

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

**OCORRÊNCIA DE LEVEDURAS OPORTUNISTAS EM AMOSTRAS DE
ÁGUA DO ARROIO DILÚVIO EM PORTO ALEGRE**

THAISA FELTRIN
Bacharel em Biomedicina

PORTO ALEGRE, 2014

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

**OCORRÊNCIA DE LEVEDURAS OPORTUNISTAS EM AMOSTRAS DE
ÁGUA DO ARROIO DILÚVIO DE PORTO ALEGRE**

THAISA FELTRIN

Bacharel em Biomedicina

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, como um dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre na Área de Microbiologia Ambiental.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Sueli Van Der Sand

Porto Alegre, RS, Brasil,
Março, 2014

CIP - Catalogação na Publicação

Feltrin, Thaisa
OCORRÊNCIA DE LEVEDURAS OPORTUNISTAS EM AMOSTRAS
DE ÁGUA DO ARROIO DILÚVIO EM PORTO ALEGRE / Thaisa
Feltrin. -- 2014.
84 f.

Orientadora: Sueli Teresinha Van Der Sand.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Leveduras Oportunistas. 2. Arroio Dilúvio. I.
Van Der Sand, Sueli Teresinha , orient. II. Título.

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

AGRADECIMENTOS

Foram muitas as pessoas que fizeram parte dessa conquista, e que de alguma forma desempenharam um papel fundamental para que eu conseguisse chegar ao fim.

Agradeço primeiramente à minha orientadora Dra Sueli Van Der Sand pela orientação e oportunidade de realizar esse projeto.

Aos colegas de laboratório, 209, 164, 210, por sempre ajudarem nos momentos de dúvidas, descontração e na hora do chimarrão.

Às amigas verdadeiras que fiz nesta caminhada, Elisandra Minotto e Francielle Bucker que fizeram meus dias mais alegres e leves, fazendo com que o significado de parceria e sinceridade sempre prevalecesse. Este trabalho foi mais fácil com vocês!

Às parceiras de mestrado, Karina Meneguetti e Belize Leite que me proporcionaram muitas risadas e me ensinaram que tudo na vida é mais fácil com humor e com amigos, a vocês o meu muito obrigada.

À amiga que fiz Luciana Milagre, que me salvou na parte mais crítica do trabalho, agradeço acima de tudo a amizade.

À Kimberly Iwanczuk pela ajuda e parceria nos dias de sofrimento molecular.

Ao Ramon que chegou no momento mais crítico e me apoiou sempre, com palavras de conforto e sabedoria todos os dias.

As minhas amigas de Farroupilha, que sempre me esperavam de braços abertos para me fazer seguir em frente e lutar pelo meu sonho.

Agradeço principalmente aos meus pais, pelo apoio incondicional sempre, por me amarem e acreditarem no meu potencial, esta conquista é para vocês!

A CAPES pelo auxílio financeiro ao longo destes dois anos.

Nunca esquecerei aqueles que conheci, e que marcaram de alguma forma essa caminhada, a todos vocês muito obrigado.

OCORRÊNCIA DE LEVEDURAS OPORTUNISTAS EM AMOSTRAS DE ÁGUA DO ARROIO DILÚVIO DE PORTO ALEGRE. ¹

Autor: Thaisa Feltrin

Orientador: Dr. Sueli Van Der Sand

RESUMO

O Arroio Dilúvio é um dos principais cursos d'água de Porto Alegre possuindo 17.605m de extensão com a sua nascente localizada na cidade de Viamão e o seu deságue junto ao Lago Guaíba. Ao longo do seu percurso o Arroio Dilúvio recebe diversos dejetos oriundos de esgoto pluvial, doméstico e hospitalar, favorecendo o crescimento de uma população microbiana diversificada, com a possível presença de microrganismos resistentes a antimicrobianos que podem comprometer a qualidade de vida da população. O objetivo do presente estudo foi avaliar a presença de leveduras oportunistas em amostras de água coletadas próximo a hospitais localizados ao longo do Arroio Dilúvio, buscando verificar a presença de fatores de virulência e resistência aos antifúngicos comumente utilizados nos tratamentos de micoses. As coletas ocorreram em três pontos em duas estações do ano. As amostras coletadas foram isoladas e semeadas em diferentes meios de cultura seletivos para leveduras. Para a verificação dos fatores de virulência foram realizados métodos de crescimento a 37°C e meios de cultura para atividade de fosfolipase e proteinase. Para a caracterização de resistência, foram realizados métodos de fungigrama e concentração inibitória mínima (CIM) utilizando diferentes antifúngicos. Após os ensaios preliminares foi observado a predominância de leveduras pertencente ao filo Ascomycota. Aproximadamente 25% dos isolados inicialmente selecionados apresentaram um potencial de leveduras oportunista. No ensaio de fungigrama foi observado resistência dos isolados ao fluconazol e voriconazol, enquanto que no CIM ao fluconazol e itraconazol. Somente três isolados apresentaram resistência ao fluconazol em ambos os ensaios.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente Microbiologia do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (82 p.) Março, 2014.

OCCURRENCE OF OPPORTUNISTIC YEASTS IN WATER SAMPLES FROM DILÚVIO STREAM IN PORTO ALEGRE. ¹

Author: Thaisa Feltrin

Supervisor: Dr. Sueli Van Der Sand

ABSTRACT

The Dilúvio Stream is one of the main watercourses in Porto Alegre, with 17.605m large with its headwaters located in the Viamão city and the outlet in the Guaíba lake. Throughout its course the Dilúvio Stream receives a high concentration of waste that comes with the rain, household and hospital sewage, promoting in this way the microbial growth of a diverse population, with the possible presence of microorganisms resistant that can compromise the quality of population life. The aim of this study was to evaluate the presence of opportunistic yeast in water samples collected near hospitals located along the Dilúvio Stream, to verify the presence of virulence factors and resistance to antifungal drugs commonly used in the treatment of fungal infections. Sampling occurred at three points in winter and summer time. The samples were isolated on different selective culture media for yeasts. To verify the virulence factors, the growth at 37°C and activity for phospholipase and proteinase were performed. To characterize the resistance, two methods were performed, the fungigrama and minimum inhibitory concentration (MIC) for different antifungal agents. After preliminary tests the prevalence of yeasts belonging to the phylum Ascomycota was observed. Approximately 25% of the initially selected isolates presented a potential to be opportunistic yeasts. In the fungigrama test was observed a resistance to fluconazole and voriconazole, while in the MIC against fluconazole and itraconazole. Only three isolates were resistant to fluconazole in both trials.

¹Master of Science dissertation in Environmental, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (82 p.) March, 2014.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
1- INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo Geral.....	3
1.2 Objetivos Específicos	3
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 Água	4
2.2 Qualidade da Água	5
2.3 Arroyo Dilúvio	8
2.4. Leveduras em Água Doce	10
2.4.1 Gênero <i>Candida</i>	14
2.5 Resistência aos Antifúngicos	17
3- MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1. Local e coleta das amostras:	21
3.2 Isolamento das leveduras.....	22
3.3 Análises Físico-Química	24
3.4 Identificação das Leveduras	24
3.4.1 Teste de Urease e Diazônio Azul B (DBB)	24
3.4.2 Capacidade de Crescimento a 37°C	25
3.5 Fatores de Virulência.....	25
3.5.1 Determinação da Atividade da Fosfolipase	26
3.5.2 Determinação da Atividade da Proteinase.....	26
3.7 Teste de Suscetibilidade aos Antifúngicos	27
3.7.1 Fungigrama	27
3.7.2 Ensaio da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	28

3.8 Análise Estatística	30
4-RESULTADOS	31
4.1 Isolamento das leveduras.....	31
3.3 Análise Físico-Química	33
3.4 Identificação das Leveduras	34
3.5 Fatores de Virulência.....	40
3.7 Testes de Resistência aos Antifúngicos	42
5- DISCUSSÃO.....	50
6- CONCLUSÃO.....	61
7- PERSPECTIVAS	62
8- REFERENCIAL TEÓRICO	63
9- ANEXOS.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação de suscetibilidade para o teste de fungigrama de acordo com a interpretação do diâmetro da zona de inibição dos antifúngicos selecionados.	28
Tabela 2- Classificação de suscetibilidade para o teste de concentração inibitória mínima de acordo com os pontos de corte do CLSI, para os cinco antifúngicos testados.	30
Tabela 3- Número total de leveduras selecionadas por ponto coletado, nas diferentes estações do ano.	32
Tabela 4- Análises físico-química das águas do Arroio Dilúvio referente aos pontos das coletas realizadas nos períodos de inverno e verão.....	33
Tabela 5-Resultados dos testes bioquímicos e de temperatura realizados para os isolados coletados no período de inverno do Arroio Dilúvio.....	34
Tabela 6- Resultados dos testes bioquímicos e de temperatura realizados para os isolados coletados no período de verão do Arroio Dilúvio.....	36
Tabela 7- Número total de isolados obtidos nas coletas realizadas e no ensaio de termotolerância a 37°C.	39
Tabela 8- Resultados positivos obtidos dos ensaios para fosfolipase e proteinase das leveduras testadas.....	41
Tabela 9- - Resultados obtidos no fungigrama dos isolados da coleta de inverno no Arroio Dilúvio.....	43

Tabela 10- Resultados obtidos no ensaio de fungigrama dos isolados referentes a coleta de verão do Arroio Dilúvio.	44
Tabela 11- Perfis de susceptibilidade obtidos no ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) para as leveduras isoladas no inverno frente aos antifúngicos testados.	46
Tabela 12- - Perfis de suscetibilidade obtidos no ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) para as leveduras isoladas no verão frente aos antifúngicos testados.	47
Tabela 13- Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM - μ g/mL) para os 50 isolados testados frente aos antifúngicos.....	48
Tabela 14- Precipitação pluviométrica dos meses de 2012 e 2013.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da localização dos três pontos coletados ao longo do Arroio Dilúvio em Porto Alegre/RS. Fonte: Google Maps.	22
Figura 2 - Amostras coletadas em triplicata (A, B, C) em cada ponto ao longo do Arroio Dilúvio. Fonte: Acervo pessoal.	23
Figura 3 - Número médio de isolados obtidos nos pontos coletados nas estações do ano de inverno e verão realizados no Arroio Dilúvio.....	32
Figura 4 - Diferentes perfis observados nas leveduras testadas para urease e DBB com relação às estações do ano inverno e verão.....	38
Figura 5 - Porcentagem de leveduras positivas para crescimento a 37°C em relação ao número total de isolados por ponto coletado no inverno e no verão.	39
Figura 6 - Fatores de virulência testados. (A) Halo formado pelo isolado V2B10 no ensaio de fosfolipase (superior esquerdo); (B) Halo formado pelo isolado V2B10 (superior direito) e pelo isolado V2B17 (inferior direito) no ensaio de proteinase.	41

1- INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural essencial à vida humana na terra. A importância deste recurso aumenta com o passar dos anos, através do crescimento gradativo do consumo e disponibilidade da água, que está cada vez mais ameaçada. Apenas 3% da água disponível no mundo é doce, e somente uma pequena parte é destinada às atividades humanas.

A contaminação das águas disponíveis para consumo representa um risco para a saúde pública, uma vez que a veiculação de doenças por utilização destas águas contaminadas é uma das grandes causas de internações hospitalares. A falta de saneamento básico e a propagação de poluentes em lagos, rios e arroios, são os principais fatores que contribuem para a propagação de micro-organismos oportunistas e patogênicos que podem ser um risco a saúde da população. A presença de bactérias altamente resistentes,

vírus capazes de causar gastroenterites severas e leveduras oportunistas demonstram a propagação destes microrganismos em ambientes aquáticos.

As leveduras são um grupo grande, diverso e amplamente distribuído no ambiente. São consideradas em sua grande maioria comensais, e estão presentes no ambiente, na microbiota de humanos e animais. Algumas destas leveduras são consideradas oportunistas, pois são capazes de ocasionar micoses, alergias e outras complicações à saúde dos seres humanos. As leveduras pertencentes ao gênero *Candida* são em sua grande maioria comensais, porém algumas espécies são consideradas oportunistas e encontradas facilmente no ambiente. Atualmente, há uma preocupação crescente na veiculação de *Candida* sp., pelo aumento significativo de doenças relacionadas a estes organismos e pelo aumento de resistência aos medicamentos hoje utilizados nos tratamentos na clínica humana.

O Arroio Dilúvio, localizado na cidade de Porto Alegre, é um dos principais efluentes desta região. Ao longo do seu trajeto entra em contato com diversos tipos de resíduos de origem industrial, doméstica e agrícola. Anualmente cerca de 50 mil metros cúbicos de lixo e terra são depositados no Arroio Dilúvio, comprometendo a qualidade da água do arroio. Com isso, a população microbiana presente nas águas do Arroio Dilúvio pode ser determinante para o desenvolvimento da população. A presença de bactérias patogênicas resistentes no Arroio Dilúvio já foi previamente descrita em diferentes trabalhos, sendo assim comprovada a importância dos estudos que avaliem a microbiota local no que se refere as leveduras.

No ambiente aquático, a maioria das investigações sobre resistência a antimicrobianos é destinada à presença de bactérias por estas serem as maiores causadoras de surtos de doenças de veiculação hídrica. Portanto, este trabalho se justifica pela importância social e econômica do Arroio Dilúvio para a população de Porto Alegre, sendo importante a identificação de leveduras oportunistas e resistentes que possam estar presentes nestes locais.

1.1 Objetivo Geral

Avaliar a presença de leveduras oportunistas presentes em amostras de água coletadas ao longo percurso do Arroio Dilúvio.

1.2 Objetivos Específicos

a) Isolar leveduras presentes em amostras de água coletadas em diferentes pontos do Arroio Dilúvio, em dois períodos distintos do ano.

b) Determinar a presença de leveduras pertencentes ao filo Ascomycota,

c) Avaliar a capacidade de termotolerância a 37°C e verificar a presença de fatores de virulência pela atividade das enzimas hidrolíticas, fosfolipase e proteinase nos isolados.

c) Verificar o padrão de suscetibilidade das leveduras por fungigrama e concentração inibitória mínima frente a diferentes antifúngicos.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Água

A água existente na terra é heterogênea e constante variando a forma de armazenamento e o estado em que é encontrada. Segundo a Organização das Nações Unidas (2014), 97,5% da água encontrada no mundo está nos oceanos na forma de água salgada, enquanto que somente 2,5% da água mundial é doce. A maior parte de água doce está armazenada em geleiras e lençóis subterrâneos, e somente uma pequena quantidade é de fácil acesso e disponível na forma de rios e lagos (Oki & Kanae, 2006).

A água é de importância vital para o desenvolvimento populacional e ambiental e, portanto a preservação, qualidade e disponibilidade deste recurso natural é indispensável. Segundo Bertoldo et al. (2004), a quantidade e a qualidade da água disponível para diversos usos são fundamentais para o desenvolvimento econômico e social de uma cidade. Entretanto, o impacto da urbanização é um fator determinante na perda da qualidade e degradação dos

recursos hídricos disponíveis nos grandes centros urbanos (Vieira et al., 2006; Silveira, 2000).

Na distribuição mundial de água o Brasil é considerado um dos países com a mais extensa área de água doce, com 12% da água doce disponível no planeta e o maior fluxo interno de recursos hídricos do mundo (Jordão et al., 2007; Noronha et al., 2006; Tundisi, 2008;).

Devido ao aumento de diferentes fontes contaminantes despejadas em recursos hídricos se faz necessário o monitoramento constante das fontes naturais de água. Sendo assim, para que se possa garantir a qualidade da água e prevenir danos que comprometam o equilíbrio dos ambientes aquáticos e vida dos seres vivos (Jordão et al., 2007; Theron & Cloete, 2002).

2.2 Qualidade da Água

O rápido desenvolvimento humano, industrial e agrícola produzem diversos resíduos que comprometem a qualidade e aceleram a contaminação dos recursos hídricos disponíveis originando um dos principais problemas ambientais enfrentados atualmente (Vieira et al., 2006; Medeiros et al., 2012; Schwarzenbach, et al., 2006; UNWATER, 2010). A escassez das fontes de água doce projetado aos desafios urbanos determinam a necessidade de propor medidas ambientais e socioeducativas que auxiliem na melhoria dos mananciais hídricos superficiais e subterrâneos (Nascimento & Naime, 2009). Segundo Blume et al. (2010), a qualidade de vida da população está diretamente relacionada com a disponibilidade e qualidade da água oferecida. Com isso, o desafio de fornecer água de qualidade, sem a presença de

contaminantes para as áreas urbanas toma uma proporção global, que desafia constantemente as redes de distribuição hídrica dos grandes centros urbanos (McDonald, et al., 2011; Meisen et al., 2011).

Os ecossistemas e a população em geral, são ambos dependentes da água de rios e lagos, que além de ser escassa, está sendo ameaçada por descarte imprudente de resíduos industriais e de esgoto doméstico (Jordão et al., 2007). Essas práticas dificultam a recuperação da qualidade da água para a reutilização nas necessidades ambientais e humanas (Pontara et al., 2011; Jordão et al., 2007).

Segundo a Organização das Nações Unidas (2010), a cada dez pessoas no mundo, uma não possui acesso a água potável, além disso, cerca de 2.5 bilhões de habitantes não possuem acesso ao saneamento básico. Cerca de 80% do esgoto gerado em países em desenvolvimento são depositados diretamente em corpos d'água, expondo a população a doenças de veiculação hídrica (UNWATER, 2014; Pereira et al., 2009).

As infecções que podem ser transmitidas resultantes da contaminação de recursos hídricos colocam comunidades inteiras em risco sendo as gastroenterites as doenças microbianas mais comuns associadas a transmissão por veiculação hídrica (Theron & Cloete, 2002). Cerca de 88% das mortes causadas por diarreia no mundo, afetando principalmente as crianças de até 5 anos, são consequência da falta de saneamento básico e má distribuição de água doce (UNWATER, 2014).

No Brasil, estima-se que 87% da população brasileira morem em áreas urbanas e, destas, aproximadamente 13% não possuem acesso a saneamento básico. Nas áreas rurais, somente 44% da população possui acesso a saneamento básico. Além disso, 52% dos brasileiros não possuem coleta de esgoto e somente 38% do esgoto que é coletado é tratado corretamente (ONUBR, 2014). A falta de saneamento básico ocasiona um elevado custo para a saúde pública no Brasil e gerou no ano de 2011 aproximadamente 400 mil casos de diarreia em todo o país (ONUBR, 2014).

A constante poluição dos recursos hídricos faz com que o sistema de abastecimento e distribuição de água potável tenha que garantir a ausência de patógenos capazes de comprometer a saúde da população (Pereira et al., 2009). Para isso, são utilizados métodos de avaliação da qualidade microbiana da água, padronizados pela de *American Public Health Association* – (APHA).

Na análise microbiológica, os indicadores de qualidade da água mais utilizados mundialmente são baseados na presença de coliformes totais e fecais, que indicam a presença de poluição fecal oriundas de fezes humanas e de outros animais de sangue quente (Vasconcellos, 2006). A determinação da presença e da origem da contaminação fecal é um fator determinante no manejo e controle de qualidade das fontes de água, possibilitando a identificação das fontes poluidoras das águas superficiais (Vilanova et al., 2002).

Devido à importância que a água exerce sobre o desenvolvimento humano, econômico e ambiental, o monitoramento e fiscalização da presença

de contaminantes nas águas superficiais se faz necessário, visando à prevenção de futuras doenças e evitando assim, a degradação dos recursos ambientais existentes (Oki & Kanae, 2005; Schwarzenbach, et al., 2006).

2.3 Arroio Dilúvio

A bacia hidrográfica do Arroio Dilúvio é a mais importante da região metropolitana de Porto Alegre devido à sua contribuição econômica e social à cidade (Moreira, 2008). Em Porto Alegre são delimitadas 27 sub-bacias hidrográficas, sendo o Arroio Dilúvio o curso fluvial responsável por escoar as águas de uma vasta área.

O curso principal do Arroio Dilúvio possui 17.605 m de extensão e sua nascente encontra-se no interior do Parque Saint' Hilaire, localizado na divisa dos municípios de Porto Alegre e Viamão (Basso et al., 2011). O Arroio recebe vários afluentes como os arroios Mato Grosso, Moinho, Cascatinha, Águas Mortas entre outros afluentes que acabaram desaparecendo sob a cidade (DEP, 2013). Além disso, o Arroio abastece a Barragem Lomba do Sabão, com seu deságue junto ao Lago Guaíba, entre os parques Marinha do Brasil e Maurício Sirotsky Sobrinho (Harmonia) (Menegat, 2006).

Ao longo da sua história, o Arroio Diúvio, antes chamado de Arroio Jacareí, devido à presença de jacarés na enseada da Rua Praia de Belas, sofreu diversas modificações quanto ao seu curso, entorno e manejo (Pereira, 1995; Brandão & Kindel, 2010). Antigamente, o Arroio Dilúvio desaguava na Ponta da Cadeia, ao lado da Usina do Gasômetro, passando antes sob a Ponte

de Pedra, que ligava os bairros à zona sul, e está localizada no atual Largo dos Açorianos (DEP, 2014; Devos et al., 2010).

Na primeira metade do século XX, iniciou-se a canalização do Arroio Dilúvio e alteração da sua foz, com o objetivo de evitar as constantes cheias no período de chuvas, comprometendo diversas áreas da cidade de Porto Alegre (Devos et al., 2010). Atualmente a área canalizada do Arroio é de aproximadamente 12 km, com 17 pontes ao longo do seu percurso percorrendo 10 bairros altamente urbanizados (Moreira, 2008; DEP, 2014).

Segundo o Departamento de Esgotos Pluviais (2014) de Porto Alegre, o Arroio Dilúvio recebe anualmente cerca de 50.000 m³ de terra e lixo em suas águas ao longo do seu curso na Avenida Ipiranga, além de carregar o esgoto cloacal de três bairros para o lago Guaíba. Isso implica na necessidade de limpeza e dragagem constante do Arroio. Sendo assim, desde outubro de 2006 a dragagem permanente do Arroio Dilúvio é realizada, e cerca de 300,5 mil toneladas de material e entulho já foram retirados do leito e da foz do Arroio (DEP, 2014).

Segundo Campana & Tucci (2001), o Arroio Dilúvio é um exemplo de curso d'água, pois devido a sua largura e pequena profundidade, durante a estiagem, há a deposição de sedimentos no canal de toda a bacia, o que reduz a capacidade de escoamento durante as enchentes. Sendo assim, quando ocorre uma grande precipitação, o Arroio Dilúvio fica mais suscetível a alagamentos e inundações nas áreas do seu entorno (Moreira, 2008).

A deterioração das águas do Arroio Dilúvio, seja pela presença de sedimentos, lixo e outros contaminantes prejudica gravemente a biota local influenciando uma vasta área ambiental e comprometendo a qualidade da água do Arroio (Silveira, 2000; Moreira, 2008; Devos, et al., 2010).

2.4. Leveduras em Água Doce

A maior preocupação para os consumidores de água doce refere-se à qualidade da água que está sendo distribuída para consumo, quanto à contaminação de microrganismos patogênicos (Hageskal et al., 2009). A possível transmissão de infecções que podem ser oriundas da água contaminada colocam comunidades inteiras em risco e ressaltam o alerta para o tratamento adequado desta (Pereira et al., 2009; Theron & Cloete, 2002; Yamaguchi et al., 2007).

O monitoramento da qualidade da água é feita pelos indicadores coliformes totais e fecais. Entretanto, esses indicadores estão começando a se mostrar ineficientes, pois alguns microrganismos potencialmente prejudiciais à saúde não são detectados (Theron & Cloete, 2002).

Segundo Hagler (2006), uma alternativa que pode ser utilizada para assegurar a qualidade da água é a utilização de leveduras associadas a fezes de animais de sangue quente que indicam a contaminação por esgoto doméstico, e podem ser um complemento aos ensaios de coliformes totais e fecais. Ainda segundo o autor, é surpreendente como pouco uso foi feito das leveduras como indicadores ambientais de qualidade, uma vez que apresentam uma vasta distribuição, são de fácil cultivo e a quantidade de leveduras que já

foi estudada no ambiente. Outro fator importante é que as leveduras podem ser mais resistentes a fatores abióticos e bióticos em água doce, e juntamente com os coliformes auxiliariam para indicar a qualidade ambiental de ecossistemas aquáticos (Brandão et al., 2010).

As leveduras são amplamente distribuídas no ambiente, porém não uniformemente e diferentes habitats tendem a abrigar comunidades de leveduras distintas. Portanto, é possível evidenciar diferença na presença de leveduras em água doce livre de poluição e águas contaminadas (Medeiros et al., 2008). Segundo Woollet & Hedrick (1970), águas poluídas possuem um aumento nas comunidades de leveduras. Sendo assim, quando há a contaminação oriunda de dejetos humanos, há a presença de leveduras associadas a animais de sangue quente, que em sua maioria incluem espécies de leveduras fermentativas (Hagler, 2006).

Alguns estudos avaliaram a presença de leveduras em amostras de água coletadas em rios e lagos e associaram a capacidade de crescimento a 37°C com a presença de indicadores fecais. Além disso, foi possível verificar uma correlação entre os parâmetros utilizados com a presença de poluição fecal, provavelmente de origem doméstica e urbana, comprovando assim a possível utilização de leveduras como indicadores de qualidade da água (Coelho et al., 2010; de Almeida et al., 2005; Brandão et al., 2010). Entretanto, Pontara et. al (2011), evidenciou a ausência de coliformes totais e fecais e a presença de leveduras e fungos filamentosos oportunistas em amostras de água mineral coletadas no estado de São Paulo. Segundo o autor, é

necessária uma reavaliação do critério utilizado para analisar a microbiota presente na água mineral, pois nem sempre os indicadores de coliformes são capazes de demonstrar a ausência de microrganismos potencialmente prejudiciais. Além disso, estas águas podem ser consideradas como possíveis vias de transmissão de fungos filamentosos e leveduras, e podem constituir um potencial risco para a saúde da população, principalmente para os indivíduos com imunidade comprometida (Yamaguchi et al., 2007).

Diversos estudos já evidenciaram a ocorrência e identificação de leveduras em água potável, água mineral engarrafada, água de torneira, água de rios e lagos e em sistemas de distribuição de água e ressaltam a importância de se conhecer a diversidade ambiental desses microrganismos (Kanzler et al., 2008; Medeiros et al., 2008; Brandão et al., 2010; Yang, et al., 2011; Pontara et al., 2011; Coelho et al., 2010; Ishida et al., 2013). A capacidade de adaptação demonstrada por leveduras permitiram sua presença em todos os habitats aquáticos, com diferenças nas comunidades impostas pelas condições físicas e químicas de cada ambiente (Boguslawska-was & Dabrowski, 2001).

No Brasil, trabalhos analisaram amostras de água oriundas de rios, lagos, garrafas de água mineral e de água de torneira, e evidenciaram a crescente contaminação de origem industrial, doméstica e agrícola das fontes analisadas, com o isolamento de leveduras oportunistas, em alguns casos com resistência a antifúngicos (Medeiros et al., 2008; Brandão et al., 2010; Medeiros et al., 2012; Yamaguchi et al., 2007; Pontara et al., 2011). Além disso,

ênfatisam a importância do conhecimento da microbiota dos ambientes aquáticos, a diversidade de leveduras encontradas e a preocupação com a veiculação de microrganismos potencialmente patogênicos (Medeiros et al., 2012; Yamaguchi et al., 2007; Pontara et al., 2011). Segundo Hageskal (2009), é importante conhecer a diversidade de fungos e leveduras presentes nas diferentes fontes de água disponíveis, pois esses microrganismos podem auxiliar na detecção da qualidade da água. Portanto, estes microrganismos podem ser capazes de comprometer a saúde da população, alterar o odor e o gosto das águas de consumo, além da capacidade de formar biofilme que resulta em uma aderência e resistência aos tratamentos de água utilizados.

O aumento de indivíduos com a imunidade comprometida facilita a disseminação e o aumento do número de doenças de origem fúngica. Com isso, diversos estudos realizados vem avaliando a presença de microrganismos oportunistas em diferentes ambientes como banheiros públicos, em diferentes tipos de solos, em diferentes fontes de água doce, em ambientes marinhos etc. (Pires-Gonçalves et al., 2008; Medeiros et al., 2008; Maciel et al., 2013; Gerhardt et al., 2012). Para os trabalhos que observaram a presença de leveduras oportunistas em amostras de água doce, foi constatado uma crescente resistência aos antifúngicos comumente utilizados na prática clínica. (Medeiros et al., 2008; Medeiros et al., 2012; Pontara et al., 2011). Segundo Hagler (2006), leveduras do gênero *Candida*, especialmente *Candida albicans*, estão associadas à contaminação com os ambientes aquáticos, sendo *C.*

parapsilosis isolada frequentemente de águas com altos índices de poluição fecal.

Embora não seja um problema epidemiológico grave se comparado a presença de bactérias, vírus e parasitas em amostras de água, a presença de possíveis leveduras oportunistas, juntamente com a capacidade de resistência a antifúngicos e sobrevivência em habitats aquáticos deve ser monitorada pois podem comprometer a saúde da população.

2.4.1 Gênero *Candida*

O gênero *Candida* pertence ao Reino Fungi, filo Ascomycota, classe Saccharomycetes e ordem Saccharomycetales (NCBI Taxonomy, 2011). Este gênero compreende mais de 150 espécies, entretanto uma pequena minoria é causadora de candidíase em humanos (Silva et al., 2012; Lim et al., 2012; Bondaryk et al., 2013).

As leveduras do gênero *Candida* estão distribuídas amplamente em diversos ecossistemas, sendo isolados de solos, rios, mares, alimentos e vivendo como comensais na pele, trato gastrointestinal e urinária de humanos (Miceli et al., 2011; Lim et al., 2012). O gênero *Candida* é composto por um grupo heterogêneo de organismos, e mais de 17 espécies diferentes são conhecidas por causarem infecções em humanos (Sardi et al., 2013). Destas as principais espécies de interesse clínico são *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida tropicalis* (Silva et al., 2012; Barbedo & Sgarbi, 2010).

As espécies de interesse clínico são consideradas comensais, entretanto podem ser consideradas patógenos oportunistas, que possuem a habilidade de causar infecções superficiais e sistêmicas devido a presença de fatores próprios de virulência e fatores predisponentes do hospedeiro (Huang & Kao, 2012; Miceli et al., 2011). Em ordem de estabelecer infecção no hospedeiro, as leveduras oportunistas do gênero *Candida* dependem de fatores de virulência tais como: a aderência às células do hospedeiro pela presença de adesinas, formação de biofilme no tecido alvo, a capacidade de crescimento a 37°C, formação de hifas e pseudohifas dificultando a fagocitose e facilitando a fixação nos epitélios, e a produção de enzimas hidrolíticas capazes de causar danos teciduais ao hospedeiro (Silva et al., 2012; Sardi et al., 2013).

As principais enzimas hidrolíticas encontradas em *Candida* são as fosfolipases e proteinases. As fosfolipases são capazes de hidrolizar os fosfoglicerídeos provocando danos no tecido do hospedeiro, ruptura das membranas das células epiteliais, promovendo a lise celular. As proteinases degradam as substâncias presentes na pele e mucosa (colágeno, queratina e mucina) do hospedeiro, bem como os componentes imunes (citocinas, anticorpos e complemento) favorecendo a penetração tecidual (Mohan & Ballal, 2008; Ballal & Vinitha, 2009; Mattei et al., 2013).

Candida albicans é a espécie de interesse clínico mais isolada, sendo comensal e patógeno causando doença em humanos (Silva et al., 2012; Bondaryk et al., 2013). Entretanto, nos últimos anos, o número de infecções ocasionadas por espécies de *Candida* não-*albicans* estão se tornando mais

frequentes (Negri et al., 2012; Krcmery & Barnes, 2002). A prevalência de espécies não-*albicans* ocasionando candidíase em pacientes hospitalares vem sendo descrita por diversos autores (Antunes et al., 2004; Furlaneto et al., 2011; Hinrichsen et al., 2009; Pfaller et al., 2001). No estudo realizado por Hinrichsen et al. (2009), em dois hospitais da cidade de Recife, os autores observaram a prevalência no número de espécies não-*albicans* isoladas de pacientes com candidíase, sendo *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermondii* as espécies encontradas.

Segundo Silva et al. (2012), o aumento do envolvimento de espécies não-*albicans* em candidíase pode estar relacionado com o avanço nos métodos diagnósticos, como a utilização de meios de cultura específicos para diferenciação das espécies, bem como com o avanço nas técnicas moleculares para identificação do diagnóstico de rotina das infecções fúngicas. Entretanto, o aumento da incidência de leveduras não-*albicans* pode estar relacionado com o surgimento de resistência a certos medicamentos antifúngicos que são sensíveis para *C. albicans*, com a versatilidade de adaptação em diferentes habitats e a variação das espécies isoladas dependendo da região geográfica e o grupo de pacientes coletados (Miceli et al., 2011; Silva et al., 2012).

Sendo assim, o monitoramento constante do comportamento das espécies de *Candida* em diferentes ambientes é relevante para o sucesso no uso terapêutico e na prevenção de novos casos de candidemias, garantindo o controle e diminuindo a disseminação das doenças causadas por esses microrganismos oportunistas.

2.5 Resistência aos Antifúngicos

A descoberta e utilização de agentes antimicrobianos é um dos maiores avanços na medicina moderna. Entretanto, a utilização descontrolada desses fármacos resultou em um aumento da incidência de microrganismos resistentes entre uma população previamente suscetível (Huang & Kao, 2012). Além disso, a resistência antimicrobiana tem sido um fator determinante no sucesso da terapia antifúngica.

Com a vasta utilização de medicamentos eficazes para o tratamento de doenças e complicações ocasionadas por leveduras, atualmente há uma preocupação crescente perante os relatos de leveduras apresentando resistência a antifúngicos utilizados pela população (Medeiros et al., 2008). Segundo Spampinato & Leonardi (2013), embora as drogas antifúngicas usadas nos tratamentos clínicos possam ser diversas apenas alguns agentes antifúngicos são utilizadas de fato para as infecções causadas por leveduras, especialmente as originadas por *Candida* spp. O desenvolvimento de novos agentes antifúngicos é limitado devido a vários fatores incluindo problemas de identificação de um agente efetivo que atue em células eucarióticas fúngicas sem ser tóxica para as células do hospedeiro (Silva et al., 2012). Sendo assim, a limitação na utilização de novos antifúngicos auxilia no desenvolvimento da resistência por leveduras.

A resistência antifúngica pode ser definida como microbiológica e clínica. Microbiológica quando o crescimento do agente patogênico é inibido por uma concentração de antimicrobiano superior ao intervalo observado em

cepas selvagens, e clínica quando o agente patogênico é inibido por uma concentração antimicrobiana que é maior do que a dose normal utilizada com segurança (Pfaller, 2012). Os mecanismos de resistência podem ser de origem primária ou secundária. Resistência primária, ou intrínseca, é encontrada naturalmente entre certos fungos e leveduras, sem que haja uma primeira exposição à droga, como a resistência de *Candida krusei* ao fluconazol. A resistência secundária, ou adquirida, é desenvolvida entre isolados previamente suscetíveis após a exposição ao agente antifúngico, e normalmente é dependente da expressão de genes alterados (Kanafani & Perfect, 2008; Sanglard & Odds, 2002; Pfaller et al., 2012). A resistência de *Candida albicans* ao fluconazol é um exemplo de resistência adquirida.

Os fungos podem tornar-se resistentes a cada uma das drogas antifúngicas por mecanismos específicos, dependendo do modo de ação de cada fármaco. O alvo dos polienos nas células é o ergosterol, onde o antifúngico liga-se no ergosterol localizado na membrana celular fúngica levando a formação de poros, aumentando a permeabilidade da membrana, o dano oxidativo e levando a perda de conteúdo celular (Bondaryk et al., 2013). O mecanismo de resistência a esses fármacos é pela diminuição do teor de ergosterol na membrana, reduzindo a suscetibilidade aos polienos. Essa diminuição está associada a mutações nos genes *erg3* e *erg6* que codificam algumas enzimas envolvidas na biossíntese do ergosterol (Spampinato & Leonardi, 2013). As equinocandinas são responsáveis por inibir a 1,3 β -D glicano sintase, enzima que forma os polímeros de glicano da parede celular

fúngicas, levando a ruptura das células e lise osmótica (Denning, 2003). Mutações no gene *fks1* que codifica uma subunidade do complexo 1,3 β -D glicano sintase, diminuem a suscetibilidade dos fungos a estes fármacos (Perlin, 2007).

Os antifúngicos da classe dos azóis atuam inibindo a enzima lanosterol 14 α -desmetilase do citocromo P450 dos fungos, alterando a membrana celular fúngica (Pfaller, 2012). Esta enzima é responsável pela biossíntese de esteróis, na conversão de lanosterol em ergosterol. A resistência aos azóis é mediada por mecanismos distintos, tais como: mutações ou superexpressão do gene *erg11*, causando a substituição de aminoácidos resultando em alterações da enzima esterol 14 α -desmetilase e diminuindo a afinidade dos azóis por esta enzima (Bondaryk et al., 2013). A redução do acúmulo dos azóis dentro da célula fúngicas ocorre através de dois tipos de bombas de efluxo, como os transportadores da Superfamília dos Facilitadores Maioritários (MFS) que utilizam gradiente de prótons como fonte de energia, e os transportadores ABC que utilizam ATP para transportar as substâncias da droga para fora da célula.; mutações no gene *erg3*, que resultam em membranas celulares fúngicas desprovidas de ergosterol, contendo outros tipos de esteróis e diminuindo assim a suscetibilidade a estes fármacos.

Diversos mecanismos são utilizados pelos fungos para resistirem aos fármacos disponíveis, impondo um desafio constante na busca e renovação de alternativas que possam auxiliar no tratamento de doenças

fúngicas (Kanafani & Perfect, 2008). A capacidade de adaptação, conjunta com a resistência originada por fatores ambientais pela substituição de espécies suscetíveis por resistentes, permanece um desafio para a medicina moderna (Bondaryk et al., 2013; Pfaller, 2012). Portanto, é necessário que haja um monitoramento da presença de microrganismos com resistência nos diversos ambientes, para que se possa acompanhar e desenvolver alternativas no manejo e controle dos patógenos oportunistas.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Micologia Ambiental do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

3.1. Local e coleta das amostras:

As amostras de água foram coletadas em dois períodos distintos, no mês de setembro de 2012 (coleta 1- inverno) e mês de fevereiro de 2013 (coleta 2- verão). Os pontos de coleta foram selecionados devido a presença de hospitais localizados ao longo do Arroio Dilúvio. Foi realizado coleta em 3 pontos distintos, com triplicata por cada ponto (Figura 1):

1. Cruzamento da Av. Ipiranga próximo com a Av. Érico Veríssimo;
2. Cruzamento entre as Rua Santana e Av. Ipiranga;
3. Av. Ipiranga próximo a Rua Nelson Duarte Brochado.

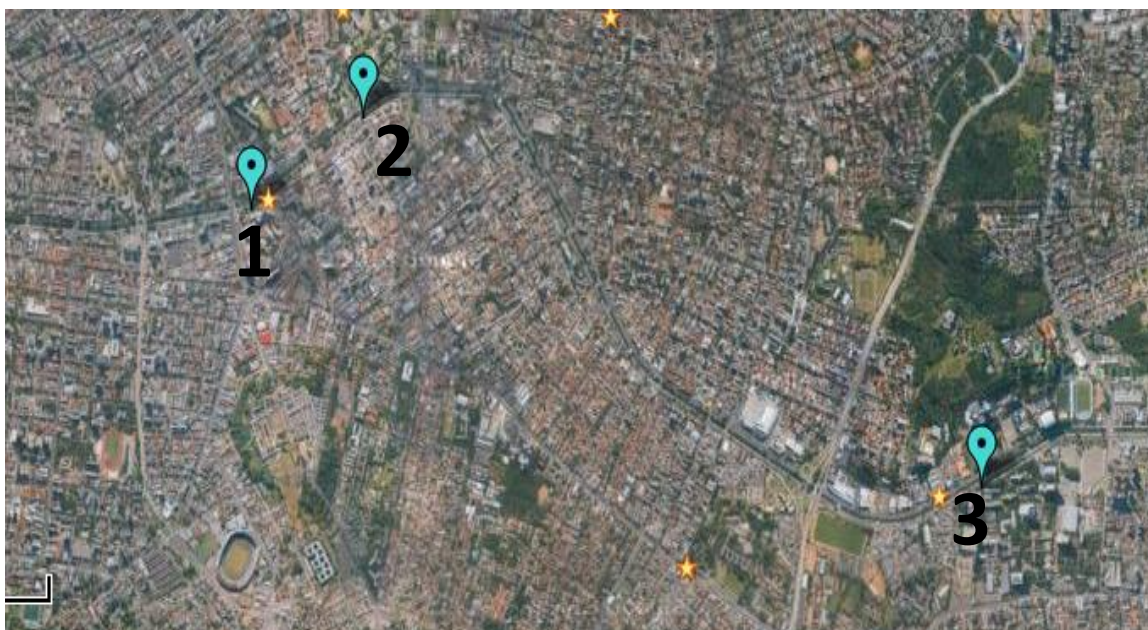


Figura 1- Mapa da localização dos três pontos coletados ao longo do Arroio Dilúvio em Porto Alegre/RS. Fonte: Google Maps.

Foram coletados aproximadamente 500mL de água em cada um dos locais selecionados. As amostras foram mantidas sob refrigeração e encaminhadas para o Laboratório de Micologia Ambiental para análise microbiológica, e para o Laboratório Toxilab para avaliação dos parâmetros físico-químicos.

3.2 Isolamento das leveduras

Logo após as coletas, as amostras sofreram diluições seriadas de até 10^{-3} . Alíquotas de 100 μ L da água bruta e de todas as diluições foram semeadas, pelo método de espalhamento em superfície, em placas de Petri, em dois meios de cultura enriquecidos: ágar Sabouraud e ágar malte extrato de levedura (YMA), ambos acrescidos com 0,2% de cloranfenicol, para inibição do crescimento bacteriano. As placas foram mantidas a temperatura ambiente por cinco dias. Os ensaios foram realizados em triplicata por ponto (Figura 2)



Figura 2- Amostras coletadas em triplicata (A, B, C) em cada ponto ao longo do Arroio Dilúvio. Fonte: Acervo pessoal.

Após o período de incubação, as colônias crescidas nas placas foram visualizadas em um microscópio estereoscópico e cinco leveduras morfológicamente distintas foram selecionadas por placa. Cada colônia selecionada foi isolada novamente pela técnica de esgotamento em placas contendo os mesmos meios de cultura descritos anteriormente. Após crescimento, as leveduras foram confirmadas quanto a sua pureza pela visualização em lâminas a fresco em microscópio ótico com aumento de 400X. Uma vez confirmada à pureza da cultura, os isolados foram armazenados em glicerol 20% e mantidos em freezer a -20°C . Uma alíquota dos isolados foi semeada em placas contendo meio ágar Sabouraud e armazenadas sob refrigeração para posterior manipulação.

3.3 Análises Físico-Química

Para análise físico-química, foram utilizadas alíquotas de água de todos os pontos coletados. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Análises Toxilab em Porto Alegre. Os parâmetros analisados foram: Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Demanda Química de Oxigênio (DQO) e a presença de Nitrogênio Total.

3.4 Identificação das Leveduras

A identificação das leveduras foi baseada em testes que avaliam características morfológicas e fisiológicas descritas por Yarrow (1998).

3.4.1 Teste de Urease e Diazônio Azul B (DBB)

Para a realização do ensaio de urease, foi utilizado meio sólido em tubo inclinado contendo uréia. Para o preparo do ensaio, foi adicionado 2,25 mL de meio base em tubos de vidro que foram autoclavados. Após a esterilização, foi adicionado em cada tubo 0,25 mL de solução de uréia a 10% previamente filtrada, homogeneizou-se e inclinou-se os tubos deixando solidificar. O inóculo foi adicionado e os tubos foram mantidos a 25°C por três dias sendo as leituras realizadas diariamente. Quando a enzima urease encontrava-se presente, ocorria alcalinização do meio de cultura pela utilização da uréia adicionada ao meio. Essa modificação de pH do meio acaba interferindo na coloração do meio, que passava de rosa para branco pela adição do indicador de pH (fucsina ácida) presente no meio de cultura (Page et al., 2006).

Após análise do teste de urease, os mesmos tubos foram incubados a 60°C por 18 horas para realização do teste Diazônio Azul B (DBB) com o objetivo de separar as leveduras pertencentes ao filo Ascomycota e Basidiomycota através da observação da coloração da colônia. Quando retirados os tubos de incubação, foi adicionado 1 mL de solução contendo o corante DBB e Tris-HCL 1M pH 7,0 sobre o inóculo. As culturas que apresentaram uma coloração avermelhada após o contato com a solução foram consideradas positivas, enquanto que aquelas que não modificaram sua coloração foram consideradas negativas (Yarrow, 1998).

3.4.2 Capacidade de Crescimento a 37°C

O teste de crescimento a 37°C foi realizado em placa de Petri com a utilização do meio de cultura ágar glicose peptona extrato de leveduras (GPY) conforme descrito por Yarrow (1998). Os isolados foram inoculados no meio de cultura e incubados a 37°C por quatro dias. A avaliação de crescimento foi realizada considerando positivos os isolados que apresentaram crescimento no meio de cultura.

3.5 Fatores de Virulência

Para determinação da presença de fatores de virulência, foram realizados os testes para verificar a atividade da fosfolipase e proteinase. Estes ensaios foram realizados para todos os isolados que apresentaram a capacidade de crescimento a 37°C, pela técnica de picada (Mohan & Ballal, 2008).

3.5.1 Determinação da Atividade da Fosfolipase

A capacidade de apresentar fosfolipase foi realizada através da utilização do meio contendo gema de ovo. O meio base foi autoclavado e após atingir a temperatura de 50°C foi adicionado 20 mL de solução de gema de ovo (10 mL de gema de ovo e 10 mL de água destilada estéril). Os isolados foram inoculados pela técnica de picada. Quando o isolado era capaz de utilizar a fosfolipase, produzia uma zona de precipitação ao redor da colônia, caracterizando um resultado positivo. A falta de precipitação ao redor da colônia era interpretada como um resultado negativo.

3.5.2 Determinação da Atividade da Proteinase

Para identificar a atividade de proteinase, o meio de cultura utilizado foi baseado conforme descrito por Mohan & Ballal (2008). Inicialmente, o meio base foi preparado e esterilizado sem a adição de albumina sérica bovina (BSA). Após o meio de cultura atingir a temperatura de aproximadamente 50°C foi adicionado uma solução de BSA (20 mL de água destilada em 2 g de BSA) previamente filtrada com membrana 0,22µm. Os isolados foram inoculados pela técnica de picada, em placas de Petri e mantidos a 37°C por 6 dias. Após o período de incubação, foi adicionada à placa uma solução contendo o corante amido preto e em seguida descorada com solução contendo ácido acético e água. Os isolados capazes de utilizar esta enzima produziam um halo transparente ao redor da colônia, sendo interpretados como positivo. A ausência de halo foi considerada como resultado negativo para o teste realizado.

3.7 Teste de Suscetibilidade aos Antifúngicos

As leveduras foram testadas quanto à suscetibilidade aos antifúngicos, pelo método de fungigrama e concentração inibitória mínima.

3.7.1 Fungigrama

Para avaliar a suscetibilidade dos isolados ambientais a agentes antifúngicos, foi realizado o ensaio de disco-difusão em ágar. Foram utilizados discos de antifúngicos (BIO-RAD) de fluconazol, voriconazol, anfotericina B e nistatina. O ensaio foi realizado sempre em duplicata e seguindo as normas preconizadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, M44-A2). Foram utilizadas placas contendo o meio ágar Mueller-Hinton com 2% de glicose e azul de metileno, onde foi inoculada uma suspensão de células na concentração 0,5 na escala de McFarland. Os discos foram adicionados no meio de cultura e as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. A leitura das placas foram realizadas pela medição do halo de inibição com o auxílio de um paquímetro. Os resultados foram expressos em suscetível (S), suscetibilidade dose-dependente (SDD) e resistente (R). Os critérios de interpretação para fluconazol e voriconazol foram baseados no documento M44-S3 (2012) do CLSI. Para os demais antifúngicos, os critérios de interpretação foram baseado nas recomendações do fabricante (Tabela 1).

Tabela 1- Classificação de suscetibilidade para o teste de fungigrama de acordo com a interpretação do diâmetro da zona de inibição dos antifúngicos selecionados.

Antifúngicos	Diâmetro da Zona de Inibição (mm)		
	Suscetível	Suscetibilidade Dose-Dependente	Resistente
Anfotericina B*	>10	-	≤ 10
Nistatina*	>10	-	≤ 10
Voriconazol	≥ 17	14-16	≤ 13
Fluconazol	≥ 19	15-18	≤ 14

*Recomendações do fabricante (Bio-Rad).

3.7.2 Ensaio da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A detecção da CIM foi realizada segundo a norma M27-A3 do CLSI (2008). Foram utilizadas microplacas estéreis de 96 poços com fundo em “U”. O ensaio foi realizado para os antifúngicos fluconazol, anfotericina B, voriconazol, cetoconazol e itraconazol. Os antifúngicos anfotericina B, voriconazol, cetoconazol e itraconazol foram preparados separadamente por solubilização do fármaco em dimetilsulfóxido (DMSO) para obter-se uma concentração de 1600µg/mL. Para a preparação da solução-estoque do fluconazol, o antifúngico foi diluído em água destilada estéril em uma concentração de 6400 µg/mL.

As soluções-estoque dos antifúngicos utilizados foram diluídos em RPMI 1640 tamponado (pH 7.0), com o tampão MOPS (0,165 M). Para anfotericina B, cetoconazol, voriconazol e itraconazol as concentrações finais

variaram de 0,0313 a 16 µg/mL e para o fluconazol a concentração final variou de 0,125 a 64 µg/mL.

Foram distribuídos 100 µL de meio RPMI-1640, previamente filtrado, nas microplacas a serem testadas. Em seguida foi pipetado 100 µL dos antifúngicos, ajustados na concentração preconizada pela CLSI M27-A3 (2008) e feita a diluição seriada.

A preparação do inóculo foi realizada com colônias crescidas em ágar Sabouraud por 24 horas. Uma solução salina 0,85% foi preparada e a ela adicionou-se o inóculo, originando uma suspensão de células ajustadas na escala 0,5 de McFarland, em uma concentração equivalente de 1×10^6 a 5×10^6 cel/mL. Em seguida, a suspensão foi diluída em meio RPMI-1640, 1:50 e 1:20 originando uma concentração final de $2,5 \times 10^3$ cel/mL. Em cada um dos poços, nas microplacas, foi adicionando 100 µL desta suspensão. Como controle de qualidade da atividade antifúngica dos fármacos utilizados, foram adicionadas em cada ensaio *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258. As microplacas foram incubadas a 35°C por 48 horas e após foram realizadas as leituras do ensaio. Os pontos de corte para a interpretação dos resultados foi baseado no documento M27-S4 (2012) do CLSI (Tabela 2).

Tabela 2- Classificação de suscetibilidade para o teste de concentração inibitória mínima de acordo com os pontos de corte do CLSI, para os cinco antifúngicos testados.

Antifúngicos	Suscetível	Suscetibilidade Dose-Dependente	Resistente
	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)
Anfotericina B	$\leq 1,0$	-	$\geq 2,0$
Cetoconazol	$\leq 8,0$	-	$\geq 16,0$
Itraconazol	$\leq 0,125$	0,25-0,5	$\geq 1,0$
Voriconazol	$\leq 0,125$	0,25-0,5	$\geq 1,0$
Fluconazol	$\leq 2,0$	4	$\geq 8,0$

3.8 Análise Estatística

A análise estatística dos dados obtidos nas coletas foram analisados pelo teste de Tukey com probabilidade de 90%. Nos ensaios referentes a urease, DBB, crescimento a 37°C, fosfolipase e proteinase foi feita análise por ANOVA, fator duplo sem repetição, com probabilidade de 95%.

4-RESULTADOS

4.1 Isolamento das leveduras

Das amostras de água coletadas foram isoladas 193 leveduras, destas 77 pertencentes as amostras coletadas no período de inverno e 116 do verão. O número de isolados selecionados em cada ponto de coleta pode ser observado na Tabela 3.

A partir dos dados obtidos nas coletas, foi realizada a média do número de isolados coletados em cada ponto nas estações do ano e o teste de Tukey, onde foi possível observar a variação entre as estações do ano e os pontos de coletados (Figura 3). No ponto 1 obteve-se o menor número de isolados (6/77) no inverno diferindo dos demais, no entanto observou-se um aumento no número de leveduras isoladas (28/116) na estação verão.

Quando analisado o ponto 2, observou-se o mesmo número de isolados em ambas as coletas, sendo este o local onde foi obtido o maior número tanto na coleta de inverno (46/77), quanto na coleta de verão (46/116). Com relação ao ponto 3, embora visualizada diferença entre as estações do

ano com aumento na coleta de verão, estatisticamente esta diferença não foi significativa (Figura 3).

Tabela 3- Número total de leveduras selecionadas por ponto coletado, nas diferentes estações do ano.

Locais das Coletas	Estações do Ano	
	Inverno	Verão
Ponto 1	6	28
Ponto 2	46	46
Ponto 3	25	42
Número Total de Isolados	77	116

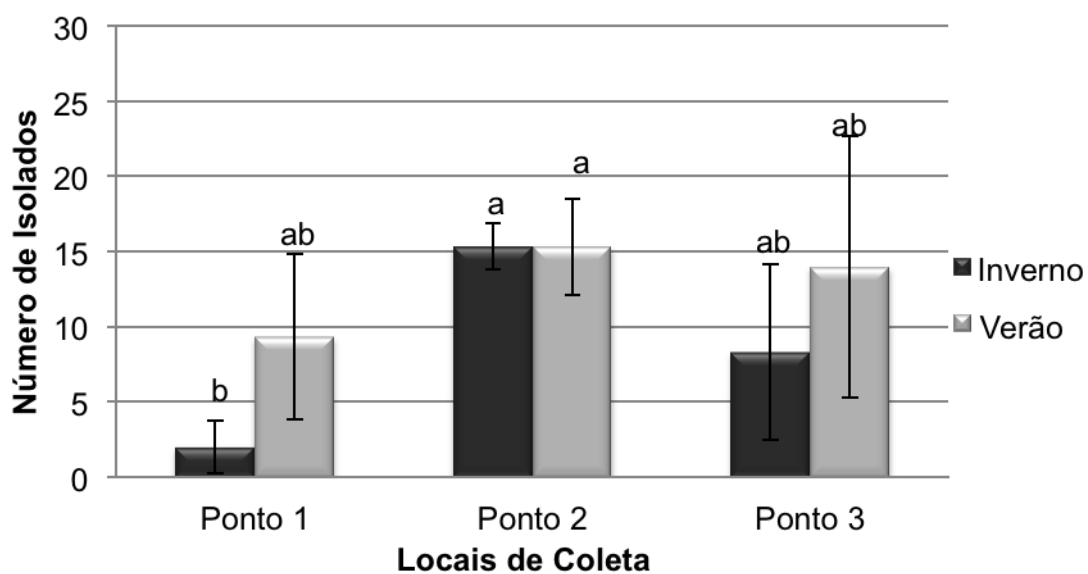


Figura 3- Número médio de isolados obtidos nos pontos coletados nas estações do ano de inverno e verão realizados no Arroio Dilúvio. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($\alpha > 0,1$).

3.3 Análise Físico-Química

Os resultados obtidos da análise físico-química referente a DBO, DQO e nitrogênio total das amostras de água do Arroio Dilúvio encontra-se Tabela 4. É possível observar as diferenças entre os parâmetros analisados quando comparadas as coletas nas diferentes estações do ano. Com relação aos pontos coletados no mesmo período, não há diferenças entre os dados obtidos.

Tabela 4- Análises físico-química das águas do Arroio Dilúvio referente aos pontos das coletas realizadas nos períodos de inverno e verão.

	Inverno			Verão		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3
DBO mg O ₂ /L	46,5	46,5	46,5	<0,1	<0,1	<0,1
DQO mg O ₂ /L	154,9	154,9	154,9	<3	<3	<3
Nitrogênio Total mg/L	13,7	15,4	14,9	8,45	9,20	8,53

Pontos de coleta: P1- av. Érico Veríssimo; P2- Rua Santana; P3- Rua Nelson Duarte Brochado. Análise realizada pelo laboratório TOXILAB.

Os resultados obtidos para a DBO no presente trabalho mostraram valores mais elevados na coleta de inverno (46,5mg/L), valor este observado para todos os pontos coletados neste período. Os dados de DBO referentes a estação verão, não foram detectados pelo teste realizado, com valores inferiores a 0,1mg/L, resultado este que também se manteve em todos os pontos coletados neste período.

A DQO na coleta do inverno apresentou valores elevados assim como a DBO se mantendo em todos os pontos. Os dados obtidos quanto a

presença de nitrogênio total mostram um aumento na coleta de inverno, sendo observado o maior índice no ponto de coleta 2 (15,4mg/L) (Tabela 4).

3.4 Identificação das Leveduras

Para uma triagem inicial na identificação preliminar das leveduras isoladas foram realizados os testes de urease e diazônio azul B (DBB) juntamente com a avaliação de crescimento a 37°C.

O perfil dos isolados para os testes de urease, DBB e crescimento a 37°C estão descritos na Tabela 5 para a coleta de inverno e Tabela 6 para a coleta realizada no verão.

Tabela 5-Resultados dos testes bioquímicos e de temperatura realizados para os isolados coletados no período de inverno do Arroio Dilúvio.

Isolados	Urease	DBB	37°C	Isolados	Urease	DBB	37°C
I1B2	-	-	-	I2B16	+	-	+
I2A4	-	-	-	I2B17	+	-	+
I2A6	-	-	-	I2B18	+	-	+
I2A11	-	-	-	I2B19	+	-	+
I2A13	-	-	-	I2B21	+	-	+
I2C1	-	-	-	I2C5	+	-	+
I2C4	-	-	-	I3B1	+	-	+
I2C6	-	-	-	I3A3	+	-	+
I2C7	-	-	-	I3C4	+	-	+
I2C17	-	-	-	I3C5	+	-	+
I2C28	-	-	-	I3C7	+	-	+
I3A5	-	-	-	I3C11	+	-	+
I3A10	-	-	-	I1C1	+	-	-

Tabela 5: Continuação – Resultados dos testes bioquímicos e de temperatura realizados para os isolados coletados no período de inverno do Arroio Dilúvio.

I3B2	-	-	-	I2A1	+	-	-
I3B7	-	-	-	I2A3	+	-	-
I3C2	-	-	-	I2A7	+	-	-
I3C13	-	-	-	I2A10	+	-	-
I1B3	-	-	+	I2B5	+	-	-
I2A8	-	-	+	I2B6	+	-	-
I2C12	-	-	+	I2B7	+	-	-
I3A9	-	-	+	I2B15	+	-	-
I3A11	-	-	+	I2C24	+	-	-
I3B5	-	-	+	I3C6	+	-	-
I3C1	-	-	+	I3C12	+	-	-
I3C3	-	-	+	I3C14	+	-	-
I3C9	-	-	+	I1C2	+	+	-
I3C10	-	-	+	I1C5	+	+	-
I1B1	+	-	+	I2C2	+	+	-
I2A2	+	-	+	I2C8	+	+	-
I2A9	+	-	+	I2C23	+	+	-
I2A12	+	-	+	I2A5	+	+	+
I2A14	+	-	+	I2B1	+	+	+
I2A15	+	-	+	I2C3	+	+	+
I2B4	+	-	+	I2C25	+	+	+
I2B9	+	-	+	I3A4	+	+	+
I2B10	+	-	+	I3C8	+	+	+
I2B11	+	-	+	I3C15	+	+	+
I2B12	+	-	+				
I2B13	+	-	+				
I2B14	+	-	+				

Tabela 6- Resultados dos testes bioquímicos e de temperatura realizados para os isolados coletados no período de verão do Arroio Dilúvio.

Isolados	Urease	DBB	37°C	Isolados	Urease	DBB	37°C	Isolados	Urease	DBB	37°C
V1A1	-	-	-	V3B10	-	-	-	V2B2	+	-	+
V1A2	-	-	-	V3C2	-	-	-	V2C9	+	-	+
V1A3	-	-	-	V3C5	-	-	-	V2C11	+	-	+
V1A4	-	-	-	V3C7	-	-	-	V2C14	+	-	+
V1C3	-	-	-	V3C8	-	-	-	V3A1	+	-	+
V1C5	-	-	-	V1A5	-	-	+	V3A4	+	-	+
V1C6	-	-	-	V1A9	-	-	+	V3A7	+	-	+
V1C9	-	-	-	V1A11	-	-	+	V3A8	+	-	+
V2A1	-	-	-	V1B1	-	-	+	V3A10	+	-	+
V2A3	-	-	-	V1B2	-	-	+	V3A21	+	-	+
V2A4	-	-	-	V1C1	-	-	+	V3B3	+	-	+
V2A6	-	-	-	V1C2	-	-	+	V3B4	+	-	+
V2A7	-	-	-	V1C4	-	-	+	V3C1	+	-	+
V2A9	-	-	-	V1C7	-	-	+	V3C6	+	-	+
V2A11	-	-	-	V1C8	-	-	+	V3C9	+	-	+
V2A12	-	-	-	V2A5	-	-	+	V1A6	+	-	-
V2B1	-	-	-	V2A8	-	-	+	V1A7	+	-	-
V2B4	-	-	-	V2B3	-	-	+	V1A8	+	-	-
V2B6	-	-	-	V2B5	-	-	+	V1A10	+	-	-
V2B7	-	-	-	V2B10	-	-	+	V1A13	+	-	-
V2B8	-	-	-	V2B14	-	-	+	V1A14	+	-	-
V2B9	-	-	-	V2B15	-	-	+	V1A15	+	-	-
V2B11	-	-	-	V2B16	-	-	+	V2A10	+	-	-
V2B12	-	-	-	V2B17	-	-	+	V2A13	+	-	-
V2B13	-	-	-	V2C4	-	-	+	V2C13	+	-	-

Tabela 6: Continuação - Resultados dos testes bioquímicos e de temperatura realizados para os isolados coletados no período de verão do Arroio Dilúvio.

V2B18	-	-	-	V2C7	-	-	+	V3A2	+	-	-
V2B19	-	-	-	V3A5	-	-	+	V3B12	+	-	-
V2C1	-	-	-	V3A6	-	-	+	V1B4	+	+	-
V2C2	-	-	-	V3A12	-	-	+	V2A2	+	+	-
V2C3	-	-	-	V3A16	-	-	+	V3A9	+	+	-
V2C6	-	-	-	V3A17	-	-	+	V3A13	+	+	-
V2C8	-	-	-	V3A18	-	-	+	V3A14	+	+	-
V2C10	-	-	-	V3A19	-	-	+	V3B11	+	+	-
V2C15	-	-	-	V3A20	-	-	+	V2C5	+	+	+
V3A3	-	-	-	V3A23	-	-	+	V3A24	+	+	+
V3A11	-	-	-	V3B8	-	-	+	V3B7	+	+	+
V3A15	-	-	-	V3B9	-	-	+				
V3A22	-	-	-	V3C3	-	-	+				
V3B5	-	-	-	V1A12	+	-	+				
V3B6	-	-	-	V1B3	+	-	+				

Dos 193 isolados obtidos em ambas as coletas, 105 apresentaram resultado negativo para o teste da urease e para a reação ao DBB, enquanto que 21 isolados somente foram positivos para ambos os testes. Para as 77 leveduras isoladas no inverno, 35% (n=27) foram negativas tanto para urease quanto DBB (Figura 4), 49% (n=38) apresentaram resultado positivo para urease e negativo para DBB e somente 16% (n=12) foram positivos para ambos os testes (Figura 4). Com relação a coleta realizada no verão, das 116 leveduras coletadas, 78 isolados (67%) apresentaram resultado negativo para urease e DBB, 29 (28%) foram urease positiva e DBB negativo e 9 (8%) isolados apenas foram positivos para urease e DBB (Figura 4).

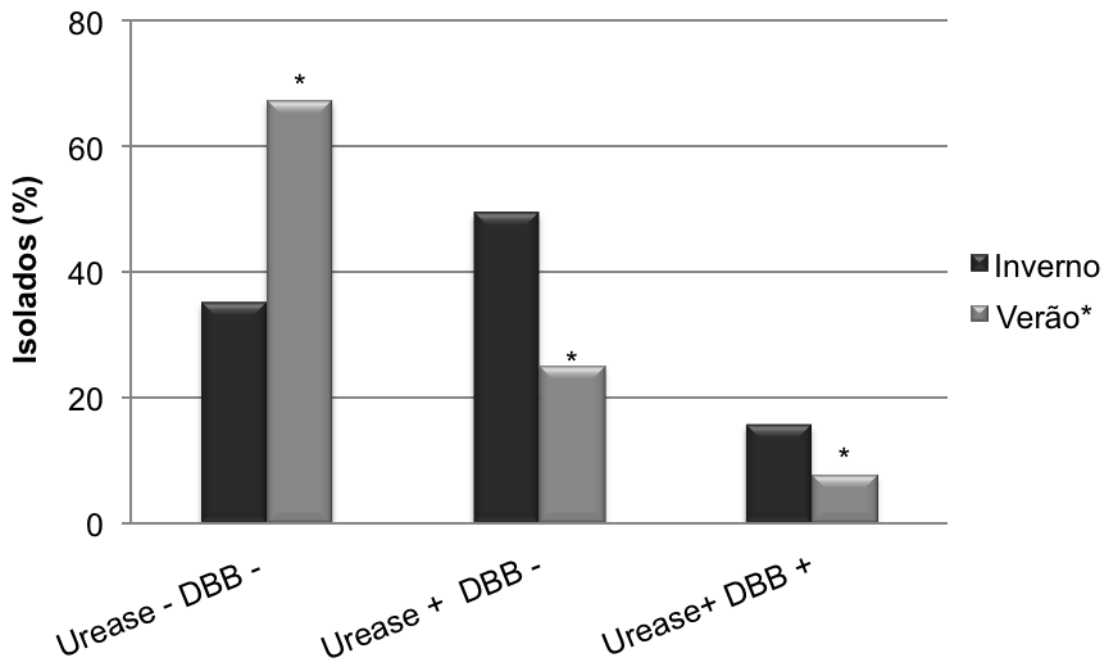


Figura 4 - Diferentes perfis observados nas leveduras testadas para urease e DBB com relação às estações do ano inverno e verão. *Coleta com resultado estatístico significativo pelo teste de Anova fator duplo sem repetição ($\alpha > 0,05$).

Com relação ao ensaio de termotolerância a 37°C, número de leveduras positivas para este teste foi elevado (n=97), quando comparado ao número total de isolados (n=193) (Tabela 7). A coleta do verão apresentou maior número de isolados positivos em relação a coleta de inverno quando observado o número total de isolados. Destes isolados positivos, 42 (n=193) foram coletados no inverno e 55 (n=193) no verão (Tabela 7). Para este ensaio houve diferença estatisticamente significativa entre as estações do ano.

A distribuição de isolados positivos para o ensaio de termotolerância a 37°C de cada local coletado pode ser observada na Figura 5. Foi possível observar que o ponto 3 apresentou um maior número de isolados com crescimento a 37°C em ambas as coletas, 64% na coleta de inverno (16/25) e 60% (25/42) no verão (Figura 5).

Tabela 7- Número total de isolados obtidos nas coletas realizadas e no ensaio de termotolerância a 37°C.

Coletas	Isolados	Crescimento a 37°C
Inverno	77	42
Verão*	116	55
Total	193	97

*Coleta com resultado estatístico significativo pelo teste de Anova fator duplo sem repetição ($\alpha > 0,05$).

Dos três locais de coleta no período de inverno, no ponto 1 obteve-se o menor número de isolados com capacidade de crescimento a 37°C (2/6), enquanto que no verão 46% (13/28) das leveduras encontradas neste ponto foram positivas para este ensaio (Figura 5). Entretanto, no ponto 2 a presença de leveduras positivas na coleta de inverno foi maior que na de verão, com 52% (24/46) e 39% (18/46) respectivamente. Os isolados positivos para este ensaio foram selecionados para os testes de fatores de virulência.

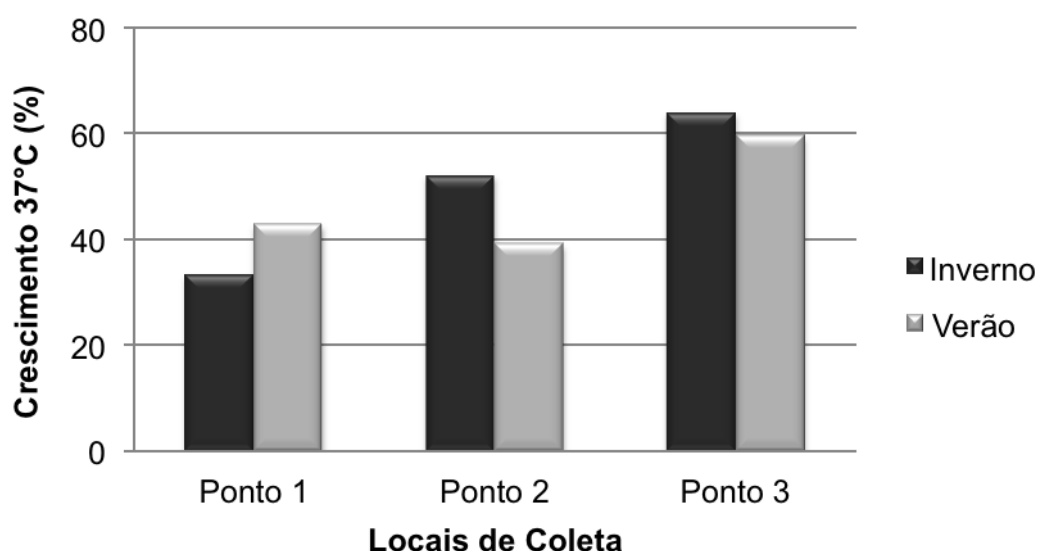


Figura 5- Porcentagem de leveduras positivas para crescimento a 37°C em relação ao número total de isolados por ponto coletado no inverno e no verão.

3.5 Fatores de Virulência

Os ensaios para fosfolipase e proteinase foram realizados em placas de Petri contendo os meios específicos para ambas. Pela importância da presença dos fatores de virulência em leveduras com potencial oportunista, este ensaio foi realizado com o objetivo de verificar a presença de isolados potencialmente virulentos e oportunistas.

A atividade da fosfolipase foi determinada pela zona de precipitação ao redor da colônia (Figura 6A), enquanto que para a proteinase a atividade foi determinada pelo halo opaco formado ao redor da colônia que não foram corados após a coloração, sendo resultado da degradação da proteína presente no meio (Figura 6B).

Das leveduras testadas correspondente ao período de inverno (n=42), 19% foram positivas pra fosfolipase, 19% para proteinase, e 10% foram positivas para ambas as enzimas (Tabela 8). O número de isolados positivos na coleta de verão foi superior ao observado no inverno, onde 31% (17/55) foram positivos para fosfolipase, 24% (13/55) positivos para proteinase e 16% (9/55) foram positivos para ambos os fatores de virulência testados (Tabela 8).

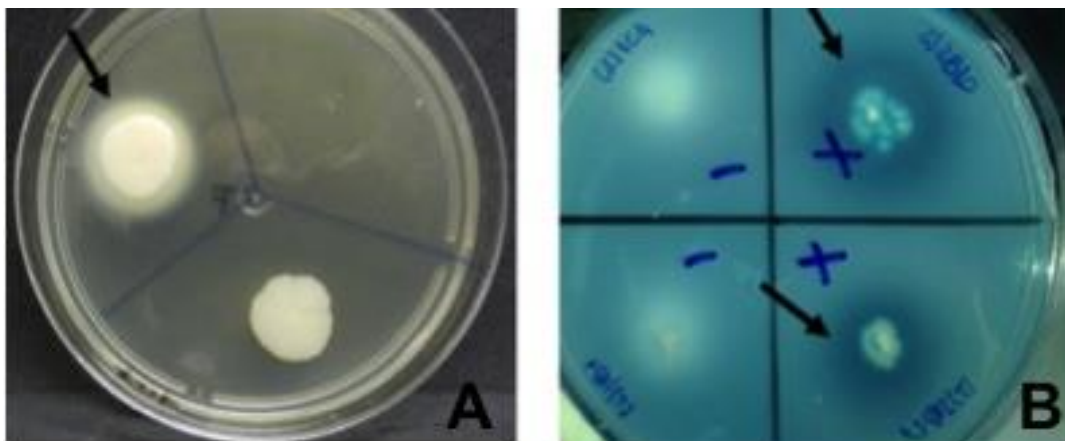


Figura 6- Fatores de virulência testados. (A) Halo formado pelo isolado V2B10 no ensaio de fosfolipase (superior esquerdo); (B) Halo formado pelo isolado V2B10 (superior direito) e pelo isolado V2B17 (inferior direito) no ensaio de proteinase.

Tabela 8- Resultados positivos obtidos dos ensaios para fosfolipase e proteinase das leveduras testadas.

	Inverno		Verão	
	Isolados	%	Isolados	%
Fosfolipase e Proteinase +	4	10	9	16
Fosfolipase +	8	19	17	31
Proteinase +	8	19	13	24
Nº total de isolados testados	42		55	

Para os próximos ensaios somente foram selecionadas as leveduras que apresentaram resultados positivos para fosfolipase, proteinase ou para ambas. Os isolados com perfis negativos foram descartados.

Com os resultados obtidos nos ensaios de urease, DBB, termotolerância a 37°C, fosfolipase e proteinase, foram selecionados 50 isolados que apresentaram relação aos ascomicetos, com potencial oportunista

e capacidade de apresentar fatores de virulência com o intuito de analisar a suscetibilidade destes isolados através dos ensaios de CIM e fungigrama.

3.7 Testes de Resistência aos Antifúngicos

A partir dos ensaios de triagem iniciais, urease, DBB, crescimento a 37°C e fatores de virulência, foram selecionadas 50 leveduras para serem submetidos os ensaios de suscetibilidade aos antifúngicos escolhidos através da técnica de fungigrama e concentração inibitória mínima. Das coletas realizadas no inverno e verão, 17 e 33 isolados respectivamente foram selecionados para os testes de sensibilidade aos antifúngicos.

No ensaio de fungigrama observou-se que dos 17 isolados referentes a coleta de inverno testados, 18% (3/17) apresentaram resistência ao voriconazol e 23% (4/17) ao fluconazol. Para os antifúngicos anfotericina B e nistatina, todas as leveduras testadas foram sensíveis (Tabela 9).

Dos 33 isolados pertencentes a coleta do verão, 6% (2/33) foram resistentes ao voriconazol e ao fluconazol, 6% apresentaram sensibilidade dose dependente ao fluconazol e anfotericina B. Para os demais isolados, todos foram sensíveis a anfotericina B e nistatina (Tabela 10).

Tabela 9- - Resultados obtidos no fungigrama dos isolados da coleta de inverno no Arroio Dilúvio.

<i>Locais Coletados</i>	<i>Isolados</i>	<i>Anfotericina B</i>	<i>Voriconazol</i>	<i>Fluconazol</i>	<i>Nistatina</i>
Ponto 1	I1B1	S	R	R	S
	I1B3	S	S	S	S
Ponto 2	I2A8	S	R	R	S
	I2A9	S	S	S	S
	I2B4	S	S	S	S
	I2B10	S	S	S	S
	I2B11	S	S	S	S
	I2B12	S	S	S	S
	I2B18	S	S	S	S
	I2B21	S	S	R	S
	I2C5	S	S	S	S
Ponto 3	I3A9	S	S	S	S
	I3A11	S	S	S	S
	I3B1	S	S	S	S
	I3B5	S	R	R	S
	I3C4	S	S	S	S
	I3C9	S	S	S	S

S = suscetível; SDD= suscetibilidade dose-dependente; R = resistente.

Tabela 10- Resultados obtidos no ensaio de fungigrama dos isolados referentes a coleta de verão do Arroio Dilúvio.

	Isolados	<i>Anfotericina B</i>	<i>Voriconazol</i>	<i>Fluconazol</i>	<i>Nistatina</i>
Ponto 1	V1A5	S	S	S	S
	V1A9	S	S	S	S
	V1A11	S	S	S	S
	V1A12	S	S	S	S
	V1B2	S	S	S	S
	V1C2	SDD	S	S	S
Ponto 2	V2A8	S	S	S	S
	V2B5	SDD	S	S	S
	V2B10	S	R	R	S
	V2B14	S	R	R	S
	V2B15	S	S	S	S
	V2B16	S	S	S	S
	V2B17	S	S	S	S
	V2C4	S	S	S	S
	V2C6	S	S	SDD	S
	V2C7	S	S	S	S
	V2C8	S	S	S	S
	V2C9	S	S	S	S
	V2C11	S	S	SDD	S
	V2C14	S	S	S	S
Ponto 3	V3A1	S	S	S	S
	V3A5	S	S	S	S
	V3A6	S	S	S	S
	V3A7	S	S	S	S
	V3A8	S	S	S	S
	V3A18	S	S	S	S
	V3A21	S	S	S	S
	V3A23	S	S	S	S
	V3B3	S	S	S	S
	V3B4	S	S	S	S
	V3C1	S	S	S	S
	V3C6	S	S	S	S
	V3C9	S	S	S	S

S = suscetível; SDD= suscetibilidade dose-dependente; R = resistente.

Para o teste de CIM, o perfil de sensibilidade das leveduras foi realizado conforme ensaio de microdiluição em caldo segundo o CLSI (2008). O teste foi realizado para os 50 isolados (17 coleta de inverno e 33 verão), com cinco antifúngicos comercialmente disponíveis.

As leveduras no ensaio de CIM, em sua grande maioria, foram sensíveis aos antifúngicos testados, e somente foi observado resistência ao fluconazol e itraconazol. Dos 50 isolados testados, 15 foram resistentes ao fluconazol e 15 resistentes ao itraconazol (Tabela 11 e 12).

Para a anfotericina B e o cetoconazol, todas as leveduras testadas apresentaram sensibilidade a estes fármacos. Resultados semelhantes foram observados para o voriconazol, para o qual 82% dos isolados se mostraram sensíveis e nenhum caso de resistência foi observado. Entretanto, 18% dos isolados apresentaram sensibilidade dose-dependente para o voriconazol.

Nos dados obtidos referente a coleta de inverno, observou-se que 41% (7/17) dos isolados foram resistentes ao fluconazol e itraconazol, enquanto que coleta de verão 24% (8/33) foram resistentes para ambos os antifúngicos. O isolado V1A12, obtido da coleta realizada no verão, foi o único encontrado com alto grau de resistência ao fluconazol (CIM \geq 64 μ g/mL), apresentando resistência também ao itraconazol e sensibilidade dose-dependente ao voriconazol (Tabela 13).

Não foram observados isolados resistentes ao voriconazol. Entretanto, os isolados que apresentaram sensibilidade dose-dependente a este fármaco, foram resistentes ao fluconazol e itraconazol. A exceção foi o isolado I3C9 que não apresentou resistência ao fluconazol.

Através dos resultados obtidos no fungigrama e no CIM, somente para o fluconazol foi observado perfil de resistência semelhante para 3 isolados em ambos os testes. Os isolados I2B21 e I3B5 da coleta de inverno foram resistentes tanto no fungigrama quanto no CIM para este antifúngico. Já para os isolados da coleta no período do verão, o isolado V2B14 foi o único que apresentou resistência ao fluconazol no fungigrama e CIM.

Tabela 11- Perfis de susceptibilidade obtidos no ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) para as leveduras isoladas no inverno frente aos antifúngicos testados.

Locais Coletados	Isolados	Antifúngicos				
		ANFO	CET	ITR	VOR	FLU
Ponto 1	I1B1	S	S	S	S	S
	I1B3	S	S	SDD	S	R
Ponto 2	I2A8	S	S	S	S	S
	I2A9	S	S	S	S	SDD
	I2B4	S	S	S	S	S
	I2B10	S	S	S	S	SDD
	I2B11	S	S	S	S	S
	I2B12	S	S	S	S	S
	I2B18	S	S	R	SDD	R
	I2B21	S	S	R	SDD	R
Ponto 3	I2C5	S	S	R	SDD	R
	I3A9	S	S	S	S	S
	I3A11	S	S	R	S	R
	I3B1	S	S	R	S	R
	I3B5	S	S	R	S	R
	I3C4	S	S	S	S	SDD
	I3C9	S	S	R	SDD	SDD

ANF=anfotericina B; CET=cetoconazol; ITR=itraconazol; VOR=voriconazol; FLU = fluconazol. Perfil de susceptibilidade estabelecido de acordo com o CLSI: S = suscetível; SDD = suscetibilidade dose-dependente; R = resistente.

Tabela 12- - Perfis de suscetibilidade obtidos no ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) para as leveduras isoladas no verão frente aos antifúngicos testados.

Local Coletado	Isolados	Antifúngicos				
		ANFO	CET	ITR	VOR	FLU
Ponto 1	V1A5	S	S	S	S	SDD
	V1A9	S	S	S	S	SDD
	V1A11	S	S	S	S	S
	V1A12	S	S	R	SDD	R
	V1B2	S	S	S	S	S
	V1C2	S	S	R	S	R
Ponto 2	V2A8	S	S	S	S	S
	V2B5	S	S	S	S	S
	V2B10	S	S	SDD	S	SDD
	V2B14	S	S	R	S	R
	V2B15	S	S	SDD	S	SDD
	V2B16	S	S	R	SDD	R
	V2B17	S	S	S	S	SDD
	V2C4	S	S	S	S	S
	V2C6	S	S	R	SDD	R
	V2C7	S	S	S	S	S
	V2C8	S	S	R	SDD	R
	V2C9	S	S	R	SDD	R
	V2C11	S	S	S	S	SDD
	V2C14	S	S	S	S	S
Ponto 3	V3A1	S	S	S	S	S
	V3A5	S	S	S	S	S
	V3A6	S	S	S	S	S
	V3A7	S	S	SDD	S	SDD
	V3A8	S	S	S	S	S
	V3A18	S	S	S	S	S
	V3A21	S	S	S	S	S
	V3A23	S	S	S	S	S
	V3B3	S	S	R	S	R
	V3B4	S	S	S	S	S
	V3C1	S	S	S	S	S
	V3C6	S	S	S	S	S
	V3C9	S	S	S	S	S

ANF=anfotericina B; CET=cetoconazol; ITR=itraconazol; VOR=voriconazol; FLU = fluconazol. Perfil de susceptibilidade estabelecido de acordo com o CLSI: S = suscetibilidade; SDD = suscetibilidade dose-dependente; R = resistente.

Tabela 13- Valores das concentrações inibitórias mínimas (CIM - µg/mL) para os 50 isolados testados frente aos antifúngicos.

Isolado	ANFO	CET	ITR	VOR	FLU
I1B1	0.125	0.0625	0.125	0.125	4
I1B3	0.125	0.0625	0.5	0.125	16
I2A8	0.125	0.125	0.0625	0.0625	4
I2A9	0.125	0.0625	0.125	0.125	4
I2B4	0.0313	0.0625	0.0625	0.125	2
I2B10	0.0625	0.0313	0.0625	0.125	4
I2B11	0.0313	0.0313	0.0313	0.0313	0.5
I2B12	0.0625	0.0313	0.125	0.0625	1
I2B18	0.0313	0.0625	1	0.25	8
I2B21	0.125	0.5	1	0.25	32
I2C5	0.5	0.125	2	0.25	8
I3A9	0.25	0.0313	0.125	0.0313	1
I3A11	0.5	0.0625	1	0.125	8
I3B1	0.25	0.0625	1	0.125	8
I3B5	0.125	0.0625	1	0.125	8
I3C4	0.5	0.0625	0.125	0.125	4
I3C9	0.5	0.0625	1	0.25	4
V1A5	0.5	0.125	0.125	0.125	4
V1A9	0.0313	0.0625	0.125	0.125	4
V1A11	0.0313	0.0313	0.125	0,06	1
V1A12	0.25	0.25	1	0.5	64
V1B2	0.25	0.0313	0.0313	0.0313	1
V1C2	0.0313	0.0313	1	0.0625	8
V2A8	0.0313	0.0313	0.0625	0.0313	0.5
V2B5	0.5	0.0313	0.125	0.0313	0.5
V2B10	0.0625	0.125	0.125	0.25	4
V2B14	0.0313	0.0625	2	0.125	8
V2B15	0.125	0.0313	0.25	0.0625	4
V2B16	0.0625	0.25	1	0.25	32
V2B17	0.5	0.0313	0.125	0.0313	4
V2C4	0.25	0.0313	0.125	0.0313	0.5
V2C6	0.25	0.25	2	0.5	16
V2C7	0.125	0.0313	0.125	0.0313	0.5
V2C8	0.125	0.25	1	0.5	32
V2C9	0.125	0.25	1	0.25	16
V2C11	0.0625	0.0625	0.125	0.125	4

V2C14	0.5	0.0313	0.125	0.0625	2
V3A1	0.0313	0.0625	0.125	0.0313	0.25
V3A5	0.25	0.0313	0.0625	0.0313	1
V3A6	0.125	0.0313	0.0625	0.0313	0.25
V3A7	0.5	0.0313	0.25	0.0313	4
V3A8	0.25	0.0313	0.125	0.0313	0.5
V3A18	0.25	0.0313	0.125	0.0313	1
V3A21	0.25	0.0313	0.125	0.0313	1
V3A23	0.25	0.0313	0.125	0.0313	0.5
V3B3	0.0313	0.0625	2	0.0625	8
V3B4	0.5	0.0625	0.125	0.0313	0.5
V3C1	0.25	0.0313	0.0625	0.125	1
V3C6	0.125	0.0313	0.0625	0.125	0.5
V3C9	0.0625	0.0313	0.0625	0.0313	0.125

ANFO=anfotericina B; CET=cetoconazol; ITR=itraconazol; VOR=voriconazol; FLU=fluconazol

5- DISCUSSÃO

O Arroio Dilúvio sofre constantemente com todo o tipo de resíduo nele é despejado. Oliveira et al., (2012) mostraram através da caracterização microbiológica das águas a contaminação das águas do Arroio Dilúvio em toda a sua extensão com exceção da sua nascente, onde a água encontra-se mais preservada, dentro do Parque Saint' Hilaire. A poluição do arroio contribui para que haja um aumento na diversidade da população microbiana presente nestas águas.

No presente trabalho foram isoladas 193 leveduras onde a coleta realizada no período do inverno observou-se o menor número de isolados. Estes resultados podem ser justificados pelo aumento da precipitação pluviométrica no período de inverno (Tabela 14). O aumento das chuvas observado no mês de setembro pode ter influenciado para que ocorresse uma diluição das águas do Dilúvio, e observou-se uma redução na concentração de leveduras isoladas. Medeiros et al. (2012) analisou a presença de leveduras em amostras de água do Rio Doce em Minas Gerais e observou o aumento de

isolados no período de seca, correlacionando a diminuição de leveduras encontradas com o aumento nos níveis de chuva nos períodos das coletas. Segundo Boguslawska-was & Dabrowski (2001), a diferença no isolamento de leveduras entre as estações do ano pode estar relacionada com a quantidade de matéria orgânica disponível para os fungos, a falta de competidores e a transferência passiva de microbiota da terra para a água.

Tabela 14- Precipitação pluviométrica dos meses de 2012 e 2013.

2012	Mês	Julho	Agosto	Setembro ¹	Outubro
	I.P	144,9	93,5	273,7	121,3
2013	Mês	Janeiro	Fevereiro ²	Março	Abril
	I.P	106,2	112,7	66,5	108,9

I.P: índice Pluviométrico (mm); ¹coleta 1 (inverno); ²coleta 2 (verão).

Fonte: 8º Distrito de Meteorologia – Instituto Nacional de Meteorologia (Inmet).

Além da variação no número de isolados coletados entre as estações, observou-se também uma variação entre os locais de coleta (Figura 3). Nos pontos 1 e 3 o número de leveduras isoladas foi distinto nas duas estações do ano, enquanto que no ponto dois esse número se manteve constante em ambos os períodos de coleta. Segundo Medeiros et al. (2012), os diferentes graus de qualidade da água encontrados nos ambientes aquáticos ocasionados pelo recebimento de diversos poluentes na forma de esgoto doméstico, efluentes industriais e agrícolas, pode influenciar diretamente na variabilidade da população microbiana, podendo assim ter influenciado nos resultados obtidos entre os locais de coleta no presente estudo.

Os parâmetros físico-químicos analisados das coletas do Arroio Dilúvio, demonstraram diferenças nos resultados entre as estações do ano (Tabela 2). A DBO determina a quantidade de oxigênio necessária para oxidar a matéria orgânica presente na água, sendo indispensável para monitorar os níveis de poluentes nas amostras de água (Agência Nacional Águas - ANA, 2014). No presente estudo foi observado uma DBO aumentada (46,5 mg/L) na coleta referente ao período de inverno, resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira et al. (2012), que evidenciaram um aumento no valor da DBO (35 mg/L) na coleta realizada em setembro de 2009 no Arroio Dilúvio. Entretanto, Bertoldo et al. (2004) avaliando a qualidade da água do Arroio Cadena em Santa Maria/RS, observaram um aumento de 30,5% na DBO na estação verão (11,8 mg/L) com relação ao inverno (8,2 mg/L). Segundo o autor, as estações do ano podem interferir na qualidade da água, devido a mudanças no clima e variações na vazão dos poluentes nos recursos hídricos, ocasionando assim variações entre os parâmetros físico-químicos.

Blume et al. (2010) avaliou a qualidade da água do Rio dos Sinos e observou um aumento da DBO nos pontos coletados com maior densidade populacional, indicando locais críticos para a contaminação devido aos despejos de esgotos não tratados nas águas do rio. Nascimento & Naime (2009), monitoraram as águas do arroio Pampa localizado em Novo Hamburgo/RS quanto ao parâmetro da DBO, e observaram uma variação nos valores obtidos permanecendo uma média de 50,3mg/L. Os autores constataram que em alguns pontos o valor observado de DBO eram comparáveis a esgoto doméstico, ressaltando a preocupação com a qualidade

das águas do arroio pois seu deságue localiza-se no Rio dos Sinos de onde é captada a água para abastecimento da região. Os dados obtidos no Arroio Dilúvio referentes à coleta de inverno ficaram próximos a média observada por Nascimento & Naime (2009), visto que tanto o Arroio Dilúvio quanto o Arroio Pampa sofrem com a constante poluição devido a passagem por entre bairros e cidades da região metropolitana.

Na coleta realizada no verão, foi observado o menor valor de DBO (<0,1mg/L). Este resultado pode ser devido à presença de grandes quantidades de sedimentos e diminuição dos volumes de água observados no dia da realização da coleta. Segundo Tucci et al. (1995), devido a largura e profundidade, durante os períodos de estiagem, o Arroio Dilúvio tem depositado no seu canal a produção de sedimentos da bacia. Sateles et al. (2006), sugerem que a quantidade e a natureza de sedimento influencia diretamente nos níveis de DBO, onde a presença de carga orgânica elevada impede a existência de oxigênio dissolvido no meio líquido, favorecendo a degradação da matéria orgânica por anaerobiose e diminuindo a DBO

A Demanda Química de Oxigênio (DQO) determina a quantidade de matéria orgânica suscetível à oxidação por meios químicos em uma amostra líquida. No Arroio Dilúvio a coleta realizada no verão obteve os menores índices de DQO observados (<3mg/L), enquanto que no inverno obteve-se os maiores valores (154,9mg/L). De acordo com a Portaria N° 05/89 da Secretaria da Saúde e do Meio Ambiente (SSMA) do Rio Grande do Sul, os limites máximos estabelecidos para DQO, estão entre ≤ 450 a ≤ 160 mg/L dependendo do volume de vazão do efluente poluidor. Dessa forma, embora o valor obtido

de DQO esteja alto (154,9mg/L), ainda está dentro dos valores estabelecidos pela SSMA. Entretanto, no estudo realizado por Oliveira et al. (2012), o resultado mais elevado de DBO obtido foi de 60mg/L, diferindo dos resultados obtidos no presente estudo, evidenciando que pode ter ocorrido uma contaminação maior do Arroio Dilúvio no período de coleta desse trabalho. Quanto mais próximos estiverem os valores de DBO e DQO, mais fácil será a biodegradação. Entretanto, observou-se elevada diferença entre os valores destes parâmetros na coleta de inverno. Segundo Sateles et al. (2006), o aumento da DQO pode estar relacionado a toxicidade do ambiente aquático, ocasionada por microrganismos como bactérias que possuem toxinas naturais. Outro fator que pode contribuir para o aumento da DQO segundo o autor, é a morte de grande quantidade de algas.

Nos corpos d'água o nitrogênio pode ocorrer nas formas de nitrogênio orgânico, amoniacal, nitrito e nitrato (ANA, 2014). Os compostos de nitrogênio são nutrientes importantes nos processos biológicos, e o lançamento em grandes quantidades de nitrogênio nos recursos hídricos, pode causar eutrofização, prejudicando o abastecimento público e a qualidade da água. Segundo a Agência Nacional Águas (2014), as principais fontes de nitrogênio nos corpos d'água são os esgotos sanitários, efluentes industriais e agrícolas. No Rio Grande do Sul o nível máximo estabelecido pela SSMA é de 10mg/L, sendo os resultados obtidos na coleta de inverno para os três pontos coletados superiores ao valor máximo estabelecido no estado. Jordão et al. (2007), observaram valores elevados de nitrogênio total (50mg/L) em determinados pontos coletados ao longo do rio Turvo Limpo em Minas Gerais. Os autores

sugerem que a variação nos valores de nitrogênio total está ligada com os diferentes tipos de poluentes que o rio recebe. Bertoldo et al. (2004) sugerem que o aumento do nitrogênio total é diretamente proporcional ao aumento da concentração de esgoto bruto, onde valores de nitrogênio total elevados podem influenciar diretamente na qualidade das águas, bem como na população microbiana presente.

Nos resultados obtidos do presente estudo para os testes de triagem iniciais, observou-se um elevado número de isolados urease e DBB negativos (Figura 4), sugerindo a prevalência de leveduras com relação aos ascomicetos. Resultado semelhante foi observado por De Almeida (2005) avaliando a comunidade de leveduras no estuário do Rio Tangus em Portugal, onde o autor constatou que a maioria das leveduras isoladas pertenciam ao Filo Ascomycota. Segundo o autor, não houve correlação entre as estações do ano e a prevalência da presença de leveduras com relação aos ascomicetos.

As leveduras que apresentaram termotolerância a 37°C isoladas do Arroio Dilúvio foi elevada, com diferença significativa entre as estações do ano, sendo o maior número de isolados positivos obtido no período do verão (Figura 5). Brandão et al. (2010), em estudo analisando a presença de leveduras oportunistas em fontes de água doce, através do ensaio de termotolerância a 37°C, observaram número elevado de leveduras com capacidade de crescimento nesta temperatura identificando como grupo prevalente as leveduras do gênero *Candida*, e associando a presença de leveduras oportunistas com a presença de coliformes fecais. Essa correlação também foi descrita por Coelho et al. (2010) que constataram a presença de leveduras que

crecem a 37°C com poluição fecal, e sugerindo que a principal fonte de contaminação por esses microrganismos seja do esgoto doméstico despejado em efluentes. Segundo Hagler (2006), as leveduras associadas com animais de sangue quente incluem várias espécies de leveduras fermentativas e há um aumento na proporção dessas em águas poluídas, indicando assim a origem da poluição e justificando a presença de leveduras com capacidade de crescimento a 37°C. Arvanitidou et al. (2005) analisando amostras de água de rios na Grécia, sugerem que a população e o número de leveduras isoladas é influenciado pela temperatura, pois há um aumento da concentração de leveduras em climas tropicais quando comparado com climas temperados. Diversos são os fatores que podem influenciar na população de leveduras em um mesmo ambiente, incluindo a possível migração e adaptação de leveduras consideradas de ambientes terrestres e restritos a humanos, para ambientes aquáticos (Coelho et al., 2010; Brandão et al., 2010).

Para selecionar as leveduras oportunistas, além dos ensaios descritos acima foi realizado ensaio para verificar presença de fatores de virulência, pela atividade das enzimas hidrolíticas fosfolipase e proteinase em todos os isolados que cresceram a 37°C. Diversos estudos analisaram a presença de enzimas hidrolíticas em isolados clínicos, pois facilitam a capacidade de estabelecer doença no hospedeiro, conferindo assim um determinado grau de virulência às leveduras (Ballal & Vinitha, 2009; Costa et al., 2010; Mattei et al., 2013; Mohan & Ballal, 2008). Entretanto, não há investigações quanto à atividade de fosfolipase e proteinase de leveduras oportunistas isoladas de ambientes aquáticos. A presença de fosfolipase e

proteínase são consideradas importantes fatores de virulência para leveduras do gênero *Candida*, possibilitando assim uma triagem para selecionar isolados oportunistas.

Mattei et al. (2013) analisando isolados clínicos de *Candida* spp. observaram que 73% dos isolados apresentaram atividade tanto para proteínase quanto para fosfolipase, diferentemente dos resultados obtidos no presente estudo, onde somente 13 isolados (n=97) foram positivos para ambas as enzimas. Além disso, poucos isolados foram capazes de apresentar atividade para fosfolipase ou para proteínase separadamente. Estes resultados sugerem que as leveduras ambientais potencialmente oportunistas podem ter uma diminuição da expressão dessas enzimas, sendo menos virulentas que isolados clínicos devido ao ambiente em que foram isoladas. Entretanto, Mohan & Ballal (2008) sugerem que a virulência de leveduras oportunistas não é atribuída somente a um fator, mas sim a uma combinação de vários fatores, como proteínase, fosfolipase, formação de biofilme, termotolerância, etc. Sendo assim, outros fatores de virulência podem estar atuando nos isolados obtidos do Arroio Dilúvio.

Dos 193 isolados iniciais encontrados nas coletas do Arroio Dilúvio, somente 50 apresentaram resultados satisfatórios nos ensaios anteriores, sendo assim estas leveduras foram testadas frente a antifúngicos pelo ensaio de fungigrama e concentração inibitória mínima (CIM). Embora a técnica de disco difusão para fungigrama seja descrita pela CLSI, a técnica de microdiluição em caldo continua sendo preconizada para verificar perfil de suscetibilidade aos antifúngicos, uma vez que os valores padronizados no teste

de disco difusão são somente para caspofungina, fluconazol e voriconazol. Neste estudo foram incluídos outros antifúngicos usados na prática clínica, e utilizado os valores de halo sugeridos pelo fabricante.

No presente trabalho, foi observado de um modo geral, para o ensaio de disco difusão, um perfil de sensibilidade para anfotericina B e nistatina. Entretanto, foram verificados perfis de resistência nos isolados para os antifúngicos voriconazol e fluconazol, 18% e 23% referente aos isolados da coleta de inverno respectivamente, e 6% para ambos os fármacos da coleta de verão. Em um estudo realizado por Demitto et al. (2012) verificando o perfil de resistência entre isolados clínicos de *Candida* spp., os autores observaram que a anfotericina B apresentou os melhores resultados com sensibilidade elevada entre as leveduras testadas. Porém para o fluconazol e o voriconazol os autores evidenciaram uma sensibilidade reduzida, dados estes similares aos obtidos neste estudo. Segundo Pfaller et al. (2003), podem ocorrer erros na técnica de disco difusão na avaliação entre os perfis de sensibilidade, sendo assim o autor sugere que os isolados confirmados com resistência por esta técnica devem ser confirmados pelo teste de microdiluição em caldo para evitar isolados falso resistentes.

Com relação ao ensaio de concentração inibitória mínima (CIM), dos 50 isolados testados, 15 foram resistentes ao fluconazol e 15 resistentes ao itraconazol. Para os demais antifúngicos testados, cetoconazol, anfotericina B e voriconazol, não foram observados perfis de resistência. Medeiros et al. (2008) verificaram a presença de leveduras oportunistas presentes em amostras de água do Rio Doce em Minas Gerais, onde os isolados obtidos pelos autores

demonstraram perfil de suscetibilidade ao fluconazol e anfotericina, porém aproximadamente 50% dos isolados apresentaram resistência para o itraconazol. Estes dados diferem do presente estudo onde observou-se resistência para fluconazol em ambas as coletas realizadas. Entretanto, os resultados obtidos para o itraconazol são similares aos dados descritos por Medeiros et al (2008). Outro estudo realizado por Brandão et al. (2010) analisando o perfil de suscetibilidade de leveduras isoladas do Rio Turvo Limpo em Minas gerais, observaram isolados mais resistentes a anfotericina B e itraconazol, entretanto com perfil de suscetibilidade elevada ao fluconazol. Diferentemente do que foi observado por Brandão et al., os isolados do arroio dilúvio apresentaram perfil de suscetibilidade elevado para anfotericina B, e resistência aumentada ao fluconazol e itraconazol. Segundo Silva et al. (2012), as variações observadas nos perfis de suscetibilidade aos antifúngicos pode estar relacionada com a região geográfica e a população, diferindo de um local para outro.

Dos isolados testados neste trabalho, somente três apresentaram resistência ao mesmo antifúngico em ambas as técnicas realizadas. Destas leveduras, duas pertencem a coleta de inverno (I2B21 e I3B5) e um a coleta de verão (V2B14), ambos resistentes ao fluconazol no fungigrama e CIM. Junior et al. (2012), comparou as duas técnicas em isolados clínicos de *Candida* spp. isoladas de pacientes de um hospital do Ceará, e observou isolados resistente ao fluconazol pela técnica de disco difusão que não obtiveram o mesmo resultado para o CIM. Outro estudo comparando as duas técnicas foi realizado por Demitto et al. (2012), que observou 100% de correlação entre os resultados

obtidos pelo CIM e disco difusão para fluconazol. Entretanto, o autor ressalta a importância da técnica de disco difusão para triagem em um laboratório, sendo necessária a confirmação por CIM.

6- CONCLUSÃO

Dos 193 isolados obtidos nas coletas realizadas ao longo do Arroio Dilúvio, aproximadamente 170 apresentaram relação aos ascomicetos. Destas leveduras, 50 isolados apresentaram capacidade de crescimento a 37°C e atividade para as enzimas fosfolipase e proteinase consideradas fatores de virulência, sugerindo a presença de leveduras oportunistas.

Foi observado perfil de resistência para o fluconazol e voriconazol no ensaio de fungigrama. Entretanto para os ensaios de concentração inibitória mínima observou-se resistência ao fluconazol e itraconazol.

Somente três isolados no presente estudo apresentaram perfil de resistência em ambos os ensaios realizados.

Estes dados demonstram a variabilidade do perfil de resistência e sensibilidade das leveduras encontradas em amostras de água, corroborando assim para que se efetuem mais estudos sobre o potencial da presença de microrganismos resistentes em amostras de água doce.

7- PERSPECTIVAS

-Sequenciamento dos isolados resistentes encontrados no fungrigrama e concentração inibitória mínima.

-Identificação em nível de espécie das leveduras visando encontrar isolados pertencentes ao gênero *Candida*.

8- REFERENCIAL TEÓRICO

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA), 2014 em: http://pnqa.ana.gov.br/rede/rede_panoramasuperficial.aspx

ALMEIDA, J. M. G. C. F. DE. Yeast community survey in the Tagus estuary. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, n. 2, p. 295–303, 1 jul. 2005.

ANTUNES, A.; PASQUALOTTO, A. Candidemia in a brazilian tertiary care hospital: species distributions and antifungal susceptibility patterns. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, n. 5, p. 239–241, 2004.

BALLAL, M.; VINITHA, M. Activity of proteinase, phospholipase and biofilm as virulence markers in *Candida* species isolated from haematogenous samples. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, pg. 94-95, 2009.

BARBEDO, LEONARDO S & SGARBI, D. B. Candidíase. **Jornal Brasileiro Doenças Sexuais Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22–38, 2010.

BASSO, L.; MOREIRA, L.; PIZZATO, F. A influência da precipitação na concentração e carga de sólidos em cursos d'água urbanos: o caso do arroio Dilúvio, Porto Alegre-RS. **Geosul**, v. 26, n. 52, p. 145–163, 2011.

BERTOLDO, F.; RIGHES, A.; MORTARI, S. Qualidade da água em um afluente do arroio Cadena em Santa Maria -RS. **Série: Ciências Naturais e Tecnológicas, S. Maria**, v. 5, p. 51–65, 2004.

BLUME, K. K.; MACEDO, J.C; MENEGUZZI, A.; SILVA, L.B.; QUEVEDO, D.M.; RODIGUES, M.A. Water quality assessment of the Sinos River, Southern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 4, p. 1185–93, dez. 2010.

BOGUSŁAWSKA-WAS, E.; DABROWSKI, W. The seasonal variability of yeasts and yeast-like organisms in water and bottom sediment of the Szczecin Lagoon. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 203, n. 5-6, p. 451–8, 2001.

BONDARYK, M.; KURZAŃKOWSKI, W.; STANISZEWSKA, M. Antifungal agents commonly used in the superficial and mucosal candidiasis treatment: mode of action and resistance development. **Postepy dermatologii i alergologii**, v. 30, n. 5, p. 293–301, out. 2013.

BRANDÃO, L. R.; MEDEIROS, A.O.; DUARTE, M.C.; BARBOSA, A.C.; ROSA, C.A. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts isolated by multiple-tube fermentation from three freshwater lakes in Brazil. **Journal of Water and Health**, v. 8, n. 2, p. 279–89, jun. 2010.

BRANDÃO, T.; KINDEL, E. Dilúvio: visões sobre um arroio. **Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental**, v. 25, 2010.

BRASIL. Portaria MS n.º 518/2004. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília, 2005.

CAMPANA, N.; TUCCI, C. Predicting floods from urban development scenarios : case study of the Dilúvio Basin, Porto Alegre, Brazil. **Urban Water**, v. 3, p. 113–124, 2001.

CLSI 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Standard M27-A3. 2008.

CLSI 2009. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Approved Guideline, M44-A2. 2009.

CLSI 2012. Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts: Informational Supplement M44-S3. 2009

CLSI 2012. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts: Fourth Informational Supplement M27-S4. 2012.

COELHO, M. A.; ALMEIDA, J.M.; MARTINS, I.M.; DA SILVA, A.J.; SAMPAIO, J.P. The dynamics of the yeast community of the Tagus river estuary: testing the hypothesis of the multiple origins of estuarine yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 98, n. 3, p. 331–42, out. 2010.

DEMITTO, F. D. O.; AMARAL, R. DO. Suscetibilidade a antifúngicos in vitro de *Candida* spp. em pacientes do Hospital Universitário Regional de Maringá-PR. **Jornal Brasileiro de Patologia Médica**, v. 48, p. 315–321, 2012.

DEVOS, R.; SOARES, A.; ROCHA, A. Habitantes do Arroio: memória ambiental das águas urbanas. **Desenvolvimento e Meio**, n. 22, p. 51–64, 2010.

FURLANETO, M. C.; ROTA, J.F.; QUESADA, R.M.; FURLANETO-MAIA, L.; RODRIGUES, R.; ODA, S.; OLIVEIRA, M.T.; SERPA, R.; FRANÇA, E.J. Species distribution and in vitro fluconazole susceptibility of clinical *Candida* isolates in a Brazilian tertiary-care hospital over a 3-year period. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 595–599, out. 2011.

GERHARDTS, A et al. A model of the transmission of microorganisms in a public setting and its correlation to pathogen infection risks. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 3, p. 614–21, mar. 2012.

HAGESKAL, G.; LIMA, N.; SKAAR, I. The study of fungi in drinking water. **Mycological research**, v. 113, n. Pt 2, p. 165–72, fev. 2009.

HAGLER, A. Yeasts as Indicators of Environmental Quality. In: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, 2006.

HINRICHSEN, S. L. et al. *Candida* isolates in tertiary hospitals in northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 325–8, abr. 2009.

HUANG, M.; KAO, K. C. Population dynamics and the evolution of antifungal drug resistance in *Candida albicans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 333, n. 2, p. 85–93, ago. 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). 8º Distrito de Meteorologia em <http://www.inmet.gov.br>

ISHIDA, K.; YAMAGUCHI, M.U.; NAKAMURA, T.U.; FILHO, B.P.D.; YAMADA-OGATTA, S.F.; NAKAMURA, C.V. Desempenho dos métodos de identificação de leveduras de água engarrafada: alta prevalência de *Candida parapsilosis*. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 2, p. 205, 19 dez. 2013.

JORDÃO, C. P.; RIBEIRO, P.R.; MATOS, A.T.; BASTOS, R.K.; FERNANDES, R.B.; FONTES, R.L. Environmental assessment of water-courses of the Turvo Limpo River basin at the Minas Gerais State, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 127, n. 1-3, p. 315–26, abr. 2007.

KANAFANI, Z. A; PERFECT, J. R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 46, n. 1, p. 120–8, 1 jan. 2008.

KANZLER, D.; BUZINA, W.; PAULITSCH, A.; HAAS, D.; PLATZER, S.; MARTH, E.; MASCHER, F. Occurrence and hygienic relevance of fungi in drinking water. **Mycoses**, v. 51, n. 2, p. 165–9, mar. 2008.

KRCMERY, V.; BARNES, A J. Non-albicans Candida spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **The Journal of Hospital Infection**, v. 50, n. 4, p. 243–60, abr. 2002.

LIM, C. S.-Y. et al. Candida and invasive candidiasis: back to basics. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 1, p. 21–31, jan. 2012.

MACIEL, N.; PILÓ, F.; FREITAS, L. The diversity and antifungal susceptibility of the yeasts isolated from coconut water and reconstituted fruit juices in Brazil. **International journal of Food Microbiology**, v. 160, p. 201–205, 2013.

MATTEI, A. S. et al. Major Article Determination of germ tube , phospholipase , and proteinase production by bloodstream isolates of Candida albicans. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, n. February, p. 340–342, 2013.

MCDONALD, R. I. et al. Urban growth, climate change, and freshwater availability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 15, p. 6312–7, 12 abr. 2011.

MEDEIROS, A. O. et al. Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil. **Water Research**, v. 42, n. 14, p. 3921–9, ago. 2008.

MEDEIROS, ADRIANA O, MISSAGIA, BEATRIZ S., BRANDÃO, LUCIANA R., CALLISTO, MARCOS, BARBOSA, FRANCISCO A. R., ROSA, C. A. Water quality and diversity of yeasts from tropical lakes and rivers from the rio Doce basin in southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1582–1594, 2012.

MEISEN, M. N. et al. Ocorrência de doenças diarréicas agudas (DDA) com a qualidade da água para consumo humano no município de Pouso Redondo. **Revista de Estudos Ambientais**, v. 13, n. 2, p. 57–67, 2011.

MENEGAT, Rualdo (coordenador). Atlas ambiental de Porto Alegre. 3 ed. rev. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS. 256, 2006 .

MICELI, M. H.; DÍAZ, J. A; LEE, S. A. Emerging opportunistic yeast infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 142–51, fev. 2011.

MOHAN DAS, V.; BALLAL, M. Proteinase and phospholipase activity as virulence factors in *Candida* species isolated from blood. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 4, p. 208–10, 31 dez. 2008.

MOREIRA, L. A influência da precipitação no transporte de sólidos em cursos d'água urbanos: o caso do Arroio Dilúvio, Porto Alegre (RS), Brasil. **Instituto de Geociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. 2008.

NASCIMENTO, C. A. DO; NAIME, R. Monitoramento de ph, temperatura, OD, DBO e condições microbiológicas das águas do arroio Pampa em Novo Hamburgo (RS). **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 5, n. 2, p. 227–244, 16 set. 2009.

NORONHA, L.C.; GRASSI, L.A.T.; CALLEGARO, V.L.; FILHO, O.L.B.; FISCHER, L.A. Tempo das águas. Porto Alegre, Laser Press Comunicação, 120 p, 2006.

OKI, T.; KANAE, S. Global hydrological cycles and world water resources. *Science*, p. 5790, 2006.

OLIVEIRA, D.V.; MEDEIROS, A.W.; NACHTIGALL, G.; SILVA, T.C.; ZANIN, J.G.; FRAZZON, A.P.G.; VAN DER SAND, S.T. Qualidade da água e identificação de bactérias gram-negativas isoladas do arroio Dilúvio, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Evidência**, v.12, p. 51-62, 2012.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (BRASIL), 2014 em: www.onu.org.br

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (ONU), 2014 em: <http://www.un.org>

PAGE, B. T. et al. Rapid identification of ascomycetous yeasts from clinical specimens by a molecular method based on flow cytometry and comparison with identifications from phenotypic assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3167–71, set. 2006.

PEREIRA, A. A grande luta pelo resgate de um arroio In: Pesquisa Ecos Revista, Departamento municipal de Água e Esgotos. Porto Alegre. Ano 2, n. 3, p. 20-25 ,janeiro/1995.

PEREIRA, V. J. et al. Occurrence of filamentous fungi and yeasts in three different drinking water sources. **Water Research**, v. 43, n. 15, p. 3813–9, ago. 2009.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1 Suppl, p. S3–13, jan. 2012.

PFALLER, M. A. et al. International Surveillance of Bloodstream Infections Due to Candida Species: Frequency of Occurrence and In Vitro Susceptibilities to Fluconazole, Ravuconazole, and Voriconazole of Isolates Collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3254–3259, 2001.

PFALLER, M.; DIEKEMA, D. Evaluation of the Etest and Disk Diffusion Methods for Determining Susceptibilities of 235 Bloodstream Isolates of Candida glabrata to Fluconazole and Voriconazole. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1875–1880, 2003.

PIRES-GONÇALVES, R. H. et al. Occurrence of fungi in water used at a haemodialysis centre. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 542–7, maio 2008.

PONTARA, A. et al. MICROBIOLOGICAL MONITORING OF MINERAL WATER COMMERCIALIZED IN BRAZIL. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 554–559, 2011.

PORTO ALEGRE. DEPARTAMENTO DE ESGOTOS PLUVIAIS (DEP) 2014 em: <http://www2.portoalegre.rs.gov.br/dep/>

SARDI, J. C. O. et al. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. Pt 1, p. 10–24, jan. 2013.

SATELES, W. DE P.; MEDRADO, F. E. DA P. E S.; PASQUALETTO, A. Eficiência das lagoas de estabilização da estação de tratamento de esgoto do parque atheneu, goiânia. Trabalho de conclusão de curso Faculdade Engenharia da Universidade Católica de Goiás., n. 62, p. 1–16, 2003.

SCHWARZENBACH, R.P.; ESCHER, B.I.; FENNER, K., HOFSTETTER, T.B.; JOHNSON, C.A.; GUNTEN, U.V.; WEHRLI, B. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science*, v. 313, p. 1072-1077, 2006.

SIDRIM, J. J. C. et al. Candida species isolated from the gastrointestinal tract of cockatiels (Nymphicus hollandicus): In vitro antifungal susceptibility profile and phospholipase activity. **Veterinary Microbiology**, v. 145, n. 3-4, p. 324–8, 26 out. 2010.

SILVA, S. et al. Candida glabrata, Candida parapsilosis and Candida tropicalis: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288–305, mar. 2012.

SILVEIRA, A. L. L. DA. Impactos Hidrológicos da Urbanização em Porto Alegre. **Avaliação e Controle da Drenagem Urbana**, p. 153–163, 2000.

SPAMPINATO, C.; LEONARDI, D. Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 204237, jan. 2013.

THERON, J; CLOETE, T. E. Emerging waterborne infections: contributing factors, agents, and detection tools. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 1–26, jan. 2002.

TUCCI, C. E. M.; PORTO, R. L. L.; BARROS, M. T. Drenagem Urbana. Porto Alegre. Editora da UFRGS. 1995.

TUNDISI, J. Recursos Hídricos no Futuro: Problemas e Soluções. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 63, 2008.

UNITED NATIONS- WATER (UNWATER), 2014 em: www.unwater.org

VASCONCELLOS, F. C. da S.; IGANCI, J. R. V.; RIBEIRO, G. A. Qualidade microbiológica da água do rio São Lourenço, São Lourenço do Sul, Rio Grande do Sul. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.2, p.177-181, abr./jun., 2006.

VASCONCELOS JÚNIOR, A. A. DE et al. Comparação entre microdiluição e disco difusão para o teste de susceptibilidade aos antifúngicos contra Candida spp. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 33, n. 1, p. 135–142, 30 jul. 2012.

VIEIRA, M. S., MOURA, M. A. M., GIL, F.; G. Qualidade da água de lagos e nascentes do parque Dr. “Fernando Costa” (Água Branca), São Paulo, SP. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, n. 4, p. 475–483, 2006.

VILANOVA, X. et al. The effect of sewage treatment plant effluent on the faecal coliforms and enterococci populations of the reception river Waters. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p.210-214, 2002.

WOOLLETT, L. L.; HEDRICK, L. R. Ecology of yeasts in polluted water. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 36, n. 3, p. 427–35, jan. 1970.

YAMAGUCHI, M. Yeasts and filamentous fungi in bottled mineral water and tap water from municipal supplies. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. January, p. 1–9, 2007.

YANG, Q. et al. Wastewater treatment systems harbor specific and diverse yeast communities. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58-59, p. 168–176, dez. 2011.

YARROW, D. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. **The yeasts, a taxonomic study**, n. Wickerham, 1998.

9- ANEXOS

Meio YMA+CL (Yeast Malt Ágar)

1% de glicose

0,5% de peptona

0,3% de extrato de malte

0,3% de extrato de levedura

2% de Ágar

0,2% de Cloranfenicol

Meio para Urease

1,17% de YCB (Yeast Carbon Base)

2% ágar

Fucsina Ácida

1% de Uréia

Teste DBB:

15ml de tampão 0,1M Tris HCl pH 7,0.

15mg Fast Blue B.

Meio Fosfolipase

6,5% Sabouraud

5,73% NaCl

0,055% CaCl₂

4% Gema de Ovo

Meio Proteinase

1,17% Yeast Carbon Base

0,01% Extrato de Levedura

1,6% Ágar

0,2% BSA

Solução de Coloração para Proteinase

0,1% amido black

20mL ácido acético

Solução Descorante para Proteinase

0,1% ácido acético

99,9 mL água destilada.