

LÍLIA DE CÁSSIA ESPÍRITO SANTO

**Ocorrência, susceptibilidade à  
antifúngicos e fatores de  
virulência de populações de  
*Candida albicans* e outras  
leveduras oportunista isoladas  
de ambientes aquáticos de  
Minas Gerais**

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós Graduação em  
Microbiologia

Orientador: Carlos Augusto Rosa  
Co-orientadora: Luciana Rocha Brandão



Lília de Cássia Espírito Santo

**Ocorrência, susceptibilidade à antifúngicos  
e fatores de virulência de populações de  
*Candida albicans* e outras leveduras  
oportunistas isoladas de ambientes  
aquáticos de Minas Gerais**

Dissertação de Mestrado  
apresentado ao Programa de Pós  
Graduação em Microbiologia do  
Instituto de Ciências Biológicas  
da Universidade Federal de  
Minas Gerais.

**Orientador: Carlos Augusto Rosa**

**Co-orientadora: Luciana Rocha Brandão**

Departamento de Microbiologia  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2014

Dedico esse trabalho aos meus pais,  
Célia e Sebastião e ao meu irmão  
Marcelo por estarem sempre presente  
em minha vida.

*“Se vivermos nosso pedaço de vida na terra sem nunca termos conhecido um caranguejo intimamente, teremos perdido a oportunidade de ter uma agradável amizade. A vida torna-se um pouco incompleta se olharmos para trás e lembrarmos dessas pequenas criaturas apenas como o prato principal depois da sopa e acompanhado de um Chablis.”*

[William Beebe, Nonsuch: Land of wate]

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Carlos Augusto Rosa, por ter me dado a oportunidade de fazer parte do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos. Agradeço também pela experiência e por estar sempre disponível as minhas dúvidas.

Agradeço também aos professores Luiz Henrique Rosa e Susana Johann por estarem sempre prontos a ajudar.

A minha co-orientadora, Luciana Rocha Brandão, por me ensinar detalhes essenciais para a realização desse projeto, pelo carinho e pela preocupação.

Aos professores Paula Benevides, Raquel Vilela e Daniel de Assis, por terem aceitado o convite de participar da avaliação deste trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia do ICB-UFMG.

Aos motoristas do ICB-UFMG, pela paciência, disponibilidade e ajuda durante as coletas para a realização deste trabalho.

A CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo auxílio financeiro.

A Nati, a Indi, a Bia e a Lu, que estão sempre me ajudando nos protocolos e a desenvolver bem os experimentos, sem vocês eu não teria conseguido.

A todos os meus professores de graduação, pelo conhecimento transmitido que me possibilitaram formar como bióloga.

A todos os amigos e colegas do Laboratório, atuais e antigos, em especial às CURICAS, obrigada pela experiência compartilhada, pelos momentos de descontração, pela amizade, conselhos, apoio e pelos diversos dias das meninas. Não poderia ter equipe melhor.

A Carla e a Ju pela “republica”; Obrigada pela paciência, por dividirem a casa e as horas vagas comigo. Obrigada em especial à Carla, sem você teria sido bem mais difícil a realização das estatísticas deste trabalho.

As amigas Maira, Mika e Silvinha, obrigada pelo companheirismo, por estarem sempre por perto, mesmo de longe, e pela segurança que me dão de poder contar com a amizade de vocês; obrigada pelo carinho; apoio (ou não)

nas minhas decisões, incentivo e paciência nos momentos difíceis; pelas boas gargalhadas; pelas saídas (mesmo sendo a maior barca furada dos tempos); por tudo. Sem vocês, eu teria abandonado o barco em alguns momento.

Aos amigos da graduação, em especial aos Hakuna Matata, obrigada por transformarem a faculade em uma experiência única, por me ensinarem que não existe uma verdade e que julgamentos não tem sentido.

Aos amigos de Ipatinga que mesmo de longe sempre farão parte da minha vida e aos amigos da vida, que fiz durante a caminhada.

A Deus, por ter me dado a família que tenho e os amigos que fiz; por todas as bênçãos e realizações para mim concedidas.

A toda minha família, principalmente minha vó Geralda e meu vó Domingos, que partiu a pouco, mas sempre foi um exemplo de força, determinação e bom humor em minha vida.

E, finalmente, aos meus pais, Sebastião e Célia, e ao meu irmão, Marcelo, por serem tudo pra mim, por terem me ensinado tudo, por terem me dado todo o amor do mundo, e por terem me dado tudo que podiam. Mesmo de longe, caminharam comigo ao longo da graduação. Amo vocês!

## RESUMO

O monitoramento da qualidade da água doce de recreação e consumo é importante a fim de se estabelecer o risco de exposição dos usuários aos contaminantes encontrados nestes locais. As bactérias do grupo coliforme são os micro-organismos de escolha para avaliar a qualidade da água. Porém, em alguns países, outros micro-organismos são utilizados como indicadores de poluição de forma complementar a esse grupo. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar as contagens de leveduras e bactérias do grupo coliforme presentes em ambientes aquáticos de Minas Gerais, além de avaliar a presença de leveduras resistentes a antifúngicos e que produzam fatores de virulência. Foram coletadas amostras de água do tanque São Luís (Parque Natural do Caraça), da lagoa da Pampulha, do lago Dom Helvécio (Parque Estadual do Rio Doce) e do rio das Velhas em Minas Gerais. Foram filtrados de 10 a 50 mL das amostras através de membranas de nitrocelulose com poros de 0,45 µm, que posteriormente foram colocadas sobre a superfície dos meios CHROMágar-*Candida* e ágar-mCa. Os diferentes morfotipos de leveduras foram contados, purificados e estocados à -86°C. Os isolados foram agrupados de acordo com os perfis morfo-fisiológicos e moleculares e pelo menos um representante de cada grupo foi selecionado e sequenciado. Todos os isolados foram testados quanto à sensibilidade a três antifúngicos e quanto à capacidade de produzir proteinase e fosfolipase. Os isolados identificados como *Candida albicans* e aqueles resistentes ou dose-dependentes as três drogas avaliadas foram testados quanto à capacidade de adesão a células epiteliais bucais humanas. A quantificação de coliformes totais e *Escherichia coli* nos ambientes estudados também foi realizada. No tanque São Luís e lago Dom Helvécio as contagens de leveduras não apresentaram correlação positiva com as de *E. coli*. Já na lagoa da Pampulha e rio das Velhas houve correlação positiva entre essas contagens. Foram obtidos 181 isolados identificados como pertencentes a 52 espécies, sendo que *C. albicans* e *Meyerozyma guilliermondii* foram as mais frequentes. Em relação ao perfil de susceptibilidade dos isolados, 61,7% foram resistentes ou dose-dependentes ao fluconazol, 92% ao itraconazol e apenas 7,8% foram resistentes à

anfotericina B. Além disso, 50 e 37 isolados foram capazes de produzir proteinase e fosfolipase, respectivamente. Em relação aos isolados de *C. albicans*, cinco foram resistentes as três drogas testadas, oito foram resistentes a duas drogas e dois isolados foram resistente e dose-dependente a uma droga. Somente um isolado de 22 testados não foi capaz de aderir a células epiteliais bucais. Os isolados de *C. albicans*, quando comparado aos demais isolados, foram mais frequentemente resistentes e dose-dependentes aos antifúngicos e foram os principais produtores de fatores de virulência. Estes resultados sugerem que essas leveduras podem representar um risco à saúde dos usuários desses ambientes aquáticos.

## ABSTRACT

Monitoring the quality of recreation and consumption freshwater is important in order to establish the risks for the users of being exposed to the contaminants found in these locations. Coliform bacteria are a group of microorganisms commonly used for evaluating the water quality. Although, in anything countries, other microorganisms also be used as pollution indicators complementarily to that group. This study aimed to evaluate the yeast and coliform bacteria counts in aquatic environments of Minas Gerais, and the presence of antifungal resistant or virulence factor producing yeasts. Water samples were collected from the São Luís tank (Caraça Natural Park – MG), the Pampulha lake (MG), the Dom Helvécio lake (Rio Doce State Park – MG) and the Velhas river (MG). About 10 to 50 ml were filtered through nitrocellulose membranes (0.45 µm pore size,) and were then positioned on the surface of the CHROMagar-*Candida* and agar-mCa media. The yeasts of different morphotypes were counted, purified, and stored. The different morpho-types were counted, purified and stocked at -86°C. The isolates were grouped into morphophysiological and molecular profiles and at least one of each profile was selected and sequenced. All of them were tested for their sensibility to three antifungal agents and for their ability to produce proteinase and phospholipase. All isolates identified as *Candida albicans* and those resistant or dose-dependent to the three drugs evaluated were also tested for their adhesion ability. A quantification of total coliforms and *Escherichia coli* was performed. In the São Luís tank and Dom Helvécio lake samples, the yeast counts did not present a positive correlation with the *E. coli* ones. Although, in the Pampulha lake and in the Velhas river, there was a positive correlation between the counts. One hundred eighty-one isolates were identified belonging to 52 species, and *C. albicans* and *Meyerozyma guilliermondii* were the most frequent ones. Regarding their susceptibility profile, 61.7% were fluconazole resistant or dose-dependent, 92% to itraconazole, and only 7.8% were resistant to amphotericin B. Furthermore, 50 and 37 isolated were capable of producing proteinase and phospholipase, respectively. Regarding their *C. albicans* isolates, five were resistant to the three drugs tested, eight were resistant to the two drugs and two isolates were dose-dependent and resistant to a drug. Only

one isolate of 22 tested was not able to adhere to buccal epithelial cells. The *C. albicans* isolates were the ones that showed a resistant and dose-dependent profile to the antifungals and were the main virulence factor producers. These results suggest that these yeasts could represent a risk to the health of the user of these aquatic environments.