



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS - PPGCA

*MICROBIOTA DE UM RIO URBANIZADO:
CARACTERIZAÇÃO, DIVERSIDADE E PERFIL DE
SUSCETIBILIDADE*

Andressa Alves Silva Panatta

Toledo – Paraná – Brasil

2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ - UNIOESTE
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

*MICROBIOTA DE UM RIO URBANIZADO: CARACTERIZAÇÃO,
DIVERSIDADE E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE*

Andressa Alves Silva Panatta

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Ambientais da Universidade Estadual do
Oeste do Paraná, Unioeste/Campus Toledo,
como parte dos requisitos para a obtenção
do Título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientadora: Dr^a Cleide Viviane Buzanello Martins
Co-Orientadora: Dr^a Susana Johann

FEVEREIRO/2020

Toledo – PR

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Panatta, Andressa Alves Silva
Microbiota de um rio urbanizado: caracterização, diversidade e perfil de suscetibilidade / Andressa Alves Silva Panatta; orientador(a), Cleide Viviane Buzanello Martins; coorientador(a), Susana Johann, 2020.
66 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, 2020.

1. Poluição ambiental. 2. Resistência antifúngica. 3. Azóis. 4. Saúde pública. I. Martins, Cleide Viviane Buzanello. II. Johann, Susana. III. Título.

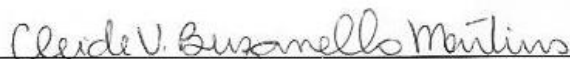
FOLHA DE APROVAÇÃO

Andressa Alves Silva Panatta

"Microbiota de um rio urbanizado: caracterização, diversidade e perfil de susceptibilidade"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais – Mestrado, do Centro de Engenharias e Ciências Exatas, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais, pela Comissão Examinadora composta pelos membros:

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Cleide Viviane B. Martins
Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Presidente)



Prof. Dr. Paulo Vanderlei Sanches
Universidade Estadual do Oeste do Paraná



Prof. Dr. Cleverson Busso
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Aprovada em: 12 de fevereiro de 2020.

Local de defesa: Auditório do Gerpel – Unioeste Toledo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora Dr^a Cleide Buzanello Martins por todo incentivo, paciência e carinho em mim depositado. Sua orientação me proporcionou experiências incríveis e inimagináveis, que foram além do conhecimento acadêmico e que levarei por toda a minha vida.

À minha co-orientadora Susana Johann pela disponibilidade, aporte e recepção na UFMG para a realização deste projeto. Essa oportunidade foi de grande valia para a elaboração dessa pesquisa.

À minha amiga do mestrado para a vida Jéssyca Carvalho, obrigada pela amizade, incentivos, energia, harmonia, inteligência e dedicação que me proporcionou. Com você, a rotina da pesquisa se tornou muito mais clara e simples.

Agradeço de todo meu coração à minha família, especialmente meu esposo George que me amparou e acompanhou diariamente todas as etapas desse projeto, sem nunca desacreditar na minha força. Obrigada por seu amor.

Agradeço também à CAPES pelo incentivo financeiro, ao Prof. Dr. Paulo Sanches pela disponibilidade nas coletas e ao Técnico Laboratorial Fernando Dressler pela atenção no laboratório. À Blenda Fernandes, Aline Valério e Lorena Carvalho pela importantíssima colaboração durante as análises na UFMG.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. METODOLOGIA DA PESQUISA	15
2.1. Área de estudo	15
2.2. Amostragem e ensaios	17
2.3. Análises físico-químicas	18
2.4. Contagem e caracterização de microrganismos	18
2.4.1. Contagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Enterococcus</i> spp.	19
2.4.2. Contagem de microrganismos heterotróficos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos cultiváveis	19
2.4.3. Contagem de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	20
2.4.4. Contagem de leveduras totais em Candida CHROMágar™	21
2.5. Seleção morfológica das leveduras	22
2.6. Teste de perfil de susceptibilidade	23
2.7. Análise molecular	25
2.7.1. Extração e quantificação de DNA	25
2.7.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Eletroforese e <i>Fingerprint</i>	26
2.7.3. Amplificação de NL1NL4, purificação e sequenciamento genético	27
2.8. Análise estatística e interpretação do código genético	29
2.9. Armazenamento das amostras	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.1. Análises físico-químicas	30
3.2. Contagem e caracterização de microrganismos	35
3.2.1. Contagem de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Enterococcus</i> spp.	35
3.2.2. Contagem de microrganismos heterotróficos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos cultiváveis	37
3.2.3. Contagem de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	38
3.2.4. Contagem de leveduras totais em <i>Candida</i> CHROMágar™ e seleção morfológica	41
3.2.5. Teste de perfil de susceptibilidade	43

3.2.7. Análise molecular	44
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
5. REFERÊNCIAS	47
6. APÊNDICE	52
6.1. Apêndice A - Resultado do ensaio de susceptibilidade a antifúngicos em leveduras	52
7. ANEXO.....	61
7.1. Anexo A – Código genético como resultado de sequenciamento de leveduras	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização geográfica dos 4 pontos de coleta de água para análise de qualidade ambiental no Rio Toledo – PR.	16
Figura 2. Esquematização gráfica das análises para a determinação do perfil microbiológico de 4 pontos do rio Toledo - PR.	19
Figura 3. Esquematização gráfica da análise de contagem de microrganismos heterotróficos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos cultiváveis.	20
Figura 4. Esquematização gráfica da análise de contagem de leveduras totais em Candida Chromágar™.	21
Figura 5. Coloração espécie-específica em meio seletivo CHROMágar Candida™.	22
Figura 6. Fluxograma da análise de resistência a antifúngicos em leveduras..	23
Figura 7. Esquema para diluição de antifúngico e amostra para o teste de resistência a antifúngicos em leveduras.	24
Figura 8. Fluxograma do processo de análises para a determinação do perfil genético de leveduras encontradas em 4 pontos do rio Toledo - PR..	25
Figura 9. Temperatura em comparação entre pontos de coleta com ação antrópica rural e urbana do rio Toledo – PR31	31
Figura 10. Oxigênio dissolvido em comparação entre pontos de coleta com ação antrópica rural e urbana do rio Toledo – PR..32	32
Figura 11. Potencial hidrogeniônico (pH) em comparação entre pontos de coleta com ação antrópica rural e urbana do rio Toledo – PR.....33	33
Figura 12. Demanda Química de Oxigênio (DQO) em comparação entre pontos de coleta com ação antrópica rural e urbana do rio Toledo – PR.34	34
Figura 13. Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) em comparação entre pontos de coleta com ação antrópica rural e urbana do rio Toledo – PR.35	35
Figura 14. Pesquisa e quantificação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em comparação entre pontos de coleta com ação antrópica rural e urbana do rio Toledo – PR..36	36
Figura 15. Pesquisa e quantificação de <i>Enterococcus</i> sp. em comparação entre pontos de coleta com ação antrópica rural e urbana do rio Toledo – PR.37	37
Figura 16. Contagem de microrganismos heterotróficos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos em comparação entre pontos de coleta com ação antrópica rural e urbana do rio Toledo – PR..38	38

Figura 17. Contagem de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> em comparação aos trechos com atividades antrópicas rurais e urbanas do rio Toledo - PR..	39
Figura 18. Contagem de coliformes totais em comparação entre pontos de coleta com ação antrópica rural e urbana do rio Toledo – PR.	40
Figura 19. Contagem de <i>Escherichia coli</i> em comparação entre pontos de coleta com ação antrópica rural e urbana do rio Toledo – PR.	40
Figura 20. Contagem de leveduras totais em Candida CHROMágar™ em 4 pontos de coleta do Rio Toledo-PR..	41
Figura 21. Contagem de leveduras totais em comparação entre pontos de coleta com ação antrópica rural e urbana do rio Toledo – PR.....	42
Figura 22. Perfil de susceptibilidade ao antifúngico itraconazol de leveduras coletadas em 4 pontos de coleta do Rio Toledo-PR.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos 4 pontos de coleta no Rio Toledo-PR, com as coordenadas geográficas e atividades antrópicas dos locais.....	17
Tabela 2. Concentrações de drogas antifúngicas em µg/mL, para o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM).	23
Tabela 3. Pontos de corte para o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM).	25
Tabela 4. Volumes e reagentes utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de GTG ₅	26
Tabela 5. Descrição de temperatura e tempo de ação do termociclador para análise de GTG ₅	27
Tabela 6. Volumes e reagentes utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de NL1NL4.	28
Tabela 7. Descrição de temperatura e tempo de ação do termociclador para o método NL1NL4.	28
Tabela 8. Volumes e reagentes utilizados na purificação de produtos de PCR (amplicon)... ..	29
Tabela 9. Resultados de análises físico-químicas da água do rio Toledo-PR.	30
Tabela 10. Pesquisa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Enterococcus</i> spp. em água do rio Toledo-PR.	35
Tabela 11. Pesquisa de microrganismos heterotróficos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos cultiváveis em água do rio Toledo-PR.....	37
Tabela 12. Pesquisa de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i> em água do rio Toledo-PR.....	39

RESUMO

PANATTA, A. A. S. Microbiota de um rio urbanizado: caracterização, diversidade e perfil de susceptibilidade. Fevereiro de 2020. 66 folhas. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Unioeste/Campus Toledo. Toledo, 12/02/20.

Águas fortemente poluídas apresentam grande concentração de comunidades fúngicas e bacterianas. A não proteção de nascentes, desmatamento, assoreamento dos rios e atividades antrópicas ribeirinhas, são exemplos dos possíveis causadores de contaminação. O uso indiscriminado de antifúngicos é uma preocupação emergente, uma vez que estes medicamentos não necessitam de prescrição médica, resultando em comércio não controlado pela agência reguladora. Estas drogas são amplamente utilizadas nas atividades médicas, agrícolas e veterinárias. Com isso, antibióticos e microrganismos acabam sendo direcionados principalmente para corpos d'água. Esta pesquisa apresentou como objetivo: avaliar a qualidade da água ao longo do Rio Toledo por meio de análises microbiológicas e físico-químicas; analisar dados físico-químicos de qualidade ambiental, quantificar microrganismos bioindicadores de qualidade hídrica, caracterizar as leveduras isoladas; observar a diversidade de espécies por meio de análises moleculares; avaliar quão resistentes essas leveduras estão aos antifúngicos fluconazol e itraconazol e, analisar a interferência antrópica no trecho rural e urbanizado do rio Toledo. As análises de Demanda Bioquímica de Oxigênio, microrganismos heterotróficos, coliformes totais e leveduras totais obteve-se diferença estatística significativa entre o trecho rural e urbanizado do rio, considerando-se $p < 0,05$. No teste de MIC para fluconazol, houve susceptibilidade de 29% das leveduras testadas, 22% de dose-dependência e resistência em 49%. Para itraconazol houve susceptibilidade de 2%, dose-dependência de 10% e resistência em 88% das leveduras testadas. Até o momento, foram identificadas 12 cepas sendo *Candida palmioleophila* e 1 cepa de *Torulaspora pretoriensis*. Confirma-se o pressuposto que atividades antrópicas como a ruralização e urbanização comprometem a qualidade deste corpo hídrico e a saúde humana uma vez que, o rio Toledo é enquadrado em rio de classe II, sendo permitida atividades de lazer, pesca, irrigação agrícola e abastecimento público.

PALAVRAS-CHAVE: Resistência antifúngica; Azóis; Poluição Ambiental; Qualidade Ambiental; Saúde pública.

ABSTRACT

PANATTA, A. A. S. Microbiota of an urbanized river: characterization, diversity and susceptibility profile. February 2020. 66 sheets. Dissertation (Master) - State University of Western Paraná, Unioeste / Campus Toledo. Toledo, 02/12/20.

Highly polluted waters have a high concentration of fungal and bacterial communities. The lack of protection from springs, deforestation, silting up of rivers and anthropic activities along the riverside are examples of the possible causes of contamination. The indiscriminate use of antifungals is an emerging concern, since these drugs do not require a medical prescription, resulting in uncontrolled trade by the regulatory agency. These drugs are widely used in medical, agricultural and veterinary activities. As a result, antibiotics and microorganisms end up being directed mainly at water bodies. The objective of this research was: to evaluate the water quality along the Toledo River by means of microbiological and physical-chemical analyses; to analyze physical-chemical data of environmental quality, to quantify bioindicator microorganisms of water quality, to characterize isolated yeasts; to observe the diversity of species by means of molecular analyses; to evaluate how resistant these yeasts are to the antifungal drugs fluconazole and itraconazole, and to analyze anthropic interference in the rural and urbanized stretch of the Toledo River. The analysis of Biochemical Oxygen Demand, heterotrophic microorganisms, total coliforms and total yeasts obtained a statistically significant difference between the rural and urbanized stretch of the river, considering $p < 0.05$. In the MIC test for fluconazole, there was susceptibility of 29% of the tested yeasts, 22% of dose-dependence and resistance in 49%. For itraconazole there was susceptibility of 2%, dose-dependence of 10% and resistance in 88% of the tested yeasts. So far, 12 strains have been identified, *Candida palmioleophila* and 1 strain of *Torulaspora pretoriensis*. It is confirmed that anthropic activities such as ruralization and urbanization compromise the quality of this water body and human health since the Toledo River is classified as a class II river, being allowed leisure activities, fishing, agricultural irrigation and public supply.

KEYWORDS: Antifungal resistance; Azois; Environment pollution; Environmental Quality; Public health.

1. INTRODUÇÃO

Os recursos hídricos são destinados a diversas finalidades, como irrigação agrícola, produção de energia, abastecimento público e de indústrias, atividades de lazer, bem como a regulação da vida aquática. As atividades humanas, sem nenhuma exceção, necessitam dos recursos hídricos para o seu desenvolvimento (AFONSO, 2010).

Menos de 1% da totalidade de água doce, se encontra disponível em locais de fácil acesso para o homem como em nascentes, rios, lagos e aquíferos de sub-superfície. A não proteção de nascentes, o desmatamento, o assoreamento dos rios, o uso equivocado de irrigação, são exemplos dos possíveis causadores da contaminação dos corpos hídricos. Caso ocorram severas interferências externas em seu ciclo, pode-se interferir diretamente em sua qualidade ou até mesmo chegar à escassez. (PEREIRA E JOSÉ, 2010).

A região Oeste do Estado do Paraná é conhecida pelos grandes produtores de grãos como soja e milho, suinocultura e avicultura. Consequentemente, utiliza-se ampla quantidade de herbicidas, inseticidas e outros produtos químicos, além da geração de dejetos decorrente do alto número de animais de criação. Ações antrópicas como atividades agropecuárias, agrícolas e industriais, descarte incorreto de resíduos, escoamento de esgotos sanitários, uso indevido do solo, entre outras ações, alteram negativamente as características da água (PEREIRA, 2016).

O rio Toledo possui 26,5 km de extensão, é responsável por parte do abastecimento de água do município, e também é receptor de efluentes advindos do uso doméstico e de indústrias localizadas em suas proximidades que, apesar das empresas terem responsabilidade com tratamento de seus contaminantes, o efluente que chega ao rio tem cor escura e causa um odor desagradável na região. Ainda foi apontado que, durante o trajeto do rio pelo município, os indicadores de qualidade ambiental vão decrescendo, principalmente após cortar o perímetro urbano. Ao chegar a sua foz, o rio Toledo pode ser classificado como ruim ou severamente poluído (PEREIRA, 2016).

Um importante parâmetro indicador biológico da potabilidade da água são as análises de coliformes totais e *Escherichia coli*. Microrganismos de contaminação sanitária, como a *E. coli* que é uma bactéria fecal estão restritas ao trato intestinal de

animais de sangue quente, geralmente causam doenças de veiculação hídrica como gastroenterite e diarreia (FUNASA, 2013).

Porém, há amplas fontes de poluição além da contaminação fecal, por isso pesquisar bioindicadores complementares aos que já são comumente estudados, conduziria informações mais assertivas sobre a qualidade da água (CARNEIRO, 2011). Alguns microrganismos como as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus* spp. e leveduras, são exemplos de indicadores complementares para o monitoramento da qualidade da água.

Águas fortemente poluídas apresentam grande concentração de comunidades fúngicas, bacterianas e vírus. Os microrganismos heterotróficos são facilmente encontrados nos corpos hídricos e por isso, são amplamente utilizados como indicadores de qualidade da água. A contagem de microrganismos heterotróficos totais cultiváveis é um dos indicadores mais confiáveis, pois algumas espécies estão associadas à poluição orgânica e fecal (CARNEIRO, 2011; PULLÉS, 2014).

Dentre esses microrganismos, as bactérias possuem grande destaque, desempenhando uma função importante no ambiente aquático por meio do sistema de decomposição e mineralização da matéria orgânica (ROCHA, 2003), porém, fungos filamentosos e leveduras também são significativos na ecologia dos ambientes aquáticos. No caso das leveduras, elas degradam diferentes substratos devido a sua capacidade de produção enzimática sendo possível encontrar representantes de grupos resistentes ou sensíveis aos ambientes poluídos, dependendo da capacidade de degradação da matéria disponível (SILVEIRA, 2012).

Os azóis são comumente utilizados na prática médica para as doenças causadas por *Candida* spp., sendo esse gênero responsável por grande parte das infecções fúngicas em humanos (WHALEY et al, 2017). Porém, tanto a frequência das infecções fúngicas quanto a resistência à antifúngicos tem aumentado consideravelmente, apesar do desenvolvimento de novos agentes para terapia antifúngica (PFALLER e DIEKEMA, 2010).

O uso indiscriminado de antifúngicos é uma preocupação emergente, uma vez que estes medicamentos não necessitam de prescrição médica, resultando em comércio não controlado pela agência reguladora. Estas drogas são amplamente utilizadas nas atividades médicas, agrícolas e veterinárias. Com isso, antibióticos e microrganismos acabam sendo direcionados principalmente em corpos d'água por meio de efluentes (GOÑI-URRIZA, 2000).

A partir do pressuposto que atividades antrópicas podem comprometer a qualidade de corpos d'água, esta pesquisa considerou como problemática: atividades de ruralização e urbanização tem relação com a contaminação ao longo do rio Toledo?

Para a resolução destes questionamentos, este trabalho apresentou como principal objetivo: avaliar a qualidade da água ao longo do rio Toledo por meio de análises microbiológicas e físico-químicas. Como objetivos específicos, analisar dados físico-químicos de qualidade ambiental, quantificar microrganismos bioindicadores de qualidade hídrica, caracterizar as leveduras isoladas; observar a diversidade de espécies de leveduras por meio de análises moleculares e; avaliar quanto resistentes essas leveduras estão a dois antifúngicos comerciais.

2. METODOLOGIA DA PESQUISA

2.1. Área de estudo

Localizado no Município de Toledo – PR, o rio Toledo atravessa uma ampla extensão dentro do perímetro urbano da cidade, sendo ele um manancial de captação de água para abastecimento que, juntamente com poços de água, atendem a necessidade hídrica do município (PEREIRA, 2016). Para o estudo, foram selecionados 4 pontos de coleta (denominados de nascente, meio, ponte e foz) do rio Toledo (Figura 1).

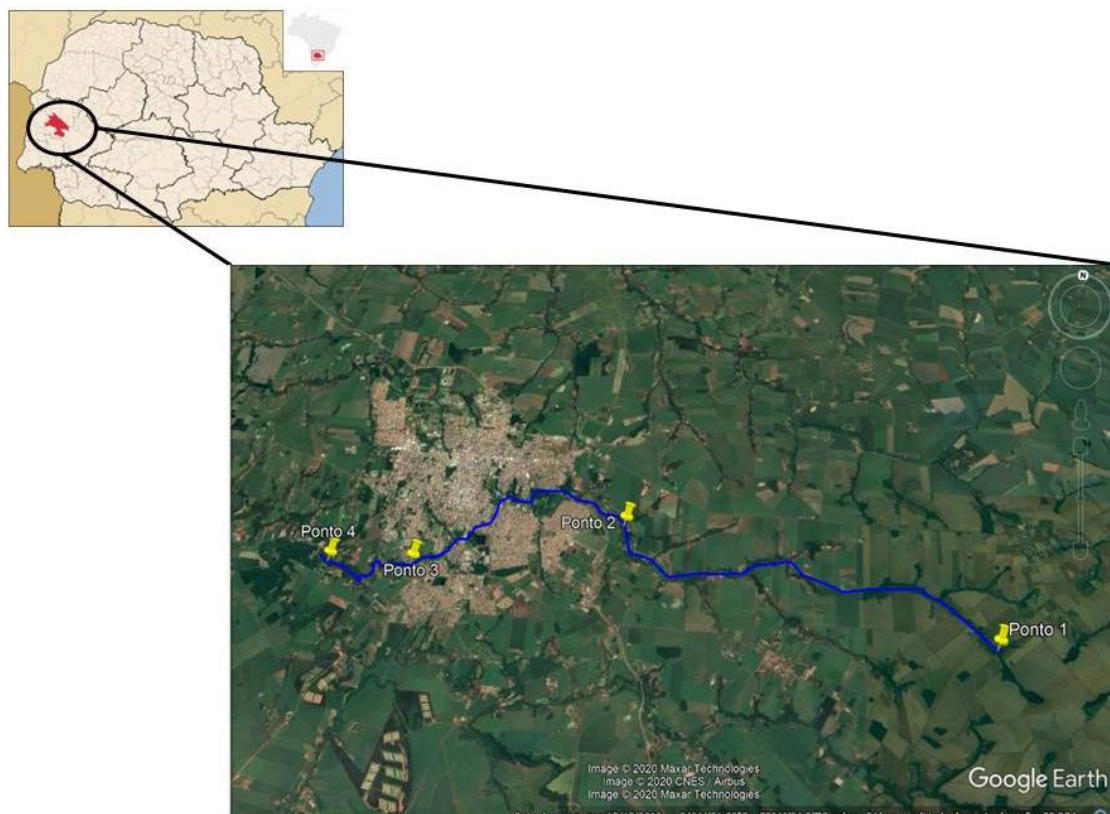


Figura 1. Localização geográfica dos 4 pontos de coleta de água para análise de qualidade ambiental no rio Toledo – PR.

(Fonte: Google Earth, 2020)

Quanto às características ambientais dos pontos de coleta, o ponto 1 localiza-se a cerca de 500 metros da nascente (São Luiz do Oeste) e possui leito com fundo arenoso com grande volume de matéria orgânica vegetal e lâmina d'água com profundidade de cerca de 50 centímetros e 3 metros de largura, considerando margem á margem. Há mata ciliar com aproximadamente 40 metros de largura para cada lado do rio.

O ponto 2 localiza-se próximo a BR467 e possui leito rochoso, possui algumas zonas com deposição de areia e próximo às margens matéria orgânica vegetal pouco expressiva. Tem profundidade com cerca de 1 metro e largura de 6 metros. Existe mata ciliar densa com cerca de 70 metros de largura.

O ponto 3 encontra-se cerca de 100 metros acima da ponte do contorno sul do município, possui leito arenoso-rochoso, com presença de matéria orgânica e lodo próximos às margens. Possui aproximadamente 1,5 metros de profundidade e cerca de 10 metros de largura. Mata ciliar direita bem preservada com cerca de 50

metros de largura e margem esquerda possui mata pouco preservada com 15 metros de largura.

Por fim, o ponto 4 apresenta-se cerca de 300 metros da foz do rio próximo à pedreira municipal. Local com leito arenoso-rochoso, com depósito de lodo e matéria orgânica próximo às margens. O rio possui cerca de 1 metro de profundidade e 10 metros de largura. A mata ciliar encontra-se muito bem preservada com aproximadamente 230 metros de largura. A tabela 1 apresenta as localizações geográficas dos pontos de coleta e também as principais atividades antrópicas existentes nesses pontos.

Tabela 1. Relação dos 4 pontos de coleta no rio Toledo-PR, com as coordenadas geográficas e atividades antrópicas dos locais.

Ponto de Coleta	Coordenada Geográfica	Atividades Antrópicas	Classific. da área
P1 (Nasc.)	24°45'45.54"S e 53°35'02.35"O	Agricultura/Suinocultura	Rural
P2 (Meio)	24°44'50.23"S e 53°38'19.26"O	Agricultura	Rural
P3 (Ponte)	24°44'10.60"S e 53°45'06.28"O	Loteamentos/Agricultura	Urbana
P4 (Foz)	24°44'17.69"S e 53°41'20.68"O	Agric./Suinoc./Pedreira	Urbana

2.2. Amostragem e ensaios

A amostragem foi realizada no mês de março (período de seca) e julho (período chuvoso) de 2019. As amostras foram coletadas em duplicata à cerca de 30 centímetros abaixo da superfície d'água e 2 metros da margem do rio. As alíquotas foram condicionadas em frascos de vidro de 200ml devidamente esterilizados e protegidos de contaminação cruzada e mantidas dentro de caixa térmica com gelo. Após a coleta, as análises foram realizadas em cinco laboratórios ao longo da pesquisa. Ao Laboratório de Análises de Qualidade - A3Q em Cascavel-PR, para as análises microbiológicas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus* spp.

Ao Laboratório de Qualidade de Água do Grupo de Pesquisas em Recursos Pesqueiros e Limnologia/Instituto Neotropical de Pesquisas Ambientais (GERPEL/INEO), localizado dentro da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) - Campus Toledo, para análise microbiológica de coliformes totais e *Escherichia coli* e também as análises físico-químicas de DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) e DQO (Demanda Química de Oxigênio).

Foram encaminhadas também, amostras para o Laboratório de Microbiologia da UNIOESTE/Toledo para as análises microbiológicas de microrganismos heterotróficos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos, isolamento e diferenciação morfológica das leveduras.

Ao Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), onde foram realizadas as análises de resistência à antifúngicos e análises moleculares.

Para a fase final, as amostras foram encaminhadas ao Instituto René Rachou da Fundação Osvaldo Cruz de Minas Gerais (FIOCRUZ/MINAS) para identificação por sequenciamento genético.

2.3. Análises físico-químicas

Para avaliar a qualidade da água nos corpos hídricos, diferentes análises que podem ser executadas, dentre elas, estão as análises físico-químicas que são amplamente utilizadas como indicadores de qualidade. Por meio de um analisador portátil (AAKER), foram obtidos parâmetros físico-químicos como temperatura, pH, condutividade, e oxigênio dissolvido.

As análises de Demanda Química de Oxigênio (DQO) e Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) foram desenvolvidas segundo Standard Methods for the Examination of the Water and Wastewater. Sendo que a DQO seguiu o método 5220-D (refluxo fechado) e a DBO o método 5210-B (5 dias à 20°C).

2.4. Contagem e caracterização de microrganismos

Para a determinação do perfil microbiológico dos 4 pontos do rio Toledo foram realizadas análises microbiológicas de caracterização, quantificação, diversidade e perfil de susceptibilidade à antifúngicos, conforme fluxograma da Figura 2.

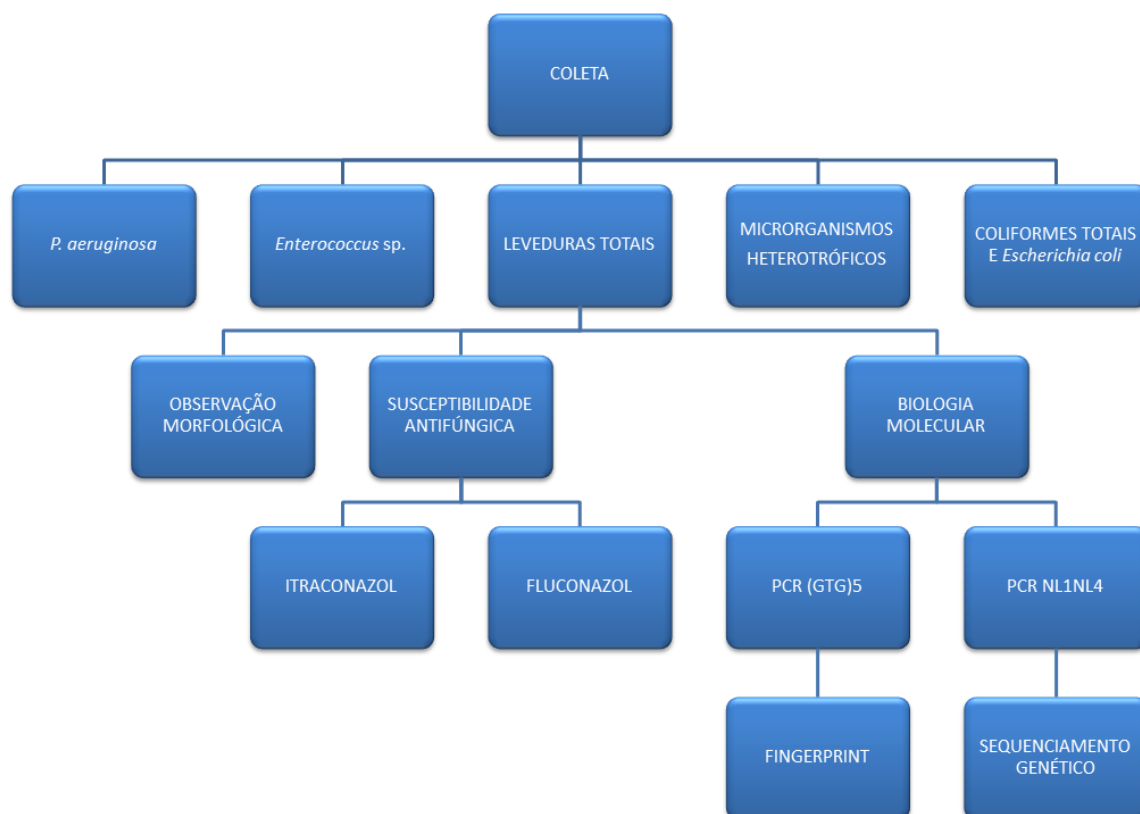


Figura 2. Esquematisação gráfica das análises para a determinação do perfil microbiológico de 4 pontos do rio Toledo - PR.

2.4.1. Contagem de *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus* spp.

Para cada análise foi utilizado 100mL da amostra. As análises foram realizadas segundo o Standard Methods for the Examination of the Water and Wastewater. Sendo que a pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* seguiu o método 9213-E (membrana filtrante) e a pesquisa de *Enterococcus* spp. o método 9230-C (membrana filtrante).

2.4.2. Contagem de microrganismos heterotróficos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos cultiváveis

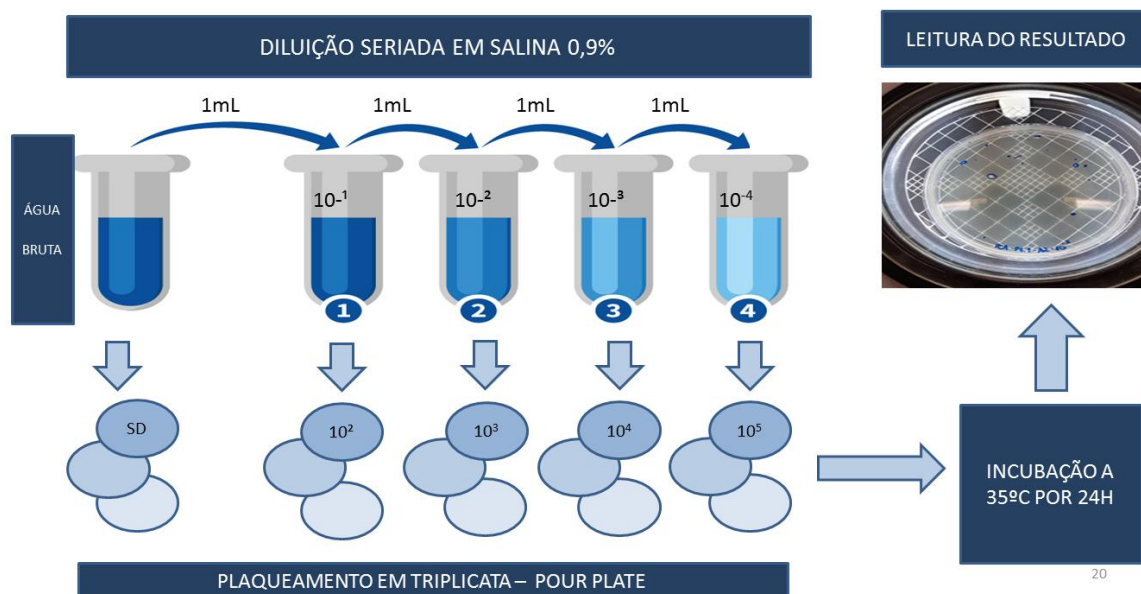


Figura 3. Esquematização gráfica da análise de contagem de microrganismos heterotróficos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos cultiváveis.

Foram utilizadas alíquotas de 1mL da amostra sem diluição e também diluições seriadas á 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} em solução salina 0,9%, dependendo do histórico de contaminação dos pontos e dos resultados do ensaio-piloto. Após as amostras diluídas, foram transferidas em triplicatas para placas de Petri por *pour plate*, ou seja, o Ágar Padrão para Contagem (23,5g/L) foi vertido em meio à amostra, homogeneizado e solidificado devidamente. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C, por 24 horas. Após a incubação, foi determinado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) com auxílio de um contador de colônias com lupa acoplada (Figura 3).

2.4.3. Contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*

As análises de determinação de coliformes totais e *Escherichia coli* foram realizadas conforme Standard Methods for the Examination of the Water and Wastewater (SMEWW, 2017), método 9223-B que descreve o teste de coliformes por substrato-enzima. Para isso, foi utilizado o kit comercial COLILERT™, que consiste em detectar e quantificar simultaneamente coliformes totais e *Escherichia coli*, por meio de uma tecnologia de substrato contendo enzimas específicas, que alteram a coloração do meio após incubação a 35°C, durante 24 horas. Ao observar os resultados, incolor considera-se resultado negativo; amarelo consideram-se coliformes totais; e amarelo-fluorescente, que deve ser observado em luz

ultravioleta, considera-se *Escherichia coli*. Os resultados finais se dão em Número Mais Provável por 100 mililitros (NMP/100mL), cujo método permite calcular o número de microrganismos em uma amostra utilizando tabelas de probabilidade.

2.4.4. Contagem de leveduras totais em *Candida Chromágar*TM

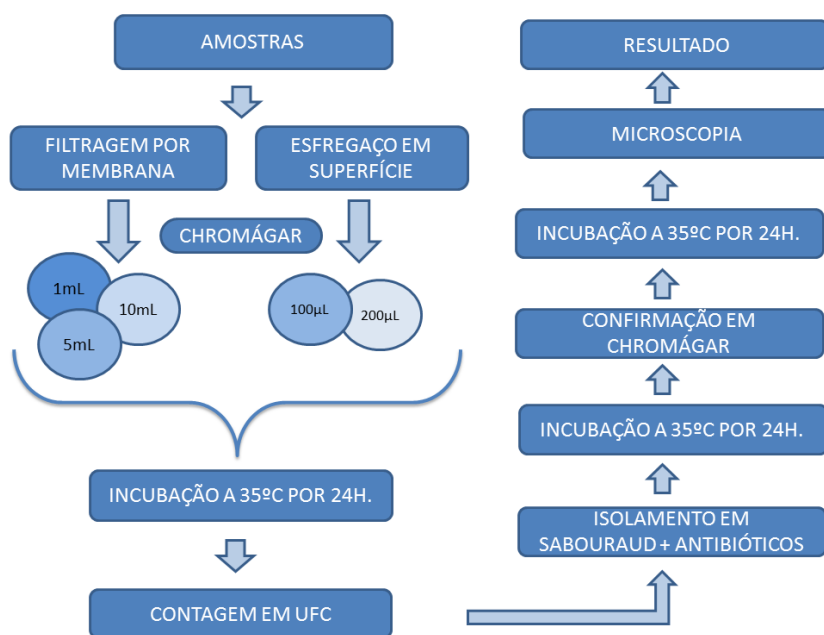


Figura 4. Esquematização gráfica da análise de contagem de leveduras totais em *Candida Chromágar*TM.

Assim como mostra a Figura 4, a análise foi executada em quintuplicata. Três replicatas foram filtradas por membrana de celulose com poros de 0,45 micrômetros (μm) em alíquotas de 1mL, 5mL e 10mL. As outras 2 replicatas (100 e 200 μL), foram realizadas por esfregaço em superfície (*spread plate*). As membranas foram sobrepostas individualmente em placas com meio de cultura CHROMágar *Candida*TM (47,7g/L), cuja principal função é diferenciar espécies de *Candida* sp. por meio de coloração de colônias.

Neste meio de cultura, cada espécie possui uma enzima espécie-específica que degrada um componente exclusivo fazendo com que o substrato cromogênico produza uma cor característica para auxiliar na identificação. *Candida albicans* – são representadas por colônias esverdeadas; *Candida tropicalis* - azul metálico; *Candida krusei* – colônias cor rosa a rosa pálido; *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e outras espécies de *Candida* – tons creme (Figura 5).

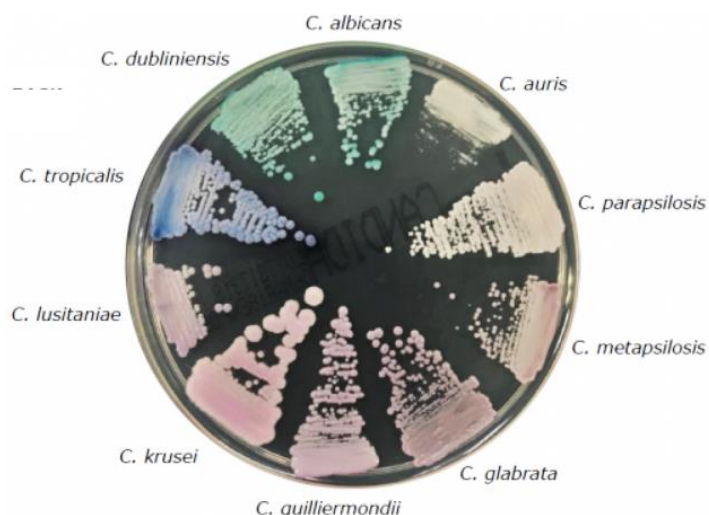


Figura 5. Coloração espécie-específica em meio seletivo CHROMágar Candida™.

(Fonte: CROMágar™)

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C com observações em 24, 48 e 72h. Após a incubação, foi determinado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

As colônias foram estriadas em placas contendo Ágar Sabouraud Dextrose (65g/L) adicionados dos antibióticos cloranfenicol (0,5g/L) e cloridrato de tetraciclina (0,5g/L) para a eliminação de bactérias eventualmente selecionadas. Após essa confirmação, os isolados foram novamente cultivados em CHROMágar Candida™ pelo método de esgotamento e juntamente com a técnica de coloração de Gram, para verificação de culturas puras e garantia da coloração espécie-específica.

2.5. Seleção morfológica das leveduras

Devido ao grande número de isolados purificados advindos da filtragem das amostras e também ao alto custo das análises de biologia molecular e perfil de susceptibilidade a antifúngicos, houve a necessidade de redução do número de isolados. Para isso, primeiramente as colônias foram separadas quanto aos pontos de coleta e diluição de filtragem, em seguida, as leveduras foram segregadas quanto suas características morfológicas como: cor, rugosidade da borda, brilho, ângulo de superfície e textura, para que fossem direcionadas para as próximas análises.

2.6. Teste de perfil de susceptibilidade

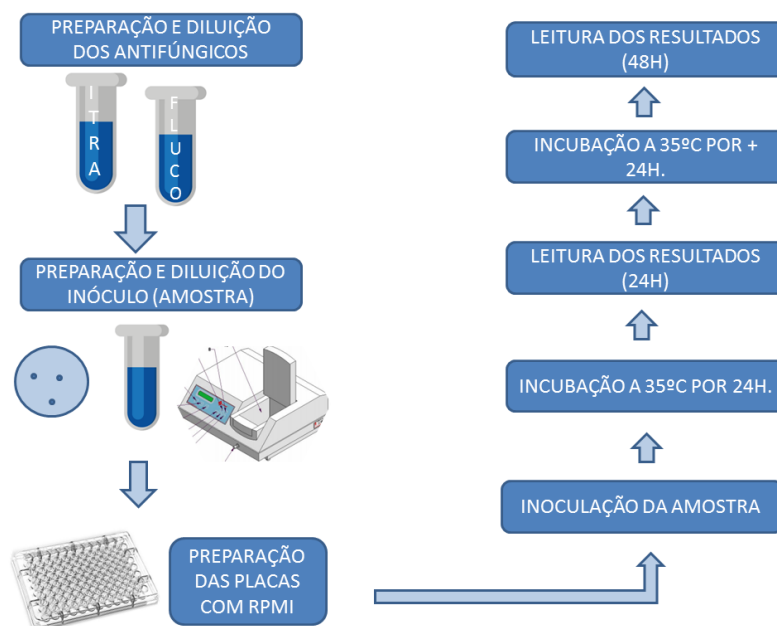


Figura 6. Fluxograma da análise de resistência a antifúngicos em leveduras.

Para esta análise foi utilizado o Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo (CLSI, 2008). A técnica de susceptibilidade consiste no teste de diferentes concentrações de fungicidas em caldo RPMI (RPMI-1640 10,4g/L; MOPS 34,53g/L), para verificação da sensibilidade de leveduras em antifúngicos específicos. O processo simplificado foi apresentado na Figura 6.

Para esta pesquisa foram utilizadas onze concentrações (Tabela 2) dos antifúngicos Itraconazol e Fluconazol e também o RPMI sem inóculo, como controle de esterilidade. As drogas em solução foram cuidadosamente preparadas seguindo as especificidades de cada uma: itraconazol (1mg/mL) em dimetilsulfóxido como diluente e armazenagem à -20°C; e fluconazol (1mg/mL) em água destilada estéril como diluente e armazenagem à -20°C. Posteriormente, houve a distribuição das concentrações do antifúngico em placas de microtitulação de 96 poços com o fundo plano, para melhor visualização do crescimento fúngico.

Tabela 2. Concentrações de drogas antifúngicas em µg/mL, para o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Antifúngicos		Concentrações (µg/mL)									
Fluconazol		64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125
Itraconazol		16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03

Para a preparação da amostra, houve o repique do microrganismo em ágar sabouraud dextrose por 48h a 35°C. Após o crescimento, cerca de 5 colônias foram passadas para um tubo com 5mL de salina 9%. A solução foi agitada em vórtex, e a sua densidade celular ajustada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 530nm. As soluções ficaram entre 75%+/-2 de transmitância, tendo entre $0,5-5 \times 10^6$ UFC/mL. Foram realizadas duas diluições (1:50 e depois 1:20) para a obtenção do inóculo final de $0,5-5 \times 10^3$ UFC/mL. Todos os testes foram realizados em duplicatas.

Após a preparação das placas e inoculação das leveduras (Figura 7), as mesmas foram incubadas em estufa a 35°C. As leituras foram realizadas em 24 e 48 horas e determinado a Concentração Inibitória Mínima (MIC) que é a menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento visível do fungo (CLSI, 2008).

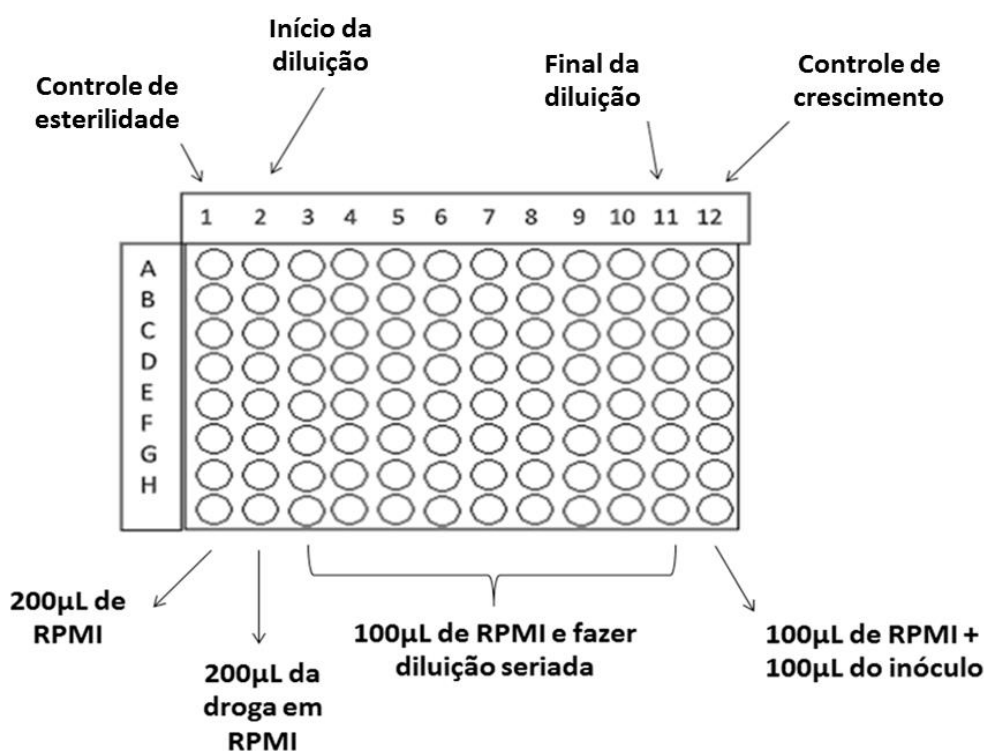


Figura 7. Esquema para diluição de antifúngico e amostra para o teste de resistência a antifúngicos em leveduras.

Para a interpretação dos resultados, foi utilizado pontos de corte (*breakpoints*) para cada antifúngico conforme Tabela 3. Além disso, foram definidos os valores de MIC50 e MIC90, ou seja, a menor concentração de antifúngico para inibir 50 e 90% das amostras (CLSI, 2008).

Tabela 3. Pontos de Corte para o teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Antifúngico (µg/mL)	Suscetível	Dose-Dependência	Resistente
Fluconazol	≤8	16-32	≥64
Itraconazol	≤0,125	0,25-0,5	≥1

Fonte: CLSI, 2008.

2.7. Análise molecular

Para a determinação do perfil genético de leveduras encontradas no rio Toledo, foram realizadas diversas análises moleculares conforme descrito no fluxograma da Figura 8.

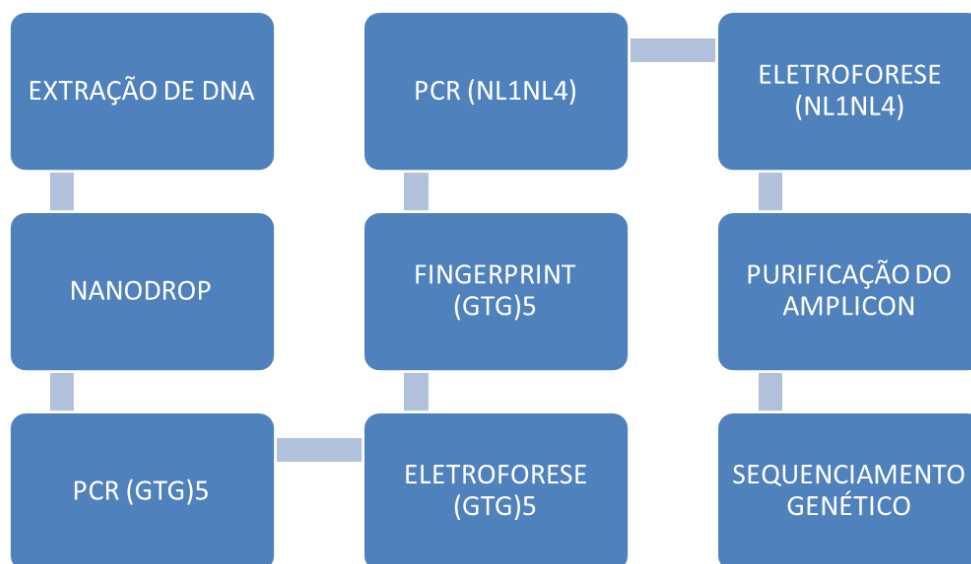


Figura 8. Fluxograma do processo de análises para a determinação do perfil genético de leveduras encontradas em 4 pontos do rio Toledo - PR.

2.7.1. Extração e quantificação de DNA

Para o processo de extração de DNA, foram seguidas as instruções de Brandão (2011) com modificações, onde as leveduras ativadas em meio Ágar Sabouraud Dextrose, incubadas por 24 horas à 30°C. Após esse período, foram suspensas em microtubos estéreis (*ependorf*) contendo 100 µL de tampão de lise (50 mmol Tris L⁻¹, 250 mmol NaCl L⁻¹, 50mmol EDTA⁻¹, 0,3% w/v SDS, pH 8), homogeneizadas e incubadas em banho-seco à 65°C por 30 minutos.

Após, foi adicionado 200 µL de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), homogeneizado por inversão, centrifugados por 14000 rpm por 15 minutos. A seguir, foi retirada a primeira fase do centrifugado (65 µL) e transferido para um novo tubo *eppendorf* estéril, deixado 15 minutos em repouso com 65 µL de isopropanol, centrifugado a 14.000 rpm em 10 minutos e descartado o sobrenadante.

Em seguida, foi adicionado 200 µL de etanol 70% gelado, homogeneizado por inversão e novamente centrifugado a 14.000 rpm em 10 minutos. As amostras foram deixadas secar *overnight* em temperatura ambiente e no dia seguinte foram re-suspendidas em 50 µL de Tampão TE (Tampão de Extração) pH 8.0 (Tris-EDTA), hidratadas por 30 minutos á 37°C.

Após a extração do DNA, 1µL das amostras foi inserido e processado em espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 permitindo a dosagem do ácido nucléico e verificação de sua pureza. Após a fase de dosagem, as amostras foram congeladas a -20°C.

2.7.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Eletroforese e Fingerprint

Para esta análise, foi utilizado o oligonucleotídeo sintético (GTG)₅ (5'GTGGTGGTGGTGGTGGT'3) como primer-microsatélite. Foi formado um *blend*, com o *primer*, os reagentes descritos na Tabela 4, e 1 µL do DNA amostrado.

Para o padrão foram utilizados 3 µL do corante reagente fluoroforo (GelRed) e 2 µL de do padrão de 1 kb pares de base. Já nas amostras, foram utilizados 3 µL corante gel red, tampão 6x, e 5 µL da amostra extraída.

Tabela 4. Volumes e reagentes utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de GTG₅.

Reagente	Volume (µl)
Água Milli-Q	16,8
Tampão (10x)	2,5
MgCl ₂ (25mM)	1,5
Primer GTG (10pmol)	2,0
dNTP (10mM)	1,0
Taq Polimerase (5 U/10 µL)	0,2

Para amplificação e multiplicação do DNA, foi utilizado o termociclador (Mastercycler, Eppendorf). As especificações de programação de ciclagem foram conforme Tabela 5.

Tabela 5. Descrição de temperatura e tempo de ação do termociclador para análise de GTG5.

Passo	Temperatura	Tempo
1	94°C	2 min
2	93°C	45 seg
3	50°C	1 min
4	72°C	1 min
5	Repetido os passos 2-3-4 (40 vezes)	110 min
6	72°C	6 min
7	10°C	-

Para visualização do produto gerado (amplicon) após a amplificação do DNA no termociclador, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose (1,5% em Tampão TBE 0,5x), com o auxílio do corante gel red. Para isso, foram configuradas as seguintes especificações do equipamento: voltagem em 90V, potência em 80W, corrente elétrica em 360mA, em um tempo de 50 minutos.

Após a corrida, foi realizada a observação dos perfis das bandas (*fingerprint*) em um equipamento trans-iluminador para a determinação da similaridade entre as amostras. Em sequência, as amostras com padrões de bandas similares foram agrupadas e consideradas de mesma espécie. Pelo menos um representante de cada grupo foi selecionado e encaminhado à próxima fase.

2.7.3. Amplificação de NL1NL4, purificação e sequenciamento genético

Após a seleção dos isolados por *Fingerprint*, as amostras foram encaminhadas para a fase de amplificação por meio do primer NL1 (5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG'3) e primer NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGACGG'3), onde apenas essa região gênica do rRNA foi amplificada. Foi formado um *blend* com os *primers*, os reagentes descritos na Tabela 6, e 2µL do DNA amostrado e encaminhados para PCR. Para o padrão foram

utilizados 2 μ L do corante GelRed e 3 μ L de do padrão de 1kb pares de base. Já nas amostras, foram utilizados 3 μ L corante GelRed, tampão 6x, e 5 μ L da amostra extraída.

Tabela 6. Volumes e reagentes utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) de NL1NL4.

Reagente	Volume (μ L)
Água Milli-Q	38,8
Tampão (10x)	5,0
NL1	1,0
NL4	1,0
dNTP (10mM)	2,0
Taq Polimerase (5 U/10 μ L)	0,2

Para a fase de amplificação do DNA, foi utilizado o termociclador (Mastercycler, *Eppendorf*) com especificações de programação de ciclagem conforme Tabela 7.

Tabela 7. Descrição de temperatura e tempo de ação do termociclador para o método NL1/NL4.

Passo	Temperatura	Tempo
1	95°C	2 min
2	95°C	15 seg
3	54°C	25 seg
4	72°C	20 seg
5	Repetido os passos 2-3-4 (35 vezes)	
		40 min
6	72°C	10 min
7	10°C	-

Para visualização do produto gerado (amplicon) após a amplificação do DNA no termociclador, foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose (1% em Tampão TBE 0,5x), com o auxílio do corante gel red.

Para isso, foram configuradas as seguintes especificações do equipamento: voltagem em 120V, potência em 80W, corrente elétrica em 360mA, em um tempo de

25 minutos. Após a corrida, foi realizada a observação dos perfis das bandas (*fingerprint*) em um equipamento trans-iluminador. No método de purificação, para cada amplicon (produto de PCR) gerado foi adicionado ao *blend* os itens conforme Tabela 8.

Tabela 8. Volumes e reagentes utilizados na purificação de produtos de PCR (amplicon).

Reagente	Volume (µL)
Amplicon	47
EDTA 125mM	11,75
Etanol absoluto	141

Após a mistura acima, as amostras foram homogeneizadas por inversão, deixadas em repouso por 15 minutos e centrifugadas a 14.000 rpm por 25 minutos à temperatura ambiente. Foi retirado cuidadosamente o sobrenadante e adicionado 120µL de etanol 70% para lavagem do sedimento, homogeneizado por inversão, centrifugado por 10 minutos à 14.000 rpm e descartado o sobrenadante.

As amostras foram deixadas secar *overnight* em temperatura ambiente e no dia seguinte foram re-suspendidas em 10µL de água ultrapura e hidratadas por 30 minutos à 37°C. Após esta fase, as amostras foram encaminhadas para a etapa de sequenciamento genético. A análise de sequenciamento genético se deu pelo sistema de sequenciamento automatizado MegaBace™1000 (Amersham Biosciences).

2.8. Análise estatística e interpretação do código genético

Para a realização da análise estatística dos resultados microbiológicos e físico-químicos e verificação de diferenças significativas entre os pontos de ambiente rural e urbano, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) por meio do software Statistica e considerado um nível de significância de 5%. Após análise de variância, nos resultados em que houve diferença significativa, foi realizado o teste de Tukey para averiguar quais médias diferiram entre si.

Para a interpretação dos resultados obtidos pelo sequenciamento genético, foi comparado aos dados do *GenBank* utilizando a ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) por meio do website do National Center for Biotechnology

Information (NCBI), para assim determinar a similaridade da sequência biológica e sua significância estatística.

2.9. Armazenamento das amostras

As amostras isoladas estão sendo mantidas em caldo BHI (37g/L) + Glicerol (70:30), sob congelamento à -20°C, e também em Caldo GYMP+Glicerol (80:20) em ultrafreezer à -80°C para acervo biológico; sendo GYMP (glicose 20g/L; extrato de levedura 5g/L; extrato de malte 10g/L; fosfato de sódio monobásico 2g/L; coranfenicol 0,1g/L).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análises físico-químicas

A resolução CONAMA 357/2005, é a legislação utilizada para a comparação de indicadores de qualidade ambiental em ambientes lóticos. Os parâmetros físico-químicos obtidos estão representados na Tabela 9.

Tabela 9. Resultados de análises físico-químicas da água do rio Toledo-PR.

Aspectos f/q	Ambiente rural				Ambiente urbano			
	P1(C)	P1(S)	P2(C)	P2(S)	P3(C)	P3(S)	P4(C)	P4(S)
Temperatura (°C)	20,6	18,5	20,6	17,9	22,3	18,0	22,9	17,5
Ox. Dissolvido (mg/L)	5,79	5,10	5,48	5,92	ND	7,22	ND	5,30
pH	6,92	6,43	6,88	6,39	6,94	6,34	7,00	6,35
DBO (mg/L)	<1,00	<1,00	<1,00	<1,00	4,26	2,51	3,32	1,77
DQO (mg/L)	15,21	51,67	8,02	71,67	34,80	71,67	38,50	64,67

ND: Não determinado; (C): período chuvoso; (S): período de seca

As bactérias e outros microrganismos heterotróficos mesófilos aeróbios são organismos que dependem de fontes externas de alimentação e são capazes de se reproduzir entre 20°C e 40°C, sendo a temperatura ideal na faixa dos 30°C (EMBRAPA, 2019). A temperatura pode interferir na quantidade de oxigênio dissolvido disponível, podendo comprometer o metabolismo de microrganismos presentes no corpo d'água.

Podemos observar na Tabela 6, que todos os pontos do período chuvoso estavam com temperatura superior as 20°C, já no período seco apresentaram valores inferiores aos 20°C. Este resultado pode ter sido influenciado pela estação fria e pelo horário da coleta. Em análise estatística, comparando ambientes com ação antrópica rural e urbana, a probabilidade de significância (p) foi de 0,6402, ou seja, não ocorreu diferença estatística (Figura 9).

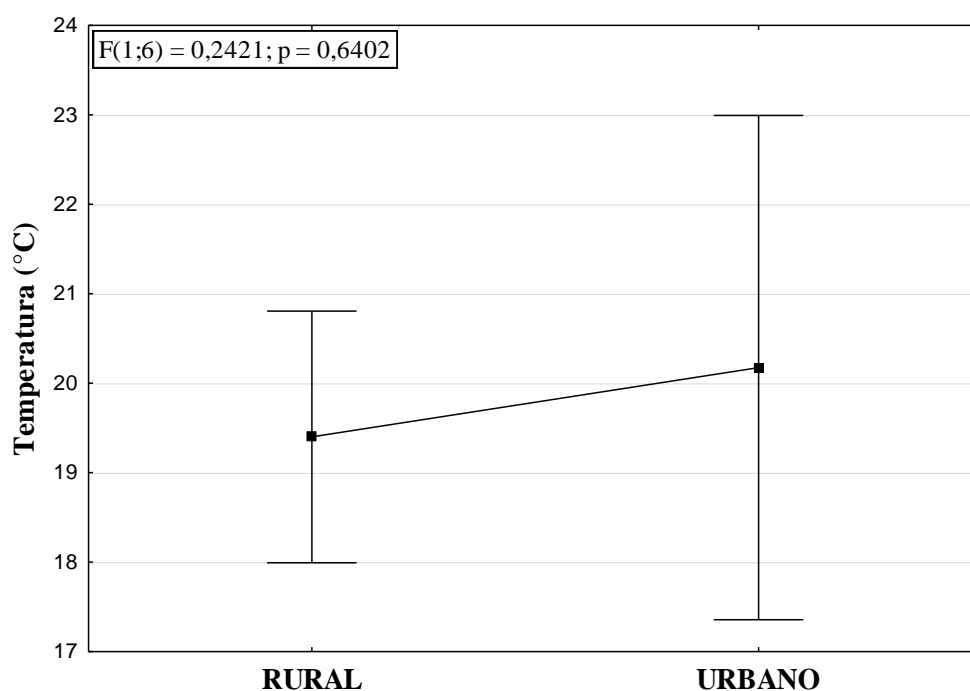


Figura 9. Temperatura em comparação entre pontos de coleta com ação antrópica rural e urbana do rio Toledo – PR.

O oxigênio dissolvido é de grande importância, pois é responsável por assegurar a todos os organismos vivos que precisam do oxigênio para manter sua atividade metabólica (NOSAKI et al., 2014). Segundo a Resolução CONAMA 357/05 o oxigênio dissolvido para auxiliar na preservação da vida aquática, deve ser superior á 5,0mg/L. Com isso, todos os pontos apresentados foram superiores ao estabelecido pela Resolução, exceto aos pontos 3 e 4 do período chuvoso, que não foi possível determinar durante a coleta. Em análise estatística, o valor de (p) foi de 0,2367, não havendo diferença significativa entre ambiente rural e urbano (Figura 10).

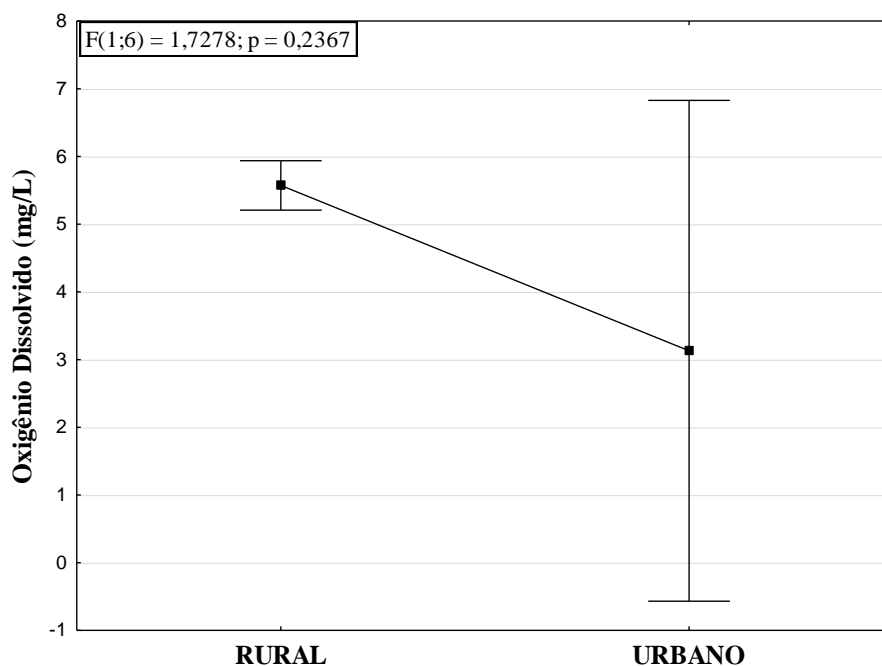


Figura 10. Oxigênio dissolvido em comparação entre pontos de coleta com ação antrópica rural e urbana do rio Toledo – PR.

Todos os organismos manifestam sua melhor performance em determinadas condições ambientais. A alteração expressiva do pH do meio, por exemplo, pode afetar significativamente o metabolismo de microrganismos que possuem funções específicas para a manutenção do corpo hídrico.

Segundo as normas do CONAMA 357/05 do Ministério da Saúde, existe uma definição de valores máximos permissíveis para as características físicas e químicas da água bruta, onde o pH da água seja mantido na faixa de 6,0 a 9,0. Sendo também que o valor de (p) foi de 0,9917, não houve diferença estatística entre o trecho urbano e rural como mostra a Figura 11.

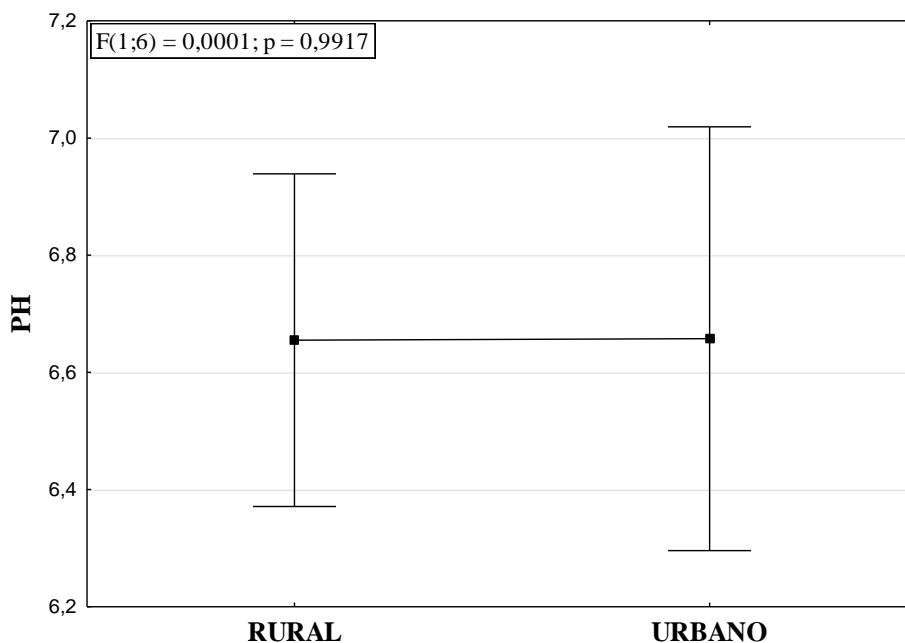


Figura 11. Potencial hidrogeniônico (pH) em comparação entre pontos de coleta com ação antrópica rural e urbana do rio Toledo – PR.

A Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) é a quantidade de oxigênio essencial para oxidar a matéria orgânica em uma forma inorgânica estável, sendo ao contrário da Demanda Química de Oxigênio (DQO) que é feito por um agente químico (CETESB, 2009).

Altos índices de DQO indicam alta disponibilidade de compostos biodegradáveis ou não, corroborando a ideia de contaminação por esgotos sanitários e efluentes industriais. Entre o trecho urbano e rural não houve diferença estatística na análise de DQO (Figura 12).

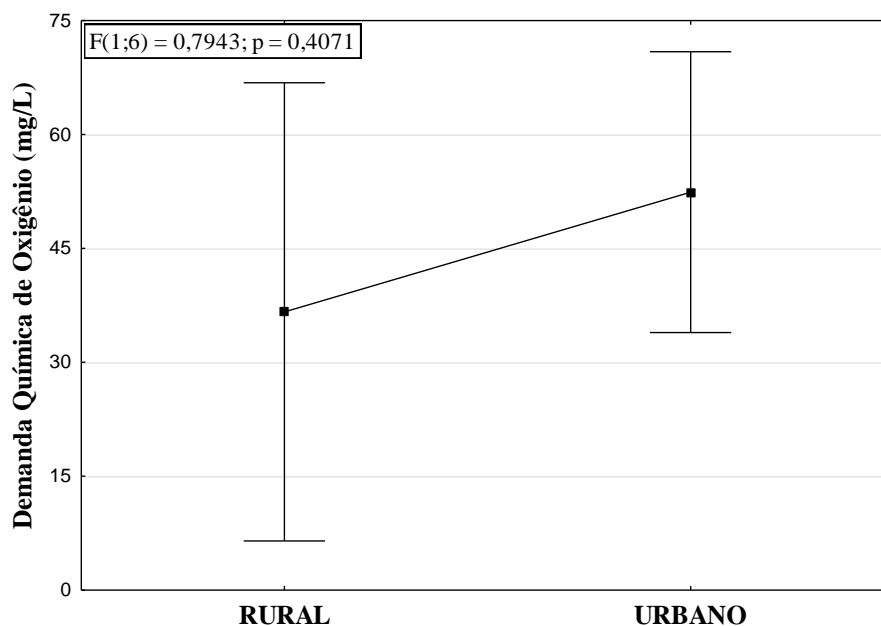


Figura 12. Demanda Química de Oxigênio (DQO) em comparação entre pontos de coleta com ação antrópica rural e urbana do rio Toledo – PR.

Quando o índice de DBO está alto, indica que há significativa disponibilidade de matéria orgânica (biodegradável) no local, uma vez que é necessária grande quantidade de oxigênio para a degradação dessa matéria. Ao contrário, quando o índice de DBO está baixo, as indicações são de ausência de poluição orgânica.

Segundo a resolução do CONAMA 357/05 os níveis ideais de DBO é de no máximo 5mg/L, portanto, todos os pontos analisados se encontram no padrão estabelecido. Porém, considerando a comparação entre o trecho urbano e rural os resultados apresentaram-se estatisticamente significativos (Figura 13), uma vez que no trecho rural os indicadores ficaram abaixo do limite de quantificação.

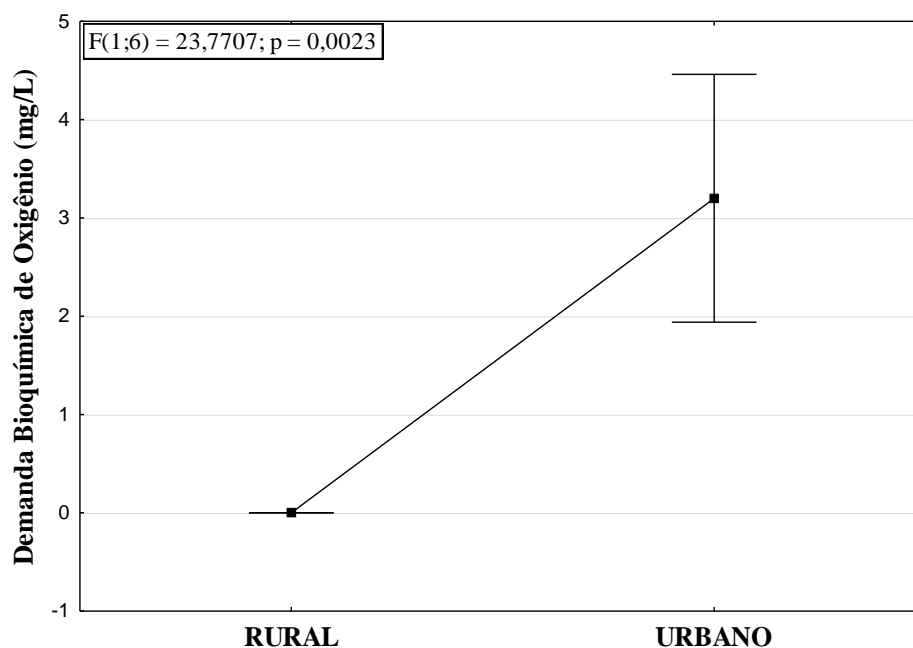


Figura 13. Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) em comparação entre pontos de coleta com ação antrópica rural e urbana do rio Toledo – PR.

3.2. Contagem e caracterização de microrganismos

3.2.1. Contagem de *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus* spp.

As bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. tem como principal particularidade a alta flexibilidade nutricional e metabólica, permitindo assim que variados compostos orgânicos distribuídos na natureza, sirva como fonte de nutrientes e energia (SILVA et al., 2017). Grande parte das contaminações por *Pseudomonas aeruginosa* procedem de fontes de água doce recreativa ou superficial, tornando esses ambientes um importante nicho de pré-infecção, podendo ocasionar doenças comuns até bacteremia e risco de morte (ENGLISH, 2018). Os resultados das análises encontram-se na Tabela 10.

Tabela 10. Pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus* spp. em água do rio Toledo-PR.

Microrganismos (UFC/100ml)	Ambiente Rural				Ambiente Urbano			
	P1(C)	P1(S)	P2(C)	P2(S)	P3(C)	P3(S)	P4(C)	P4(S)
<i>Pseudomonas</i>	<1	<1	<1	100	<1	400	<1	<1
<i>Enterococcus</i>	13.000	15.000	2.000	18.000	12.000	18.000	19.000	36.000

(C): período chuvoso (S): período de seca

Diante dos resultados dessa pesquisa, em apenas dois pontos houve presença de *P. aeruginosa* (ponto 2 e 3) sendo ainda o trecho urbano com maior incidência desse bioindicador complementar de contaminação fecal. Quando comparados trecho urbano e rural não houve diferença significativa (figura 14).

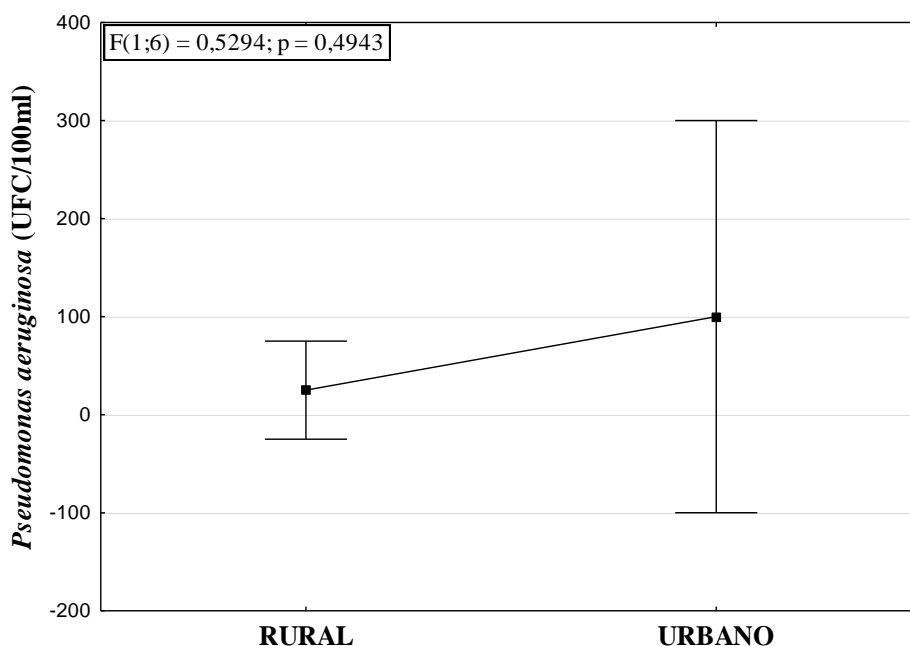


Figura 14. Pesquisa e quantificação de *Pseudomonas aeruginosa* em comparação entre pontos de coleta com ação antrópica rural e urbana do rio Toledo – PR.

As bactérias do gênero *Enterococcus* spp. estão distribuídas em diversos ambientes como solo, águas superficiais, águas residuais, plantas, alimentos e trato gastrointestinal de animais e humanos. Algumas espécies estão associadas a uma ampla gama de infecções clínicas do trato urinário, coração, corrente sanguínea, feridas cirúrgicas, e neonatos (SANDERSON et. al, 2020).

Quanto ao resultado da pesquisa de *Enterococcus* spp., o ponto que obteve maior prevalência foi o P4 (foz do rio Toledo). Porém, todos os pontos apresentaram um número importante de indivíduos, corroborando a ideia de degradação ambiental uma vez que estes microrganismos são comensais do trato intestinal de animais endotérmicos, e são tradicionalmente utilizados como indicadores de contaminação fecal por seres humanos ou outros animais em águas de superfície (SILVA et al., 2017).

Sendo os resultados comparados com o Artigo 2º da Resolução CONAMA nº 274/2000, que dispõe sobre as condições de balneabilidade considerando a saúde e

o bem-estar humano, as águas são consideradas impróprias para uso quando for verificado o limite de 400 ou mais UFC/100mL. Com isso, nota-se que todos os pontos desta pesquisa estão fora dos limites recomendados. Contudo, quando comparados o trecho urbano e rural não houve diferença significativa (figura 15).

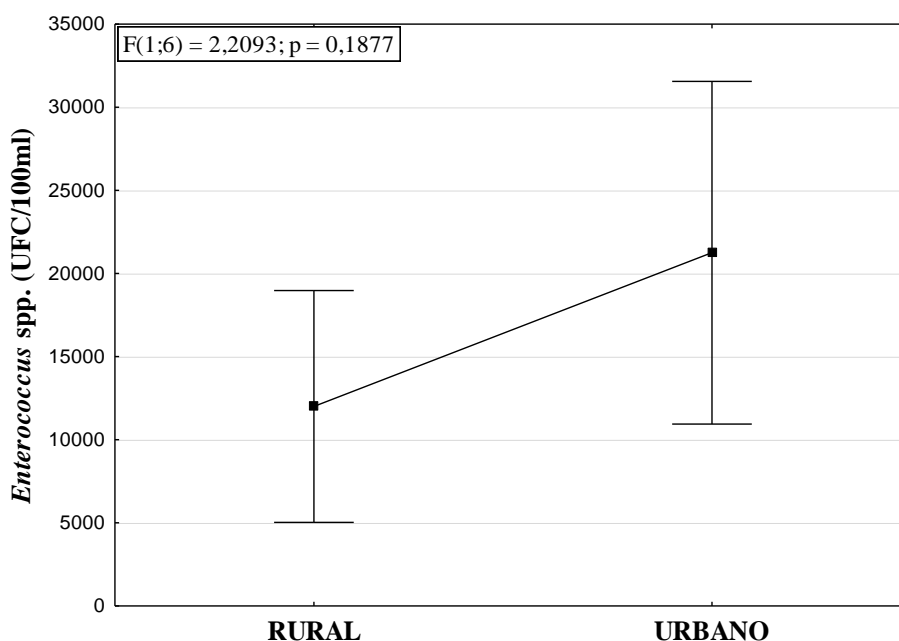


Figura 15. Pesquisa e quantificação de *Enterococcus* sp. em comparação entre pontos de coleta com ação antrópica rural e urbana do rio Toledo – PR.

3.2.2. Contagem de microrganismos heterotróficos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos cultiváveis

Os resultados quanto à contagem de microrganismos heterotróficos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos, foram determinados em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL) conforme Tabela 11.

Tabela 11. Pesquisa de microrganismos heterotróficos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos cultiváveis em água do rio Toledo-PR.

Microrganismo	Ambiente rural				Ambiente urbano			
	P1(C)	P1(S)	P2(C)	P2(S)	P3(C)	P3(S)	P4(C)	P4(S)
Heterotróficos (10 ⁴ UFC/mL)	1,01	2,08	0,77	3,5	21,9	36,1	47,2	61,0

(C): período chuvoso; (S): período de seca

A contagem de bactérias heterotróficas fornece dados mais específicos sobre a qualidade bacteriológica da água, uma vez que essas bactérias necessitam de

carbono orgânico como fonte de alimento, e habitam os ambientes que suprem essa necessidade (BRASIL, 2007).

Quanto a considerável diferença nos pontos 3 e 4 (trecho urbano) quando comparado aos pontos 1 e 2 (trecho rural), possivelmente seja resultado de uma maior deposição de matéria orgânica nos locais. Em uma comparação estatística, pode-se observar que há diferenças significativas entre os o trecho rural e o trecho urbano (Figura 16), sendo também apoiado com a diferença significativa de DBO, mencionado anteriormente.

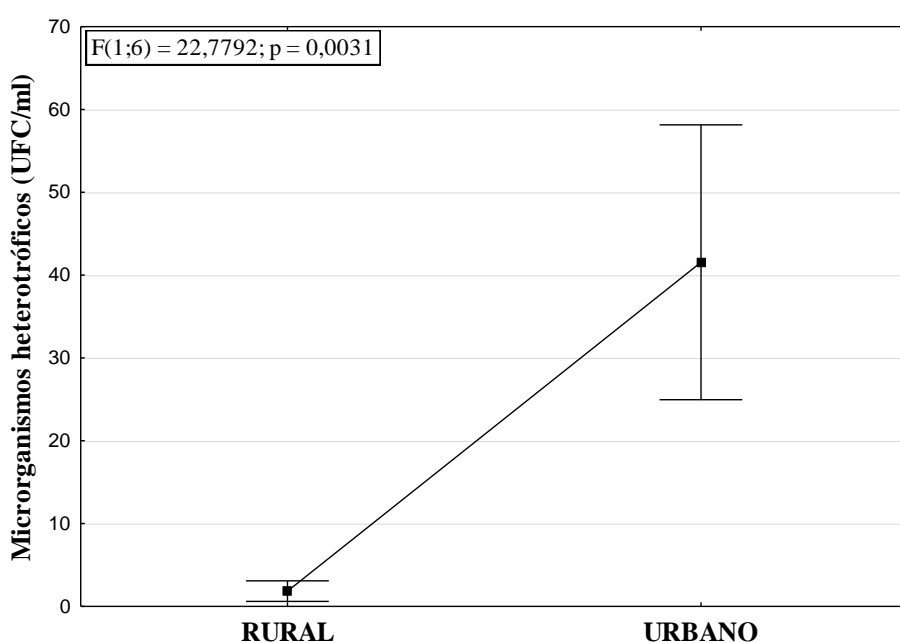


Figura 16. Contagem de microrganismos heterotróficos mesófilos aeróbios e anaeróbios facultativos em comparação entre pontos de coleta com ação antrópica rural e urbana do rio Toledo – PR.

Segundo o estudo feito por Pereira (2016), foi apontado que durante o trajeto do rio pelo município, os indicadores de qualidade ambiental vão decrescendo, principalmente após cortar o perímetro urbano. Ao chegar a sua foz, o rio Toledo pode ser classificado como ruim ou severamente poluído.

3.2.3. Contagem de coliformes totais e *Escherichia coli*

De acordo com o Art. 15 da resolução CONAMA 357/2005, que dispõe sobre a qualidade microbiológica das águas de Classe II, o limite máximo seria de 1.000 coliformes termotolerantes por 100mL de água. Com isso, é possível afirmar que

somente o Ponto 2 do rio Toledo atenderia a legislação vigente. Os resultados da contagem de coliformes totais e *E. coli*, foram determinados em Número Mais Provável (NMP) e descritos na Tabela 12.

Tabela 12. Pesquisa de coliformes totais e *Escherichia coli* em água do rio Toledo-PR.

Microrganismo	Ambiente rural				Ambiente urbano			
	P1(C)	P1(S)	P2(C)	P2(S)	P3(C)	P3(S)	P4(C)	P4(S)
Coliformes Totais	5.475	3.436	9.208	4.106	24.196	9.606	24.196	24.196
<i>E. coli</i>	1.187	633	723	480	3.873	1.334	19.863	9.208

(C): período chuvoso; (S): período de seca

Microrganismos presentes em corpos d'água, em sua grande maioria, não agredem a saúde humana. Porém, quando ocorre contaminação por esgoto sanitário ou alguma outra forma de contaminação fecal, os microrganismos que ali estão podem ser prejudiciais à saúde humana. A origem fecal da *E. coli* é inquestionável, o que ampara seu grande desempenho como bioindicador de contaminação tanto em água bruta quanto em água tratada (FUNASA, 2013). No gráfico da Figura 17, nota-se a grande variação entre os trechos rural e urbano.

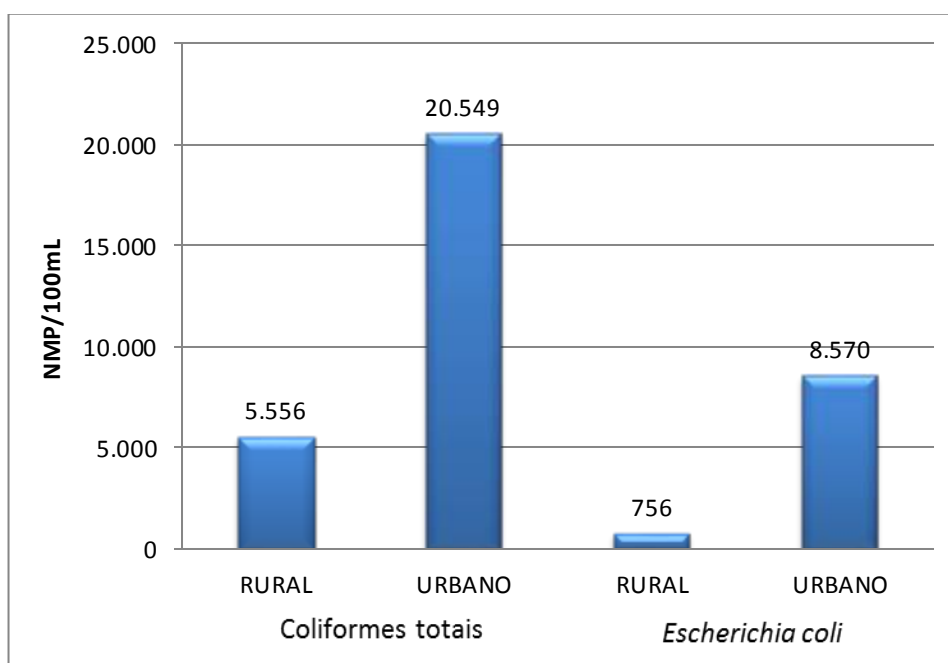


Figura 17. Contagem de coliformes totais e *Escherichia coli* em comparação aos trechos com atividades antrópicas rurais e urbanas do rio Toledo - PR.

Em comparação estatística, pode-se observar que há diferenças significativas entre os pontos do trecho rural e os pontos do trecho urbano na análise de coliformes totais (Figura 18), isso apoia a prevalência de intensa ação antrópica urbana. Já para a pesquisa de *E. coli*, os resultados não foram estatisticamente diferentes (Figura 19).

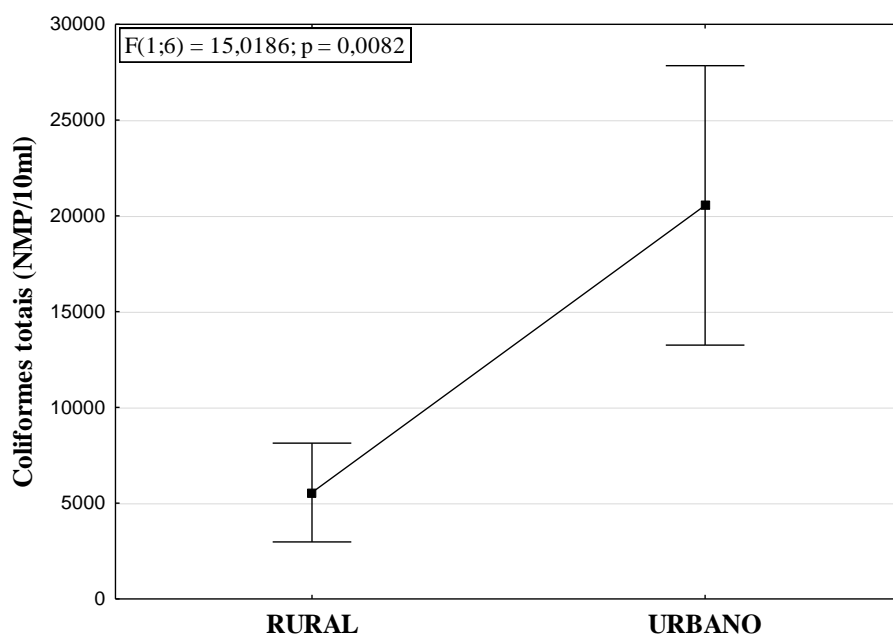


Figura 18. Contagem de coliformes totais em comparação entre pontos de coleta com ação antrópica rural e urbana do rio Toledo – PR.

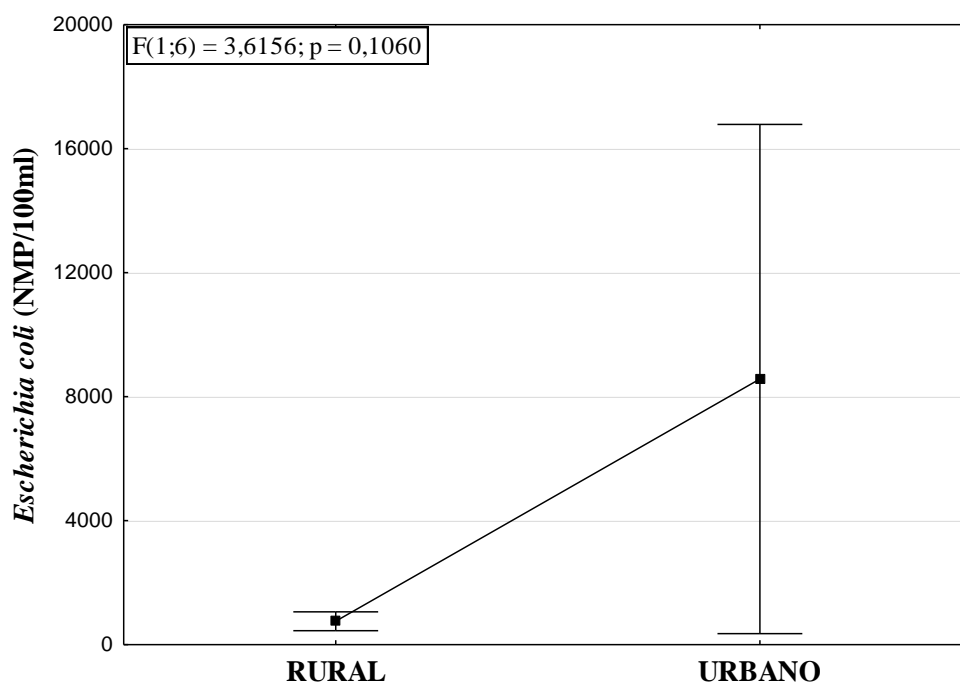


Figura 19. Contagem de *Escherichia coli* em comparação entre pontos de coleta com ação antrópica rural e urbana do rio Toledo – PR.

3.2.4. Contagem de leveduras totais em *Candida Chromágar*TM e seleção morfológica

As leveduras em sua grande maioria tem afinidade com matéria líquida, uma vez que são unicelulares e se dispersam com mais facilidade no ambiente aquoso, além de serem microrganismos anaeróbios facultativos (SILVA et al., 2017). A Figura 20 demonstra a diferença em UFC, do trecho rural e urbano.

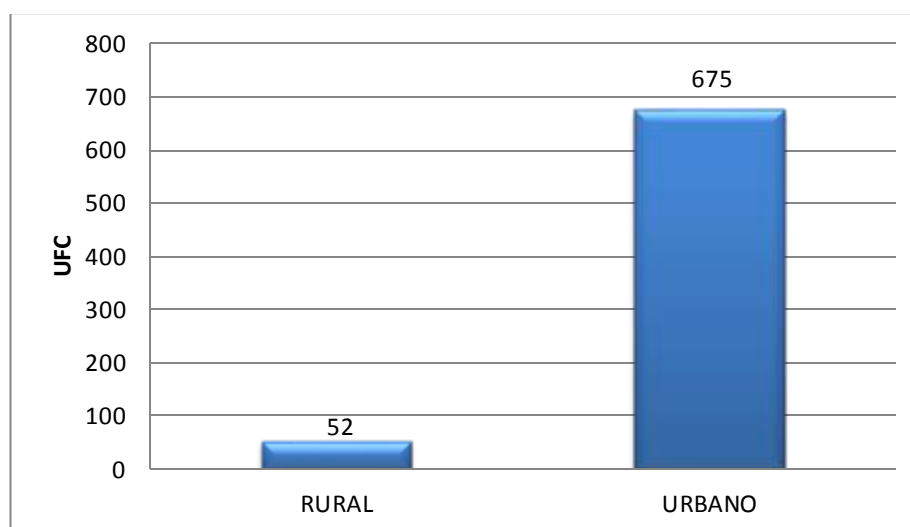


Figura 20. Contagem de leveduras totais em *Candida CHROMágar*TM em 4 pontos de coleta do rio Toledo-PR.

Em comparação estatística, pode-se observar que há diferenças significativas entre os pontos do trecho rural e os pontos do trecho urbano, uma vez que o valor de (p) ficou em 0,0087, como demonstrado na Figura 21.

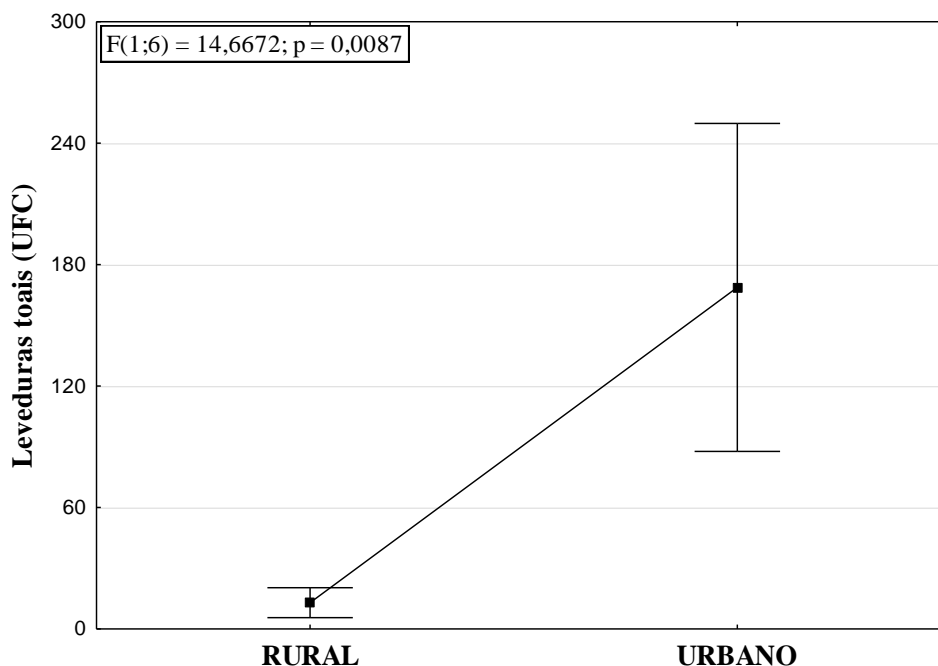


Figura 21. Contagem de leveduras totais em comparação entre pontos de coleta com ação antrópica rural e urbana do rio Toledo – PR.

Ao considerar o número de isolados por mililitro, teremos para o trecho rural uma densidade de 0,40 leveduras/mL e para o trecho urbanizado 5,18 leveduras/mL. Após a contagem total de leveduras, 451 isolados foram direcionados à análise morfológica. Ao final do processo, 164 isolados continuaram em análise nas demais etapas da pesquisa.

Mananciais pouco poluídos apresentam menores concentrações de leveduras quando comparados aos ambientes com alta carga de eutrofização, ocorrendo grande correlação entre contagens de leveduras e outros bioindicadores aquáticos como os coliformes fecais, coliformes totais e *Escherichia coli* (MILANEZI, 2016; MEDEIROS et. al., 2008).

A utilização de bioindicadores é uma ferramenta importante para investigar passivos ambientais provocados pela poluição por resíduos industriais, agrícolas, e sanitários. Leveduras do gênero *Candida* são consideradas bioindicadores pela sua capacidade de sobreviver em água doce contaminada e são mais comumente recuperadas que coliformes fecais, facilitando o diagnóstico de ambientes antropizados (BRILHANTE et. al., 2015).

3.2.5. Teste de perfil de susceptibilidade

A Concentração Inibitória Mínima (CIM/MIC) é a menor concentração necessária de um antifúngico para inibir o crescimento de um microrganismo alvo. Foram analisadas 164 amostras (Apêndice A) sendo que no teste para itraconazol houve resistência de 144 leveduras, dose dependência de 16 e suscetibilidade em 4 amostras e para fluconazol, 80 foram resistentes, 37 dose-dependentes e 47 suscetíveis (Figura 22). A pesquisa também indicou que 47% do total de leveduras testadas, eram resistentes a ambas as drogas.

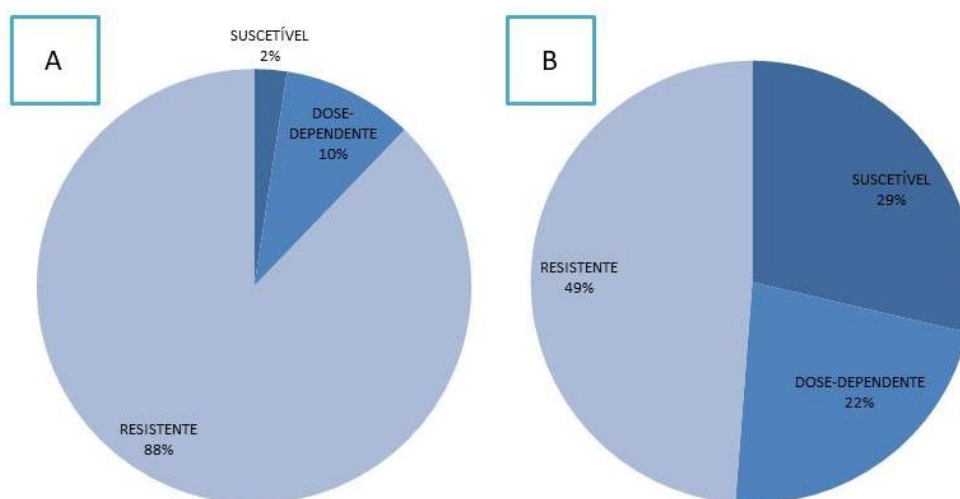


Figura 22. Perfil de susceptibilidade aos antifúngicos (a) itraconazol (b) fluconazol de leveduras coletadas em 4 pontos de coleta do rio Toledo-PR.

Ao definir os valores de MIC50 e MIC90, ou seja, a menor concentração de antifúngico para inibir 50 e 90% das amostras, os resultados foram: para itraconazol os valores são respectivamente 4 e 8 µg/mL e para fluconazol os valores são 32 e >64 µg/mL, respectivamente.

Resistência aos antifúngicos podem ocorrer de forma intrínseca ou adquirida. Intrínseca quando a resistência é expressa naturalmente, sem exposição precedente à droga; e resistência adquirida, quando há mutação após exposição ao antifúngico ocasionando posterior seleção genética, sobrevivência e proliferação dos mutantes resistentes (KANAFANI e PERFECT, 2008). Atividades de bombas de efluxo pode ser fundamental na resistência de azóis em espécies do gênero *Candida*, e tem sido utilizada como um próspero instrumento de monitoramento da qualidade em ambientes de água doce (BRILHANTE et. al, 2015).

Os azóis são comumente utilizados em diversas atividades humanas como, proteção de plantas, pré e pós-colheita agrícola, compostagem, preservação de materiais como tintas, pastas de papel e até mesmo em colchões para impedir a proliferação de fungos. (SNELDERS et. al, 2009). Esta classe de fungicida também é reconhecida pelo potencial de persistência no solo e nos alimentos (SNELDERS et. al, 2009; AZEVEDO et. al., 2015).

Fungicidas azólicos são frequentemente encontrados em águas residuais domésticas, águas superficiais e sedimentos. Azóis residuais no ambiente aquático pode causar efeitos adversos em diferentes níveis de organismos com efeitos tóxicos no crescimento de algas e interferência endócrina em peixes. (CHEN e YING, 2015). Dito isso, considera-se uma preocupação exponencial quando adicionado ao corpo hídrico resíduos de exploração agrícola e pecuarista, como no caso do rio Toledo.

Grande parte dos patógenos fúngicos é proveniente do meio ambiente e, apenas algumas espécies de leveduras são originárias da microbiota natural de humanos saudáveis. Com isso, isolados resistentes em condições ambientais podem ter apresentado esta situação depois de prolongada pressão seletiva do meio. Portanto, a probabilidade de um indivíduo ser exposto a um fungo resistente no meio ambiente é elevada (AZEVEDO et. al., 2015).

A presença de leveduras resistentes aos medicamentos antifúngicos mais comumente utilizados, em águas de uso público e fins recreativos, pode ser considerada um risco para a população envolvida (MEDEIROS et. al. 2008).

3.2.7. Análise molecular

Até o momento, 13 amostras foram sequenciadas e identificadas. 12 cepas apresentaram perfil genético de *Candida palmioleophila* e 1 cepa de *Torulaspora pretoriensis*. As sequências genéticas estão dispostas no Anexo A.

Candida palmioleophila é um patógeno fúngico oportunista antes negligenciado, caracterizado por um exclusivo perfil de suscetibilidade e que provoca fungemia associada a cateteres intravenosos (JENSEN e ARENDRUP, 2010). No processo de identificação da espécie *Candida palmioleophila*, devido à grande semelhança em suas características bioquímicas e morfológicas, são

frequentemente confundidas com diferentes espécies como *C. famata* ou *C. guilliermondii*, entre outras (JENSEN e ARENDRUP, 2010; MOTA et al., 2011).

A levedura *Torulaspora pretoriensis* está intensamente relacionada com o gênero *Saccharomyces* podendo ser diferenciada quando analisado seu ciclo de vida. Cepas de *T. pretoriensis* foram encontradas no solo (LIMTONG et. al. 2008; SILVA-BEDOYA et. al., 2014). Possui alta capacidade fermentativa em certos açúcares e resistência ao ciclo de congelamento e degelo (ODA e TONOMURA, 1995).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos ensaios físico-químicos e microbiológicos realizados nas águas do rio Toledo, houve a constatação que as atividades antrópicas (agrícolas e urbanas) que são realizadas no entorno da bacia estão interferindo na qualidade deste corpo hídrico, uma vez que microrganismos heterotróficos, coliformes totais e fecais estão acima dos valores máximos estabelecidos pelo CONAMA nº 357/2005, para as águas doces de classe 2, no trecho urbanizado do rio.

Ao comparar a qualidade ambiental dos pontos de coleta quanto à sua localização, o trecho com atividades antrópicas de urbanização (pontos 3 e 4) apresentou diferenças significativas nas análises de demanda bioquímica de oxigênio, leveduras totais, coliformes totais e microrganismos heterotróficos mesófilos aeróbios facultativos cultiváveis, quando comparado ao trecho de atividades antrópicas rurais (pontos 1 e 2), confirmando assim maior impacto antrópico no trecho urbano.

Em questão de saúde pública e epidemiológica, os azóis são fundamentais no tratamento de algumas doenças fúngicas e o alto número de microrganismos resistentes a estes antifúngicos promove séria preocupação. Porém, é compreendido que não somente a resistência intrínseca se faz presente uma vez que, ações antrópicas interferem nesse processo e contribuem expressivamente no processo de resistência antifúngica.

A enorme resistência de leveduras encontradas no rio Toledo aos antifúngicos itraconazol (88%) e fluconazol (49%), reforça seriedade ao fomento de estudos de microbiota ambiental, em rios que indicam poluição por influência antrópica. Acredita-se, portanto, que essa resistência possa ser resultado da relação entre o

uso agropastoril de azóis, advindos de atividades antrópicas ribeirinhas como também azóis médicos, provenientes do lançamento de esgoto sanitário no trecho urbano.

Dito isso, confirma-se o pressuposto que atividades antrópicas como a ruralização e urbanização realmente comprometem a qualidade deste corpo hídrico, e a saúde humana uma vez que, o rio Toledo é enquadrado em rio de classe II, sendo permitida atividades de lazer, pesca, irrigação agrícola e abastecimento hídrico.

Políticas ambientais devem ser rapidamente implementadas como, por exemplo, ampliação da rede de estações de tratamento de esgoto no município, tratamento de esgoto doméstico e industrial antes da liberação no rio, fiscalização em ligações clandestinas de esgoto sanitário em galerias pluviais, revitalização de mata ciliar e educação ambiental.

5. REFERÊNCIAS

AFONSO, J. A. C. Nascentes protegidas e recuperadas. Secretaria do Estado Meio Ambiente e Recursos Hídricos – SEMA. 2010

AZEVEDO, M. M.; FARIA-RAMOS, I.; CRUZ, L. C.; PINA-VAZ, C.; GONÇALVES RODRIGUES, A. Genesis of Azole Antifungal Resistance from Agriculture to Clinical Settings. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 63 (34), p. 7463–7468, 2015.

BRANDÃO, L. R.; LIBKIND, D.; VAZ, A. B. M.; ESPÍRITO SANTO, L. C.; MOLINÉ, M.; GARCÍA, V.; BROOCK, M. V.; ROSA, C. A. Yeasts from an oligotrophic lake in Patagonia (Argentina): Diversity, distribution and synthesis of photoprotective compounds and extracellular enzymes. **FEMS Microbiology Ecology**, v.76, n. 1, p. 1-13, 2011.

BRILHANTE, R. S. N., PAIVA; M. A. N., SAMPAIO, C. M. S.; CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; ALENCAR, L. P.; BANDEIRA, T. J. P. G.; CORDEIRO, R. A.; NETO, W. A. P.; MOREIRA, J. L. B.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Surveillance of Azole Resistance Among *Candida* spp. as a Strategy for the Indirect Monitoring of Freshwater Environments. **Water, Air, & Soil Pollution**, 226(3), 2015.

CARNEIRO, M. T. *Desenvolvimento de meios seletivos para contagem de leveduras em membrana filtrante para monitorar a poluição no lago Juturnaíba, Rio de Janeiro*. 2001. 124 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2011.

CETESB. Significado Ambiental e Sanitário das Variáveis de Qualidade das águas e dos Sedimentos e Metodologias Analíticas de Amostragem. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2009.

CHEN, Z.-F. e YING, G.-G. Occurrence, fate and ecological risk of five typical azole fungicides as therapeutic and personal care products in the environment: A review. **Environment International**, v. 84, p. 142–153, 2015.

CONAMA 274/2000 do Ministério do Meio Ambiente. *Ministério do Meio Ambiente*. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=272>>. Acesso em: 01 set. 2019.

CONAMA 357/2005 do Ministério do Meio Ambiente. *Ministério do Meio Ambiente*. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acesso em: 08 set. 2019.

CLSI, *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts*; approved standard-third edition; CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2008.

EMBRAPA Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_182_21720039246.html>. Acesso em 8 set. 2019.

ENGLISH, E. L., SCHUTZ, K. C., WILLSEY, G. G., & WARGO, M. J. Transcriptional Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to Potable Water and Freshwater . **Applied and Environmental Microbiology**, 84(6), 2018.

FUNASA, Fundação Nacional de Saúde, Manual prático de análise de água, Brasília, 2013. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/site/wp-content/files_mf/manual_pratico_de_analise_de_agua_2.pdf> Acesso em: 04 de fev. 2020.

GOÑI-URRIZA, M.; CAPDEPUY, M.; ARPIN, C.; RAYMOND, N.; CAUMETTE, P.; QUENTIN, C. Impact of an Urban Effluent on Antibiotic Resistance of Riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 125–132, 2000.

INSTITUTO DAS ÁGUAS DO PARANÁ. Sistema de informações hidrológicas (SIH). Disponível em: <<http://www.sihweb.aguasparana.pr.gov.br/sihweb/gerarRelatorioAlturasDiariasPrecipitacao.do?action=carregarInterfaceInicial>>. Acesso em: 8 set. 2019.

JENSEN, R. H.; ARENDRUP, M. C. *Candida palmioleophila*: Characterization of a Previously Overlooked Pathogen and Its Unique Susceptibility Profile in Comparison

with Five Related Species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49 n. 2, p. 549–556, 2010.

KANAFANI, Z. A. e PERFECT, J. R. Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46 n.1, p. 120–128, 2008.

LIMTONG, S.; IMANISHI, Y.; JINDAMORAKOT, S.; NINOMIYA, S.; YONGMANITCHAI, W.; NAKASE, T. *Torulaspora maleeae* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species from Japan and Thailand. **FEMS Yeast Research**, v. 8 n. 2, p. 337–343, 2008.

MEDEIROS, A. O., KOHLER, L. M., HAMDAN, J. S., MISSAGIA, B. S., BARBOSA, F. A. R., ROSA, C. A. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. **Water Research**, v. 42 n. 14, p. 3921–3929, 2008.

MILANEZI, A. C. M. Avaliação do perfil de resistência a antifúngicos de leveduras isoladas do Arroio Dilúvio em Porto Alegre. Dissertação (Mestrado em microbiologia agrícola e do ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, 2016.

MOTA, A. J.; BACK-BRITO, G. N.; NOBREGA, F. G. Molecular identification of *Pichia guilliermondii*, *Debaryomyces hansenii* and *Candida palmioleophila*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. 122–125, 2011.

NOZAKI, C. T., MARCONDES, M. A., LOPES, F. A., DOS SANTOS, K. F., & DA COSTA LARIZZATTI, P. S. Comportamento temporal do oxigênio dissolvido e pH nos rios e córregos urbanos. **Atas de Saúde Ambiental-ASA**. v. 2, n. 1, p. 29-44, 2014.

ODA, Y., TONOMURA, K. Molecular genetic properties of the yeast *Torulaspora pretoriensis*: Characterization of chromosomal DNA and genetic transformation by *Saccharomyces cerevisiae*-based plasmids. **Current Genetics**, v. 27, n. 2, p. 131–134, 1995.

PEREIRA, E. A. *Exaustão das águas: o que mudou no Rio Toledo e no potencial hídrico no município de Toledo – PR no período de 1985 a 2010*. 113 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Toledo, 2016.

PEREIRA, M. C. B.; JOSÉ, L. S. Bacias hidrográficas do Paraná. *Secretaria do Estado do Meio Ambiente e Recursos Hídricos – SEMA*. 2010.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of Invasive Mycoses in North America. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n.1, p.1–53, 2010.

PULLÉS, M. R. Microorganismos indicadores de la calidad del agua potable en Cuba. **Revista CENIC - Ciências Biológicas**. v. 45, n. 1, p. 25-36, Centro Nacional de Investigaciones Científicas Ciudad de La Habana. Cuba, 2014.

ROCHA, O. Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica do Brasil, 2003. Disponível em: <<https://www.mma.gov.br/informma/item/7933-avalia%C3%A7%C3%A3o-do-conhecimento-sobre-a-diversidade-biol%C3%B3gica.html>> Acesso em: 07 set. 2019.

SANDERSON, H., ORTEGA-POLO, R., ZAHEER, R., GOJI, N., AMOAKO, K. K., BROWN, R. S., MAJURI, A.; LISS, S. N.; MCALLISTER, T. A. Comparative genomics of multidrug-resistant *Enterococcus* spp. isolated from wastewater treatment plants. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, 2020.

SILVA-BEDOYA, L. M., RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M., & OSORIO-CADAVID, E. Yeast diversity associated to sediments and water from two Colombian artificial lakes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 135–142, 2014.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A., TANIWAKI, M. H., GOMES, R. A. R., OKAZAKI, M. M. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água (livro eletrônico), São Paulo: Blucher, v. 5, p. 560, 2017.

SILVEIRA, E. S. Fungos e leveduras na água e plantas macrófitas em decomposição na região estuarina da Lagoa dos Patos e praia do Cassino, RS-Brasil, 126 f. Tese (Doutorado em Oceanografia Biológica) – Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, 2012.

SNELDERS, E., HUIS IN'T VELD, R. A. G., RIJS, A. J. M. M., KEMA, G. H. J., MELCHERS, W. J. G., & VERWEIJ, P. E. Possible Environmental Origin of Resistance of *Aspergillus fumigatus* to Medical Triazoles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n 12, p. 4053–4057, 2009.

WHALEY, S. G., BERKOW, E. L., RYBAK, J. M., NISHIMOTO, A. T., BARKER, K. S., & ROGERS, P. D. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans* *Candida* Species. **Frontiers in Microbiology**, v.7, n. 2173, 2017.

6. APÊNDICE

Apêndice A - Resultado do ensaio de susceptibilidade a antifúngicos em leveduras.

CÓDIGO	ITRACONAZOL		RESULTADO (µg/mL)	FLUCONAZOL		RESULTADO (µg/mL)
	24 H	48H		24H	48H	
AAP004	2	4	RESISTENTE	8	>64	RESISTENTE
	2	4		8	>64	
AAP005	2	4	RESISTENTE	8	32	DOSE DEPENDENTE
	2	4		8	32	
AAP006	0,25	0,5	DOSE DEPENDENTE	0,5	1	SUSCETÍVEL
	0,25	0,5		0,5	1	
AAP007	4	4	RESISTENTE	ND	>64	RESISTENTE
	4	4		ND	>64	
AAP009	1	4	RESISTENTE	16	>64	RESISTENTE
	1	4		16	>64	
AAP010	0,25	1	RESISTENTE	1	16	DOSE DEPENDENTE
	0,25	1		1	16	
AAP017	8	8	RESISTENTE	ND	>64	RESISTENTE
	8	8		ND	>64	
AAP020	4	>16	RESISTENTE	16	64	RESISTENTE
	4	>16		16	64	
AAP029	4	8	RESISTENTE	2	4	SUSCETÍVEL
	4	8		2	4	
AAP035	2	8	RESISTENTE	2	8	SUSCETÍVEL
	2	8		2	8	
AAP036	ND	>16	RESISTENTE	8	>64	RESISTENTE
	ND	>16		8	>64	
AAP037	8	16	RESISTENTE	16	64	RESISTENTE
	8	16		16	64	
AAP041	<0,03	<0,03	SUSCETÍVEL	<0,125	<0,125	SUSCETÍVEL
	<0,03	<0,03		<0,125	<0,125	
AAP042	ND	1	RESISTENTE	ND	8	SUSCETÍVEL
	ND	0,5		ND	8	
AAP045	1	2	RESISTENTE	4	4	SUSCETÍVEL
	1	2		4	4	
AAP048	0,5	0,5	DOSE DEPENDENTE	4	4	SUSCETÍVEL
	0,5	0,5		4	4	
AAP050	4	8	RESISTENTE	64	>64	RESISTENTE
	4	8		ND	>64	
AAP051	4	8	RESISTENTE	8	16	DOSE

						DEPENDENTE
	4	8		8	16	
						DOSE
AAP057	ND	2	RESISTENTE	2	16	DEPENDENTE
	ND	2		2	16	
AAP059	0,5	>16	RESISTENTE	4	4	SUSCETÍVEL
	0,5	>16		4	4	
AAP062	4	4	RESISTENTE	ND	4	SUSCETÍVEL
	4	4		ND	4	
AAP064	ND	4	RESISTENTE	ND	64	RESISTENTE
	ND	4		ND	64	
AAP075	2	4	RESISTENTE	1	4	SUSCETÍVEL
	2	4		1	4	
AAP087	ND	8	RESISTENTE	>64	>64	RESISTENTE
	ND	8		>64	>64	
AAP088	2	>16	RESISTENTE	8	64	RESISTENTE
	2	>16		8	64	
AAP089	4	8	RESISTENTE	16	>64	RESISTENTE
	4	8		16	64	
AAP095	<0,03	<0,03	SUSCETÍVEL	<0,125	<0,125	SUSCETÍVEL
	<0,03	<0,03		<0,125	<0,125	
						DOSE
AAP098	4	8	RESISTENTE	8	16	DEPENDENTE
	4	8		8	16	
AAP100	1	4	RESISTENTE	0,25	0,25	SUSCETÍVEL
	1	4		0,25	0,25	
AAP101	1	1	RESISTENTE	0,5	1	SUSCETÍVEL
	1	1		0,5	4	
			DOSE			
AAP102	0,25	0,5	DEPENDENTE	ND	4	SUSCETÍVEL
	0,25	0,5		ND	4	
AAP103	2	4	RESISTENTE	ND	16	SUSCETÍVEL
	2	4		ND	16	
AAP106	ND	2	RESISTENTE	32	>64	RESISTENTE
	ND	2		32	>64	
AAP109	ND	4	RESISTENTE	8	8	SUSCETÍVEL
	ND	4		8	8	
AAP131	1	2	RESISTENTE	2	2	SUSCETÍVEL
	1	2		2	2	
AAP132	ND	>16	RESISTENTE	0,25	>64	RESISTENTE
	ND	>16		0,25	>64	
AAP134	8	8	RESISTENTE	1	1	SUSCETÍVEL
	8	8		1	1	
AAP135	1	2	RESISTENTE	8	64	RESISTENTE
	1	2		8	64	

AAP136	ND	>16	RESISTENTE	0,25	>64	RESISTENTE
	ND	>16		0,25	>64	
AAP137	2	4	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	2	4		32	64	
AAP140	<0,03	<0,03	SUSCETÍVEL	<0,125	<0,125	SUSCETÍVEL
	<0,03	<0,03		<0,125	<0,125	
AAP146	1	>16	RESISTENTE	2	4	SUSCETÍVEL
	1	>16		2	4	
AAP171	ND	1	RESISTENTE	ND	4	SUSCETÍVEL
	ND	1		ND	4	
AAP173	0,5	1	RESISTENTE	0,5	64	RESISTENTE
	0,5	1		0,5	64	
			DOSE			DOSE
AAP175	0,125	0,25	DEPENDENTE	16	16	DEPENDENTE
	0,125	0,25		16	16	
AAP176	1	2	RESISTENTE	0,25	2	SUSCETÍVEL
	2	4		0,25	2	
			DOSE			
AAP179	0,25	0,5	DEPENDENTE	1	>64	RESISTENTE
	0,25	0,5		1	>64	
AAP180	2	4	RESISTENTE	0,5	2	SUSCETÍVEL
	2	4		0,5	2	
AAP182	4	8	RESISTENTE	16	>64	RESISTENTE
	4	8		16	>64	
AAP183	1	2	RESISTENTE	1	4	SUSCETÍVEL
	1	2		1	4	
AAP186	1	2	RESISTENTE	1	2	SUSCETÍVEL
	1	2		1	2	
AAP187	2	>16	RESISTENTE	1	>64	RESISTENTE
	2	>16		1	>64	
AAP188	0,5	1	RESISTENTE	8	>64	RESISTENTE
	0,5	1		8	64	
AAP189	0,5	2	RESISTENTE	16	64	RESISTENTE
	0,5	2		16	64	
AAP190	1	2	RESISTENTE	2	4	SUSCETÍVEL
	1	2		2	4	
			DOSE			DOSE
AAP191	1	1	RESISTENTE	8	32	DEPENDENTE
	1	1		8	32	
			DOSE			
AAP192	ND	0,25	DEPENDENTE	>64	>64	RESISTENTE
	ND	0,25		>64	>64	
AAP193	4	8	RESISTENTE	16	64	RESISTENTE
	4	8		16	64	
AAP194	4	8	RESISTENTE	16	64	RESISTENTE

	4	8		16	64	
						DOSE
AAP195	4	8	RESISTENTE	16	16	DEPENDENTE
	4	8		16	16	
AAP196	0,5	2	RESISTENTE	8	8	SUSCETÍVEL
	0,5	2		8	8	
AAP197	4	8	RESISTENTE	16	64	RESISTENTE
	4	8		16	64	
						DOSE
AAP199	0,125	1	RESISTENTE	8	16	DEPENDENTE
	0,125	1		8	16	
AAP208	8	8	RESISTENTE	32	>64	RESISTENTE
	8	8		32	>64	
AAP212	4	>16	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	ND	>16		32	64	
AAP214	4	8	RESISTENTE	16	64	RESISTENTE
	4	8		16	64	
						DOSE
AAP215	1	2	RESISTENTE	8	16	DEPENDENTE
	1	2		8	16	
AAP216	2	4	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	2	4		32	64	
			DOSE			DOSE
AAP218	0,5	0,5	DEPENDENTE	4	16	DEPENDENTE
	0,5	0,5		4	16	
AAP219	1	2	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	1	2		32	64	
			DOSE			
AAP223	0,5	0,5	DEPENDENTE	8	8	SUSCETÍVEL
	ND	0,5		8	8	
AAP230	ND	2	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	ND	2		32	64	
						DOSE
AAP232	8	8	RESISTENTE	8	16	DEPENDENTE
	8	8		8	16	
						DOSE
AAP235	2	8	RESISTENTE	4	16	DEPENDENTE
	2	8		4	16	
AAP248	2	2	RESISTENTE	ND	8	SUSCETÍVEL
	2	2		ND	8	
AAP249	2	2	RESISTENTE	4	64	RESISTENTE
	2	2		4	64	
AAP250	4	8	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	4	8		32	64	
AAP251	8	8	RESISTENTE	4	8	SUSCETÍVEL
	8	8		4	8	

AAP253	2	4	RESISTENTE	32	>64	RESISTENTE
	2	4		32	>64	
AAP263	8	8	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	8	8		32	64	
AAP282	2	4	RESISTENTE	16	64	RESISTENTE
	2	4		16	64	
AAP285	4	8	RESISTENTE	4	8	SUSCETÍVEL
	4	8		4	8	
AAP291	2	2	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	2	2		32	64	
AAP292	ND	8	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	ND	8		32	64	
AAP299	2	4	RESISTENTE	64	>64	RESISTENTE
	2	4		64	>64	
AAP307	2	4	RESISTENTE	16	32	DOSE DEPENDENTE
	2	4		16	32	
AAP308	4	8	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	4	8		32	64	
AAP309	8	8	RESISTENTE	32	32	DOSE DEPENDENTE
	8	8		32	32	
AAP310	ND	1	RESISTENTE	4	4	SUSCETÍVEL
	ND	1		4	4	
AAP311	4	8	RESISTENTE	16	32	DOSE DEPENDENTE
	4	8		16	32	
AAP315	2	4	RESISTENTE	16	64	RESISTENTE
	2	4		16	64	
AAP316	ND	8	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	ND	8		32	64	
AAP317	4	8	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	8	8		32	64	
AAP318	0,5	1	RESISTENTE	4	8	SUSCETÍVEL
	0,5	1		4	8	
AAP320	ND	8	RESISTENTE	32	>64	RESISTENTE
	ND	8		32	>64	
AAP321	4	8	RESISTENTE	8	8	SUSCETÍVEL
	8	8		8	8	
AAP322	8	4	RESISTENTE	16	32	DOSE DEPENDENTE
	ND	ND		16	32	
AAP324	4	8	RESISTENTE	16	32	DOSE DEPENDENTE
	4	8		16	32	

AAP325	4	8	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	4	8		32	64	
AAP326	4	8	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	4	8		32	64	
AAP328	ND	4	RESISTENTE	>64	>64	RESISTENTE
	ND	4		>64	>64	
			DOSE			
AAP330	0,5	0,5	DEPENDENTE	8	8	SUSCETÍVEL
	0,5	0,5		8	8	
AAP340	1	1	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	1	1		32	64	
AAP342	4	8	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	4	8		32	64	
			DOSE			
AAP344	0,5	0,5	DEPENDENTE	8	8	SUSCETÍVEL
	0,5	0,5		8	8	
AAP346	8	8	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	8	8		32	64	
			DOSE			
AAP347	4	8	RESISTENTE	4	16	DEPENDENTE
	4	8		4	16	
			DOSE			
AAP349	2	4	RESISTENTE	8	32	DEPENDENTE
	ND	ND		8	16	
AAP351	1	2	RESISTENTE	8	8	SUSCETÍVEL
	1	2		8	8	
			DOSE			
AAP357	2	2	RESISTENTE	16	32	DEPENDENTE
	2	2		16	32	
			DOSE			
AAP358	1	1	RESISTENTE	16	16	DEPENDENTE
	1	1		16	16	
AAP359	ND	2	RESISTENTE	32	>64	RESISTENTE
	ND	2		32	>64	
			DOSE			
AAP360	2	4	RESISTENTE	16	32	DEPENDENTE
	2	4		16	32	
AAP361	1	1	RESISTENTE	8	8	SUSCETÍVEL
	1	1		8	8	
AAP362	1	2	RESISTENTE	16	64	RESISTENTE
	1	2		16	64	
AAP367	1	2	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	1	2		32	64	
			DOSE			
AAP371	1	2	RESISTENTE	16	32	DEPENDENTE
	1	2		16	32	

AAP373	4	8	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	4	8		32	64	
AAP374	2	4	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	2	4		32	64	
AAP375	ND	2	RESISTENTE	ND	4	SUSCETÍVEL
	ND	2		ND	4	
AAP377	2	4	RESISTENTE	16	32	DOSE DEPENDENTE
	2	4		16	32	
AAP389	1	2	RESISTENTE	16	>64	RESISTENTE
	1	2		16	>64	
AAP390	4	8	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	4	8		32	64	
AAP392	2	2	RESISTENTE	>64	>64	RESISTENTE
	2	2		>64	>64	
AAP395	8	8	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	8	8		32	64	
AAP396	4	8	RESISTENTE	64	>64	RESISTENTE
	4	8		64	>64	
AAP399	ND	2	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	ND	2		32	64	
AAP402	0,5	2	RESISTENTE	0,5	1	SUSCETÍVEL
	ND	ND		0,5	1	
AAP403	2	4	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	2	8		32	64	
AAP411	4	4	RESISTENTE	16	64	RESISTENTE
	ND	ND		16	64	
AAP422	2	4	RESISTENTE	32	32	DOSE DEPENDENTE
	2	4		32	32	
AAP434	1	1	RESISTENTE	8	32	DOSE DEPENDENTE
	1	1		8	32	
AAP435	4	8	RESISTENTE	8	64	RESISTENTE
	4	8		8	>64	
AAP440	1	2	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	1	2		32	64	
AAP446	2	4	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	2	4		32	64	
AAP447	4	8	RESISTENTE	16	64	RESISTENTE
	4	8		16	64	
AAP449	0,5	1	RESISTENTE	4	16	DOSE DEPENDENTE
	0,5	1		4	16	
AAP453	4	4	RESISTENTE	32	>64	RESISTENTE
	4	4		32	>64	

AAP457	8 8	8 8	RESISTENTE	32 32	64 64	RESISTENTE
AAP459	1 1	2 2	RESISTENTE	8 16	16 16	DOSE DEPENDENTE
AAP461	1 1	>16 >16	RESISTENTE	8 8	64 64	RESISTENTE
AAP462	ND ND	0,5 0,5	DOSE DEPENDENTE	8 8	32 32	DOSE DEPENDENTE
AAP463	<0,03 <0,03	0,5 0,5	DOSE DEPENDENTE	>64 >64	>64 >64	RESISTENTE
AAP464	2 2	4 4	RESISTENTE	32 32	64 64	RESISTENTE
AAP465	2 2	4 4	RESISTENTE	32 32	>64 >64	RESISTENTE
AAP469	ND ND	2 2	RESISTENTE	16 16	64 64	RESISTENTE
AAP473	0,5 0,5	0,5 0,5	DOSE DEPENDENTE	8 8	16 16	DOSE DEPENDENTE
AAP481	ND ND	8 8	RESISTENTE	32 32	64 64	RESISTENTE
AAP486	ND ND	0,25 0,25	DOSE DEPENDENTE	2 2	4 4	SUSCETÍVEL
AAP487	2 2	2 2	RESISTENTE	8 8	8 8	SUSCETÍVEL
AAP488	ND ND	1 1	RESISTENTE	4 4	16 16	DOSE DEPENDENTE
AAP489	0,5 0,5	>16 >16	RESISTENTE	ND ND	16 16	DOSE DEPENDENTE
AAP490	0,5 0,5	0,5 0,5	DOSE DEPENDENTE	ND ND	4 4	SUSCETÍVEL
AAP495	1 1	2 2	RESISTENTE	16 16	16 16	DOSE DEPENDENTE
AAP496	2 2	2 2	RESISTENTE	8 8	16 16	DOSE DEPENDENTE
AAP497	1 2	2 2	RESISTENTE	16 16	64 64	RESISTENTE
AAP499	8	8	RESISTENTE	16	32	DOSE

						DEPENDENTE
	8	8		16	32	
AAP505	0,5	1	RESISTENTE	ND	32	DOSE DEPENDENTE
	0,5	1		ND	32	
AAP506	0,25	0,5	DOSE DEPENDENTE	2	8	SUSCETÍVEL
	0,25	0,5		4	8	
AAP515	1	1	RESISTENTE	ND	2	SUSCETÍVEL
	1	1		ND	16	
AAP529	2	4	RESISTENTE	8	64	RESISTENTE
	2	4		8	64	
AAP530	0,06	0,125	SUSCETÍVEL	4	8	SUSCETÍVEL
	0,06	0,125		4	8	
AAP533	1	2	RESISTENTE	8	8	SUSCETÍVEL
	1	2		8	8	
AAP537	2	2	RESISTENTE	32	64	RESISTENTE
	2	2		32	64	

ND: Não determinado

7. ANEXO

7.1. Anexo A - Código genético como resultado de sequenciamento de leveduras

Levedura AAP035 - *Torulaspora pretoriensis*

AAGTAAC TT

TGGGGCTGGTCCTTGTCTATGTTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGA
GAATCCCGTGTGGCGAGGATCCCAGTTCTTTGTAAAGTGCTTTCGAAGAGT
CGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGC
TAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGA
AAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAA
GGGCATTTGATCAGACATGGTGTTTTGCGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTGGG
GGAATCTCGCAGCTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGCGGCAGGATAAATC
TGCAGGAATGTGGCTTGCTTCGGTAAGTGTTATAGCCTGTATAAATACTGC
CAGCTGGGACTGAGGACTGCGACTTTTAGTCAAGGATGCT

Levedura AAP194 – *Candida palmioleophila*

TCAAATTTGAAATCTGGCACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGG
TAACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGA
GGGTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTTCG
AAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATC
TAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAA
AGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAA
AGGGAAGGGTATGAGATCAGACTTGGTGTTTTGCAACCTTACTCTCGGGTG
GGCCCCCTGCAGTTCATCGGGCCAGCATCAGTTTGGATGGTAGGATAATGG
CATTGGAATGTAGCTTGGCTTCGGTTAAGTGTTATAGCCTTTGTTGATACT
GCCTGTCTAGACTGAGGACTGCGTCTTTGACTAGGATGCTGGCATAATGAT
CCTATACCGCCCGTCT

Levedura AAP196 – *Candida palmioleophila*

CGGCAAAGAAATTTGAAATCTGGCACCTTCGGTGTCCATTGTAAATTTGAAGAAGGTA
ACCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGG
GTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTTCGAA
GAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTA
AAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAG

ATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAG
 GGAAGGGTATGAGATCAGACTTGGTGTGTTTGCAACCTTACTCTCGGGTGGG
 GCCCCTGCAGTTCATCGGGCCAGCATCAGTTTGGATGGTAGGATAATGGCA
 TTGGAATGTAGCTTGGCTTCGTTAAGTGTTATAGCCTTTGTTGATACTGC
 CTGTCTAGACTGAGGACTGCGTCTTTGACTAGGATGCTGGCATAATGATCC
 TATACCGCCCGTCTTGAACACGGACCA

Levedura AAP199 – *Candida palmioleophila*

AAAGCTCAC

ATTTGAATCTGGCACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTAAC
 CTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGT
 GAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTCGAAGA
 GTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAA
 GCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGAT
 GAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGG
 AAGGGTATGAGATCAGACTTGGTGTGTTTGCAACCTTACTCTCGGGTGGGGC
 CCCTGCAGTTCATCGGGCCAGCATCAGTTTGGATGGTAGGATAATGGCATT
 GGAATGTAGCTTGGCTTCGGTTAAGTGTTATAGCCTTTGTTGATACTGCCT
 GTCTAGACTGAGGACTGCGTCTTTGACTAGGATGCTGGCATAATGATCCTA
 TACCGCCCGTC

Levedura AAP 322 – *Candida palmioleophila*

GAGTGAAGCGGCAAGCTCAAAT

TTGAAATCTGGCACCTTCGGTGTCCTTTGTAATTTGAAGAAGGTAACCT
 TGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTGA
 GAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTCGAAGAGT
 CGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGC
 TAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGA
 AAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAA
 GGGTATGAGATCAGACTTGGTGTGTTTGCAACCTTACTCTCGGGTGGGGCCC
 CTGCAGTTCATCGGGCCAGCATCAGTTTGGATGGTAGGATAATGGCATTGG
 AATGTAGCTTGGCTTCGGTTAAGTGTTATAGCCTTTGTTGATACTGCCTGT
 CTAGACTGAGGACTGCGTCTTTGACTAGGATGCTGGCATAATGATCCTATA
 CCGCCCGTCTT

Levedura AAP 358 – *Candida palmioleophila*

CGGC^{AA}AGCTCAA^A

TTTGAAATCTGGCACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTAACC
 TTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTG
 AGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTCGAAGAG
 TCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAG
 CTAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATG
 AAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGA
 AGGGTATGAGATCAGACTTGGTGTTTTGCAACCTTACTCTCGGGTGGGGCC
 CCTGCAGTTCATCGGGCCAGCATCAGTTTGGATGGTAGGATAATGGCATTG
 GAATGTAGCTTGGCTTCGGTTAAGTGTTATAGCCTTTGTTGATACTGCCTG
 TCTAGACTGAGGACTGCGTCTTTGACTAGGATGCTGGCATAATGATCCTAT
 ACCGCCCGTCT^T

Levedura AAP 361 – *Candida palmioleophila*

GAGTGAAGCGG^{CA}AAAAGCTCAA^A

TTTGAAATCTGGCACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTAACC
 TTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTG
 AGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTCGAAGAG
 TCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAG
 CTAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATG
 AAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGA
 AGGGTATGAGATCAGACTTGGTGTTTTGCAACCTTACTCTCGGGTGGGGCC
 CCTGCAGTTCATCGGGCCAGCATCAGTTTGGATGGTAGGATAATGGCATTG
 GAATGTAGCTTGGCTTCGGTTAAGTGTTATAGCCTTTGTTGATACTGCCTG
 TCTAGACTGAGGACTGCGTCTTTGACTAGGATGCTGGCATAATGATCCTAT
 ACCGCCCGT^T

Levedura AAP 374 – *Candida palmioleophila*

CCTTCGGTGTCC^{CT}TTAG^{AA}TTGA^{AG}TAAGGTAA

CCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGG
 GTGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTCGAA
 GAGTCAAGTTGTTTGGGAATCGAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTA
 AAGCTAAATATTGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAG
 ATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGTAATTGTTGAAAG

GGAAGG GTATGAGATC ATACTTGGTGT TTTGCAACCTTACTCTCGGGTGGG
 GCCCCTGCAGTTCATCGGGCCAGCATCAGTTTGGATGGTAGGATAATGGCA
 TTGGAATGTAGCTTGGCTTCGGTTAAGTGTTATAGCCTTTGTTGATACTGC
 CTGTCTAGACTGAAGACTGCGTCTTTGACTAGGATGCTGGCATTATGATCC
 TATACCGCCCGTCTTGAAACACGGACC

Levedura AAP 392 – *Candida palmioleophila*

GCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAA
 TTTGAAATCTGGCACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTAACC
 TTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTG
 AGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTCGAAGAG
 TCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAG
 CTAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATG
 AAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGA
 AGGGTATGAGATCAGACTTGGTGTTTTGCAACCTTACTCTCGGGTGGGGCC
 CCTGCAGTTCATCGGGCCAGCATCAGTTTGGATGGTAGGATAATGGCATTG
 GAATGTAGCTTGGCTTCGGTTAAGTGTTATAGCCTTTGTTGATACTGCCTG
 TCTAGACTGAGGACTGCGTCTTTGACTAGGATGCTGGCATAATGATCCTAT
 ACCGCCC GTCT

Levedura AAP 395 – *Candida palmioleophila*

GCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAA
 TTGAAATCTGGCACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTAACCT
 TGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTGA
 GAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTCGAAGAGT
 CGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGC
 TAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGA
 AAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAA
 GGGTATGAGATCAGACTTGGTGTTTTGCAACCTTACTCTCGGGTGGGGCCC
 CTGCAGTTCATCGGGCCAGCATCAGTTTGGATGGTAGGATAATGGCATTGG
 AATGTAGCTTGGCTTCGGTTAAGTGTTATAGCCTTTGTTGATACTGCCTGT
 CTAGACTGAGGACTGCGTCTTTGACTAGGATGCTGGCATAATGATCCTATA
 CCGCCC GTCT

Levedura AAP 495 – *Candida palmioleophila*

GAGTGAAGCGGCAAAAGCTCA

AATTTGAAATCTGGCACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTAA
 CCTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGG
 TGAGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTTGAAG
 AGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAA
 AGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGA
 TGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGG
 GAAGGGTATGAGATCAGACTTGGTGTGTTTGC AACCTTACTCTCGGGTGGGG
 CCCCTGCAGTTCATCGGGCCAGCATCAGTTTGGATGGTAGGATAATGGCAT
 TGGAATGTAGCTTGGCTTCGGTTAAGTGTTATAGCCTTTGTTGATACTGCC
 TGTCTAGACTGAGGACTGCGTCTTTGACTAGATGCTGGCATAATGATCCT
 ATACCGCCCGTCTTGA

Levedura AAP 515 – *Candida palmioleophila*

GGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAAT

TTGAAATCTGGCACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGTAACT
 TGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTGA
 GAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTTGAAGAGT
 CGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGC
 TAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGA
 AAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAA
 GGGTATGAGATCAGACTTGGTGTGTTTGC AACCTTACTCTCGGGTGGGGCCC
 CTGCAGTTCATCGGGCCAGCATCAGTTTGGATGGTAGGATAATGGCATTGG
 AATGTAGCTTGGCTTCGGTTAAGTGTTATAGCCTTTGTTGATACTGCCTGT
 CTAGACTGAGGACTGCGTCTTTGACTAGGATGCTGGCATAATGATCCTATA
 CCGCCCGTC

Levedura AAP 533 – *Candida palmioleophila*

CACCTTCGGTGTCCTCAGTTGTAATTTGAAGAAGGTAACC

TTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTG
 AGAATCCCGTGCGATGAGATGCCCAATTCTATGTAAGGTGCTTTTGAAGAG
 TCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAG
 CTAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATG
 AAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGA
 AGGGTATGAGATCAGACTTGGTGTGTTTGC AACCTTACTCTCGGGTGGGGCC

CCTGCAGTTCATCGGGCCAGCATCAGTTTGGATGGTAGGATAATGGCATTG
GAATGTAGCTTGGCTTCGGTTAAGTGTTATAGCCTTTGTTGATACTGCCTG
TCTAGACTGAGGACTGCGTCTTTGACTAGGATGCTGGCATAATGATCCTAT
ACCGCCCGTCTT