os tubos foram resfriados a 4 °C por 15 minutos. O resultado positivo foi considerado quando houve liquefação do meio.

4.6.2 Meio DNase

A produção de enzima DNase foi avaliada em meio comercial DNase Test Agar (Acumedia). Foram adicionadas 39g de DNase para 1 L de água destilada. O meio foi autoclavado a 1 ATM durante 15 minutos e distribuído em placas de petri. As leveduras foram crescidas a 25 °C durante 48h, após, foi realizado um inóculo com concentração 0,5 na escala de McFarland, padronizado no aparelho DensiCheck. Cerca de 2 uL do inóculo foram inoculados pontualmente na placa. O ensaio foi realizado em triplicata. Após 48-72 h de incubação a 25 °C, 1 mL de ácido clorídrico foi adicionado em cada placa, em câmara química, e a leitura dos resultados positivos foi realizada através da visualização de halo de precipitação. Os halos e as colônias foram medidas utilizando um paquímetro digital para o cálculo do Pz. O controle positivo utilizado foi *Rhodotorula taiwanensis* (LT15).

4.6.3 Meio lipase

A capacidade de degradar lipídios foi testada utilizando meio lipase contendo 2,5g de peptona de carne, 2,5 g de peptona de caseína, 3 g de extrato de levedura, 20 g de ágar, 10 mL de tributirina em 1 L de água destilada. Os componentes foram dissolvidos em agitador magnético antes da autoclavagem a 1 ATM por 15 minutos. Após, o meio foi distribuído em placas. As leveduras, crescidas durante 48 h a 25 °C, foram utilizadas para a preparação do inóculo em uma concentração de 0,5 na escala McFarland, utilizando DensiCheck. Cerca de 2 uL de inóculo foram depositados pontualmente sobre a camada superficial do meio e o ensaio foi realizado em triplicata. As placas foram incubadas a 25 °C por 48 h e a leitura dos resultados positivos foi realizada através da visualização de halos translúcidos ao redor da colônia. As colônias e os halos foram medidos para o cálculo do Pz. O controle positivo utilizado foi *Candida blattae* (M06).

4.6.4 Meio urease

Para o teste de produção de urease e coloração por Diazonium Blue B (DBB) os isolados, assim como os controles positivo *Cryptococcus neoformans* ATCC 20882 e negativo *Candida albicans* ATCC 2001, foram cultivados em tubos contendo meio YCB-ureia (1,17% Yeast Carbon Base, fucsina ácida, 2% ágar, ureia 10%). A fucsina ácida é adicionada até a obtenção de uma coloração rosa escuro. As culturas foram incubadas a 22-25 °C por 72 horas. A capacidade de produzir urease foi conferida através da alteração da coloração do meio para a cor branca. Os tubos foram examinados todos os dias durante 3 dias (HAGLER e MENDONÇA-HAGLER, 1991).

4.6.5 Meio fosfolipase

A capacidade de degradar fosfolipídios foi testada em meio fosfolipase. Para o preparo do meio, os ovos de galinha foram colocados em álcool 70% para a desinfecção da casca por pelo menos 30 minutos. O meio base é composto de 10 g de bactopectona, 10 g de glicose, 57,3 g de Cloreto de Sódio, 0,55 g de Cloreto de Cálcio, 20 g de ágar bacteriológico diluídos em 960 mL de água destilada e autoclavado por 15 minutos a 1 ATM. Foram filtrados 2,5 mL de Protovit Plus (Bayer), os ovos foram quebrados assepticamente e a gema depositada em placa de petri estéril. Cerca de 40 mL de gema foi alíquotada com pipeta de vidro estéril, evitando a membrana, e adicionada ao meio de cultura base resfriado a 50 °C. Após a homogeneização, o meio foi distribuído em placas de Petri e 2 uL de inóculo para cada levedura na concentração de 0,5 McFarland foram depositados na placa em triplicata. As placas foram incubadas por 48 h a 25 °C. O resultado positivo foi considerado pela formação de um halo opaco ao redor de cada colônia. O controle positivo foi realizado através da cepa de *Candida albicans* ATCC10231.

4.6.6 Meio protease

Para avaliar a capacidade das leveduras de produzirem enzimas proteolíticas, foi utilizado o meio albumina. Para isso, foi feito um meio base contendo 18 g de ágar e 900 mL de água destilada, autoclavado a 1 ATM durante 15 minutos. O meio albumina foi confeccionado separadamente com 1,17 g de Yeast Carbon Base (YCB), 2 g de albumina bovina, 2,5 mL de Protovit diluídos em 100 mL de água destilada e esterilizada por filtração. O meio albumina foi adicionado ao meio base após o seu resfriamento e distribuído em placas de Petri. Cerca de 2 uL de inóculo na concentração de 0,5 de McFarland foram adicionados nas placas em triplicata. Após 48 h a 25° C, a leitura foi realizada adicionando corante (1 g de negro de amido, 200 mL de ácido glacial, 800 mL de água de destilada). Após cinco minutos, o excesso do corante foi retirado e as placas lavadas com a solução reveladora (10 mL de ácido acético glacial, 990 mL de água destilada). *C. albicans* ATCC10231 foi utilizada como controle positivo.

4.6.7 Meio queratinase

Para verificar a capacidade das leveduras em produzir enzimas capazes de degradar a queratina, foi utilizado um meio modificado de Scott et al. (2014). O ensaio foi realizado em meio líquido contendo 0,5 g de KCl, 0,25g de $MgSO_4 \times 7 H_2O$, 0,001 g $CaCl_2 \times 2 H_2O$, 4 g $NaH_2PO_4 \times H_2O$, 1 g $FeCl_3 \times 6 H_2O$, 0,5 mL solução de 1 g/L de $MnCl_2 \times 4 H_2O$, 1 mL solução de 100 mg/L $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$, 1 mL solução de 250 mg/L $CuSO_4 \times 5 H_2O$ em 100 mL solução tampão (1,42 g de Na_2HPO_4 em 98 mL de água, ajustar o pH para 9 com solução de KH_2PO_4 . Autoclavar a 1 ATM durante 15 minutos).

Em cada tubo foi adicionado 12 mg de queratina azure (Keratin azure, Sigma K8500), autoclavado por 15 minutos a 1 ATM. Após o resfriamento do meio basal, foram adicionados 3 mL em cada tubo contendo keratin azure. Foram reservados três tubos para o controle negativo. O inóculo das leveduras foi preparado em uma concentração de $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. O controle positivo utilizado

foi *Microsporium canis* 14. A leitura foi realizada após a incubação por 7 dias a 25 °C e centrifugação dos tubos por 10 minutos a 18440 xg. Após, o sobrenadante foi adicionado a cubetas de cristal e a turbidez lida com espectrofotômetro em uma absorvância de 595 nm. O valor de ABS = 0,01 é igual a 1 UK (unidade de queratinase) (SCOTT et al., 2004; SHARMA et al., 2012, PAGANI et al., 2016).

4.7 COLETA E PROCESSAMENTO DE DADOS META-TAXONÔMICOS

4.7.1 Plataforma Íon Torrent: processamento e análises

A extração de DNA foi realizada em triplicata com o DNeasy PowerSoil Kit (QIAGEN), a qualidade e a quantidade de DNA foram avaliadas por espectrofotometria (NanoDrop ND 1000, NanoDrop Technologies, Wilmington, EUA). As amostras foram coletadas em agosto/2017 e fevereiro/2018, estação chuvosa e seca respectivamente. Após a extração do DNA total de cada amostra, a amplificação por PCR foi realizada usando ITS3 (5'-GCATCGATGAAGAACGCAGC-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (IDT), oligonucleotídeos iniciadores direcionados à região ITS2 (350 pb) da região ITS. A PCR foi realizada após 95 °C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, anelamento a 55 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C durante 1 minuto; uma fase final de extensão foi realizada a 72 °C durante 10 minutos. Em seguida, os amplicons foram sequenciados utilizando a plataforma Íon Torrent, purificados por Agencount AMPure Beads (Beckman Coulter) e a construção da biblioteca foi realizada a partir de uma quantidade inicial de 100 ng de DNA, conforme descrito na Ion Plus Fragment Library. As amostras foram processadas como amostras compostas, ou seja, apenas uma corrida para cada ponto foi realizada. Todas as amostras foram sequenciadas em uma execução PGM multiplexada e as sequências de código de barras foram usadas para identificar cada amostra da saída de sequenciamento total. O sequenciamento foi conduzido no Instituto do Petróleo e dos Recursos Naturais (IPR), localizado dentro das

dependências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). As amostras foram sequenciadas em um sistema Ion Personal Genome Machine (PGM) (Thermo Fisher) usando um chip Ion 316, seguindo as instruções do fabricante. Um arquivo FASTQ foi gerado para cada ponto amostrado.

O processamento das análises foi realizado dentro do BASH no sistema operacional LINUX. Os arquivos FASTQ recebidos foram convertidos em FASTA utilizando a ferramenta FASTX v 0.0.13 (HANNON, 2010). A seguir, os adaptadores das sequências foram removidos utilizando o programa cutadapt. Para visualizarmos e limparmos os arquivos das sequências, utilizamos o programa MOTRUR v 1.41.1 (SCHLOSS et al., 2009), em seguida foi realizada a limpeza desses arquivos ($Q \geq 25$; maxambig = 0; maxhomop = 8) retirando sequências curtas (minlength = 100 pb). Após, as sequências em duplicatas e as quimeras foram removidas e as sequências foram normalizadas (GIHRING et al., 2012). Em seguida, mesclamos todas as sequências e agrupamos as OTUs com 97% ou mais de similaridade, utilizando o programa fMLC (VU et al., 2018). Em seguida, sequências representativas foram alocadas em um novo arquivo. Para realizar a identificação, utilizou-se o banco de dados referência para fungos UNITE e realizou-se a comparação do *dataset*. Usando dados OTU agrupados com 97% de similaridade, comparou-se com o banco de dados UNITE, a tabela resultante foi submetida à ferramenta FUNGuild (NGUYEN et al., 2016). O FUNGuild foi usado para atribuir OTUs aos grupos funcionais (guildas) e ser capaz de caracterizar a comunidade fúngica. O pipeline encontra-se no apêndice B.

A diversidade beta e alfa (WHITAKKER, 1972) foram calculadas através do programa R.

4.7.2 Plataforma Illumina: processamento e análise

As amostras foram coletadas durante o verão em março de 2019. Após a coleta e extração de DNA, a PCR foi realizada utilizando fITS7 (5'-GTGARTCATCGAATCTTTG-3') (IHRMARK et al., 2012) e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990), tendo como alvo a região

ITS2 do DNA ribossomal nuclear. O PCR foi realizado utilizando a ciclagem: 94 °C por 2 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94° C por 1 minuto, anelamento a 60 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 3 minutos; uma fase de extensão final foi realizada a 72 °C por 5 minutos. Uma quantidade de 5 µg / µl de gDNA foi considerada para a construção de bibliotecas de sequenciamento de extremidades emparelhadas (2 × 150 bp) de tamanho de inserção de 450 pb seguindo o protocolo do fabricante para o NEBNext® Fast DNA Fragmentation and Library Preparation Kit (New England Biolabs Inc.). A análise de qualidade das bibliotecas finais foi realizada por meio do 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) com controle de tamanho de gDNA de comprimento de leitura usando eletroforese em gel de agarose. Todas as amostras foram sequenciadas no Instituto de Medicina Veterinária, Burckhardtweg, na Universidade de Göttingen, na Alemanha. Utilizou-se a plataforma Illumina Hi-Seq 2500 conforme recomendado pelo fabricante. Sequências *barcode* foram usadas para identificar cada amostra da saída de sequenciamento total. As amostras foram sequenciadas em triplicata. As amostras foram denominadas S01, S02 e S03 para o Ponto 1 (P1); S04, S05 e S06 para o Ponto 2 (P2); S07, S08 e S09 para o Ponto 3 (P3); S10, S11 e S12 para Ponto 4 (P4);

Para a limpeza inicial do conjunto de dados, as leituras foram filtradas com uma pontuação de qualidade igual ou superior a 33 e um comprimento mínimo de 150 bp. Então, o limite usado foi de 97% de similaridade para agrupar OTUs, que é o valor de corte normalmente usado em estudos de comunidade de fungos. Singletons e quimeras foram removidos utilizando o software Vsearch (ROGNES et al., 2016). Posteriormente, as sequências foram alinhadas com o banco de dados UNITE fungal ITS utilizando a ferramenta BLAST (GEML et al., 2014; NOUHRA et al., 2018). A identificação dos fungos foi feita com a ferramenta BLAST, apenas sequências com pelo menos 97% de similaridade e pelo menos 90% de cobertura foram identificadas. OTUs com ≥ 98,5% de similaridade foram atribuídos em nível de espécie e semelhanças entre 97 e 98,5% foram atribuídas em nível de gênero.

As análises estatísticas de diversidade beta e alfa foram realizadas utilizando o índice de diversidade Chao1 (CHAO, 2005). É um índice útil para

conjuntos de dados de baixa abundância, como costuma ser o caso de microrganismos . Também foi feita a correlação com os metadados ambientais utilizando o índice de similaridade Bray-Curtis através da plataforma R com o pacote Vegan.

4.9 CITÔMETRO DE FLUXO NA IDENTIFICAÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO

A amostra LT12 (*Papiliotrema laurentii*) foi escolhida por se tratar de uma espécie ambiental com importância clínica que apresentou resistência à terbinafina. A escolha também se deve ao fato do aumento de casos de infecções relacionadas à espécie. A levedura foi semeada em meio YPD e incubada a 25 °C durante 48h. Após, foi preparado um inóculo de aproximadamente 10^6 células em PBS 1x (8g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na_2HPO_4 , 0,24g KH_2PO_4). Para o preparo da solução estoque de verapamil, diluiu-se 0,0106 g do soluto para 1 mL de etanol.

O teste foi realizado utilizando terbinafina, pela sua ação fungicida, a uma concentração de 256 $\mu\text{g/mL}$, por exposição aguda ao antifúngico, durante 30 minutos. Após, as amostras foram coradas com Syto24 e iodeto de propídio por 15 minutos e a análise foi realizada no equipamento de citômetro de fluxo BD FACSVerse. Para fins comparativos, realizamos o teste com exposição aguda a clorexidina 200 $\mu\text{g/mL}$ sem terbinafina, adicionada de corante. Utilizou-se como controle os inóculos em PBS.

4.10. TESTES BIOQUÍMICOS PARA DESCRIÇÃO DE POSSÍVEL ESPÉCIE NOVA

Para a descrição de possível espécie nova realizaram-se os testes bioquímicos. A espécie foi caracterizada fenotipicamente através de morfologia e fisiologia (YARROW,1998; KURTZMAN et al., 2011).

4.11 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, COLONIAL E CELULAR

O DNA do isolado LT49 foi extraído com DNeasy PowerSoil Kit (QIAGEN). A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi baseada na amplificação da região D1/D2 do LSU rDNA e utilizaram-se os oligonucleotídeos iniciadores NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') e NL4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') (O'Donnell, 1993). E também foi amplificada a região ITS: ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (Péter et al., 2009). PCR e sequenciamento ocorreu conforme o item 4.3 descrito anteriormente. As árvores filogenéticas para as duas regiões foram construídas utilizando o programa MEGA 7 (REF), utilizando as 20 sequências de cepas tipo mais semelhantes a LT49. As sequências foram alinhadas pelo método MUSCLE (REF), a árvore filogenética foi criada utilizando o algoritmo *maximum likelihood*, utilizando o método *kimura-2-parameters* e *bootstrap* igual a 1000.

A levedura foi incubada em meio YPD, a 25 °C durante 48h e a caracterização foi realizada observando cor, textura, produção de pigmento, margem, brilho, elevação, superfície e consistência (YARROW, 1998).

A caracterização celular foi realizada em meio ágar batata (AB), com incubação de 7 dias. O AB teve de ser utilizado, pois em meio YPD a colônia apresentava-se esclerótica, e não foi possível realizar lâmina a fresco. A visualização das células ocorreu em um aumento de 1000x para a observação do tamanho, formato, presença de pseudohifa, tipo de reprodução e possível presença de outras estruturas reprodutivas (KURTZMAN et al., 2011). Para a visualização de possíveis hifas, foi realizado o método de microcultivo, utilizando AB, incubado por até 7 dias a 25 °C.

4.12 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

4.12.1 Fermentação

Verificou-se a capacidade de fermentação da levedura para glicose, trealose, lactose, xilose e celobiose. O meio base consistiu em 0,75 g de peptona, 0,5g de extrato de levedura e 2g de açúcar a ser testado. Aliquotas de 4 mL foram adicionadas aos tubos de ensaio e foram adicionados os tubos de Durham para a observação de formação de gás, sendo considerado +1 a formação de gás no primeiro $\frac{1}{3}$ do tubo, +2 a produção de gás preenchendo até $\frac{2}{3}$ do tubo e +3 quando ocorreu o total preenchimento do tubo de Durham por gás ou ainda 0 quando a fermentação foi negativa. As leituras ocorreram regularmente todos os dias para a observação do comportamento da levedura e os resultados foram anotados nos dias 7, 14 e 21 dias após a inoculação. Todos os açúcares foram testados em triplicata.

4.12.2 Fontes de carbono

A capacidade de assimilar diferentes fontes de carbono foi realizada em placa de petri em meio contendo 0,67 g de yeast nitrogen base (YNB), adicionado de 0,5 g da fonte de carbono desejada, 2 g agar Difco e em triplicata. As fontes testadas foram D-glicose, D-galactose, N-acetil-glucosamina, D-ribose, D-xilose, L-arabinose, L-ramnose, Sacarose, Maltose, Trealose, inulina, amido solúvel, glicerol, eritritol, D-manitol, celobiose, salicina, lactose, rafinose, etanol, M-inositol, D-gluconato, succinato, citrato, metanol, acetona, isopropanol, NAG, twenn 20, tween 80, manose e dextrina. Para a realização dos testes a levedura metabolicamente ativa, foi inoculada em uma concentração de 1×10^6 UFC/mL em meio para a estarvação (0,67 g de YNB e 0,1 g de glicose) durante 24h. Aproximadamente 1 μ L do inóculo foi adicionado em cada placa. As placas foram incubas por 21 dias a 25° C. O controle positivo utilizado foi uma placa contendo 0,67 g de YNB, 2 g de ágar e 0,5 g

de glicose e o controle negativo utilizado foi uma placa contendo 0,67 g de YNB e 2 g de ágar.

4.12.3 Fontes de nitrogênio

A assimilação de nitrogênio foi feita através do método de auxanograma. O inóculo (1×10^6 UFC/mL) foi feito a partir de colônias metabolicamente ativas, em água destilada autoclavada por 24h a fim de que a levedura esgotasse suas reservas energéticas. O meio teste foi preparado com 1,17 g de *yeast carbon base* (YCB) e 2 g de ágar Difco, após, o inóculo foi incorporado ao meio. As fontes testadas foram peptona, L-lisina, creatinina e nitrato de sódio que foram colocados pontualmente sobre o auxanograma. A leitura positiva foi realizada a partir da formação de halos.

4.12.4 Teste de urease

O teste foi realizado como descrito no item 4.6.4.

4.12.5 Teste de crescimento a diferentes temperaturas

O teste de crescimento foi realizado em banho maria em caldo YPD após a inoculação da levedura em diferentes temperaturas: 25 °C, 30 °C, 37 °C, 40 °C e 42 °C. O crescimento foi observado por até 14 dias. Devido às características da levedura, o crescimento foi observado pelo aumento do volume de inóculo.

4.12.6 Teste de tolerância a NaCl 10%

O teste foi realizado em meio contendo 0,67 g de YNB, 5 g de glicose e 10 g de NaCl. A incubação ocorreu durante 21 dias a uma temperatura de 25 °C com observação semanal do crescimento (BARNETT et al., 2020).

4.12.7 Produção de compostos amilóides

A leitura da produção de compostos amilóides foi realizada com a adição de uma solução de iodeto de potássio 1:5 (Iugol) na placa com crescimento positivo de YNB, ágar e glicose. A leitura positiva é evidenciada pela coloração azulada na colônia, resultante da reação do Iugol com os compostos amilóides produzidos pela levedura.

5. ARTIGOS

Microbiological Research 262 (2022) 127083



Contents lists available at ScienceDirect

Microbiological Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mres



High MICs for antifungal agents in yeasts from an anthropized lagoon in South America

Danielle M. Pagani^{a,b}, Dalane Heidrich^{a,c,d}, Fabiana Tormente^{a,b}, Gabriela Milani^{a,d}, Louise Jank^e, Ng Haig They^f, Patrícia Valente^{a,b}, Maria Lúcia Scroferneker^{a,c,g}

^a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e de Alimentos, Federal University of Rio Grande do Sul, Sarmento Leite Street, 500, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Federal University of Rio Grande do Sul, Sarmento Leite Street, 500, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^d Laboratório de Análise de Água, Saneamento e Biologia de Pesca, Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos (CECCOMAR), Brazil

^e Laboratório Federal de Defesa Agropecuária - LFDIA/DF, Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Porto Alegre, Brazil

^f Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus Livramento, Departamento Interdisciplinar, Centro de Análise Costeira, Limnológica e Marinha (CECCOMAR), Programa de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PPGRAC/PURG), Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
High antifungal MIC
Agricultural fungicides
Vandaea fovea
Yeast
Polluted freshwater

ABSTRACT

The lagoons are fragile ecosystems used by several species as a refuge and breeding area, and it is also a place where certain communities practice fishing activity. With increasing urbanization around this ecosystem, pesticides used in agriculture and untreated urban wastewater are drained into the river basin, resulting in the dispersion of organic matter and antifungals used by the population and farmers. These may favor the selection of resistant pathogens directly into the environment, a concern since several fungi have emerged as pathogens in the last decades. In this study, we investigated the presence in an impacted lagoon by potentially resistant yeast to antifungal agents. We evaluated their capacity for producing extracellular enzymes that could act as virulence factors. Water samples from the Tramandai lagoon were analyzed for the presence of pesticides using the SPE-LC-ESI-MS/MS. Tricyclazole, carbendazim, azoxystrobin, thiothiobenzazole, and tebuconazole were found. Twenty-eight yeast species were isolated, including the multidrug-resistant *Candida lusitana*, and species with high minimal inhibitory concentrations (MICs) for clinical antifungal agents. Around 92% of the isolates had MIC values above the resistance breakpoints established for *Candida* species for at least two antifungal agents. And 27% had high MIC values for fluconazole, terbinafine, amphotericin B, and rasopitragin. Tebuconazole MICs values were highly associated with MICs for fluconazole, azobenzazole, and amphotericin B, and significant correlations between high MICs for antifungal agents and enzyme production were found. The results indicated that the lagoon is a reservoir of resistance genes and a potential source for fungal infection, highlighting the importance of the One Health approach and the integrated vision of the ecosystem when managing these environments.

1. Introduction

Estuaries and lagoons play a fundamental ecological role by presenting high primary productivity and functioning as nurseries for many species, thus supporting fisheries and providing recreational areas (McGlathery et al., 2007). Anthropogenic pressures such as agriculture

and the discharge of untreated urban wastewater can cause cumulative effects on the environment, negatively affecting the ecosystem and its species to different degrees (Jones and Pang, 2012; Fernandes et al., 2017). The One Health concept represents the inseparability of human, animal, and environmental health. The quality of life of populations and their health depends on an ecologically balanced environment (Goun

* Correspondence to: Departamento de Microbiologia, FCS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, Sala. 325, Porto Alegre, CEP 90050-170, Brazil.

E-mail address: scroferne@ufrgs.br (M.L. Scroferneker).

[†] Present address: Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas (PPGCM) e Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec), Universidade do Vale do Taquari - Univates, Avenida Avelino Tallini, 171, Bairro Universitário, Lajeado, 99914-014, Rio Grande do Sul, Brazil.

<https://doi.org/10.1016/j.mres.2022.127083>

Received 11 May 2022; Received in revised form 23 May 2022; Accepted 26 May 2022

Available online 7 June 2022

0944-5013/© 2022 Elsevier GmbH. All rights reserved.

8. REFERÊNCIAS

AIME, M. C.; MATHENY, P. B.; HENK, D. A.; FRIEDERS, E. M.; NILSSON, R. H.; PIEPENBRING, M.; et al. An overview of the higher level classification of Pucciniomycotina based on combined analyses of nuclear large and small subunit rDNA sequences. *Mycologia*, v. 98, n. 6, p. 896-905, 2006.

AIME, M. C.; TOOME, M.; MCLAUGHLIN, D. J. Pucciniomycotina. In: MCLAUGHLIN, D. J.; SPATAFORA, J. W. *The mycota: Systematics and evolution Part A*. 2nd ed. Springer-Verlag, v. 7A, 461 p.

AL-BAQSAMI, Z. F.; AHMAD, S.; KHAN, Z. Antifungal drug susceptibility, molecular basis of resistance to echinocandins and molecular epidemiology of fluconazole resistance among clinical *Candida glabrata* isolates in Kuwait. *Science Reports*, v. 10, p. 6238, 2020.

ALMEIDA, F.; RODRIGUES, M. L.; COELHO, C. The Still Underestimated Problem of Fungal Diseases Worldwide. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, p. 214, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00214>.

ALVARADO-RYBAK, M.; LEPE-LOPEZ, M.; PEÑAFIEL-RICAURTE, A.; VALENZUELA-SÁNCHEZ, A.; VALDIVIA, C.; MARDONES, F.O.; et al. Bioclimatic and anthropogenic variables shape the occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* over a large latitudinal gradient. *Scientific Reports*, v. 11, p. 17383, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96535-w>

ANTONELLI, A.; ZIZKA, A.; CARVALHO, F. A.; SCHARN, R.; BACON, C. D.; SILVESTRO, D.; CONDAMINE, F. L. Amazonia is the primary source of Neotropical biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 115, n. 23, p. 6034-6039, 2018. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713819115>.

ASSRESS, H. A.; SELVARAJAN, R.; NYONI, H.; MAMBA, B. B.; MSAGATI, T. A. M. Antifungal azoles and azole resistance in the environment: current status and future perspectives - a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, v. 20, p. 1011-1041, 2021.

BALL, B.; LANGILLE, M.; GEDDES-MCALISTER, J. Fun(gi)omics: Advanced and Diverse Technologies to Explore Emerging Fungal Pathogens and Define Mechanisms of Antifungal Resistance. *mBio*, v. 11, n. 5, p. e01020-20, 2020. <https://doi.org/10.1128/mBio.01020-20>.

BARDAL, S. K.; WAECHTER, J. E.; MARTIN, D. S. Infectious diseases. In: BARDAL, S. K.; WAECHTER, J. E.; MARTIN, D. S. *Applied pharmacology*, W. B. Saunders, 2011, p. 233-291. ISBN 978-1-4377-0310-8.

BARNES, R. S. K. *Coastal lagoons*. Cambridge Univ. Press, New York. 1980, 106 p.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. Yeasts: Characteristics and identification. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000. 811 p. ISBN 9780521573962.

BEARDSLEY, J.; HALLIDAY, C. L.; CHEN, S. C.; SORREL, T. C. Responding to the emergence of antifungal drug resistance: perspectives from the bench and the bedside. *Future Microbiology*, v. 13, n. 10, 2018. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb-2018-0059>.

BEGEROW, D.; SCHÄFER, A. M.; KELLNER, R.; YURKOV, A.; KEMLER, M.; OBERWINKLER, F.; BAUER, R. Ustilaginomycotina. In: MCLAUGHLIN, D. J.; SPATAFORA, J. W. The mycota: Systematics and evolution Part A. 2nd ed. Springer-Verlag, v. 7A, 461, 2014.

BEHJATI, S., TARPEY, P.S. (2013) What is next generation sequencing?. *Archives of Disease in Childhood - Education and Practice*, v. 98, n. 6, p. 236-238, 2013. <http://dx.doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>.

BHATTACHARYA, S.; ESQUIVEL, B. D.; WHITE, T. C. Overexpression or Deletion of Ergosterol Biosynthesis Genes Alters Doubling Time, Response to Stress Agents, and Drug Susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *mBio*, v. 9, n. 4, p. e01291-18, 2018. <https://doi.org/10.1128/mBio.01291-18>.

BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B. C. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. *Antibiotics*, v. 9, n. 6, p. 312, 2020.

BIRNBAUM, J. E. Pharmacology of the allylamines. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 34, n. 4, part 2, p. 782-785, 1990.

BLACKWELL, M. Fungal evolution and taxonomy. *BioControl*, v. 55, p. 7-16, 2010.

BOEKHOUT, T.; FONSECA, A.; SAMPAIO, J. P.; BANDONI, R. J.; FELL, J. W.; KWON-CHUG, K. J. Discussion of teleomorphic and anamorphic Basidiomycetous yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. The yeasts: A taxonomy study. 5th ed. London: Elsevier, 2011, p.1339-1372. ISBN 978-0-444-52149-1.

BRAUER, V. S.; REZENDE, C. P.; PESSONI, A. M.; DE PAULA, R.G.; RANGAPPA, K. S.; NAYAKA, S. C.; GUPTA, V.K.; ALMEIDA, F. Antifungal agents in agriculture: friends and foes of public health. *Biomolecules*, v. 9, n. 10, p. 521, 2019. <https://doi.org/10.3390/biom9100521>.

BRILHANTE, R. S.; PAIVA, M. A.; SAMPAIO, C. M.; CASTELO-BRANCO, D. S.; TEIXEIRA, C. E.; DE ALENCAR, L. P.; et al. Azole resistance in *Candida* spp. isolated from Catu Lake, Ceara, Brazil: an efflux-pump-mediated mechanism. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, p. 33-38, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.008>.

BRONDZ, I. FUNGI | Classification of the Basidiomycota. In: BATT, C. A.; TORTORELLO, M. L. Encyclopedia of food microbiology, 2 nd ed. Academic Press, 2014, p. 20-29. ISBN 9780123847331.

BROWN, G. D.; DENNING, D. W.; GOW, N. A.; LEVITZ, S. M.; NETEA, M. G.; WHITE, T. C. Hidden killers: human fungal infections. Science Translational Medicine, 4, n. 165, p. 165rv13, 2012.

BUZZINI, P.; LACHANCE, M.; YURKOV, A. Yeasts in natural ecosystems: Diversity. Springer, 2017, 499 p. ISBN 978-3-319-62682-6.

CAMPOY, S.; ADRIO, J. L. Antifungals. Biochemical Pharmacology, v. 133, n. 1, p. 86-96, 2017.

CAO, B.; HAELEWATERS, D.; SCHOUTTETEN, N.; BEGEROW, D.; BOEKHOUT, T.; GIACHINI, A. J.; et al. Delimiting species in Basidiomycota: a review. Fungal Diversity, v. 109, p. 181-237, 2021.

CAROLUS, H.; PIERSON, S.; LAGROU, K.; VAN DIJCK, P. Amphotericin B and other polyenes-discovery, clinical, use, mode of action and drug resistance. Journal of Fungi, v. 6, n. 4, p. 321, 2020.

CHANG, W.; LIU, J.; ZHANG, M.; SHI, H.; ZHENG, S.; JIN, X.; GAO, Y.; WANG, S.; JI, A.; LOU, H. Efflux pump-mediated resistance to antifungal compounds can be prevented by conjugation with triphenylphosphonium cation. Nature Communications, v. 9, p. 5102, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07633-9>.

CHAO, A.; CHAZDON, R. L.; COLWELL, R. K.; SHEN, T. J. A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. Ecology Letters, v. 8, n. 2, p. 148-159, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00707.x>.

CHEN, S. C.; SLAVIN, M. A.; SORREL, T. C. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison. Drugs, v. 71, n. 1, p. 11-41, 2011.

COUGHLAN, L. M.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A. Biotechnological applications of functional metagenomics in the food and pharmaceutical industries. Frontiers in Microbiology, v. 6, p. 672, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00672>.

COLLADO, C.,;MEDINA, L.; ZORRAQUINO, A.; BAEZA, T.; FERRER ,C.; PLAZAS, J.; COLOM, M. F. Cutaneous fusariosis by a species of the *Fusarium dimerum* species complex in a patient with acute myeloblastic leukemia. Revista Iberoamericana de Micología, v. 30, n. 2, p. 119-121, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2012.11.001>.

COUTO, R.M.; BRANDESPIM, D.F. A review of the One Health concept and its application as a tool for policy-makers. *International Journal of One Health*, v. 6, n. 1, p. 83-89, 2020.

CUENCA-ESTRELLA, M. Antifungal drug resistance mechanisms in pathogenic fungi: from bench to bedside. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 20, n. 6, p. 54-59, 2014.

CUEVAS, N.; MARTINS, M.; COSTA, P. M. Risk assessment of pesticides in estuaries: a review addressing the persistence of an old problem in complex environments. *Ecotoxicology*. v. 27, n. 7, p. 1008-1018, 2018.
<https://doi.org/10.1007/s10646-018-1910-z>.

DALHOFF, A. Does the use of antifungal agents in agriculture and food foster polyene resistance development? A reason for concern. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 13, p. 40-48, 2018.

DALHOFF, A. Does the use of antifungal agents in agriculture and food foster polyene resistance development? A reason for concern. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 13, p. 40-48, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.10.024>.

DEAK, T. Ecology and biodiversity of yeasts with potential value in biotechnology. In: SATYANARAYANA, T.; KUNZE, G. *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. Springer, Dordrecht, 2009, p. 151-168. ISBN 978-1-4020-8291-7.

DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; MAVINGUI, P.; BOETSCH, G.; BOISSIER, J.; DARRIET, F.; DUBOZ, P.; FRITSCH, C.; GIRAUDOUX, P.; LE ROUX, F.; MORAND, S.; PAILLARD, C.; PONTIER, D.; SUEUR, C.; VOITURON, Y. The One Health Concept: 10 years old and a long road ahead. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 5, p. 14, 2018. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00014>.

DIAZ, R.; IBÁÑEZ, M.; SANCHO, J. V.; HERNÁNDEZ, F. Qualitative validation of a liquid chromatography–quadrupole-time of flight mass spectrometry screening method for organic pollutants in waters. *Journal of Chromatography A*, v. 1276, p. 47-57, 2013. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.12.030>.

DOUGLAS, C. M.; D'IPPOLITO, J. A.; SHEI, G. J.; MEINZ, M.; ONISHI, J.; MARRINAN, J. A.; LI, W.; ABRUZZO, G. K.; FLATTERY, A.; BARTIZAL, K.; MITCHELL, A.; KURTZ, M. B. Identification of the FKS1 gene of *Candida albicans* as the essential target of 1,3-beta-D-glucan synthase inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 41, n. 11, p. 2471–2479, 1997.
<https://doi.org/10.1128/AAC.41.11.2471>.

EL-ELIMAT, H.A.T., RAJA, M. FIGUEROA, A.H. AL SHARIE, R.L. BUNCH, N.H. OBERLIES. Freshwater fungi as a source of chemical diversity: a review. *J. Nat. Prod.*, 84, p. 898-916, 2021. 10.1021/acs.jnatprod.0c01340

Emami, S.; Tavangar, P.; Keighobadi, M. An overview of azoles targeting sterol 14 α -demethylase for antileishmanial therapy. *Eur J Med Chem*, v. 135, p. 241-259, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.044>.

FARIA-RAMOS, I.; FARINHA, S.; NEVES-MAIA, J.; TAVARES, P.R.; MIRANDA, I.M.; ESTEVINHO, L.M.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G. Development of cross-resistance by *Aspergillus fumigatus* to clinical azoles following exposure to prochloraz, an agricultural azole. *BMC Microbiology*, v. 14, p. 155, 2014. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-155>.

FELL, J. W.; 6 Yeasts in marine environments. In: JONES, G.; PANG, K. *Marine fungi and fungal-like organisms*. Berlin, Boston: De Gruyter, 2012, p. 91-102.

FELL, J. W.; VAN UDEN, N. Yeasts in marine environments. In: Oppenheimer, C.H. *Marine Microbiology*. Springfield Illinois, Charles C. Thomas, 1963, p. 329-340.

FERA, M. T.; LA CAMERA, E.; DE SARRO, A. New triazoles and echinocandins: mode of action, in vitro activity and mechanisms of resistance. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, v. 7, n. 8, p. 981-998, 2009.

FERNANDES, K. E.; CARTER, D. A. Cellular plasticity of pathogenic fungi during infection. *PLOS Pathogens*, v.16, n. 6, p. e1008571, 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008571>.

FISHER, M. C.; HENK, D. A.; BRIGGS, C. J.; BROWNSTEIN, J. S.; MADOFF, L. C.; MCCRAW, S. L.; GURR, S. J. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, v. 484, p. 186–194, 2012. <https://doi.org/10.1038/nature10947>.

FORASTIERO, A.; MESA-ARANGO, A. C.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A.; ALCAZAR-FUOLI, L.; BERNAL-MARTINEZ, L.; PELAEZ, T.; LOPEZ, J. F.; GRIMALT, J. O.; GOMEZ-LOPEZ, A.; CUESTA, I.; ZARAGOZA, O.; MELLADO, E. *Candida tropicalis* antifungal cross-resistance is related to different azole target (Erg11p) modifications. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 57, n. 10, p. 4769-4781, 2013.

FRANCISCO, E. C.; DE ARAÚJO, M. C.; LIMA-NETO, R. G.; NEVES, R. P.; DE AZEVEDO MELO, A. S.; CHAVES, G. M. Evaluation of virulence factors in vitro, resistance to osmotic stress and antifungal susceptibility of *Candida tropicalis* isolated from the coastal environment of Northeast Brazil. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, 1783. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01783>.

FRANCOIS, E. J. A. I. CAMMUE, P. A. B.; BORGERS, M.; AUSMA, J.; DISPERSYN, D. G.; THEVISSSEN, K. Azoles: Mode of antifungal action and resistance development. Effect of miconazole on endogenous reactive oxygen species production in *Candida albicans*. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, v. 5, n. 1, p. 3-13, 2006.

FURUKAWA, T.; VAN RHIJN, N.; FRACZEK, M.; GSALLER, F.; DAVIES, E.; CARR, P.; GAGO, S.; FORTUNE-GRANT, R.; RAHMAN, S.; GILSENAN, J. M.; HOULDER, E.; KOWALSKI, C. H.; RAJ, S.; PAUL, S.; COOK, P.; PARKER, J. E.; KELLY, S.; CRAMER, R. A.; LATGÉ, J. P.; MOYE-ROWLEY, S.; BIGNELL, E.; BOWYER, P.; BROMLEY, M. J. The negative cofactor 2 complex is a key regulator of drug resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Nature Communications*, v. 11, n. 1, p. 427, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14191-1>.

GABALDÓN, T.; CARRETÉ, L. The birth of a deadly yeast: tracing the evolutionary emergence of virulence traits in *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Research*, v. 16, n. 2, p. fov110, 2016. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov110>.

GÁRBOR, P.; ROSA, C. *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2006 Printed in Germany, 2006, 580 p. ISBN: 978-3-642-06552-1. <https://link.springer.com/book/10.1007/3-540-30985-3#about>

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanism of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical Microbiology Review*, v. 12, n. 4, p. 501-517, 1999.

GHOSH, P. N.; FISHER, M. C.; BATES, K.A. Diagnosing Emerging Fungal Threats: A One Health Perspective. *Frontiers in Genetics*, v. 9, p. 376, 2018. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00376>.

GLEASON, F. H.; KAGAMI, M.; LEFÈVRE, E.; SIME-NGANDO, T. The ecology of chytrids in aquatic ecosystems: roles in food web dynamics. *Fungal Biology Reviews*, v. 22, p. 17–25, 2008.

GOODWIN, S., MCPHERSON, J., MCCOMBIE, W. (2016) Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, v. 17, p. 333-351, 2016. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>.

GORAVEY, W.; ALI, G. A.; ABID, F.; IBRAHIM, E. B.; AL MASLAMANI, M. A.; ABDEL HADI, H. Central line-associated *Rhodotorula mucilaginosa* fungemia in an immunocompetent host: Case report and review of the literature. *Clinical Case Reports*. v. 9, p. 2158-2161, 2021. <https://doi.org/10.1002/ccr3.3969>.

GROSSART, HP.; VAN DEN WYNGAERT, S.; KAGAMI, M.; WURZBACHER, C.; CUNLIFFE, M.; ROJAS-JIMENEZ, K. Fungi in aquatic ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, v. 17, p. 339-354, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0175-8>.

GUPTA, A. K.; GUPTA, U. D. Chapter 19 - Next Generation Sequencing and Its Applications. In: VERMA, A. S.; SINGH, A. *Animal Biotechnology*. Academic Press, 2014, p. 345-367. ISBN 9780124160026. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416002-6.00019-5>.

HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; PAGNOCCA, F. C. Yeasts in aquatic ecotone habitats. In: BUZZINI, P.; LACHANCE, M.; YURKOV, A. Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity. Springer, 2017, p. 63-85. ISBN 978-3-319-62682-6.

HAHN, M. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: Botrytis as a case study. *Journal of Chemical Biology*, v. 7, n. 4, p. 133-41, 2014.
<https://doi.org/10.1007/s12154-014-0113-1>.

HANDELSMAN, J., RONDON, M.R., BRADY, S.F., CLARDY, J., GOODMAN, R.M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, v. 5, n. 10, p. R245-249, 1998.
[https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90108-9).

HANG, J.; DEBETS, A. J. M.; VERWEIJ, P. E.; SNELDERS, E. Azole-Resistance Development; How the *Aspergillus fumigatus* lifecycle defines the potential for adaptation. *Journal of Fungi*. v. 7, n. 8, p. 599, 2021.
<https://doi.org/10.3390/jof7080599>.

HANNON, G. J. FASTX-Toolkit. http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit, 2010.
HATWIG, C.; BALBUENO, E. A.; BERGAMO, V. Z.; PIPPI, B.; FUENTEFRIA, A. M.; SILVEIRA, G. P. Multidrug-resistant *Candida glabrata* strains obtained by induction of anidulafungin resistance in planktonic and biofilm cells. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 55, p. E18025, 2019.

HEALEY, K. R.; PERLIN, D. S. Fungal resistance to echinocandins and the MDR phenomenon in *Candida glabrata*. *Journal of Fungi*, v.4, n. 3, p. 105, 2018.
HEITMAN, J. Microbial Pathogens in the Fungal Kingdom. *Fungal Biology Reviews*, v. 25, n. 1, p. 48-60, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2011.01.003>.

HERB, A.; SABOU, M.; DELHORME, J. B.; PESSAUX, P.; MUTTER, D.; CANDOLFI, E.; LETSCHER-BRU, V. *Pseudozyma aphidis* fungemia after abdominal surgery: First adult case. *Medical Mycology Case Reports*, v. 8, p.37-39, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2015.03.001>.

HIBBET, D. S. A phylogenetic overview of the Agaricomycotina. *Mycologia*. V. 98, n. 6, p. 917-925, 2006.

HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P. F.; ERIKSSON, O. E.; et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, v. 111, n. 5, p. 509-547, 2007.

HOLZ, M. Do mar ao deserto: a evolução do Rio Grande do Sul no tempo geológico. Editora UFRGS, Porto Alegre, 1999. [In Portuguese].

Illumina, 2021.

<https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/hiseq-2500.html>

ISHII, N.; ISHIDA, S.; KAGAMI, M. PCR primers for assessing community structure of aquatic fungi including Chytridiomycota and Cryptomycota. *Fungal Ecology*, v. 13, p. 33-43, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2014.08.004>.

IYER, K. R.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Flow Cytometric Measurement of Efflux in *Candida* species. *Current Protocol in Microbiology*, v. 59, n. 1, p. e121, 2020. <https://doi.org/10.1002/cpmc.121>.

JAMES, T. Y.; KAUFF, F.; SCHOCH, C. L.; MATHENY, P. B.; HOFSTETTER, V.; COX, C. J.; et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, v. 443, n. 7113, p. 818-822, 2006.

JAMES, T. Y.; PORTER, D. L.; LEANDER, C. A.; VILGALYS, R.; LONGCORE, J. E. Molecular phylogenetics of the Chytridiomycota supports the utility of ultrastructural data in chytrid systematics. *Canadian Journal of Botany*, v. 78, n. 3, p. 336-350, 2000. <https://doi.org/10.1139/b00-009>.

JAMES, T. Y.; STAJICH, J. E.; HITTINGER, C. T.; ROKAS, A. Toward a fully resolved fungal tree of life. *Annual Review of Microbiology*, v. 74, n. 1, p. 291-313, 2020.

JONES, E. B. G., CHOYEKLIN, R. Ecology of marine and freshwater basidiomycetes. In: BODDY, L.; FRANKLAND, J. C.; VAN WEST, P. *British Mycological Society Simposia Series*. Academic Press, v. 28, 2008, p. 301-324. ISSN 0275-0287.

JONES, E. B. G.; SUETRONG, S.; SAKAYAROJ, J.; BAHKALI, A. H.; ABDEL-WAHAB, M. A.; BOEKHOUT, T.; PANG, K. Classification of marine Ascomycota, Basidiomycota, Blastocladiomycota and Chytridiomycota. *Fungal Diversity*, v. 73, n. 1, p. 1-72, 2015.

KACHALKIN, A. V. Yeasts of the White Sea intertidal zone and description of *Glaciozyma litorale* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 105, n. 6, p. 1073-1083, 2014.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T.; ROBERT, V. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. *The Yeasts: A taxonomy study*. 5th ed. London: Elsevier, 2011, p. 87-110. ISBN 978-0-444-52149-1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0>.

LANGILLE, M. G. I., ZANEVELD, J., CAPORASO, J. G., MCDONALD, D., KNIGHTS, D., REYES, J. A., CLEMENTE, J.C., BURKEPILE, D.E., THURBER, R.L.V., KNIGHT, R., BEIKO, R.G., HUTTENHOWER, C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nature Biotechnology*, v. 31, p. 814-821, 2013. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>.

- LAURA, C., PAUL, C., COLIN., AVELINO, A. Biotechnological applications of functional metagenomics in the food and pharmaceutical industries. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 672, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00672>.
- LEITE, B.; DE CHAVES, M. A.; ATHOS ARAMIS THOPOR NUNES, A. A. T.; JANK, L.; CORÇÃO, G. Antibiotic resistance in surface waters from a coastal lagoon of Southern Brazil under the impact of anthropogenic activities. *Revista Ambiente & Água [online]*, v. 14, n. 5, 2019. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.2379>.
- LETSCHER-BRU, V.; HERBRECHT, R. Caspofungin: the first representative of a new antifungal class. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 51, n. 3, p. 513-21, 2003. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg117>.
- LIBKIND, D.; BUZZINI, P.; TURCHETTI, B.; ROSA, C. A. Yeasts in continental and seawater. In: BUZZINI, P.; LACHANCE, M.; YURKOV, A. *Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity*. Springer, 2017, p. 1-61. ISBN 978-3-319-62682-6.
- LOH, B. S.; ANG, W. H. "Illuminating" echinocandins' mechanism of action. *ACS Central Science*, v. 6, n. 10, p. 1651-1653, 2020.
- LORCH, J. M.; KNOWLES, S.; LANKTON, J. S.; MICHELL, K.; EDWARDS, J. L.; KAPFER, J. M.; STAFFEN, R. A.; WILD, E. R.; SCHMIDT, K. Z.; BALLMANN, A. E.; BLODGETT, D.; FARRELL, T. M.; GLORIOSO, B. M.; LAST, L. A.; PRICE, S. J.; SCHULER, K. L.; SMITH, C. E.; WELLEHAN, J. F. X.; BLEHERT, D. S. Snake fungal disease: an emerging threat to wild snakes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. v. 371, n. 1709, p. 20150457, 2016. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0457>.
- LLORET, J.; MARÍN, A.; MARÍN-GUIRAO, L. Is coastal lagoon eutrophication likely to be aggravated by global climate change? *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. v. 78, p. 403-412, 2008.
- MA, L. J.; GEISER, D. M.; PROCTOR, R. H.; ROONEY, A. P.; O'DONNELL, K.; TRAIL, F.; GARDINER, D. M.; MANNERS, J. M.; KAZAN, K. *Fusarium* pathogenomics. *Annual Review of Microbiology*, v. 67, p. 399-416, 2013. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155650>.
- MACIEL, N. O.; JOHANN, S.; BRANDÃO, L. R.; KUCHARÍKOVÁ, S.; MORAIS, C. G.; OLIVEIRA, A. P.; FREITAS, G. J.; BORELLI, B. M.; PELLIZZARI, M. F.; SANTOS, A. D.; DIJCK, V. P.; ROSA, C. A. Occurrence, antifungal susceptibility, and virulence factors of hypersaline and freshwater bodies in Egypt. *Czech Mycology*, 70 (1), 1-32, 2019.
- MACKENZIE, J.S.; JEGGO, M. The One Health Approach-Why Is It So Important? *Trop Med Infect Dis*. v. 4, n. 2, p. 88, 2019. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4020088>.

MARCHESI, J.R., RAVEL, J. (2015) The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*, v. 3, p. 31, 2015. <https://doi.org/10.1186/s40168-015-0094-5>.

MARTEL, C. M.; PARKER, J. E.; BADER, O.; WEIG, M.; GROSS, U.; WARRILOW, A. G.; KELLY, D. E.; KELLY, S. L. A clinical isolate of *Candida albicans* with mutations in ERG11 (encoding sterol 14 alpha-demethylase) and ERG5 (encoding C22 desaturase) is cross resistant to azoles and amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n. 9, p. 3577-3583, 2020.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 30, n. 1, p. 179-206, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2015.10.006>.

MEDEIROS, A. O.; MISSAGIA, B. S.; BRANDÃO, L. R.; CALLISTO, M.; BARBOSA, L. A. R. Water quality and diversity of yeasts from tropical lakes and rivers from the Rio Doce basin in Southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, n. 4, p. 1582-1594, 2021.

MILANEZI, A. C. M.; WITUSK, J. P. D.; VAN DER SAND, S. T. Antifungal susceptibility of yeasts isolated from anthropogenic watershed. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 91, n. 1, p. e20170369, 2019. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170369>.

MILLANES, A. M.; DIEDERICH, P.; EKMAN, S.; WEDIN, M. Phylogeny and character evolution in the jelly fungi (Tremellomycetes, Basidiomycota, Fungi). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 61, n. 1, p. 12-28, 2011.

MIZWAR, A.; SURAPATI, H.U. Biological Oxygen Demand (BOD5) as bio indicator of phytoplankton diversity index in the mangrove area of kintap estuary - south Kalimantan. *IOP Conference Series. Earth and Environmental Science; Bristol Vol. 448, Ed. 1, 2020*. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/448/1/012126>.

MONTOYA, A. M.; GONZÁLEZ A. S; PALMA-NICOLÁS, J. P.; GÓMEZ-TREVIÑO, A.; GONZÁLEZ, J. G.; GONZÁLEZ, G. M. Genotyping, extracellular compounds, and antifungal susceptibility testing of *Trichosporon asahii* isolated from Mexican patients. *Medical Mycology*, v. 53, n. 5, p. 505-11, 2015. <https://doi.org/10.1093/mmy/myv009>.

MONTOYA, A. M.; LUNA-RODRÍGUEZ, C. E.; GRACIA-ROBLES, G.; ROJAS, O. C.; GONZÁLEZ, G. M. In vitro lytic activity and antifungal susceptibility of infrequently isolated yeasts. *Archives of Microbiology*, v. 201, n. 8, p. 1147-1149, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01684-2>.

MORIO, F.; JENSEN, R. H.; PAPE, P. L.; ARENDRUP, M. C. Molecular basis of antifungal drug resistance in yeasts. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 50, n. 5, p. 599-606, 2017.

MOURAD, A.; PERFECT, J. R. Tolerability profile of the current antifungal armoury. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, v. 73, n. Suppl_1, p. 26-32, 2018.

MOUTON, M.; POSTMA, F.; WILSENACH, J.; BOTHA, A. Diversity and characterization of culturable fungi from marine sediment collected from St. Helena Bay, South Africa. *Microbiology of Aquatic Systems*, v. 64, n. 2, p. 311-319.

MRO CZYNSKA, M.; BRILLOWSKA-DABROWSKA, A. Current status of echinocandins use. *Antibiotics*, v. 9, n.5, p. 227, 2020.

NGUYEN, N. H.; SONG, Z.; BATES, S. T.; BRANCO, S.; TEDERSOO, L.; MENKE, J.; SCHILLING, J. S.; KENNEDY, P. G. FUNGuild: an open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology*, v. 20, p. 241-248, 2016.

NIGAM, P. K. Antifungal drugs and resistance: Current concepts. *Our Dermatology Online*, v. 6, p. 212-221, 2015.

NUCCI, M.; VARON, A. G.; GARNICA, M.; AKITI, T.; BARREIROS, G.; TROPE, B. M.; NOUÉR, S. A. Increased incidence of invasive fusariosis with cutaneous portal of entry, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 19, n. 10, p. 1567-72, 2013. <https://doi.org/10.3201/eid1910.120847>.

O'SHAUGHNESSY, E. M.; LYMAN, C. A.; WALSH, T. J. Amphotericin B: Polyene resistance mechanism. In: MAYERS, D. L. *Antimicrobial drug resistance*. Infectious Disease. Humana Press, 2009, p. 295-305.

OECHSLER, R. A.; YAMANAKA, T. M.; BISPO, P. J.; SARTORI, J.; YU, M. C.; MELO, A. S.; MILLER, D.; HOFLING-LIMA, A. L. *Fusarium keratitis* in Brazil: genotyping, in vitro susceptibilities, and clinical outcomes. *Clinical ophthalmology (Auckland, N.Z.)*, v. 7, p. 1693–1701, 2013. <https://doi.org/10.2147/OPHTH.S40063>.

OPULENTE, D. A.; LANGDON, Q. K.; BUH, K. V.; HAASE, M. A. B.; SYLVESTER, K.; MORIARTY, R. V.; et al. Pathogenic budding yeasts isolated outside of clinical settings. *FEMS Yeast Research*, v. 19, n. 3, foz032, 2019.

ORTIZ-CASTELLANOS, L.; RUIZ-HERRERA, J. Phylogenetic relationships of the wall-synthesizing enzymes of Basidiomycota confirm the phylogeny of their subphyla. *Folia Microbiologica*, v. 60, n. 2, p. 143-150, 2015.

PAGANI, D. M.; HEIDRICH, D.; PAULINO, G. V. B.; ALVES, K. O.; DALBEM, P. T.; OLIVEIRA, C. F.; et al. Susceptibility to antifungal agents and enzymatic activity of *Candida haemulonii* and *Cutaneotrichosporon dermatis* isolated from soft corals on the Brazilian reefs. *Archives of Microbiology*, v. 198, n. 10, p. 963-971, 2016.

PÉTER, G.; ROSA, C. *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*. 1st ed. Springer: Berlin Heidelberg, 2006, p.155-174 (The Yeast Handbook). ISBN 978-3-540-26100-1. POLVI EJ, LI X, O'MEARA TR, LEACH MD, COWEN LE. Opportunistic yeast pathogens: reservoirs, virulence mechanisms, and therapeutic strategies. *Cellular and Molecular Life Science*. v. 72, n. 12, p. 2261-87, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1860-z>.

POLVI, E. J.; LI, X.; O'MEARA, T. R.; LEACH, M. D.; COWEN, L. H. Opportunistic yeast pathogens: reservoirs, virulence mechanisms, and therapeutic strategies. *Cellular and Molecular Life Science*, v. 72, p. 2261-2287, 2015.

PRASAD, R.; RAWAL, M. K. Efflux pump proteins in antifungal resistance. *Frontiers in Pharmacology*, v. 5, p. 202, 2014. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00202>.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, v. 20, n. 1, p. 7-14, 1982.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of candida to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 25, n. 7, p. 792-798, 2019.

REVIE, N. M.; IYER, K. R.; ROBBINS, N.; COWEN, L. E. Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Current Opinion in Microbiology*, v. 45, p. 70-76, 2018.

ROCHA, M.F.; ALENCAR, L. P.; PAIVA, M. A.; MELO, L. M.; BANDEIRA, S. P.; PONTE, Y.B.; SALES, J. A.; GUEDES, G. M.; CASTELO-BRANCO, D. S.; BANDEIRA, T. J.; CORDEIRO, R. A.; PEREIRA-NETO, W. A.; BRANDINE, G. S.; MOREIRA, J. L.; SIDRIM, J. J.; BRILHANTE, R S. Cross-resistance to fluconazole induced by exposure to the agricultural azole tetraconazole: an environmental resistance school? *Mycoses*, v. 59, n. 5, p. 281-90, 2016. <https://doi.org/10.1111/myc.12457>.

ROGNES, T.; Flouri, T.; Nichols, B.; Quince, C.; Mahé, F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ life and environment*, v. 4, 2016.

RÜCHEL, R.; TEGELER, R.; TROST, M. A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia*, v. 20, n.3, p. 233-244, 1982.

RYBAK, J. M.; DICKENS, C. M.; PARKER, J. E.; CAUDLE, K. E.; MANNIGABA, K.; WHALEY, S. G.; et al. Loss of C-5 Sterol desaturase activity results in increased resistance to azole and echinocandin antifungals in a clinical isolate of *Candida parapsilosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 9, 2017.

SALIPANTE, S. J.; KAWASHIMA, T.; ROSENTHAL, C.; HOOGESTRAAT, D. R.; CUMMINGS, L. A.; SENGUPTA, D. J.; HARKINS, T. T.; COOKSON, B. T.; HOFFMAN, N. G. Performance comparison of Illumina and ion torrent next-generation sequencing platforms for 16S rRNA-based bacterial community profiling. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 80, n. 24, p. 7583-7591, 2014. <https://doi.org/10.1128/AEM.02206-14>.

SALIPANTE, S. J.; KAWASHIMA, T.; ROSENTHAL, C.; HOOGESTRAAT, D. R.; CUMMINGS, L. A.; SENGUPTA, D. J.; HARKINS, T. T.; COOKSON, B. T.; HOFFMAN, N. G. Performance comparison of Illumina and ion torrent

next-generation sequencing platforms for 16S rRNA-based bacterial community profiling. *Applied Environmental Microbiology*, v. 80, n. 24, p. 7583-7591, 2014. <https://doi.org/10.1128/AEM.02206-14>.

SANGLARD, D.; COSTE, A.; FERRARI, S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Research*, v. 9, n. 7, p. 1029-1050, 2009.

SCHÄFER, A. A planície costeira do Rio Grande do Sul: um sistema ecológico costeiro único no mundo. In: SCHÄFER, A.; LANZER, R.; PEREIRA, R. Atlas socioambiental dos municípios de Mostardas, Tavares, São José do Norte e Santa Vitória do Palmar. Caxias do Sul: EducS, v., 2009, p. 44-55.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied Environmental Microbiology*, v. 75, n. 23, p. 7537-41, 2009.

SCHOCH, C. L.; SUNG, G.; LÓPEZ-GIRÁLDEZ, F.; TOWNSEND, J. P.; MIADLIKOWSKA, J.; HOFSTETTER, V.; et al. The ascomycota tree of life: A phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Systematic Biology*, v. 58, n. 2, p. 224-239, 2009.

SCHROERS, H. J.; O'DONNELL, K.; LAMPRECHT, S. C.; KAMMEYER, P. L.; JOHNSON, S.; SUTTON, D. A.; RINALDI, M. G.; GEISER, D. M.; SUMMERBELL, R. C. Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. *Mycologia*, v. 101, n. 1, p. 44-70, 2009. <https://doi.org/10.3852/08-002>.

SCOTT, J. A.; UNTEREINER, W. A. Determination of keratin degradation by fungi using keratin azure. *Medical Mycology*, v. 42, n. 3, p. 239-46, 2004.

SELMECKI, A.; FORCHE, A.; BERMAN, J. Aneuploidy and isochromosome formation in drug-resistant *Candida albicans*. *Science*, v. 313, n. 5785, p. 367-70, 2006. <https://doi.org/10.1126/science.1128242>.

SHARMA, A.; CHANDRA, S.; SHARMA, M. Difference in keratinase activity of dermatophytes at different environmental conditions is an attribute of adaptation to parasitism. *Mycoses*, v. 55, n. 5, p. 410-415, 2012.

SHEN, X. X.; STEENWYK, J. L.; LABELLA, A. L.; OPULENTE, D. A.; ZHOU, X.; KOMINEK, J.; LI, Y.; GROENEWALD, M.; HITTINGER, C. T.; ROKAS, A. Genome-scale phylogeny and contrasting modes of genome evolution in the fungal phylum Ascomycota. *Science Advances*, v. 6, n. 45, eabd0079, 2020.

SILVA, D. P.; LESSA, I. L. P.; DE MEDEIROS, M. A. S.; DE LACERDA, G. A. N.; MASCARENHAS, M. L. V. C.; FERREIRA, A. L. C.; LÚCIO, I. M. L.; MOREIRA, R. T. F. Infecções fúngicas em prematuros por leveduras do gênero *Malassezia* / Fungal

infections in preterm infants by yeasts of the genus *Malassezia*. Revista de Enfermagem UFPE on line, v. 12, n.10, p. 2836-2843, 2018.

SIME-NGANDO, T. Phytoplankton chytridiomycosis: fungal parasites of phytoplankton and their imprints on the food web dynamics. Frontiers in Microbiology, v. 3, p. 361, 2012. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00361>.

SIMON, L.; GASTAUD, L.; MARTIANO, D.; BAILLEUX, C.; HASSEINE, L.; GARI-TOUSSAINT, M. First endogenous fungal endophthalmitis due to *Fusarium dimerum*: A severe eye infection contracted during induction chemotherapy for acute leukemia. Journal de Mycologie Médicale, v. 28, n. 2, p. 403-406, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.01.002>.

SINGH, A.; MASIH, A.; KHURANA, A.; SINGH, P. K.; GUPTA, M.; HAGEN, F.; MEIS, J. F.; CHOWDHARY, A. High terbinafine resistance in *Trichophyton interdigitale* isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene. Mycoses, v. 61, n. 7, p. 477-484, 2018.

SOUZA, S. O.; DO VALE, C. C. Vulnerabilidade ambiental da planície costeira de Caravelas (BA) como subsídio ao ordenamento ambiental. Sociedade & Natureza, v. 28, n. 1, 2016. <https://doi.org/10.1590/1982-451320160110>.

SNELDERS, E.; CAMPS, S.M.T.; KARAWAJCZYK, A.; SCHAFTENAAR, G.; KEMA, G.H.J.; VAN DER LEE H.A.; KLAASSEN, C.H.; MELCHERS, W.J.G.; VERWEIJ, P.E., 2012. Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. PLoS One, v. 7, n. 3, p. e31801, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031801>.

SOUZA, T. F.; SCROFERNEKER, M. L.; COSTA, J. M.; CARISSIMI, M.; CORBELLINI, V. A. Secretion of five extracellular enzymes by strains of chromoblastomycosis agents. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, v. 50, n. 5, p. 269-72, 2008.

SPATAFORA, J. W.; SUNG, G.; JOHNSON, D.; HESSE, C.; O'ROURKE, B.; SERDANI, M.; et al. A five-gene phylogeny of Pezizomycotina. Mycologia, v. 98, n. 6, p. 1018-1028, 2006.

SPETTEL, K.; BAROUSCH, W.; MAKRISTATHIS, A.; ZELLER, I.; NEHR, M.; et al. Analysis of antifungal resistance genes in *Candida albicans* and *Candida glabrata* using next generation sequencing. Plos One, v. 14, n. 1, p. E0210397.

STEENWYK, J.L.; OPULENTE, D. A.; KOMINEK, J.; SHEN, X. X.; ZHOU, X.; LABELLA, A., L.; et al. Extensive loss of cell-cycle and DNA repair genes in an ancient lineage of bipolar budding yeasts. PLOS Biology, v. 17, n. 5, p. e3000255, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000255>.

STIEFEL, P.; SCHMIDT-EMRICH, S.; MANIURA-WEBER, K.; REN, Q. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiology*, v. 15, p. 36, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0376-x>.

SUGIYAMA, J.; HOSAKA, K.; SUH, S.-O. Early diverging Ascomycota: phylogenetic divergence and related evolutionary enigmas. *Mycologia*, v. 98, n. 6, p. 996-1005, 2006.

SUMMERELL, B. A.; LAURENCE, M. H.; LIEW, E. C. Y.; LESLIE, J. F. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Diversity*, v. 44, p. 3-13, 2010. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0060-2>.

TEDERSOO, L.; SÁNCHEZ-RAMIREZ, S.; KOLJALG, U.; BAHRAM, M.; DÖRING, M.; SCHIGEL, D.; et al. High-level classification of the fungi and a tool for evolutionary ecological analyses. *Fungal Diversity*, v. 90, p. 135-159, 2018.

THOMAS T, GILBERT J, MEYER F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics Experimentation*, v. 2, n. 1, p. 3, 2016. <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>.

TROVATO, L.; BONGIORNO, D.; CALVO, M.; MIGLIORISI, G.; BORACCINO, A.; MUSSO, N.; OLIVERI, S.; STEFANI, S.; SCALIA, G. Resistance to echinocandins complicates a case of *Candida albicans* bloodstream infection: A case report. *Journal of Fungi*, v. 7, n. 6, p. 405, 2021.

TRUONG, C.; MUJIC, A. B.; HEALY, R.; KUCHAR, F.; FURCI, G.; TORRES, D.; et al. How to know the fungi: combining field inventories and DNA-barcoding to document fungal diversity. *New Phytologist*, v. 214, p. 913-919, 2017. <https://doi.org/10.1111/nph.14509>.

The Ocean Conference. United Nations, New York, 5-9 June, 2017. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/wp-content/uploads/2017/05/Ocean-fact-sheet-package.pdf>

VAN DIEPENINGEN, A. D.; AL-HATMI, A. M. S.; BRANKOVICS, B.; DE HOOG, G. S. Taxonomy and Clinical Spectra of *Fusarium* Species: Where Do We Stand in 2014?. *Current Clinical Microbiology Report*, v. 1, p. 10-18, 2014. <https://doi.org/10.1007/s40588-014-0003-x>.

VEGA-CHACÓN, Y.; ALBUQUERQUE, M. C. de; PAVARINA, A. C.; GOLDMAN, G. H.; MIMA, E. G. O. Verapamil inhibits efflux pumps in *Candida albicans*, exhibits synergism with fluconazole, and increases survival of *Galleria mellonella*, *Virulence*, v.12, n.1, p. 231-243, 2021. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1868814>.

ORTIZ-VERA, M. P.; OLSCHANESKI, L. R.; DA SILVA, E. G.; DE LIMA, F. R.; MARTINEZ, L. R. P. R.; SATO, M. I. Z.; JAFFÉ, R.; ALVES, R.; ICHIWAKI, S.; PADILLA, G.; ARAÚJO.. Influence of water quality on diversity and composition of

fungal communities in a tropical river. *Sci Rep*, v. 8, p. 14799, 2018.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-33162-y>.

VINCENT, B. M.; LANCASTER, A. K.; SCHERZ-SHOVAL, R.; WHITESELL, L.; LINDQUIST, S. Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. *Plos Biology*, v. 11, n.10, p. E1001692.

VU, D.; GEORGIEVSKA, S.; SZOKE, S.; KUZNIAR, A.; ROBERT, V. fMLC: fast multi-level clustering and visualization of large molecular datasets. *Bioinformatics*, v. 34, n. 9, p. 1577-1579, 2018.

VU, D.; GROENEWALD, M.; DE VRIES, M.; GEHRMANN, T.; STIELOW, B.; EBERHARDT, U.; et al. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in Mycology*, v. 92, p. 135-154, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.05.001>.

WALKER, L. A.; GOW, N. A. R.; MUNRO, C. A. Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genetics and Biology*, v. 47, n.2, p. 117-126, 2010.

WERTHEIMER, N.B.; STONE, N.; BERMAN, J. Ploidy dynamics and evolvability in fungi. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, v. 371, n. 1709, 2016. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0461>.

WHITTAKER, R. H. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon*, v. 21, n. 2/3, p. 213–251, 1972.

WIJAYAWARDENE, N. N.; HYDE, K. D.; AL-ANI, L. K. T.; TEDERSOO, L.; HAELEWATERS, D.; RAJESHKUMAR, K. C.; et al. Outline of Fungi and fungus-like taxa. *Mycosphere*, v. 11, n. 1, p.1060-1456, 2020.

WIJAYAWARDENE, N. N.; HYDE, K. D.; LUMBSCH, H. T.; LIU, J. K.; MAHARACHCHIKUMBURA, S. S. N.; EKANAYAKA, A. H.; TIAN, Q.; PHOOKAMSAK, R. Outline of Ascomycota: 2017. *Fungal Diversity*, v. 88, p. 167-263, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0394-8>.

WIT, R.D. Biodiversity of Coastal Lagoon Ecosystems and Their Vulnerability to Global Change. In: Grillo, O. *Ecosystems Biodiversity*, PhD. Oscar Grillo (Ed.), ISBN: 978-953-307-417-7, InTech, 2011, 464 p. Available from:
<http://www.intechopen.com/books/ecosystems-biodiversity/biodiversity-of-coastal-lagoon-ecosystems-and-their-vulnerability-to-global-change>.

Xu, Y.; Sheng, F.; Zhao, J.; Chen, L.; Li, C. ERG11 mutations and expression of resistance genes in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates. *Arch Microbiol*, v. 197, p. 1087-1093, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1146-8>.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance, and identification of yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. The Yeasts: A taxonomy study. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 1998, p. 77-100. ISBN 978-0-444-81312-1.

ZUZA-ALVES, D. L.; DE MEDEIROS, S. S.; DE SOUZA, L. B.; SILVA-ROCHA, W. P.; FRANCISCO, E. C.; DE ARAÚJO, M. C.; et al. Evaluation of virulence factors in vitro, resistance to osmotic stress and antifungal susceptibility of *Candida tropicalis* isolated from the coastal environment of Northeast Brazil. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, 1783. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01783>.

APÊNDICE A - Lista de compostos orgânicos testados quanto a presença na
laguna Tramandaí

Acefato, Acetamiprida, Alacloro, Aldicarb, Aldicarbessulfona, Aletrina, Azinfósetil, Azinfosmetil, Azoxistrobina, Barban, Benfuracarbe, Bentazona, Bifentrina, Bitertanol, Boscalida, Bromuconazol, Bupirimato, Carbaril, Carbendazim, Carbofenotion, Carbofurano, Ciazofamida, Cimoxanil, Cipermetrina, Ciproconazol, Clorbromuron, Clorfenvinfós, Clorimuron, Cloroxuron, Clorpirifos, Clorpirifós, Cresoximmetílico, Deltametrina, Desmedifan, Diazinon, Diclorvos, Dicrotofós, Difenconazol, Diflubenzuron, Dimetoato, Dimetomorfe, Dimoxistrobina, Dissulfotonsulfona, Dissulfotonsulfóxido, Diuron, Dodemorfe, Epoxiconazol, Etiofencarbe sulfona, Etiofencarbe sulfoxido, Etion, Etiprole, Etirimol, Etoprofos, Etrinós, Fempropatrina, Fenamifós, Fenamifóssulfona, Fenamifóssulfóxido, Fenarimol, Fenitrotiona, Fenobucarb, Fenoxicarbe, Fentiona, Fention Sulfona, Fention sulfoxido, Fentoato, Fipronil, Fluazifopebutil, FlucitrinatoNH₄ + , Fludioxonil-NH₄ + , Flufenacet, Flusilazole, Flutriafol, Folpete-NH₄ + , Foransulfuron, Forato, Foratosulfona, Foratosulfoxido, Fosadona, Fosfamidona, Fosmete, Fostiazate, Furatiocarbe, Hexaconazol, Hexitiazox, Imazapic, Imazapir, Imazalil, Imibenconazol, Imidacloprido, Iprobenfos, Iprodiona, Iprovalicarbe, Isocarbofós, Isoproturon, Lambdacialotrina, Linurom, Malaoxon, Malation, Mefosfolan, Mesotriona, Mevinós, Metalaxil, Metamidofos, Metazaclor, Metconazol, Metidationa, Metiocarbessulfona, Metiocarbe sulfóxido, Metomil, Metoxifenazida, Metoxuron, Metsulfuron metal, Miclobutanil, Monocrotófós, Monuron, Nitempiram, Nuarimol, Ometoato, Oxamil-NH₄ + , Oxicarboxina, Oxifluorfen, Paclobutrazol, Paraoxonetil, Paraoxonmetil, Pation etil, Pencicuron, Penconazol, Permetrina, Piraclofos, Piraclostrobina, Pirazofós, Pirifenox, Pirimifósetil, Pirimifósmetil, Piriproxifen, Procloraz, Profenofós, Promecarbe, Prometrina, Propamocarbe, Propanil, Propargito, Propiconazol, Propoxur, Prosulfuron, Pirimicarbe, Simazim, Tebuconazol, Tebufenpirade, Tepp, Terbufos, Tiacloprido, Tiametoxan, Tifensulfuron metal, Tiodicarbe, Tolilfluanid-NH₄ + , Triadimefon, Triadimenol, Triazofós, Triciclazole, Triclorfon, Triforina, Tiobencarbe, Tiofanatometila, Triassulfuron, Tridemorfe, Trifloxistrobina, Trifloxusulfuron, Triflumuron, metil, Trinexapaque etil

APÊNDICE B - Pipeline das análises dos dados obtidos na plataforma Ion Torrent

Abaixo estão enumerados o passo-a-passo utilizado para o processamento dos dados brutos de metagenômica:

1. Fastq_to_fasta

```
(sudo apt-get install FASTX-Toolkit  
fastq_to_fasta -i rawdata/Danielle_S1_P1.fastq -o results/Danielle_S1_P1.fasta
```

2. Cutadapt

```
cutadapt -a TCCTCCGCTTATTGATATGC rawdata/Danielle_S2_P4.fasta >  
results/Danielle_S2_P4_cutadapted3.fasta
```

```
cutadapt -g GCATCGATGAAGAACGCAGC  
results/Danielle_S2_P4_cutadapted3.fastq > results/Danielle_S2_P4_trimmed.fasta
```

3. Tenha uma visão global sobre as sequências: (mothur and vsearch are required)

```
mothur  
summary.seqs(fasta=Danielle_*.fasta) > Danielle_*.summary
```

4. Limpe as sequências fasta removendo sequências curtas (<100bp) e coloque as informações de localização e estação das sequências no cabeçalho da sequência

```
/data/Danielle/scripts/removeshortsequences.py Danielle_S1_P1.fasta  
Danielle_S1_P1_clean.fasta
```

5. Remova as sequências duplicadas para cada amostra

```
mothur  
unique.seqs(fasta=Danielle_S1_P1_clean.fasta)
```

6. Remover sequências de quimera

```
mothur  
chimera.vsearch(fasta=Danielle_S1_P1_clean.unique.fasta,reference=self)
```

7. Mesclar todas as sequências

```
cat *_clean.unique.fasta > samples.fasta
```

8. Agrupar as sequências para ter OTUs usando fMLC (0.95,0.97;m=1000), output como clusters97.txt

9. Obter sequências representativas e resumo de OTUs

```
/home/Python/Danielle/./getOTURepresentatives.py clusters97.txt samples.fasta 1  
clusters97_1.fasta otus97_1.table
```

Visualizar as amostras com fMLC

10. Converta os arquivos para .fasta e os arquivos validados com as mesmas propriedades no cabeçalho:

```
/home/Python/Danielle/addemptypropertytosequenceheader.py  
allvalidatedITSWithTaxa.fasta 8 3 allvalidatedITSWithTaxa_with_emptylocation.fasta
```

```
/home/Python/Danielle/addemptypropertytosequenceheader.py  
Working/samples.fasta 2 6 Working/samples_withemptytaxa.fasta
```

```
cat allvalidatedITSWithTaxa_with_emptylocation.fasta  
Working/samples_withemptytaxa.fasta > samples_withITS.fasta
```

11. Baixe as sequências do banco de dados UNITE, limpe o cabeçalho do UNITE para o BLAST:

```
/data/Danielle/scripts/cleansequenceheader.py UNITE_public_01.12.2017.fasta 2  
UNITE_public_01.12.2017_clean.fasta
```

12. Baixe as sequências GB do banco de dados do CBS, projectID PRJNA351778:

```
/home/Python/fungibarcoding/extractGBFastaFile.py  
/home/Data/FungiBarcoding/Gbsubmission/sequence.fasta
```

13. Indexe as sequências para Blast mais rápido:

```
/data2/Danielle/scripts/indexingthesequences.py allvalidatedITS_removespaces.fasta  
allvalidatedITS_indexed.fasta
```

```
/data2/Danielle/scripts/indexingthesequences.py  
UNITE_public_01.12.2017_clean.fasta  
UNITE_public_01.12.2017_clean_indexed.fasta
```

```
/home/duong/Data/Danielle/scripts//indexingthesequences.py clusters97_1.fasta  
clusters97_1_indexed.fasta
```

14. Compare cada arquivo fasta ao dataset validado/referência do UNITE:

```
/data2/Danielle/scripts/identifyusingsemi-indexes.py clusters97_1_indexed.fasta  
/data2/Danielle/data/references/UNITE/UNITE_public_01.12.2017_clean_indexed.fasta  
clusters97_1.blastresult
```

```
/data2/Danielle/scripts/addBlastResultToOTUs.py otus97_1.table  
clusters97_1.blastresult  
/data2/Danielle/data/references/UNITE/UNITE_public_01.12.2017_indexed.fasta  
otus97_1_withtaxa.table
```

select only the OTUs with 90% similar to UNITE:

```
/data2/Danielle/scripts/addBlastResultToOTUs.py otus97_1.table  
clusters97_1.blastresult  
/data2/Danielle/data/references/UNITE/UNITE_public_01.12.2017_indexed.fasta  
otus97_1_withtaxa_90.table 0.9
```

14. FunGuild

submit the otus97_1_withtaxa_90.table file to
funguild.org to get back the functionality file

15. Otus_based analysis

Open /home/Data/Danielle/scripts/script.R

16. Instalar o programa R e o pacote vegan para as análises estatísticas.

APÊNDICE C - Dados físico-químicos da laguna, por coleta.

	Coleta 1				Coleta 2				Coleta 3				Coleta 4			
	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4	P1	P2	P3	P4
DBO5 (mg/L)	0,00	0,62	1,24	1,24	1,94	1,91	2,64	1,18	0	2,51	2,17	0,17	1,34	1,92	1,73	0,96
ODinicial (mg/L)	7,70	7,53	8,39	8,56	5,70	6,91	8,47	5,36	8,36	9,2	8,69	6,86	7,49	7,87	7,1	6,53
pH	7,7	8,39	8,56	7,53	7,90	7,92	7,92	7,12	7,4	7,36	7,3	7,1	7,82	7,77	7,68	7,53
Cloretos (mg/L)	133,44	117,83	111,44	18,57	14513,44	2580,17	2075,58	2070,38	1290,08	988,37	1201,65	41,62	6626,7	4597,83	4487,04	754,77
Salinidade (‰)	0,24	0,21	0,20	0,03	26,22	4,66	3,75	3,74	2,33	1,79	2,17	0,08	11,97	8,31	8,11	1,36
Condutividade (µs/cm)	560,00	510,00	480,00	42,2	60907,67	11167,84	8940,37	4705,36	5414	4278	5176	94,59	18740	13000	12730	1690
Temperatura	19,5	20	21	20	30	30	31	31	16	16	17	15	24	23	23	25