

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE ÁGUA  
SUBTERRÂNEA PARA CONSUMO HUMANO**

**MELINA HATSUE SASAKI**

**DOURADOS MS  
2017**

MELINA HATSUE SASAKI

CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE ÁGUA  
SUBTERRÂNEA PARA CONSUMO HUMANO

Área do CNPq: Microbiologia aplicada

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Doenças Crônicas e Infecto-Parasitárias

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kelly Mari Pires de Oliveira

DOURADOS MS  
2017

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

S252c Sasaki, Melina Hatsue

Caracterização de leveduras isoladas de água subterrânea para o consumo humano em Mato Grosso do Sul / Melina Hatsue Sasaki -- Dourados: UFGD, 2017.

50 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Kelly Mari Pires de Oliveira

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Candida. 2. Poços de água. 3. Microbiologia da água. 4. Antifúngicos. 5. Biofilmes. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR MELINA HATSUE SASAKI, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "DOENÇAS CRÔNICAS E INFECTO-PARASITÁRIAS", REALIZADA NO DIA 21 DE AGOSTO DE 2017.

Ao vigésimo primeiro dia do mês de agosto do ano de dois mil e dezessete (21/08/2017), às 8h, em sessão pública, realizou-se, no Auditório da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "**Caracterização de leveduras isoladas de água subterrânea.**" apresentada pela mestranda MELINA HATSUE SASAKI, do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos professores **Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira** (Presidente/orientador), **Dra. Melyssa Fernanda Norman Negri Grassi** (membro titular/externo) e **Dra. Rosangela da Costa Lima** (membro titular/interno). Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer à candidata e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após a candidata ter apresentado a sua Dissertação, no tempo previsto de 20 até 30 minutos, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa do candidato, no tempo previsto de até 240 minutos. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou ao julgamento, tendo sido a candidata considerada **APROVADA**, fazendo jus ao título de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 21 de agosto de 2017.

Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira

*Kelly Pires de Oliveira*

Dra. Melyssa Fernanda Norman Negri Grassi

*Melyssa Grassi*

Dra. Rosangela da Costa Lima

*Rosangela Lima*

ATA HOMOLOGADA EM: \_\_/\_\_/\_\_, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFGD.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me permitido chegar até aqui, e por toda a força concedida na concretização dessa etapa da vida. Agradeço a Ele por todas as pessoas que cruzaram meu caminho e que estão aqui citadas.

À Professora Doutora Kelly Mari Pires de Oliveira, agradeço, primeira por ter aceito me orientar, sem ao menos me conhecer, e por ter acreditado que eu era capaz, pela confiança e pelos conselhos e ensinamentos, orientações, palavras de incentivo, puxões de orelha, paciência e dedicação.

Aos meus pais, Dalva e Susumu, minhas bases, por tanto amor, por tudo que sou, por cada oração, por terem me proporcionado educação e sempre me estimularem a continuar.

Aos meus irmãos, Ronaldo e Massao, por me apoiarem e me ajudar!

Aos amigos de grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia Aplicada, que de forma direta ou indireta, contribuíram ou auxiliaram na elaboração do presente estudo, pela paciência, atenção e força: Danny, Stephanie, Fernanda, Andressa, Nayara, Allan, Jhon, Pamella, Vagner, Thaianne, Ana Caroline, Isabelle, Karina, Daiane, Bianca Boni, Helene, Pâmela e Pedro.

As doutorandas Adriana, Fabiana e Renata, que tanto me ensinaram e ajudaram! Em especial para Dri por toda paciência, ensinamentos e apoio nos meus experimentos!

Ao Doutor Bruno pelo auxílio e apoio nos experimentos moleculares.

A Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul – FUNDECT/CAPEL, pela concessão da bolsa de mestrado.

**O meu muito obrigada a todos!**

*“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.”*

Charles Chaplin

*“Da mesma forma que a água cria condições para a vida, a vida mantém as possibilidades de continuidade de existência de água na Terra.”*

Mário Wrege

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 .....	13
----------------	----

# CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE ÁGUA SUBTERRÂNEA PARA CONSUMO HUMANO

## RESUMO

A água é um bem essencial e indispensável para a vida, e deve estar livre de contaminantes para assegurar a sua qualidade, a fim de evitar a contaminação por microrganismos patogênicos que podem levar a doenças de veiculação hídrica. A presença de leveduras em água subterrânea já foi relatada, principalmente do gênero *Candida*. Tal gênero tem aumentado a incidência de infecções, podendo conferir resistência aos antimicrobianos. O objetivo foi isolar, identificar leveduras de água subterrânea para consumo humano; avaliar a susceptibilidade antifúngica e ao hipoclorito de cálcio; avaliar a capacidade de formação de biofilme de leveduras do gênero *Candida*. A coleta da água subterrânea foi realizada em 82 poços, o isolamento das leveduras foi realizado pela técnica da membrana filtrante em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e identificados pela amplificação por PCR da região ITS universal do DNA ribossomal. Os isolados de *Candida* spp foram submetidos ao teste de susceptibilidade ao hipoclorito de cálcio e aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol por microdiluição em caldo, e foi avaliada a capacidade de formação de biofilme. Por sequenciamento foram identificados 10 gêneros de leveduras: *Candida* spp., *Meyerozyma* spp., *Exophiala* spp., *Pichia* spp., *Clavispora* sp., *Hanseniaspora* sp., *Kazachstania* sp., *Kodamaea* sp., *Rhodospiridium* sp. e *Rhodotorula* sp. O hipoclorito de cálcio não foi capaz de inibir o crescimento dos isolados na concentração de 20 mg/L. Quatro isolados apresentaram resistência aos antifúngicos, sendo *C. glabrata* e *C. tropicalis* resistentes ao itraconazol e dose dependente para fluconazol, *C. parapsilosis* resistente ao fluconazol e *C. tropicalis* ao voriconazol. Todos os isolados foram sensíveis para anfotericina B. 20 isolados foram capazes de formar biofilme. Neste estudo foram isoladas leveduras do gênero *Candida* capazes de formar biofilme e resistente aos antifúngicos azóis, podendo assim, se agregar no encanamento das residências e ser uma fonte constante de contaminação do ambiente doméstico, como eletrodomésticos, alimentos e seres humanos que fazem uso dessa água. Vale ressaltar, que leveduras resistentes aos antifúngicos não é algo relacionado estritamente à clínica médica, podendo ser observado no meio ambiente como na água subterrânea. Dessa forma, sua presença leva a uma preocupação em relação à qualidade da água para consumo humano e discussão de seus critérios de potabilidade.

**Palavras-chave:** *Candida*; poços de água; microbiologia da água; antifúngicos; biofilmes.

# CHARACTERIZATION OF ISOLATED YEASTS OF GROUNDWATER ON DRINKING WATER

## ABSTRACT

Water is an essential and indispensable for life and must be free of contaminants to ensure its quality in order to avoid contamination by pathogenic microorganisms that can lead to waterborne diseases. The presence of yeasts in groundwater has been reported, mainly from the genus *Candida*. Such a genus has increased the incidence of infections and may confer antimicrobial resistance. The aim was to isolate and identify groundwater yeasts for human consumption, evaluate the susceptibility to antifungal and the biofilm formation capacity of yeasts of the genus *Candida*. The collection of groundwater was carried out in 82 wells and the isolation of the yeasts performed by filter membrane in Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol and identified by PCR amplification of the universal ITS region of the ribosomal DNA. *Candida* spp isolates were tested for susceptibility to calcium hypochlorite and to antifungal agents amphotericin B, fluconazole, itraconazole and voriconazole by microdilution in broth, and the biofilm formation was evaluated. Ten genus of yeasts were identified by sequencing: *Candida* spp., *Meyerozyma* spp., *Exophiala* spp. *Pichia* spp., *Clavispora* sp., *Hanseniaspora* sp., *Kazachstania* sp., *Kodamaea* sp., *Rhodospiridium* sp. and *Rhodotorula* sp. Calcium hypochlorite was not able to inhibit the growth of the isolates at a concentration of 20 mg / L. Four isolates showed resistance to antifungals, *C. glabrata* and *C. tropicalis* resistant to itraconazole and a dose dependent for fluconazole, *C. parapsilosis* resistant to fluconazole and *C. tropicalis* to voriconazole. All isolates were sensitive to amphotericin B. 20 isolates were able to form biofilm. In this study, yeasts of the genus *Candida* were capable of forming a biofilm and resistant to azole antifungals, and thus can aggregate in household plumbing and be a constant source of contamination of the domestic environment, such as appliances, food and human beings that make use of this water. It is worth pointing out, that yeasts resistant to antifungal agents are not strictly related to medical practice, but can be observed in the environment as well as in groundwater. In this way, their presence leads to a concern regarding the quality of water for human consumption and discussion of their drinking criteria.

**Keywords:** *Candida*; waters wells; water microbiology; antifungal agents; biofilms

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. Água subterrânea	13
2.2. Leveduras isoladas em água	16
2.3. Biofilmes	20
2.4. Antifúngicos	19
3. OBJETIVOS	22
GERAL	22
ESPECÍFICOS	22
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
5. APÊNDICES	33
Artigo: Revista <i>International Journal of Hygiene and Environmental Health</i> (A2 / 4.463)	33

## 1. INTRODUÇÃO

A água é uma necessidade básica de qualquer ser vivo, independentemente de sua utilização. Existem padrões internacionais e nacionais responsáveis pelo controle da potabilidade e qualidade da água, sendo estabelecidos padrões físico-químicos e microbiológicos, de acordo com sua utilização, garantindo assim a promoção da qualidade de vida da população (BRASIL, 2005; WHO, 2011; WHO, 2013). A potabilidade da água está relacionada com a ausência de bactérias da espécie *Escherichia coli*, e desta forma, a presença de fungos filamentosos e leveduras não são avaliados na qualidade da água, apesar de serem considerados como possíveis patógenos da água (KANZLER et al., 2007; HAGESKAL et al., 2009; BRASIL, 2011).

As leveduras estão presentes em diversos ambientes aquáticos, como nascentes, águas mineral, águas de superfície, águas subterrâneas, rios, lagos, mar, água encanada e esgoto (GÖTTLICH et al., 2002; LOUREIRO et al., 2005; PEREIRA et al., 2009; PEREIRA et al., 2010; ISHIDA et al., 2013; SILVA-BEDOYA et al., 2014; BABIČ et al., 2016; KARIMI; HASSANSHAHIAN, 2016). Os gêneros *Candida* spp., *Rhodotorula* spp., *Cryptococcus* spp., *Kloeckera* spp. e *Aureobasidium pullulans* já foram isolados de água para consumo humano (KANZLER et al., 2007; PEREIRA et al., 2010; AYANBIMPE et al., 2012; LATERGAN et al., 2012; BABIČ et al., 2016). Devido à evidência de distintas espécies de leveduras estarem presentes em água doce potável e água contaminada, elas tornam-se um indicador ambiental de qualidade, uma vez que em águas poluídas há uma maior prevalência das mesmas (WOOLLET; HEDRICK, 1970; MEDEIROS et al., 2008; ).

A identificação e a caracterização de leveduras de água em diferentes ambientes já foram descritas, no entanto, dados destas em águas subterrâneas carecem de mais informações. Assim há uma demanda de pesquisas relacionada à presença de leveduras em águas subterrâneas, visto que esta água é utilizada para consumo direto, sem tratamento. Além disso, quando presentes na água, diferentes microrganismos são capazes de se agrupar e formar biofilme, inclusive nas tubulações de água na distribuição ou nas residências, tendo em vista que em toda superfície em contato com água não esterilizada esta susceptível ao desenvolvimento de biofilmes (WINGENDER; FLEMMING, 2011). O biofilme é a forma natural de crescimento dos fungos, além de ser a principal causa de infecções e estar

relacionado com a virulência do microrganismo, sendo definido como a organização das colônias em uma matriz extracelular (WINGENDER; FLEMMING, 2011; ARAÚJO et al., 2017).. Assim, tornam-se uma fonte constante de contaminação da água e até mesmo alimentos, podendo ocasionar em danos ao consumidor, sendo, então necessária a busca destas no ambiente aquático subterrâneo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Água subterrânea

A água subterrânea é proveniente da infiltração por gravidade no solo pelas falhas nas rochas, a qual é armazenada e transmitida através dos aquíferos, sendo classificados em livres ou confinados. O livre corresponde à zona saturada, está sob a ação da gravidade e pressão atmosférica, já o confinado é relativamente impermeável, estando sob uma pressão maior que a atmosférica (ABAS, 2012).

Catorze por cento da água doce do planeta é água subterrânea, no entanto, nem toda a água contida nos aquíferos está própria para o consumo, pois sua potabilidade depende da profundidade, segurança de acesso, qualidade e custo de exploração ou extração (ABAS, 2012). Em diversos continentes, como América, Europa, Ásia, África e Oceania, a água subterrânea é utilizada para o abastecimento de cerca de 50% da população mundial. Assim, trata-se de uma importante fonte para o consumo humano, sendo em muitos casos a única fonte disponível ou com melhor qualidade, quando comparada com a água de superfície (GROUNDWATER GOVERNANCE, 2015). Segundo Censo 2010, no Brasil, 7 931 649 domicílios são abastecidos por poços, destes, 122 274 estão no Mato Grosso do Sul (DATASUS, 2017).

A água deve ser fornecida de forma satisfatória, adequada, segura e acessível, devendo ser ausente de sabor e odor (WHO, 2011). Para tanto, deve ser tratada por diferentes processos para a remoção de poluentes, sendo estes: coagulação, floculação, sedimentação, filtração, desinfecção e fluoretação (SORLINI et al., 2014; AHMAD et al., 2016). Para a desinfecção da água, podem ser utilizados diferentes métodos, como cloração, radiação, ozônio, ultravioleta e filtração por membrana, sendo a cloração o método mais utilizado (WHO, 2003).

O gás cloro, a solução hipoclorito de sódio e o sólido hipoclorito de cálcio são as formulações mais utilizadas na desinfecção da água (SU et al., 2009). O hipoclorito de sódio e hipoclorito de cálcio são capazes de promover a dissolução de tecido orgânico, e também possui atividade antimicrobiana (GARCIA-VILLANOCA et al., 2010; ALMEIDA et al., 2014).

O Ministério da Saúde recomenda a utilização de hipoclorito de sódio 2,5% para a realização do tratamento de água para consumo humano que não pode ser filtrada ou fervida (BRASIL, 2011). Outra forma de clorar a água para o consumo humano é a utilização de hipoclorito de cálcio com 65% de cloro ativo, produto obtido da cloração da cal hidratada, com alto poder oxidante. Assim, é aplicado no tratamento de água potável e água de piscina, como sanitizantes em indústria de bebidas, assepsia de bebedouros, aviários e hospitais. A concentração deve ser em torno de 1 mg/L, tendo um teor mínimo de 0,2 mg/L (BRASIL, 2011; ALMEIDA et al., 2014).

Desta forma, com o propósito de obter água segura para a população, são criadas barreiras para prevenir sua contaminação ou reduzir esta a níveis que não sejam prejudiciais à saúde. Uma das principais preocupações são com microrganismos patogênicos, como bactérias, vírus, helmintos, protozoários (WHO, 2013). Porém não há menção de fungos filamentosos ou leveduras, estes podem ser encontrados em diferentes ambientes, como água de superfície, esgoto, água para tratamento, água poluída, água mineral e água subterrânea (HAGESKAL et al., 2009; ISHIDA et al., 2013). Assim, são poucos os estudos em relação à presença de leveduras em água subterrânea para o consumo humano como apresentado na Tabela 1, a qual demonstra as espécies e/ou gênero de leveduras que já foram isoladas de água subterrânea em diferentes países, na qual é possível observar a presença de leveduras patogênicas oportunistas.

Tabela 1 – Revisão de literatura de estudos com leveduras isoladas de água subterrânea

<b>Leveduras presentes em água subterrânea</b>	<b>Local estudado</b>	<b>Autores / Ano</b>
<i>Exophiala</i> sp. <i>Rhodotorula</i> sp.	Alemanha	GÖTTLICH et al., 2002
<i>Rhodotorula minuta</i> <i>Cryptococcus</i> spp.	Suécia	EKENDAHL et al., 2003
<i>Rhodotorula</i> sp. Leveduras não identificadas	Áustria	KANZLER et al., 2007
<i>Candida</i> sp. <i>Kloeckera</i> sp. <i>Rhodotorula</i> sp.	Portugal	PEREIRA et al., 2010
<i>Candida albicans</i> <i>Candida guilliermondii</i> <i>Candida kefyr</i> <i>Candida krusei</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Candida lusitana</i> <i>Candida stelatoidea</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Cryptococcus laurentii</i> <i>Geotrichum candidum</i> <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Nigéria	AYANBIMPE et al., 2012
<i>Candida</i> spp. <i>Cryptococcus</i> <i>Exophiala</i> <i>Rhodotorula</i> spp. <i>Sporobolomyces</i> Leveduras não identificadas	Austrália	LATEGAN et al., 2012
<i>Cryptococcus</i> sp. <i>Exophiala</i> sp. <i>Kodamaea</i> sp. <i>Malassezia</i> spp. <i>Rhodotorula</i> sp. <i>Saccharomyces</i> sp. <i>Sporobolomyces</i> spp.	Finlândia	SOHLBERG et al., 2015
<i>Candida parapsilosis</i> <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> <i>Trichosporon coremiiforme</i>	Eslovênia	BABIČ et al., 2016

A presença das leveduras em água subterrânea pode ser um indicativo de contaminação, que possivelmente ocorreu durante a perfuração do poço, bem como podem estar naturalmente presentes nesse ambiente (SOHLBERG et al., 2015). Todavia, esse fato

demonstra que esses microrganismos possuem capacidade de adaptação para sobreviver em ambientes com quantidade reduzida de nutrientes (EKENDAHL et al., 2003; SOHLBERG et al., 2015).

## **2.2. Leveduras isoladas em água**

As leveduras são microrganismos eucariotos, unicelulares, e se reproduzem de forma sexuada ou assexuada, apresentando coloração branca, vermelha ou preta, com pH ideal para o seu crescimento entre 5 e 6, e o crescimento é inibido na alcalinidade (LACAZ et al., 2002; TORTORA et al., 2012). Podem ser úteis, como quando utilizadas na indústria para a fermentação, mas também podem se apresentar como patógenos oportunistas, no qual causam infecções em imunocompetentes e imunocomprometidos, nas formas mais severas (MURRAY et al., 2009; PALUCHOWSKA et al., 2014). As leveduras são ubíqua, sendo detectada em diferentes ambientes aquáticos.

O gênero *Candida* possui mais de 100 espécies descritas e estão na microbiota endógena do indivíduo, colonizando principalmente o trato gastrointestinal do homem e animais de sangue quente, também são encontrados como comensais na vagina, uretra, pele e unhas, podendo estar presente em 20 a 80% da população adulta saudável (DIGNANI et al., 2003; MURRAY et al., 2009). É capaz de causar infecções oportunistas em indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos (BARBEDO; SGARBI, 2010). No qual, mais de 17 espécies são capazes de causar candidíase por meio de infecções superficiais ou sistêmicas, onde as sistêmicas ocorrem principalmente em indivíduos imunocomprometidos (QUEIROZ et al., 2015). Sua virulência está associada à capacidade de adesão a tecidos, dimorfismo entre as formas de leveduras e hifas, hidrofobicidade de sua superfície celular, secreção de proteínas e mudanças fenotípicas que permitem a adaptação ao ambiente (LACAZ et al., 2002; MURRAY et al., 2009; SILVA et al., 2011).

*Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout (1923) é a principal espécie deste gênero e é considerado o patógeno oportunista mais comum que acomete humanos (LACAZ et al., 2002; TAMURA et al., 2007). Entretanto, *Candida* não-*Candida albicans* tem sido responsável pelo aumento de infecções (BENNETT et al., 2004; MURRAY et al., 2009; SILVA et al., 2011), como: *C. glabrata* (H.W. Anderson) S.A. Mey. & Yarrow (1978) que apresenta tolerância a primária a fluconazol, sendo diferente das outras que desenvolvem resistência ao fluconazol após a exposição ao tratamento. *C. parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice (1932) que

pode causar candidíase superficial e sistêmica em pacientes imunocomprometidos. *C. tropicalis* (Castell.) Berkhout (1923) que causa meningite, endocardite, candidíase, pielonefrite, esofagite e vaginite. Observa-se também que tem sido isolada de animais de sangue quente (LACAZ et al., 2002). *C. palmioleophila* Nakase & Itoh (1988) que inicialmente foi identificada como *C. famata* ou *C. guilliermondii*, sendo uma espécie emergente, descrita inicialmente por Nakase *et al.* em 1988 (JENSEN; ARENDRUP, 2011).

*Clavispora lusitaniae* Rodr. Mir. (1979) é anamorfo da *C. lusitaniae* (LACAZ et al., 2002). Pode ser encontrada em frutos, solo, água e em seres humanos, porém é um patógeno raro em humanos, além de possuir propensão a desenvolver resistência a anfotericina B durante tratamento (DESNOS-OLLIVIER et al., 2011; RAMOS et al., 2011).

O gênero *Exophiala* é composto por leveduras pretas patogênicas oportunistas, ocorrendo principalmente em pacientes imunocomprometidos, havendo a hipótese de infecção por inalação, ingestão, sendo a forma mais comum por inoculação traumática (DÖĞEN et al., 2013; NAJAFZADEH et al., 2013). *E. dermatitidis* (Kano) de Hoog (1977) anteriormente conhecida como *Wangiella dermatitidis* é um fungo dermatológico encontrado no solo e em material vegetal morto em todo o mundo, e a levedura preta mais comum na rotina clínica (SUZUKI et al., 2012; RACLAVSKY et al., 2016). Porém, *E. heteromorfa* (Nannf.) de Hoog & Haase (2003) é um raro oportunista em humanos (DÖĞEN et al., 2013).

*Kodamaea ohmeri* (Etchells & T.A. Bell) Y. Yamada, Tom. Suzuki, M. Matsuda & Mikata (1995), era conhecida como *Pichia ohmeri* ou *Yamadazyma ohmeri*, e corresponde o telemorfo *Candida guilliermondii* var. *membranaefaciens*. Já foi isolada da fermentação de alimentos, casca de árvores e frutas, além de piscina e água do mar. Atualmente é reconhecido como um patógeno oportunista, principalmente em pacientes imunocomprometidos (SHANG et al., 2010; BOUREE; PIERRE, 2015; VIVAS et al., 2016).

*Rhodotorula mucilaginosa* (A. Jörg.) F.C. Harrison (1928) pertence ao gênero das leveduras vermelhas. Já foram isoladas em material biológico humano, está relacionada à infecções oportunistas, principalmente em paciente imunocomprometidos. *R.mucilaginosa* é capaz de biodegradar lindano, diazinon e pesticidas orgânicos de elevada toxicidade. Na indústria gera interesse devido à bioprodução de carotenoides e lipídios (LANZAFAME et al., 2001; EVANGELISTA, 2008; AL-OBAID et al., 2011; TSIODRAS et al., 2014; PACIA et al., 2016).

*Hanseniaspora opuntiae* (Cadez, Poot, Raspor & M.T. Sm. 2003) está presente em frutas, solos e exsudato de árvores. (JINDAMORAKOT et al., 2009). É um potencial probiótico, pois apresenta melhora na resistência a doenças (MA et al., 2013).

*Kazachstania aerobia* tem sido relatada em grãos de cevada e kefir no Brasil, além de ser a espécie predominantemente isolada em silagem de milho aerobicamente deteriorada, dando origem ao nome da espécie (LU et al., 2004; MAGALHÃES et al., 2010; OLSTORPE et al., 2010; GAROFALO et al., 2015).

*Meyerozyma caribbica* (Vaughan-Mart., Kurtzman, S.A. Mey. & E.B. O'Neill) Kurtzman & M. Suzuki (2010) conhecida anteriormente como *Pichia caribbica*, possui a habilidade de produzir etanol por fermentação alcoólica. É capaz de se aderir a outro fungo, criando assim um mecanismo de biocontrole, além da capacidade de produzir biofilme. No Brasil foi relatado estar presente no kefir (BAUTISTA-ROSALES et al., 2013; SUKPIPAT et al., 2017; WRENT et al., 2016). *Meyerozyma guilliermondii* (Wick.) Kurtzman & M. Suzuki (2010) é o anamorfo *Candida guilliermondii*, e anteriormente conhecida como *Endomycopsis guilliermondii* (1954), e depois *Pichia guilliermondii* (1966), sendo recentemente renomeada para *Meyerozyma* (2010), é amplamente encontrada no ambiente, em alimentos, principalmente nas cascas das frutas. Apresenta interesse biotecnológico devido a sua produção de vitamina B<sub>2</sub> (CORTE et al., 2015; WRENT et al., 2016).

As espécies do gênero *Pichia* possuem capacidade de fermentação facultativa e formam ésteres ao invés de álcool, em líquidos estão presentes principalmente em vinhos e cervejas (EVANGELISTA, 2008). Porém, estão correlacionadas com a deterioração de alimentos e formação de biofilme na indústria de alimentos (TOMIČIĆ et al., 2017). *Pichia fermentans* Lodder (1932) é anamorfo da *Candida lambica* sendo inicialmente isolada do solo e apresenta a capacidade de produzir 2-feniletanol (HUANG et al., 2001; SANNA et al., 2014), está presente em Kombucha, um probiótico que forma uma comunidade gelatinosa de fungos e bactérias cultivados em chá (JARRELL et al., 2000). *P. kluyveri* Bedford ex Kudryavtsev (1960) possui atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, todavia não há relatos na literatura de ser um patógeno, possui capacidade de fermentação espontânea em cacau e vinhos (CRAFACK et al., 2013; FAI et al., 2014; BATISTA et al. 2015). *P. kudriavzevii* Boidin, Pignal & Besson (1966) é sinônimo de *Issatchenkia orientalis* Kudryavtsev, 1960 e um anamorfo da *Candida krusei*. Pode ser utilizada na produção de etanol, apresentando importância na produção de vinhos, além de

possuir a habilidade de hidrolisar fitatos, sendo já isolada de alimentos fermentados e frutas, como cacau fermentado (DHALIWAL et al., 2011; LI et al., 2016; MÓNACO et al., 2016; SAMAGACI et al., 2016; GREPPI et al., 2017;). *P. manshurica* Saito (1914) anteriormente conhecida como *P. galeiformis*, sua presença está relacionada à deterioração de vinhos, podendo também estar presente nos porões, em particular nos filtros, agindo desta forma como fonte de contaminação para vinhos armazenados ou fermentados em adega (SAEZ et al., 2011)

*Rhodospordium toruloides* I. Banno (1967) é anamorfo *Rhodotorula glutinis* e pertence ao gênero das leveduras vermelhas. É capaz de produzir lipídios, podendo ser utilizado para a conversão de óleo para biodiesel, outro interesse na indústria é a produção elevada de carotenoides (FREITAS et al., 2014; DIAS et al., 2015; LING et al., 2016; SARAN et al., 2017).

### **2.3. Antifúngicos**

Os antifúngicos são drogas utilizadas para o tratamento de infecções fúngicas, e sua ação ocorre pela eliminação seletiva de patógenos fúngicos (DIXON; WALSH, 1996; NETT; ANDES, 2016). A anfotericina foi o primeiro antifúngico utilizado, desde 1958, e pode ser encontrada em duas formas, A e B. Anfotericina B apresenta maior atividade inibitória que a anfotericina A (DUTCHER, 1968; NETT; ANDES, 2016), sendo um antifúngico de amplo espectro utilizado para o tratamento da maioria das micoses fúngicas e alguns protozoários, seu modo de ação se dá a ligação ao ergosterol da membrana celular do fungo, ocorrendo assim à perda da integridade da membrana e lise da célula. Apesar disto, este antifúngico possui alto grau de toxicidade quando administrado no paciente, devendo ser utilizado na clínica médica com muito critério (DIXON; WALSH, 1996; GIROIS et al., 2006; PAPICH, 2016).

O fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol e isavuconazol são antifúngicos da classe dos triazóis, sua ação consiste na inibição das enzimas dependentes do citromo P450 envolvido na biossíntese do ergosterol. O fluconazol é a droga mais utilizada na clínica médica por causar menos efeitos colaterais, também devido a sua biodisponibilidade e tolerabilidade (THOMPSON et al., 2009). Porém, *C. glabrata*, *C. guilliermondii* e *C. rugosa* possuem sensibilidade diminuída e *C. krusei* é intrinsecamente resistente a esse antifúngico

(COLEMAN et al., 1998; NETT; ANDES, 2016). O voriconazol é a segunda geração sintética de fluconazol, sendo capaz de inibir a enzima lanosterol 1,4- $\alpha$ -desmetilase em *C. albicans* e *Aspergillus fumigatus* chegando a ser 1,6 e 160 vezes mais potente do que o fluconazol, além de inibir 2,4-metileno dihidrolanosterol de algumas leveduras e fungos filamentosos, no entanto, este antifúngico em comparação ao fluconazol apresenta mais efeitos colaterais e interações com drogas (DIXON; WALSH, 1996; CANUTO; RODERO, 2002; SARAVOLATZ et al., 2003; MCCARTY; PAPPAS, 2016). O voriconazol possui melhor ação frente a espécies de *C. glabrata* e *C. krusei*, que são resistentes ao fluconazol e ao itraconazol, desta forma, torna-se um fármaco em potencial contra a maioria dos fungos causadores de micose sistêmica (KAUFFMAN et al., 2006; COLOMBO et al., 2012). A resistência a antifúngicos azóis pode ocorrer em função de mutações no gene ERG11, responsável pela resistência de isolados clínicos de *Candida* spp. provocando uma redução da afinidade de ligação com o fármaco (BARK; ROGERS, 2006; MORIO et al., 2010; SILVA et al., 2016).

A caspofungina pertence à classe das equinocandinas, cuja ação consiste na inibição da síntese de  $\beta$ -1,3-glucanas, presentes na parede celular fúngica e ausente em mamíferos, o que torna sua ação seletiva aos fungos. Dentre as equinocandinas, além da caspofungina, existem outros dois fármacos: anidulafungina e micafungina, que são utilizados para o tratamento ou prevenção de micoses, visto que é bem tolerado e possui pouca interação com outras drogas. A caspofungina é utilizada para o tratamento de candidíase, principalmente em cepas resistentes ao fluconazol (MURRAY et al., 2009).

Outras classes de antifúngicos utilizados são antimetabólitos (flucitosina) que agem na interferência da síntese de DNA, RNA e proteínas na célula fúngica, alilaminas (terbinadina e naftifina) que possuem ação sistêmica e tópica, atuando na inibição da enzima esqualeno epoxidase, e griseofulvina que atua na inibição do crescimento fúngico, resultando na inibição da mitose, porém seu uso causa muitos efeitos colaterais (MURRAY et al., 2009).

#### **2.4. Biofilmes**

O conjunto de células microbianas aderidas à superfície ou entre si é denominado biofilme, o qual possui capacidade de realizar uma ligação inicial no local, e posteriormente uma estrutura fortemente aderida, não podendo ser removida com enxágue suave

(COSTERTON et al., 1995; SILVA et al., 2011; ARAÚJO et al., 2017). Pode ser formado em diferentes superfícies, como por exemplo, tecidos, dispositivos médicos, encanamento de indústrias e água potável, e até mesmo em sistema aquático natural (DONLAN, 2002; TORTORA et al., 2012).

A formação de biofilme ocorre por pelo menos três mecanismos: redistribuição de células unidas por motilidade superficial; pela divisão binária de células anexas; e pelo recrutamento de células do fluido a granel para o biofilme em desenvolvimento. A forma como cada mecanismo irá se aderir depende das condições em que o organismo está envolvido, da natureza da superfície a ser colonizadas e condições físicas e químicas do ambiente. Um biofilme pode demorar até 10 dias para atingir a maturidade estrutural, com base nas dimensões físicas e na comparação visual (STOODLEY et al., 2002; SILVA et al., 2011; ARAÚJO et al., 2017).

Bactérias como *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus* e *Stenotrophomonas maltophilia* possuem capacidade de formar biofilme no sistema de distribuição de água, como no encanamento de residências e hospitais (O'TOOLE; KOLTER, 1998; CASTONGUAY et al., 2006; COOPER; HANLON, 2010; DROR-EHRE et al., 2010; BUSE et al., 2014; GOMES et al., 2016). Apesar das condições ambientais não serem favoráveis, bactérias e leveduras possuem capacidade de formar biofilme no sistema de distribuição de água, além de resistirem à presença de desinfetantes (WINGENDER; FLEMMING, 2011; LIU et al., 2014; SEGHIR et al., 2017).

A ocorrência de biofilme no sistema de distribuição de água pode ser a causa de problemas de saúde pública, agindo como uma barreira para agentes antimicrobianos (LIU et al., 2014; LI et al., 2016; ARAÚJO et al., 2017, SEGHIR et al., 2017). Além disto, o biofilme no sistema de distribuição de água potável é considerado a principal fonte de microrganismos, tendo em vista que tal formação se dá principalmente na presença de água, podendo a interação de diferentes microrganismos na sua formação (WINGENDER; FLEMMING, 2011; GOMES et al., 2014).

### 3. OBJETIVOS

#### GERAL

- Caracterizar leveduras isoladas de água subterrâneas utilizadas para consumo humano.

#### ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar leveduras provenientes de água subterrânea;
- Avaliar a resistência das leveduras do gênero *Candida* ao hipoclorito de cálcio;
- Avaliar *in vitro* o perfil de susceptibilidade do gênero *Candida* aos antifúngicos;
- Avaliar a capacidade da formação de biofilme de *Candida spp*;

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Associação Brasileira de Águas Subterrâneas – ABAS. Caderno Técnico 5: Águas subterrâneas: Fontes legais e seguras de abastecimento. 2012.

AHMAD, T.; AHMAD, K.; AHAD, A.; ALAM, M.. Characterization of water treatment sludge and its reuse as coagulant. **Journal of Environmental Management**, v. 182, n.1, p. 606-611, 2016.

ALMEIDA, A.P.; SOUZA, M.A.; MIYAGAKI, D.C.; BELLO, Y.D.; CECCHIN, D.; FARINA, A.P. Comparative Evaluation of Calcium Hypochlorite and Sodium Hypochlorite Associated with Passive Ultrasonic Irrigation with *Enterococcus faecalis*: An *In Vitro* Study. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 12, p. 1953-1957, 2014.

AL-OBAID, I.; KHAN, Z.U.; AHMAD, S.; EMARA, M.; BURHAMA, M.; PUROHIT, P.; JOSEPH, L. Persistent catheter-related *Rhodotorula mucilaginosa* fungemia in a leukemic child. **Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology**, v. 21, n. 2, p. 134-137, 2011.

ARAÚJO, D.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. Portrait of *Candida* Species Biofilm Regulatory Network Genes. **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 1, 2017.

AYANBIMPE, G.M.; ABBAH, V.E.; IOR, C.A. Yeast and yeast-like fungal contaminants of water used for domestic purposes in Jos, Nigeria. **Microbiology Research**, v.3, n. e24, p. 99-102, 2012.

BABIČ, M.N.; ZALAR, P.; ŽENKOB, B.; DŽEROSKIB, S.; GUNDE-CIMERMAN, N.. Yeast and yeast-like fungi in tap water and groundwater, and their transmission to household appliances. **Fungal Ecology**, v. 20, p. 30-39, 2016.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **Jornal brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010

BARK, S.K.P.; ROGERS, D.P. Recent insights into the mechanisms of antifungal resistance. **Current Infectious Disease Reports**. v. 8, p. 449-459, 2006.

BAUTISTA-ROSALES, P.U.; CALDERON-SANTOYO, M.; SEVÍN-VILLEGAS, R.; OCHOA-ÁLVAREZ, N.A.; RAGAZZO-SÁNCHEZ, J.A.. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloesporioides* in mangoes. **Biological control**, v. 65, n. 3, p. 293-301, 2013.

BATISTA, N.N.; RAMOS, C.L.; RIBEIRO, D.D.; MARQUES, A.C.M.; SCHWAN, R.F. Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. **LWT – Food Science and Technology**, V. 63, n. 1, p.221-227, 2015.

BENNETT, J.E.; IZUMIKAWA, K.; MARR, K.A. Mechanism of increased fluconazole resistance in *Candida glabrata* during prophylaxis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, V. 48, n. 5, p. 1773-1777, 2004.

BOUREE, P.; PIERRE, A.F. *Kodamaea ohmeri*: un nouveau champignon chez les nouveau-nés. **Option/Bio**. V. 26, n. 521, p. 16-17, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. Programa Nacional de Vigilância em Saúde Ambiental relacionada à qualidade da água para consumo humano / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005. (Série C. Projetos, Programas e Relatórios).

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. DOU de 14 de dezembro de 2011.

BUSE, H.Y.; LU, J.; STRUWEING, I.T.; ASHBOLT, N.J. Preferential colonization and release of *Legionella pneumophila* from mature drinking water biofilms grown on copper versus unplasticized polyvinylchloride coupons. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, V. 217, p. 219-225, 2014.

CANUTO, Mar Masiá; RODERO, Félix Gutiérrez. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 9, 550-563, 2002.

CASTONGUAY, M.H.; SCHAAF, S. van der; KOESTER, W.; KROONEMAN, J.; MEER, W. van der; HARMSEN, H.; LANDINI, P.. Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. **Research in Microbiology**, v. 157, p. 471-478, 2006.

COLEMAN, D.C.; RINALDI, M.G.; HAYNES, K.A.; REX, J.H.; SUMMERBELL, R.C.; ANAISSIE, E.J.; LI, A.; SULLIVAN, D.J. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. **Medical Mycology**, v. 36, n. Suppl 1, p. 9-14, 1998.

COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T.; CAMARGO, L.F.A.; RICHTMANN, R.; QUEIROZ-TELLES, F.; SALLES, M.J.C. Tratamento das principais infecções causada por *Candida* spp.: relato de reuniões conjunta de três sociedades médicas. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, p. 1-43, 2012.

COOPER, I.R.; HANLON, G.W. Resistance of *Legionella pneumophila* serotype 1 biofilms to chlorine-based disinfection. **Journal of Hospital Infection**, v. 74, p. 152-159, p. 2010.

CORTE, L.; CAGNO, R.di; GROENEWALD, M.; ROSCINI, L.; COLABELLA, C.; GOBBETTI, M.; CARDINALI, G. Phenotypic and molecular diversity of *Meyerozyma guilliermondii* strains isolated from food and other environmental niches, hints for an incipient speciation. **Food microbiology**, v. 48, p. 206-215, 2015.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; KORBER, D.R.; LAPPIN-SCOTT, Hilary M. Microbial biofilms. **Annual Reviews Connect with our Experts**, v. 49, p. 711-745, 1995.

CRAFACK, M.; MIKKELSEN, M.B.; SAERENS, S.; KNUDSEN, M.; BLENNOW, A.; LOWOR; T.J.; SWIEGERS, J.H.; PETERSEN, G.B.; HEIMDAL, H.; NIELSEN, D.S. Influencing cocoa flavor using *Pichia kluyveri* and *Kluyveromyces marxianus* in a defined mixed starter culture for cocoa fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 1, p. 103-116, 2013.

DATASUS. Informações de Saúde (TABNET): Demográficas e Socioeconômicas. Saneamento – Censos 1991, 2000 e 2010. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0206&id=6947>. Acessado em 20 de fevereiro de 2017.

DESNOS-OLLIVIER, M.; MOQUET, O.; CHOUAKI, T.; GUÉRIN, A.M.; DROMER, F. Development of Echinocandin Resistance in *Clavispora lusitaniae* during Caspofungin Treatment. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 2304-2306, 2011.

DHALIWAL, S.; OBEROI, H.S.; SANDHU, S.K.; NANDA, D.; KUMAR, D.; UPPAL, S.K. Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of a newly isolated thermotolerant strain of *Pichiakudriavzevii*. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 5968-5975, 2011.

DIAS, C.; SOUZA, S.; CALDEIRA, J.; REIS, A.; SILVA, T.L.. New dual-stage pH control fed-batch cultivation strategy for the improvement of lipids and carotenoids production by the red yeast *Rhodospiridium toruloides* NCYC 921. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 309-318, 2015.

DIGNANI, M. C.; SOLOMKIN, J. S.; ANAISSIE, E. *Candida*. In: ANAISSIE, E.; MCGINNIS, M.R.; PFALLER, M. A. (eds) Medical Mycology. 1ª Edição, Churchill Livingstone, Filadélfia, p. 195-239, 2003

DIXON, D.M.; WALSH, T.J. **Chapter 76: Antifungal Agents**. In BARON, S. Medical Microbiology. 4ª ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston. 1996.

DÖĞEN, A.; ILKIT, M.; HOOG, G. Sybren de. Black yeast habitat choices and species spectrum on high altitude creosote-treated railway ties. **Fungal Biology**, v. 117, n. 10, p. 692-696, 2013.

DONLAN, R.M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.

DOUGLAS, L.J.. *Candida* biofilms and their role in infection. **TRENDS in Microbiology**, v. 11, n. 1, 2003.

DROR-EHRE, A.; ADIN, A.; MARKOVICH, G.; MAMANE, H. Control of biofilm formation in water using molecularly capped silver nanoparticles. **Water Research**, v. 44, p. 2601-2609, 2010.

DUTCHER, J.D. The Discovery and Development of Amphotericin B. **Diseases of the Chest**, v. 54 suppl. 1, 1968.

EKENDAHL, D.; O'NEILL, A.H.; THOMSSON, E.; PEDERSEN, K. Characterisation of yeast isolated from deep igneous rock aquifers of the Fennoscandian Shield. **Microbial Ecology**, v. 46, p. 416-428, 2003.

EVANGELISTA, J. Tecnologia de Alimentos. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

FAI, A.E.C.; SILVA, J.B.; ANDRADE, C.J.; BUTION, M.L.; PASTORE, G.M.. Production of prebiotic galactooligosaccharides from lactose by *Pseudozyma tsukubaensis* and *Pichia kluyveri*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 343-350, 2014.

FREITAS, C.; NIBRE, B.; GOUVEIA, L.; ROSEIRO, J.; REIS, A.; SILVA, T.L.. New at-line flow cytometric protocols for determining carotenoid content and cell viability during *Rhodospodium toruloides* NCYC 921 batch growth. **Process Biochemistry**, v.49, n. 4, p. 554-562, 2014.

GAROFALO, C.; OSIMANI, A.; MILANOVIĆ, V.; AQUILANTI, L.; FILIPPIS, F.; STELLATO, G.; MAURO, S.D.; TURCHETTI, B.; BUZZINI, P.; ERCOLINI, D.; CLEMENTI, F.. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. **Food microbiology**, v. 49, p. 123-133, 2015.

GARCIA-VILLANOVA, R.J.; LEITE, M.V.O.; HIERRO, J.M.H.; ALFAGEME, S.C.; HERNÁNDEZ, C.G. Occurrence of bromate, chlorite and chlorate in drinking waters disinfected with hypochlorite reagents. Tracing their origins. **Science of the Total Environment**, v. 4008, p. 2616-2620, 2010.

GIROIS, S.B.; CHAPUIS, F.; DECULLIER, E.; REVOL, B.G. Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections: review and meta-analysis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 25, n. 2, p. 138,149, 2006.

GREPPI, A.; SAUBADE, F.; BOTTA, C.; HUMBLLOT, C.; GUYOT, J.P.; COCOLIN, L. Potential probiotic *Pichia kudriavzevii* strains and their ability to enhance folate content of traditional cereal-based African fermented food. **Food Microbiology**, v. 62, p. 169-177, 2017.

Groundwater Governance. A Global Framework for Action. **Global Diagnostic on Groundwater Governance**. 2015.

GOMES, I.B.; SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C. An overview on the reactors to study drinking water biofilms. **Water research**, v. 62, p. 63-87, 2014.

GOMES, I.B.; SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C. The effects of sodium hypochlorite against selected drinking water-isolated bacteria in planktonic and sessile states. **Science of the Total Environment**, v. 565, p. 40-46, 2016.

GÖTTLICH, E.; LUBBE, W. van der; LANGE, B.; FIEDLER, S.; MELCHERT, I.; REIFENRAATH, M.; FLEMMING, H.C.; HOOG, S. de. Fungal flora in groundwater-derived public drinking water. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 205, p. 269-279, 2002.

HAGESKAL, G.; LIMA, N.; SKAAR, I. The study of fungi in drinking water. **Mycological Research**, v. 113, n. 2, p. 165-172, 2009.

HUANG, C.J.; LEE, S.L.; CHOU, C.C.. Production of 2-phenylethanol, a flavor ingredient, by *Pichia fermentans* L-5 under various culture conditions. **Food Research International**, v. 34, n. 4, p. 277-282, 2001.

ISHIDA, K.; UEDA-YAMAGUCHI, M.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; YAMADA-OGATTA, S. F.; NAKAMURA, C. V.; Performance of methods for identification of yeast isolated from bottled water: High prevalence of *Candida parapsilosis*. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 205-214, 2013.

JARRELL, J.; CAL, T.; BENNETT, J.W. The Kombucha Consortia of yeast and bacteria. **Mycologist**, v. 14, n. 4, p. 166-170, 2000.

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, 2011.

JINDAMORAKOT, S.; NINOMIYA, S.; LIMTONG, S.; YONGMANITICHAI, W.; TUNTIRUNGKIJ, M.; POTACHAROEN, W.; TANAKA, K.; KAWASAKI, H.; NAKASE, T.. Three new species of bipolar budding yeasts of the genus *Hanseniaspora* and its anamorph *Kloeckera* isolated in Thailand. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p.1327-1337, 2009.

KANZLER, D.; BUZINA, W.; PAULITSCH, A.; HAAS, D.; PLATZER, S.; MARTH, E.; MASCHER. Occurrence and hygienic relevance of fungi in drinking water. **Mycoses**, v. 51, n. 2, p. 165-169, 2007.

KARIMI, M.; HASSANSHAHIAN, M. Isolation and characterization of phenol degrading yeast from wastewater in the coking plant of Zarand, Kerman. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 18-24, 2016.

KAUFFMAN, C.A. Fungal infections. **Proceeding of the American Thoracic Society**, v. 3, n. 1, p. 35-40, 2006.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; ; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**: Lacaz. 9ª ed. São Paulo, Sarvier, 2002.

LANZAFAME, M.; CHECCHI, G.; PARINELLO, A.; CATTELAN, M.; TREVENZOLI Ana Maria. Rhodotorula glutinis – Related Meningitis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, n. 1, p. 410. 2001.

- LATERGAN, M.J.; TORPY, F.R.; NEWBY, S.; STEPHENSON, S.; HOSE, G.C. Fungal Diversity of Shallow Aquifers in Southeastern Australia. **Geomicrobiology Journal**, v. 29: p. 352-361, 2012.
- LI, C.; YU, J.; WANG, D.; LI, L.; YANG, X.; MA, H.; XU, Y.. Efficient removal of zinc by multi-stress-tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* A16. **Bioresource Technology**, v. 206, p. 43-49, 2016.
- LING, J.; NIP, S.; TOLEDO, R.A.; TIAN, Y.; SHIM, H.. Evaluation of specific lipid production and nutrients removal from wastewater by *Rhodospiridium toruloides* and biodiesel production from wet biomass via microwave irradiation. **Energy**, v. 108, p. 185-194, 2016.
- LIU, R.; ZHU, J.; YU, Z.; JOSHI, D.; ZHANG, H.; LIN, W.; YANG, M.. Molecular analysis of long-term biofilm formation on PVC and cast iron surfaces in drinking water distribution system. **Journal of Environmental Sciences**, v. 26, p. 865-874, 2014.
- LOUREIRO, S.T.A.; CAVALCANTI, M.A.Q.; NEVES, R.P.; PASSAVANTE, J.Z.O. Yeasts isolated from sand and sea water in beaches of Olinda, Pernambuco state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 333-337, 2005.
- LU, H.Z.; CAI, Y.; WU, Z.W.; JIA, J.H.; BAI, F.Y.. *Kazachstania aerobia* sp. nov., na ascomycetous yeast species from aerobically deteriorating corn silage. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 2431-2453, 2004.
- MA, Y.; LIU, Z.; YANG, Z.; LI, M.; LIU, J.; SONG, J.. Effects of dietary live yeast *Hanseniaspora opuntiae* C21 on the immune and disease resistance against *Vibrio splendidus* infection in juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicas*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 1, p.66-73, 2013.
- MAGALHÃES, K.T.; PEREIRA, M.A.; NICOLAU, A.; DRAGONE, G.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J.A.; SILVA, J.B.A.; SCHWAN, R.F.. Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: Evaluation of morphological and microbial variations. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 22; p. 8843-8850, 2010.
- MARTINS, J.E.C.; MELO, N.T.; HEINS-VACCARI, E.M. **Atlas de micologia médica**. São Paulo: Manole, 2005. ISBN 85-204-2060-5.
- MCCARTY, T.P.; PAPPAS, P.G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 103-124, 2016.
- MEDEIROS, A.O.; KOHLER, L.M.; HAMDAN, J.S.; MISSAGIA, B.; BARBOSA, F.A.R.; ROSA, C.A. Diversity and antifungal susceptibility of yeast from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. **Water Research**, v.42, n.14, p 3921-9, ago, 2008.
- MÓNACO, S. M. del; RODRÍGUEZ, M.E.; LOPES, C.A.. *Pichia kudriavzevii* as a representative yeast of North Patagonian winemaking terroir. **International Journal of Food Microbiology**, v. 230, p. 31-39, 2016.

MORIO, F.; LOGE, C.; BESSE, B.; HENNEQUIN, C.; PAPE, P.L.. Screening for amino acid substitutions in the *Candida albicans* Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 66, n. 4, p. 373-384, 2010.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia Médica**. 6ª edição, Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NAJAFZADEH, M.J.; DOLATABADI, S.; KEISARI, M. SARADEGHI; NASERI, A.; FENG, P.; HOOG, G.S. de. Detection and identification of opportunistic *Exophiala* species using the rolling circle amplification of ribosomal internal transcribed spacers. **Journal of Microbiological Methods**. V.94, n. 3, p. 338-342, 2013.

NAKASE, T.; ITOH, M.; SUZUKI, M.; KOMOGATA, K.; KODAMA, T. *CANDIDA PALMIOLEOPHILA* SP. NOV., A YEAST CAPABLE OF ASSIMILATING CRUDE PAL OIL, FORMERLY IDENTIFIED AS *TORULOPSIS CANDIDA*. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 34, p. 493-498, 1988.

NETT, J.E.; ANDES, D.R. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. **Infectious Disease Clinics of North America**, V. 30, n. 1, p. 51-83, 2016.

OLSTORPE, M.; SCHNÜRER, J.; PASSOTH, V.. Microbial changes during storage of moist crimped cereal barley grain under Swedish farm conditions. **Animal Feed Science and Technology**, v. 156, n. 1-2, p. 37-46, 2010.

O'TOOLE, G.; KOLTER, R.. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 449-461, 1998.

PACIA, M.Z.; PUKALSKI, J.; TURNAU, K.; BARANSKA, M.; KACZOR, A.. Lipids, hemoproteins and carotenoids in alive *Rhodotorula mucilaginosa* cells under pesticide decomposition – Raman imaging study. **Chemosphere**, v. 164, p. 1-6, 2016.

PALUCHOWSKA, P.; TOKARCZYK, M.; BOGUSZ, B.; SKIBA, I.; BUDAK, A. Molecular epidemiology of *Candida albicans* and *Candida glabrata* strains isolated from intensive care unit patients in Poland. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 4, p. 436-441, 2014.

PAPPAS, P.G.; REX, J.H.; HAMILL, R.J.; LARSEN, R.A.; POWDERLY, W.; KAUFFMAN, C.A.; HYSLOP, N.; MANGINO, J.E.; CHAPMAN, S.; HOROWITZ, H.W.; EDWARDS, J.E.; DISMUKES, W.E.; NIAID Mycoses Study Group. A Prospective Observational Study of Candidemia: Epidemiology, Therapy, and Influences on Mortality in Hospitalized Adult and Pediatric Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v.37, n.5, p. 634-643, 2003.

PAPICH, M.G. **Amphotericin B**. **Saunders Handbook of Veterinary Drugs**, 4ª edition, p. 41-43, 2016.

PEREIRA, V.J.; BASÍLIO, M.C.; FERNANDES, D.; DOMINGUES, M.; PAIVA, J.M.; BENOLIEL, M.J.; CRESPO, M.T.; ROMÃO, M.V. San. Occurrence of filamentous fungi and yeasts in three diferente drinking water sources. **Water Research**, v. 48, p. 3813-3819, 2009.

PEREIRA, V.J.; FERNANDES, D.; CARVALHO, G.; BENOLIEL, M.J.; ROMÃO, M.V.San; CRESPO, M.T.B. Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods. **Water Research**, v. 44, p. 4850-4859, 2010.

QUEIROZ, P.A.; GODOY, J. S. R.; MENDONÇA, P. S. B.; PEDROSO, R. B.; SVIDZINSKI, T. I. E.; NEGRI, M. Adhesion and biofilm formation in artificial saliva and susceptibility os yeasts isolated from chronic kidney patients undergoing haemodialysis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p.960-966, 2015.

RACLAVSKY, V.; NOVOTNY, R. *Burkholderia cepacia* selective agar can be useful for recovery of *Exophiala dermatitidis* from sputum samples of cystic fibrosis patients. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 15, n. 2, p. 19. 2016.

RAMOS, C.L.; ALMEIDA, E.G.; FREIRE, A.L.; SCHWAN, R.F.. Diversity of bacteria and yeast in the naturally fermented cotton seed and rice beverage produced by Brazilian Amerindians. **Food Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1380-1386, 2011.

SANNA, M.L.; ZARA, G.; ZARA, S.; MIGHELI, Q.; BUDRONI, M.; MANNAZZU, I. A putative phospholipase C is involved in *Pichia fermentans* dimorphic transition. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects**, v. 1840, n.1, p. 344-349, 2014.

SAEZ, J.S.; LOPES, C.A.; KIRS, V.E.; SANGARRÍN, M.. Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. **Food Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 503-509, 2011.

SAMAGACI, L.; OUATTARA, H.; NIAMKÉ, S.; LEMAIRE, M. *Pichia kudrazevii* and *Candida nitrativorans* are the most well-adapted and relevant yeast species fermenting cocoa in Agneby-Tiassa, a local Ivorian cocoa producing region. **Food Research International**, v.89, part 1, p. 773-780, 2016.

SARAN, S.; MATHUR, A.; DALAL, J.; SAXENA, R.K. Process optimization for cultivation and oil accumulation in an oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* A29. **Fuel**, v. 188, p. 324-331, 2017.

SARAVOALATZ, L. D.; JOHNSON L.B.; KAUFFMAN, C.A. Voriconazole: A new Triazole Antifungal Agent. **Clinical Infectious Disesaes**, v. 36, n. 5, p. 630-637, 2003

SEGHIR, A.; BOUCHERIT-OTMANI, Z.; SARI-BELKHARROUBI, L.; BOUCHERIT, K. Risque infectieux lié la formation des biogilms multi-espèces (*Candida* – bactéries) sur catheters vasculaires périphériques. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 27, n. 1, 2017.

SHANG, S.T.; LI, J.C.; HO, S.J.; YANG, Y.S.; CHANG, F.Y.; WANG, N.C. The emerging Life-threatening Opportunistic Fungal Pathogen *Kodamaea ohmeri*: Optimal Treatment and

Literature Review. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 43, n. 3, p. 200-206, 2010.

SILVA, D.B.S.; RODRIGUES, L.M.C.; ALMEIDA, A;A.; OLIVEIRA, K.M.P.; GRISOLIA, A.B.. Novel point mutations in the ERG11 gene in clinical isolates of azoles resistant *Candida* species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 3, p. 192-199, 2016.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R., WILLIAMS, D.W.; AZEREDO, J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 5, 2011.

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

SOHLBERG, E.; BOMBERG, M.; MIETTILINEN, H.; NYSSÖNEN, M.; SALAVIRTA, H.; VIKMAN, M.; ITÄVAARA M.. Revealing the unexplored fungal communities in deep groundwater of crystalline bedrock fracture zones in Olkiluoto, Finland. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, article 573, 2015.

SORLINI, S.; GIALDINI, F.; BIASIBETTI, M.; COLLIVIGNARELLI, C. Influence of drinking water treatments on chlorine dioxide consumption and chlorite/chlorate formation. **Water research**. V. 54, p. 44-45, 2014.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D.G.; COSTERTON, J.W. Biofilms as Complex Differentiated Communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.

SU, Y.S.; MORRISON III, D.T.; OGLE, R.A. Chemical kinetics of calcium hypochlorite decomposition in aqueous solutions. **Journal of Chemical Health & Safety**, may/june, p. 21-25, 2009.

SUKPIPAT, W.; KOMEDA, H.; PRASERTASAN, P.; ASANO, Y. Purification and characterization of xylitol dehydrogenase with L-arabitol dehydrogenase activity from the newly isolated pentose-fermenting yeast *Meyerzzyma caribbica* 5XY2. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, n. 1, p. 20-27, 2017.

SUZUKI, K.; NAKAMURA, A.; FUJIEDA, A.; NAKASE, K.; KATAYAMA, N. Pulmonary infection caused by *Exophiala dermatitidis* in a patient with multiple myeloma: A case report and a review of the literature. **Medical mycology case reports**, v. 1, n. 1, p. 95-98, 2012.

TAMURA, N.K.; NEGRI, M.F.N.; BONASSOLI, L.A.; SVIDZINSKI, T.I.E. Fatores de virulência de *Candida* spp. isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 1, p. 91-93, 2007.

THOMPSON, G.R. CADENA, J.; PATTERSON, T.F. Overview of antifungal agents. **Clinics In Chest Medicine**, v. 30, n. 2, p. 203-215, 2009.

TOMIČIĆ, R.; TOMIČIĆ, Z.; RASPOR, P. Adhesion of *Candida* spp. and *Pichia* spp. to Wooden Surface. **Food Technology & Biotechnology**, v. 55, n. 1, p. 138-142, 2017.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 10ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

TSIODRAS, S.; PAPAGEORGIOU, S.; MELETIADIS, J.; TODAS, P.; PAPPA, V.; PANAYIOTIDES, J.; KARAKITSOS, P.; ARMAGANIDIS, A.; PETRIKKOS, G. *Rhodotorula mucilaginosa* associated meningitis: A subacute entity with high mortality. Case report and review. **Medical Mycology Case Reports**, v. 6, p. 46-50, 2014.

VIVAS, R.; BELTRAN, C.; MUNERA, M.I.; TRUJILLO, M.; RESTREPO, A.; GARCÉS, C. Fungemia due to *Kodamaea ohmeri* in a Young infant and review of the literature. **Medical mycology case reports**, v. 13, p. 5-8, 2016.

WINN, W. C.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; KONEMAN, E. W.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G. **Diagnóstico Microbiológico**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008

WHO - World Health Organization. Chlorine in Drinking-water: Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. 2003.

WHO - World Health Organization. Guidelines for Drinking-water Quality. 4<sup>th</sup> ed. Geneva, 2011.

WHO - World Health Organization. Water Quality and Health Strategy: 2013 -2020. Geneva, 2013.

WINGENDER, J.; FLEMMING, H.C. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, p. 417-423, 2011.

WOOLLETT, LL; HEDRICK LR. Ecology of yeast in polluted water. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 36, n 3, p. 427-35, 1970

WRENT, P.; RIVAS, E.M.; PEINADO, J.M.; SILÓNIZ, M.I. Development of an affordable typing method for *Meyerozyma guilliermondii* using microsatellite markers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 217, p. 1-6, 2016.

## 5. APÊNDICES

**Artigo: Revista *International Journal of Hygiene and Environmental Health* (A2 / 4.463)**

**Normas da revista:** <https://www.elsevier.com/journals/international-journal-of-hygiene-and-environmental-health/1438-4639?generatepdf=true>

### **Perfil de susceptibilidade antifúngica e formação de biofilme de leveduras presentes em água subterrânea para o consumo humano**

**Melina Hatsue Sasaki<sup>1</sup>; XXX<sup>2</sup>; XXX<sup>3</sup>; XXX<sup>4</sup>; Kelly Mari Pires de Oliveira<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados.

<sup>2</sup> Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados.

<sup>3</sup> Hospital Universitário, Universidade Federal da Grande Dourados.

<sup>4</sup> Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados, e-mail: kellyoliveira@ufgd.edu.br.

#### **Resumo**

A água subterrânea é utilizada por pelo menos metade do planeta em propriedades privadas devido à facilidade de captação, no qual a potabilidade esta relacionada com a ausência de *Escherichia coli*, no entanto, leveduras não são levadas em consideração. As leveduras estão presentes em todos os ambientes, desde o hospitalar até ambientes aquáticos. Nas últimas décadas tem-se evidenciado um aumento de infecções fúngicas, principalmente por leveduras do gênero *Candida* e observa-se o aumento de microrganismos resistentes às terapias utilizadas. Este trabalho teve como objetivo isolar e identificar leveduras de água subterrânea para o consumo humano. Foram realizadas a identificação e a caracterização das leveduras isoladas, e o gênero *Candida* foram avaliadas a resistência ao cloro, a formação de biofilme e o perfil de susceptibilidade para os antifúngicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol. Um total de 50 leveduras foram isoladas de águas subterrâneas, sendo isolados 10 gêneros: *Candida* spp, *Meyerozyma* spp., *Pichia* spp., *Exophiala* spp., *Clavispora* spp., *Kodomaea* spp., *Hanseniaspora* spp., *Kazachstania* spp, *Rhodosporidium* e *Rhodotorula* spp. Os 23 isolados de *Candida* spp. não foram inibidas em 20 mg /L de cloro., e foi observado que 86,9% dos isolados de *Candida* spp. foram capazes de produzir biofilme e 17,4% apresentaram resistência aos azóis e todos os isolados foram sensíveis a anfotericina B. Devido à capacidade de formação biofilme pela maioria dos isolados, além da resistência ao cloro, produto utilizado para desinfecção de água, trata-se um problema para a população que faz uso desta água, visto que o biofilme pode ser formado no encanamento, promovendo a transmissão desses microrganismos através da água e contaminação de alimentos. Tal problema agrava quando se trata de leveduras resistentes a antifúngicos utilizados na clínica médica. Desta forma, encorajamos a inclusão do isolamento de *Candida* spp. seja considerado um critério de qualidade da água potável, uma vez que foi possível a detecção de *Candida* spp. resistentes aos azóis.

**Highlight:** Contaminação da água subterrânea por *Candida* spp. resistentes a antifúngicos e capazes de formar biofilme.

**Palavras-chave:** Microbiologia da água; Poços de água; *Candida*; Farmacoresistência fúngica  
**Keywords:** Water Microbiology; Water Wells; *Candida*; Drug resistance, fungal.

## **Introdução**

A água para consumo humano pode ser proveniente de nascente, superfície e poços subterrâneos (Risebro et al., 2012). A água subterrânea água fornecida pelo sistema público de abastecimento são realizadas avaliações periódicas para assegurar a sua inocuidade, diferentemente da utilizada em propriedades privadas que não passa por monitoramento e tratamento (Fox et al., 2016; Law et al., 2017). A contaminação da água subterrânea pode ocorrer devido a atividades antrópicas ou atividades naturais, tipo de poço, forma de perfuração, profundidade, proximidade com fossa séptica e ausência de manutenção dos poços (Hynds et al., 2014; Maran et al., 2016). O tratamento, monitoramento e manutenção dos poços particulares são responsabilidade do proprietário, a fim de prevenir sua contaminação e doenças de veiculação hídrica (Fox et al., 2016; Law et al., 2017).

O monitoramento da água para consumo humano ocorre por análises químicas, físicas e microbiológicas. Neste último é avaliado a presença de *Escherichia coli*, para assegurar a sua potabilidade (WHO, 2011). No entanto, vírus, protozoários, fungos e leveduras não são avaliados na qualidade da água e a presença de microrganismos patogênicos torna-se um problema devido aos riscos a saúde do consumidor (Hageskal et al., 2009).

A água deve ser fornecida de forma satisfatória, adequada, segura e acessível, devendo ser ausente de sabor e odor (WHO, 2011). Para tanto, deve ser tratada por diferentes processos para a remoção de poluentes, sendo estes: coagulação, floculação, sedimentação, filtração, desinfecção e fluoretação (SORLINI et al., 2014; AHMAD et al., 2016). Para a desinfecção da água, podem ser utilizados diferentes métodos, como cloração, radiação, ozônio, ultravioleta e filtração por membrana, sendo a cloração o método mais utilizado (WHO, 2003).

As leveduras podem ser encontradas em diferentes ambientes aquáticos, como subterrâneo, nascente, superfícies e até mesmo água encanada e mineral (Kanzler et al., 2007;

Pereira *et al.*, 2009; Ishida *et al.*, 2013; Babič *et al.*, 2016). As leveduras do gênero *Candida* são responsáveis pela maioria das infecções fúngicas e estão relacionadas com a morbimortalidade de pacientes (Almeida *et al.*, 2013; Ibrahim *et al.*, 2015; McCarty; Pappas, 2016; Araújo *et al.*, 2017). *Candida* spp. são uma das principais causas de deterioração de alimentos e estão presentes em fontes hídricas formando biofilme nas tubulações e proporcionando sua disseminação. (Estivill *et al.*, 2011; Wingender e Flemming 2011; Babič *et al.*, 2016; Tomičić *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017). Além disto, a formação do biofilme pode ocorrer por múltipla espécies, ocasionando desta forma, a proteção destes microrganismos a agentes antimicrobianos.

Os biofilmes se organizam em comunidades rodeadas por uma camada de matriz extracelular polimérica, que atua como uma barreira para sanitizantes e outros agentes antimicrobianos, e sua formação ocorre geralmente em superfícies que estão em contato com água (Gomes *et al.*, 2014; Ibrahim *et al.*, 2015; Araújo *et al.*, 2017; Campoy and Adrio, 2017).

A falta de monitoramento da água subterrânea obtida em poços privados pode ser um veículo de transmissão de doenças hídricas, pois além de relatos da presença de leveduras em ambientes aquáticos, vê-se a necessidade pela investigação de leveduras patogênicas em água subterrânea, tendo em vista que estas podem ocasionar em problemas de saúde ao consumidor. Este trabalho teve como objetivo isolar e identificar leveduras cultiváveis de água subterrânea utilizada para o consumo humano, e caracterizar os isolados do gênero *Candida* quanto susceptibilidade ao hipoclorito de cálcio e antifúngicos e formação de biofilme.

## **Materiais e Método**

### **Coleta da água**

A coleta das águas subterrâneas foi realizada de forma aleatória em poços cavados e semi-artesiano destinadas para consumo humano em residências de três municípios do sul do Centro-Oeste brasileiro, sendo 36 em Caarapó (C), 16 em Dourados (D) e 30 em Itaporã (I). A água foi coletada em frascos de vidro de 500 mL esterilizados e as amostras foram obtidas da primeira saída de água do poço subterrâneo antes do armazenamento em caixa d'água. A torneira foi desinfetada com álcool 70°, aberta por 5 minutos e realizada a coleta (APHA, 1999). O material foi transportado sob refrigeração a 4 °C e o processamento realizado em até 8 horas.

### **Isolamento de leveduras**

As leveduras foram isoladas por meio da Técnica de Membrana Filtrante, no qual 100 mL de água foram filtradas em membrana éster de celulose (Millipore 0,45 µm; Kitlabor, EUA), posteriormente colocada em Ágar Sabouraud Dextrose (Fluka Analytical, Índia) suplementado com 50 mg/mL de cloranfenicol (Ishida et al., 2013). As placas foram incubadas a  $35 \pm 0,5$  °C, examinadas diariamente durante sete dias, e as leveduras foram armazenadas em Caldo Sabouraud Dextrose (Acumedia, EUA) com glicerol a -20 °C no Laboratório de Microbiologia Aplicada, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados (FCBA/UFGD).

### **Identificação das leveduras**

As leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud Dextrose por 48 h a  $35 \pm 0,5$  °C. As colônias foram transferidas para um tubo contendo caldo Sabouraud Dextrose à 25 °C overnight com rotação de 50 rpm. A extração do DNA foi realizada com o kit *YeaStar<sup>TM</sup> Genomic DNA Kit* (Zymo Research, EUA) seguindo o protocolo II e ampliada a região ITS universal por PCR, utilizando o primer Universal ITS4 R 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3' e ITS1 F 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3' (White et al., 1990). As soluções foram preparadas em volume final de 25 µL, constituídos por 7,5 µL de água, 1,5 µL de Primer Forward, 1,5 µL de Primer Reverse, 12,5 µL de PCR Master MIX (Promega, USA) e 2,0 µL de DNA genômico. As condições de ciclagem se deu por uma etapa de desnaturação inicial de 94 °C por 3', 35 ciclos de desnaturação por 94 °C por 1', anelamento a 55 °C por 1' e extensão a 72 °C por 1', seguida da extensão final a 72 °C por 5'. Os produtos resultantes das ampliações por PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (Uniscience, USA). As amostras foram purificadas por meio de Álcool Isoamílico. O sequenciamento foi realizado utilizando o método de Sanger (Sanger et al., 1977) no ABI 3500 *automated DNA sequencer* e sequenciadas pela Reação completa com BigDye. As sequências obtidas foram analisadas pelo *Software* Cap 3 e BioEdit e submetidas a alinhamento pelo *Software* ClustalW2 (Lakin et al., 2007). Para a identificação foi utilizado o programa BLASTIN 2.4.0+ seguido da análise de filogenia utilizando o programa Mega 7. Após a identificação, as leveduras do gênero *Candida* foram submetidas aos testes biológicos.

### **Preparo do inoculo para os testes de susceptibilidade antimicrobiana**

Para o preparo do inoculo, os isolados foram cultivados em Ágar Sabouraud Dextrose por 24 h a  $35 \pm 0,5$  °C. As leveduras foram suspensas em solução salina (0,85%) e a concentração das leveduras foram ajustadas para  $0,5$  a  $2,5 \times 10^3$  UFC/mL (90%  $\pm 2$  de transmitância com comprimento de onda de 530 nm).

### **Resistência ao cloro**

O ensaio de resistência ao cloro foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços (KASVI, China), com meio de cultura RPMI-1640 (GIBCO) tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico (SIGMA), com pH 7,0, suplementado com 2% de glicose como proposto pelo documento M27-A3 do CLSI (2012). Para o preparo do cloro foi utilizado o Hipoclorito de Cálcio 65% em 10 concentrações (20 mg a 0,9375 mg). As placas foram incubadas a 35 °C por 48 h seguido por leitura visual.

### **Concentração Inibitória Mínima (CIM) aos antifúngicos para *Candida* spp.**

O teste de suscetibilidade por microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços foi realizado seguido o documento M27-A3 do CLSI (2012) com os antifúngicos: anfotericina B (Sigma), fluconazol (Sigma), itraconazol (Sigma) e voriconazol (Sigma). As concentrações utilizadas foram de 16 µg/mL a 0,03 µg/mL para anfotericina B, itraconazol e voriconazol e de 128 µg/mL a 0,25 µg/mL para fluconazol. O meio de cultura utilizado foi o RPMI-1640 (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA) tamponado com ácido morfolinopropanosulfônico (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA), com pH 7,0, suplementado com 2% de glicose. As placas foram incubadas a  $35 \pm 0,5$  °C por 48 h, sendo realizada uma leitura visual. A concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração do antifúngico capaz de promover 50% de inibição para fluconazol, itraconazol, voriconazol, e 100% de inibição para anfotericina B. A definição dos pontos de corte segue o documento M27-S3 e M27-S4 (CLSI, 2008; CLSI, 2012) e os resultados foram expressos em: sensível (S), sensível dose dependente (DD), e resistente (R). Os pontos de corte com valores de CIM para fluconazol de  $\leq 8$  µg/mL como S, DD de 16-32 µg/mL e  $\geq 64$  µg/mL para R; itraconazol de  $\leq 1$  µg/mL como S e  $\geq 2$  µg/mL como R; voriconazol de  $\leq 0,125$  µg/mL como S e  $\geq 1$  µg/mL como R. Anfotericina apresentou S com valores  $\leq 1$  µg/mL e R para  $\geq 2$  µg/mL. Para o controle de cada teste foram utilizados cepas provenientes do

American Type Culture Collection (ATCC): *C. krusei* ATCC 6558 e *C. parapsilosis* ATCC 22019

### **Formação de biofilme**

A formação de biofilme foi realizada de acordo com Shin et al. (2002). As leveduras foram cultivadas em ágar sabouraud dextrose por 24 h a 35 °C. O inóculo foi ajustado em solução salina (0,85%) com turbidez de  $3 \times 10^7$  UFC/mL. Em microplacas de 96 poços foram inoculados 20 µL do inóculo em 180 µL de caldo Sabouraud Dextrose em quintuplicada, e incubada a 35 °C por 24 h. A leitura foi realizada em leitor de ELISA sob comprimento de onda de 430 nm. Os valores foram convertidos de densidade ótica para transmitância (T). A produção de biofilme foi classificada como negativo (%T < 5), 1+ (%T de 5 a 20) - fraco, 2+ (%T de 20 a 35) - moderado, 3+ (%T de 35 a 50) - moderado ou 4+ (%T ≥ 50) - forte.

### **Análise estatística**

Os dados foram tabulados utilizando o programa Microsoft Excel 2010<sup>®</sup>. Realizou-se a análise descritiva das variáveis por meio da frequência absoluta e seus percentuais.

## **Resultados**

### **Leveduras isoladas**

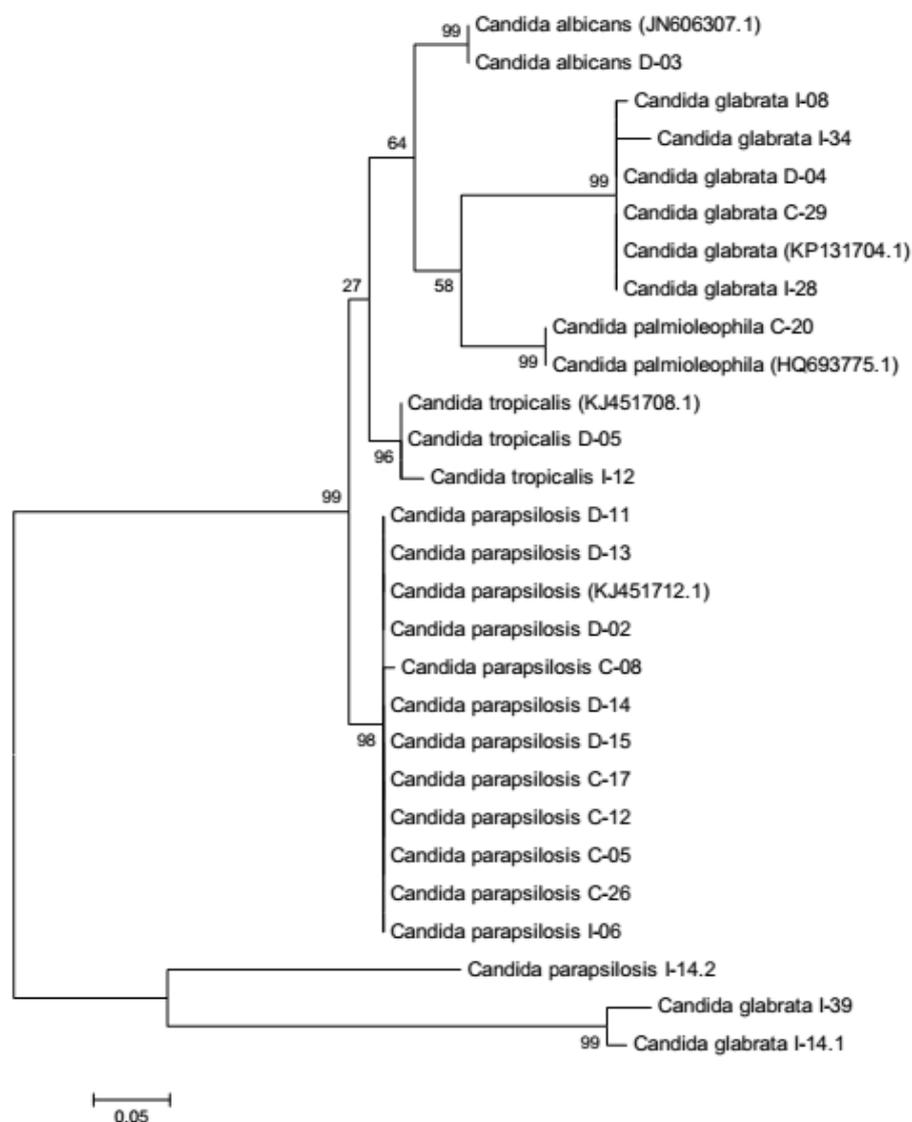
A presença de leveduras foi detectada em 34 (41,5%) poços, sendo 10 em Caarapó, 11 Dourados e 13 em Itaporã, obtendo um total de 50 leveduras isoladas. A identificação filogenética por sequenciamento revelou 10 gêneros, sendo: *Candida* spp. (46%), *Clavispora* sp. (4%), *Exophiala* spp. (8%), *Hanseniaspora* sp. (2%), *Kazachstania* sp. (2%), *Kodamaea* sp. (4%), *Meyerozyma* spp. (22%), *Pichia* spp. (8%), *Rhodospiridium* sp. (2%) e *Rhodotorula* sp. (2%) (Tabela 2). O gênero *Candida* se destacou com 23 isolados, sendo *C. parapsilosis* a espécie mais frequente, seguida de *C. glabrata*. Outro gênero predominante foi *Meyerozyma* spp. com 11 isolados, dos quais a espécie prevalente foi por *M. caribbica*.

Tabela 1 – Identificação das leveduras isoladas de água subterrânea, quantidade de isolados e número de acesso GenBank

Espécie identificada	Número isolados n (%)	Nº de acesso GenBank
<i>Candida albicans</i>	1 (2)	JN606307.1
<i>Candida glabrata</i>	7 (14)	KP131704.1
<i>Candida palmiophila</i>	1 (2)	HG693775.1
<i>Candida parapsilosis</i>	12 (24)	KJ451712.1
<i>Candida tropicalis</i>	2 (4)	KJ451708.1
<i>Clavispora lusitaniae</i>	2 (4)	KP068775.1
<i>Exophiala dermatitidis</i>	3 (6)	KX001797.1
<i>Exophiala heteromorfa</i>	1 (2)	KP959252.1
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	1 (2)	KT226114.1
<i>Kazachstania aerobia</i>	1 (2)	KF057700.1
<i>Kodamaea ohmeri</i>	2 (4)	KP132353.1
<i>Meyerozyma caribbica</i>	10 (20)	KM402049.1
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1 (2)	KM982970.1
<i>Pichia fermentans</i>	1 (2)	KT029804.1
<i>Pichia kluyveri</i>	1 (2)	KT309130.1
<i>Pichia kudriavzevii</i>	1 (2)	JX174414.1
<i>Pichia manshurica</i>	1 (2)	KM368827.1
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	1 (2)	AB0733266.1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1 (2)	KU052792.1
<b>TOTAL</b>	<b>50 (100)</b>	

Os isolados do gênero *Candida* foram caracterizados utilizando dados do GenBank e posicionamento na árvore filogenética (Figura 1). Pode-se observar a separação das espécies no dendograma com 98% de similaridade com os dados do GenBank e distância de pares de 0,01 a 1,34.

No entanto, três isolados, *C. parapsilosis* (I-14.2) e *C. glabrata* (I-14.1 e I-39), se diferiram dos demais isolados, demonstrando uma distância evolutiva maior em relação aos demais, e agrupamento fora da mesma família. Tais isolados foram coletados de poços cavados, os quais possuem uma estrutura aberta, apresentando maior susceptibilidade para contaminantes.



**Figura 1 – Dendograma construído com 23 isolados de *Candida* spp. presentes em água subterrânea utilizada para o consumo humano.** A árvore foi construída pela matriz de distância Kimura 2-paramêtros pelo método de Evolução Máxima, utilizando CLUSTAL W e MEGA ver.7.0. Os níveis de suporte do bootstrap estão indicados nos nós da árvore. A barra de escala representa uma substituição de 0.05 nucleotídeos por posição. Os números após o nome das espécies indicam a cidade e poço subterrâneo de coleta. **Legenda:** *espécie identificada* cidade da coleta – ponto coletado; (C) Caarapó, (D) Dourados, (I) Itaporã.

### Resistência ao cloro

O hipoclorito de cálcio, em todas as concentrações testadas (20 mg/L à 0,94 mg/L) não foi capaz de inibir nenhum isolados de *Candida* spp. de água subterrânea.

### Concentração Inibitória Mínima (CIM) para *Candida ssp.*

A resistência foi observada em quatro (17,4 %) isolados para os antifúngicos testados. Sendo dois resistentes ao itraconazol e dose-dependente ao fluconazol, um resistente ao fluconazol e o outro resistente ao voriconazol. Todos foram sensíveis a anfotericina B (Tabela 2).

Tabela 2 – Formação de biofilme e Concentração Inibitória Mínima das leveduras do gênero *Candida spp.* isoladas de água subterrânea para os antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol.

Origem	Microrganismo	ANF B		FLU		ITR		VOR		Biofilme
D-03	<i>C. albicans</i>	0,25	S	0,5	S	0,03	S	0,03	S	Negativo
D-04	<i>C. glabrata</i>	0,125	S	16	DD	8	R	< 0,03	S	1+
C-29	<i>C. glabrata</i>	0,125	S	8	S	0,06	S	0,06	S	1+
I-08	<i>C. glabrata</i>	0,125	S	1	S	0,125	S	0,125	S	1+
I-39	<i>C. glabrata</i>	0,125	S	1	S	0,125	S	0,5	S	1+
I-34	<i>C. glabrata</i>	0,25	S	2	S	0,25	S	0,25	S	1+
I-28	<i>C. glabrata</i>	0,25	S	1	S	0,25	S	0,25	S	1+
I-14.1	<i>C. glabrata</i>	0,125	S	2	S	0,25	S	0,125	S	1+
C-20	<i>C. palmiophila</i>	0,06	S	8	S	0,125	S	0,03	S	1+
D-02	<i>C. parapsilosis</i>	0,03	S	0,25	S	0,03	S	< 0,03	S	4+
D-11	<i>C. parapsilosis</i>	0,06	S	4	S	0,25	S	0,03	S	1+
D-13	<i>C. parapsilosis</i>	0,125	S	4	S	0,03	S	< 0,03	S	1+
D-14	<i>C. parapsilosis</i>	0,125	S	4	S	0,03	S	< 0,03	S	4+
D-15	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	S	0,5	S	0,03	S	0,03	S	2+
C-17	<i>C. parapsilosis</i>	0,03	S	64	R	0,5	S	< 0,03	S	1+
C-12	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	S	8	S	0,5	S	0,03	S	1+
C-08	<i>C. parapsilosis</i>	0,025	S	4	S	0,03	S	0,03	S	1+
C-05	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	S	2	S	0,03	S	0,03	S	Negativo
C-26	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	S	1	S	0,03	S	< 0,03	S	1+
I-06	<i>C. parapsilosis</i>	0,5	S	0,25	S	0,03	S	< 0,03	S	2+
I-14.2	<i>C. parapsilosis</i>	0,25	S	4	S	0,03	S	< 0,03	S	2+
D-05	<i>C. tropicalis</i>	0,06	S	0,5	S	0,03	S	16	R	1+
I-12	<i>C. tropicalis</i>	0,125	S	16	DD	16	R	0,03	S	Negativo
	<i>C. krusei</i> ATCC 6558	0,25		16		0,125		0,03		
	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	0,5		2		0,03		0,03		

Legenda: N° indica o município da coleta e poço subterrâneo de coleta. ANF B Anfotericina B; FLU Fluconazol; ITR Itraconazol; VOR Voriconazol. S Sensível; DD Dose-dependente; R Resistente COLOCAR OS PONTOS DE CORTE Concentração dos antifúngicos testados em micrograma por mililitro (µg/mL). Biofilme – 1+ fraco; 2+ e 3+ moderado; 4+ forte.

### Biofilme

Dos 23 isolados, 20 foram capazes de formar biofilme e apenas três não formaram (Tabela 2). Os isolados de *C. glabrata* formaram biofilme fraco, *C. parapsilosis* mostrou uma formação do tipo fraca a forte, e *C. tropicalis* apresentou formação do tipo fraco e negativo, *C. albicans* não formou biofilme e *C. palmiophila* formou o tipo fraco.

## Discussão

Na avaliação da potabilidade da água para consumo humano é analisada a presença de bactérias da espécie *E. coli*, no entanto, leveduras e bolores não são avaliados na qualidade da água, apesar de ser possível detectar a presença dos mesmos em ambientes aquáticos. O estudo foi realizado em três municípios do Mato Grosso do Sul com o intuito de isolar leveduras presentes em água subterrânea para o consumo humano, porém, durante o isolamento das leveduras um limitante para o isolamento das colônias foram o crescimento de fungos filamentosos nas placas, levando ao descarte das mesmas.

Neste estudo foram isoladas diferentes gêneros de leveduras presentes na água subterrânea, as quais foram identificadas como comensais, patógenos oportunistas e de interesse industrial. Destaca-se *Meyerozyma* spp., o segundo gênero mais isolado, que é utilizado para fermentação alcoólica e biocontrole (Bautista-Rosales et al., 2013; Wrent et al., 2016), porém até o momento não houve relatos de sua presença em água subterrânea. Patógenos oportunistas como *Exophiala* spp., *Kodomaea* sp. e *Rhodotorula* sp. são causadores de infecções fúngicas principalmente em pacientes imunocomprometidos (Tsiodras et al., 2014; Babič et al., 2016; Vivas et al., 2016). Isolados de *Exophiala* spp. podem ser encontrados naturalmente em ambientes úmidos, como banheiros e máquinas de lavar louça, e desta forma, podem levar a infecções em indivíduos imunocomprometidos (Babič et al., 2016). Neste estudo foram encontradas tais leveduras pertencentes aos gêneros citados, o que acarreta em um alerta ao risco a saúde do consumidor.

Já foram descritas a presença em água subterrânea de *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Exophiala dermatitidis*, *Kloeckera apis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces* sp., *Sporobolomyces* spp., *Trichosporon coremiiforme* (Göttlich et al., 2002; Ekendahl et al., 2003; Kanzler et al., 2007; Pereira et al., 2009; Ayanbimpe et al., 2012; Latergan et al., 2012; Sohlberg et al., 2015; Babič et al., 2016). A presença das leveduras em água subterrânea pode ser um indicativo de contaminação, possivelmente durante a perfuração do poço, mas também, podem estar naturalmente presente nesse ambiente (Sohlberg et al., 2015). Todavia, este estudo demonstra que esses microrganismos possuem capacidade de adaptação para sobreviver em um ambiente com quantidade reduzida de nutrientes. As coletas foram realizadas de água subterrânea provenientes de poços semi-artesianos e cavados, sendo que este último possui maior risco de contaminação externa, devido ao método de construção. No entanto, no município de Dourados foram realizadas coletas somente em poços semi-

artesianos, diferentemente dos municípios de Itaporã e Caarapó em que foram encontrados poços cavados, os quais apresentaram mais leveduras cultiváveis dos que os poços semi-artesianos.

O patógeno oportunista mais prevalente no estudo foi o gênero *Candida*, sendo *C. parapsilosis*, a espécie mais encontrada seguida de *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. albicans* e *C. palmiroleophila*. *Candida* spp. é um comensal do corpo humano e também um patógeno oportunista, sendo comum em infecções superficiais e sistêmicas no organismo humano. Além disto, a candidíase pode ocorrer por infecção exógena como por vias ambientais (Sabino et al., 2015; Savastano et al. 2016).

O gênero *Candida* é dividido em dois grupos, *Candida albicans*, espécie a qual é mais frequentemente isolada na clínica médica e *Candida não-Candida albicans* (CNCA), como, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* e *C. kefyr* (Estivill et al., 2011; Silva et al., 2011; Almeida et al., 2013; Ibrahim et al., 2015; Kaur et al., 2016; McCarty and Pappas, 2016; Alencar et al., 2017). Um estudo com isolados clínicos de *C. albicans* e CNCA, demonstrou que as espécies *C. parapsilosis* e *C. glabrata* apresentam altas taxas de mortalidade, seguida pela *C. tropicalis*. Acredita-se que pacientes infectados por CNCA apresentam quadros clínicos piores, devido a terapias antifúngicas utilizadas anteriormente (Almeida et al., 2013; Alencar et al., 2017). O que gera uma preocupação, pois as espécies de CNCA foram as mais isoladas neste estudo.

A presença de leveduras não está estritamente relacionada ao ambiente hospitalar, podendo ser encontrada em diferentes ambientes, como locais públicos, residências e até mesmo no sistema de distribuição de água. Como a presença de *C. parapsilosis* encontrada em água mineral e água subterrânea (Ishida et al., 2013; Pereira et al., 2009; Pereira et al., 2010; Babič et al., 2016).

Aproximadamente metade da população mundial tem como fonte de água para o consumo a água subterrânea e a sua utilização em propriedades privadas ocorre devido à facilidade de captação da água, por estar próximo do usuário, além de exigir menos tratamento que a água de superfície (Groundwater Governance, 2015). No Brasil, cerca de 13,8% das residências utilizam a água subterrânea como fonte privada para o consumo humano (Brasil, 2010).

A água para o consumo humano deve passar por tratamento em diferentes processos para a certificação da remoção de poluentes (Sorlini et al., 2014). O gás cloro, hipoclorito de

sódio e hipoclorito de cálcio são os sanitizantes mais utilizados na desinfecção de água. O hipoclorito de cálcio é capaz de promover a dissolução de tecido orgânico, possui também atividade antimicrobiana e é comumente utilizado na indústria e no tratamento de purificação de água (Garcia-Villanova et al., 2010). A concentração utilizada deve ser de 2 mg/L para o tratamento de água, tendo um teor mínimo de 0,2 mg/L. Neste estudo, as leveduras testadas foram capazes de crescer mesmo em concentração de 20 mg/L, sendo acima do recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2011). Demonstrando desta forma que a desinfecção da água utilizando cloro não é eficaz para leveduras.

Com relação ao perfil de susceptibilidade aos antifúngicos, quatro isolados apresentaram resistência à classe dos azóis testados (fluconazol, voriconazol e itraconazol), que são usados para o tratamento de candidíases (McCarty and Pappas, 2016). Dos isolados que foram resistentes apenas três produziram biofilme, *C. glabrata* (D-04), *C. parapsilosis* (C-17) e *C. tropicalis* (D-05). A resistência aos antifúngicos pode ocorrer devido a atividades antrópicas decorrentes de poluição, e até mesmo resíduos agrícolas, além de mudanças genéticas. Alguns pesquisadores descrevem que a presença de leveduras em água pode ser utilizada como bioindicadores de poluentes em água (Brilhante et al., 2012; McCarty and Pappas, et al., 2016; Silva et al., 2016).

Os isolados que demonstraram resistência são CNCA, como *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, estas últimas são mais encontradas em ambiente hospitalares, porém estes isolados foram ambientais. *C. tropicalis* é a espécie mais isolada na clínica médica no sul do Mato Grosso do Sul (Almeida et al., 2013), destaca-se o fato de que ambos os isolados de *C. tropicalis* do ambiente aquático subterrânea apresentaram resistência a dois dos azóis.

A porcentagem (17%) de isolados resistentes é preocupante, devido serem isolados ambientais que não passaram por um processo prévio de seleção por antimicrobianos, pois quando comparamos a estudos com isolados clínicos de *Candida* spp. é relatado um perfil de resistência de 6% a 41,2;% a classe dos azóis (Almeida et al., 2013; Ibrahim et al., 2015; Kaur et al., 2016; Silva et al., 2016; Alencar et al., 2017) e isolados ambientais apresentam perfil de resistência que varia de 18,9% a 33,3% (Brilhante et al., 2011; Brilhante et al., 2016). Assim, a resistência a antifúngicos não é algo estritamente relacionado à clínica médica, podendo ser observada em isolados ambientais.

Os fungicidas azóis têm sido considerados um potencial poluente para o meio ambiente. Antifúngicos utilizados na clínica médica e em cosméticos, além de fungicidas utilizados na agricultura, podem contaminar os solos e águas, e dessa forma podem entrar em contato com os lençóis freáticos e contaminando a água subterrânea (Brilhante et al., 2012; Chen and Ying, 2015; Maran et al., 2016). A presença de pesticidas em água subterrânea é afetada por períodos maiores do que a água de superfície, uma vez que há o acúmulo do contaminante no solo (Chakraborti et al., 2011).

Reilly et al. (2012) avaliaram a presença de fungicidas em água subterrânea e de superfície, comprovando sua presença em 58% das amostras subterrâneas e 75% em superfície. Fungicidas utilizados na agricultura apresentam atividade contra patógenos humanos, como a *Candida albicans*, colaborando desta forma para um potencial aumento da resistência aos antifúngicos (Brilhante et al., 2011; Myung, 2015). As leveduras foram isoladas de regiões com intensa atividade agrícola e podem ter tido o primeiro contato com os antifúngicos ou fungicidas que contaminaram o solo e a água subterrânea, e assim, desenvolver a resistência aos azóis. Com isso, a presença de leveduras do gênero *Candida* resistentes torna-se um problema e um risco a saúde das pessoas que utilizam desta água, tendo em vista a possibilidade de transmissão de doenças por esses microrganismos aos consumidores.

No presente estudo a maioria dos isolados de *Candida* spp foram capazes de formar biofilmes. Tal formação pode ser influenciada pelo material de contato, fatores ambientais e as espécies envolvidas no processo (Estivill et al., 2011). A adesão é um passo importante para a virulência do microrganismo, uma vez que pode ocorrer em superfícies abióticas, como o encanamento da água subterrânea, o qual possui uma superfície favorável ao seu desenvolvimento, como as tubulações de aço em que ocorre maior acúmulo de microrganismos quando comparado com outros materiais, como policloreto de vinila (PVC) (Silva et al., 2011; Liu et al., 2017; Hamid et al., 2017). O tratamento da água é outro fator importante para a prevenção da formação do biofilme na tubulação, visto que minimiza a quantidade de matéria orgânica e nutrientes presentes na água (Gomes et al., 2014).

Nossos resultados corroboram com Wingender e Flemming (2011), os quais sugerem que a formação de biofilme por leveduras na rede de distribuição de água potável pode ser uma fonte de contaminação contínua. Além da possibilidade de alterar o sabor e o odor da água, fungos patogênicos apresentam um risco à transmissão para eletrodomésticos, causando

desta forma a contaminação de alimentos e utensílios domésticos, e conseqüentemente a sua transmissão aos seres humanos, principalmente imunocomprometidos (Silva et al., 2011; Wingender and Flemming, 2011; Babič *et al.*, 2016; Maran et al., 2016).

A formação e a adesão do biofilme por *Candida* spp pode estar relacionada com a presença de outros microrganismos, como *E. coli* e coliformes totais (Castonguay et al., 2006), os quais podem competir por nutrientes, podendo também podem ser benéficas uma para as outras (Sohlberg et al., 2015), além de produzir biofilmes mais resistentes devido a interação entre eles, visto que ambos estavam presentes nas águas coletadas (Maran et al., 2016; dados não mostrados). *Candida* spp. é capaz de formar pseudo-hifas para a adesão em superfícies e formando uma camada de proteção, sendo assim, o biofilme é uma barreira a ação dos antifúngicos e sanitizantes, podendo estar relacionado com a resistência de leveduras a antimicrobianos (Estivill et al., 2011; Ibrahim et al., 2015; Sabino et al., 2015; McCarty and Pappas, 2016; Araújo et al., 2017; Liu et al., 2017).

## **Conclusão**

Neste estudo, além de *Candida* spp foram isolados diferentes gêneros de leveduras, com interesse industrial e ambiental como *Meyerozyma* spp e outros patógenos oportunistas como *Rhodotorula* sp *Exophiala* spp. Devido à capacidade de virulência e importância clínica, os isolados de água subterrânea do gênero *Candida* spp. foram avaliados, considerando a susceptibilidade antifúngica e a capacidade de formação de biofilme, sendo um potencial risco à saúde de seus consumidores por ser uma constante fonte de contaminação, e assim, provocando infecção em pessoas com sistema imunológico comprometido. Além do fato de que 17,4% dos isolados apresentaram resistência aos azóis, tornando um problema na clínica médica. Desta forma, há a necessidade de investigações quanto à presença de leveduras em água para o consumo humano.

Há uma relação da presença de leveduras do gênero *Candida* e poluentes ambientais, assim o gênero deve ser considerado como um potencial indicador de qualidade de água. Além disso, torna-se importante que a população utilize métodos de purificação da água subterrânea antes do consumo, pois não há nenhum monitoramento desta, sendo um risco para a saúde de seus consumidores, devido à presença de microrganismos patogênicos.

## Referências Bibliográficas

- Alencar, D.S.O.; Tsujisaki, R.A.S.; Sposito, F.L.E.; Nunes, M.O.; Almeida, A.A.; Martins, M.A.; Melhem, M.S.C.; Chang, M.R., 2017. *Candida* duo to *Candida parapsilosis* species complexa at a hospital in Brazil: Clinical characteristics and antifungal susceptibility profile. *Rev. Iberoam. Micol.* 34(2), 106-108.
- Almeida, A.A.; Mesquita, C.S.S.; Svidzinski, T.I.E.; Oliveira, K.M.P., 2013. Antifungal susceptibility and distribution of *Candida* spp. isolates from the University Hospital in the municipality of Dourados, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Tro.* 46(3), 335-339.
- Araújo, D.; Henriques, M.; Silva, S., 2017. Portrait of *Candida* Species Biofilm Regulatory Network Genes. *TIMI.* 25(1):62-75.
- Ayanbimpe, G.M.; Abbah, V.E.; Ior, C.A. 2012. Yeast and yeast-like fungal contaminants of water used for domestic purposes in Jos, Nigeria. *Micro Res.* 3(e24), 99-102.
- Babič, M.N.; Zalar, P.; Ženkob, B.; Džeroski, S.; Gunde-Cimerman, N., 2016. Yeast and yeast-like fungi in tap water and groundwater, and their transmission to household appliances. *Fungal Ecology.* 20, 30-39.
- Bautista-Rosales, P.U.; Calderon-Santoyo, M.; Sevín-Villegas, R.; Ochoa-Ávarez, N.A.; Ragazzo-Sánchez, J.A., 2013. Action mechanisms of the yeast *Meyerozyma caribbica* for the control of the phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides* in mangoes. *Biological control.* 65(3), 393-301.
- Brasil. Ministério da Saúde, 2010. Abastecimento de Água – Brasil: Domicílios segundo abastecimento de água, Período: 2010. IBGE – Censos Demográficos de 1991, 2000 e 2010. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?ibge/cnv/aaguf.def>. Acessado em: 13 de julho de 2017.
- Brilhante, R.S.N.; Paiva, M.A.N.; Sampaio, C.M.S.; Teixeira, Carlos, E.C.; Castelo-Branco, D.S.C.M.; Leite, J.J.G.; Moreira, C.A.; Silva, L.P.; Cordiro, R.A.; Monteiro, A.J.; Sidrim, J.J.C.; Rocha, M.F.G., 2011. Yeast from *Macrobrachium amazonicum*: a focus on antifungal susceptibility and virulence factors of *Candida* spp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76, 268-277.
- Brilhante, R.S.N.; Branco, D.S.C.M.C.; Duarte, G.P.S.; Paiva, M.A.N.; Teixeira, C.E.C.; Zeferino, J.P.O.; Monteiro, A.J.; Cordeiro, R.A.; Sidrim, J.J.C.; Rocha, M.F.G. 2012. Yeast microbiota of raptors: a possible tool for environmental monitoring. *Environ. Microbiol. Rep.* 4(2), 189-193.
- Brilhante, R.S.N.; Paiva, M.A.N.; Sampaio, C.M.S.; Castelo-Branco, D.S.C.M.; Teixeira, C.E.C.; Alencar, L.P.; Bandeira, T.J.P.G.; Monteiro, A.J., 2016. Azole resistance in *Candida* spp. isolated from Catú Lake, Ceará, Brazil: an efflux-pump-mediated mechanism. *BJM.* 47(1), 33-38.
- Campoy, S; Adrio, J.L., 2017. Antifungals. *Biochemical Pharmacology* 133(1), 86-96.

Castonguay, M.H.; Schaaf, S. van der; Koester, W.; Krooneman, J.; Meer, W. van der; Harmsen, H.; Landini, P., 2006. Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. Res. Microbiol. 157, 471-478.

Chakraborti, D.; Das, B.; Murrill, M.T., 2011. Examining India's Groundwater Quality Management. Environ. Sci. Technol.. 45, 27-33.

Chen, Z.F.; Ying, G.G. 2015. Occurrence, fate and ecological risk of five typical azole fungicides as therapeutic and personal care products in the environment: A review. Environ. Interna 84: 142-153.

Ekendahl, S.; O'Neill, A.H.; Thomsson, E.; Pedersen, K. 2003. Characterisation of Yeast Isolated from Deep Igneous Rock Aquifers of the Fennoscandian Shield. Microb Ecol. 46, 416-428.

Estivill, D.; Arias, A.; Torres-Lana, A.; Carrillo-Muñoz, A.J.; Arévalo, M.P., 2011. Biofilm formation by five species of *Candida* on three clinical materials. J. Microbiol. Methods 86(2), 238-242.

Fox, M.A.; Nachman, K.E.; Anderson, B.; Lam, J.; Resnick, B., 2016. Meeting the public health challenge of protecting private wells: Proceedings and recommendations from an expert panel workshop. Sci. Total. Environ. 554-555(1), 113-118.

Garcia-Villanova, R.J.; Leite, M.V.O.D.; Hierro, J.M.H.; Alfageme, S.C.; Hernández, C.G., 2010. Occurrence of bromate, chlorite and chlorate in drinking waters disinfected with hypochlorite reagents. Tracing their origins. Sci. Total Environ. 408(12), 2616-2620.

Gomes, I.B.; Simões, M.; Simões, L.C., 2014. An overview on the reactors to study drinking water biofilms. Water Res. 62, 63-87.

Göttlich, E.; Lubbe, W. van der; Lange, B.; Fiedler, S.; Melchert, I.; Reinfenrath, M.; Flemming, H.C.; Hoog, S. 2002. Fungal flora in groundwater-derived public drinking water. Int. J. Hyg. Environ. Health. 205, 269-279.

Groundwater Governance, 2015. Global Diagnostic on Groundwater Governance. Disponível em:

[http://www.groundwatergovernance.org/fileadmin/user\\_upload/gwg/documents/Global Diagnostic on Groundwater Governance Draft.pdf](http://www.groundwatergovernance.org/fileadmin/user_upload/gwg/documents/Global_Diagnostic_on_Groundwater_Governance_Draft.pdf). Acessado em :13 de julho de 2017.

Hageskal, G.; Lima, N.; Skaar, I., 2009. The study of fungi in drinking water. Mycol. Res 113:165-172.

Hamid, S.; Zainab, S.; Faryal, R.; Ali, N., 2017. Deterrence in metabolic and biofilms forming activity of *Candida* species by mycogenic silver nanoparticles. J. App. Biomed. **IN PRESS**.

Hynds, P.; Misstear, B.D.; Gill, L.W.; Murphy, H.M., 2014. Groundwater source contamination mechanisms: Physicochemical profile clustering, risk factor analysis and multivariate modelling. J. Contam. Hydrol. 156, 47-56.

- Ibrahim, N.H.; Melake, N.A.; Somily, A.M.; Zakaria, A.S.; Baddour, M.M.; Mahmoud, A.Z., 2015. The effect of antifungal combination on transcripts of a subset of drug-resistance genes in clinical isolates of *Candida* species induced biofilms. *SPJ*. 23(1), 55-66.
- Ishida, K.; Ueda-Yamaguchi, M.; Ueda-Nakamura, T.; Dias Filho, B.P.; Yamada-Ogatta, S.F.; Nakamura, C.V., 2013. Performance of methods for identification of yeast isolated from blotted water: High prevalence of *Candida parapsilosis*. *Semina: Ciec. Biol. Saúde* 34(2), 205-214.
- Kanzler, D.; Buzina, W.; Paulitsch, A.; Haas, D.; Platzer, S.; Marth, E.; Mascher, F. 2007. Occurrence and hygienic relevance of fungi in drinking water. *Mycoses*. 51, 165-169.
- Kaur, R.; Dhakad, M.S.; Goyal, R.; Kumar, R., 2016. Emergence of non-*albicans* *Candida* species and antifungal resistance in intensive care unit patients. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 6(5), 455-460.
- Latergan, M.J.; Torpy, F.R.; Nweby, S.; Stephenson, S.; Hose, G.C.; 2014. Fungal Diversity of Shallow Aquifers in Southeastern Australia. *Geomicro J.* 29, 352-361.
- Law, R.K.; Murphym M.W.; Choudhary. 2017. Private well groundwater quality in West Virginia, USA-2010. *Science of The Total Environmental* 558(15), 559-565.
- Liu, G.; Zhang, Y.; Knibbe, W.J.; Feng, C.; Liu, W.; Medema, G.; Meer, W. van der, 2017. Potential of changing supply-water quality on drinking water distribution: A review. *Water Res.* 116, 135-148.
- Maran, N.H.; Crispim, B.A.; Iahnn, S.R.; Araújo, R.P.; Grisolia, A.B.; Oliveira, K.M.P., 2016. Depth and Well Type Related to Groundwater Microbiological Contamination. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13(10), 1036.
- McCarty, T.P.; Pappas, P.G., 2016. Invasive Candidiasis. *Infec. Dis. Clin. N. Am.* 30(1), 103-124.
- Myung, K., 2015. Can agricultural fungicides accelerate the discovery of human antifungal drugs? *Drug Discov. Today*. 20(1), 710.
- Pereira, V.J.; Basílio, M. C.; Fernandes, D.; Domingues, M.; Paiva, J. M.; Benoliel, M. J.; Crespo, M.T.; San Romão, M. V., 2009. Occurrence of filamentous fungi and yeast in three different drinking water. *Water Res.* 43, 3813-3819.
- Pereira, V.J.; Fernandes, D.; Carvalho, G.; Benoliel, M.J.; San Romão, M.V.; Barreto Crespo, M.T., 2010. Assessment of the presence and dynamics of fungi in drinking water sources using cultural and molecular methods. *Water Res.* 44:4850-4859.
- Reilly, T.J.; Smalling, K.L.; Orlando, J.L.; Kuivila, K.M., 2012. Occurrence of boscalid and other selected fungicides in surface water and groundwater in three targeted use areas in the United States. *Chemosphere*. 89, 228-234.

Risebro, H.L.; Breton, L.; Aird, H.; Hooper, A.; Hunter, P.R., 2012. Contaminated Small Drinking Water Supplies and Risk of Infectious Intestinal Disease: A Prospective Cohort Study. *Plos One* 7(8), 1-12.

Sabino, R.; Sampaio, P.; Rosado, L.; Videira, Z.; Grenouillet, F.; Pais, C., 2015. Analysis of clinical and environmental *Candida parapsilosis* isolates by microsatellite genotyping – a tool for hospital infection surveillance. *Clin. Microbiol. Infect.* 21, 954.e1-954.e8.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 5463-5467.

Shin, J.H.; Kee, S.J.; Shin, M.G.; Kim, S.H.; Shin, D.H.; Lee, S.K.; Suh, S.P.; Ryang, D.W., 2002. Biofilm Production by Isolates of *Candida* Species Recovered from Nonneutropenic Patients: Comparison of Bloodstream Isolates with Isolates from Other Sources. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1244-1248.

Silva, D.B.S.; Rodrigues, L.M.C.; Almeida, A.A.; Oliveira, K.M.P.; Grisolia, A.B., 2016. Novel point mutations in the ERG11 gene in clinical isolates of azoles resistant *Candida* species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 111(3), 192-199.

Sohlberg, E.; Bomberg, M.; Miettinen, H.; Nyssönen, M.; Salavirta, H.; Vikman, M.; Itävaara, M., 2015. Revealing the unexplored fungal communities in deep groundwater of crystalline bedrock fracture zones in Olkiluoto, Finland. *Front. Microbiol.* 6(573).

Sorlini, S.; Gialdini, F.; Biasibetti, M.; Collivignarelli, C., 2014. Influence of drinking water treatments on chlorine dioxide consumption and chlorite/chlorate formation. *Water Res.* 54(1), 44-52.

Tsiodras, S.; Papageorgiou, S.; Meletiadis, J.; Todas, P.; Pappa, V.; Panayiotides, J.; Karakitsos, P.; Armaganidis, A., Petrikkos, G., 2014. *Rhodotorula mucilaginosa* associated meningitis: A subacute entity with high mortality. Case report and review. *Med. Mycol. Case Rep.* 6, 46-50.

Vivas, R.; Beltran, C.; Munera, M.I.; Trujillo, M.; Restrepo, A.; Garcés, C., 2016. Fungemia due to *Kodomaea ohmeri* in a Young infant and review of the literature. *Med. Mycol. Case Rep.* 13, 5-8.

White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* 315, 322.

Wingender, J.; Flemming, H.C., 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International J. Hygiene and Environ. Health* 214(6), 417-423.

WHO – World Health Organization. Guidelines for Drinking-water quality. Fourth Edition, 2011.

Wrent, P.; Rivas, E.M.; Penado, J.M.; Silóniz, M.I., 2016. Development of an affordable typing method for *Meyerozyma guilliermondii* using microsatellite markers. Int. J. Food Microbiol. 217, 1-6.