

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Fungos em areias e águas costeiras e
interiores em Portugal – relevância para
a saúde humana e bem-estar**

Sara Cristina Costa Brito

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada por:
Doutora Elisabete Valério
Professora Doutora Deodália Dias

2019

Agradecimentos

A escrita desta dissertação é um passo muito importante, pois permite-me concluir este mestrado. No entanto, eu não teria conseguido chegar até aqui sozinha. Assim, queria guardar algumas linhas para poder agradecer a todos aqueles que me ajudaram e apoiaram ao longo desta etapa.

Gostaria de começar por agradecer à minha orientadora, a Doutora Elisabete Valério, por todo o tempo dispensado, pela sua dedicação, pelo apoio e pelos conselhos que me deu durante estes meses, por estar sempre disponível para me ajudar, e por tudo o que me ensinou na área da Biologia Molecular.

À minha orientadora interna, a Professora Deodália Dias, pela sua simpatia, pela sua ajuda com a burocracia, e pelo apoio e pela ajuda na realização deste trabalho.

Agradeço também ao Dr. João Brandão pela sua dedicação neste projeto, por tudo o que me ensinou na área da Micologia, pela sua disponibilidade para me ajudar e por todo o apoio e todos os conselhos que me deu durante estes meses.

À Doutora Raquel Sabino, à Dr^a Cristina Veríssimo e à Dr^a Helena Parada do laboratório de Micologia, por toda a ajuda que me deram, por tudo o que me ensinaram e por me receberem no seu laboratório.

Agradeço às Dr^{as} Cecília Silva e Filipa Ferreira do laboratório de Microbiologia das Águas, por todo o apoio, pela ajuda e por me receberem no seu laboratório.

Gostaria de agradecer à Doutora Lena Klingspor, por ter feito a colheita de todas as amostras provenientes da Praia Verde. A sua colaboração foi fundamental para a realização deste trabalho.

Agradeço também à Susana Silva, por ter realizado toda a análise estatística dos dados recolhidos.

Por fim, deixo um agradecimento muito especial à minha família, em especial aos meus pais e ao meu irmão, por todo o apoio, pelos conselhos e pela paciência durante este ano. O vosso apoio foi fundamental nesta etapa.

Agradeço também a todos os meus amigos e aos meus colegas, pelo apoio. Agradeço em particular à Marta, por toda a sua ajuda no laboratório e por estar disponível para me apoiar e me ajudar quando eu precisei.

Muito obrigada a todos!

instituto **Nacional de Saúde**
Doutor Ricardo Jorge



O trabalho apresentado nesta Dissertação de Mestrado foi realizado no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge sob a orientação direta da Doutora Elisabete Valério e contou com a coorientação do João Brandão.

A Professora Doutora Deodália Dias foi a orientadora interna, designada no âmbito do Mestrado em Biologia Humana e Ambiente da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Nota Prévia

As referências bibliográficas desta dissertação estão escritas de acordo com as normas da revista *Science of the Total Environment*.

A escrita deste documento seguiu as regras do novo acordo ortográfico.

A partir deste trabalho, foi escrito o artigo por Sara Brito, Raquel Sabino, Cristina Veríssimo, Susana Silva, Elisabete Valério, João Brandão, “Fungos em areias e águas costeiras e interiores em Portugal – relevância para a saúde humana e bem-estar”, número especial de Novembro, Boletim Epidemiológico Observações.

Resumo

Os fungos filamentosos e as leveduras são omnipresentes na natureza, incluindo nas zonas balneares. A areia frequentada por pessoas e por animais tem uma população crescente de fungos específicos de humanos e específicos de animais, em comparação com a areia não frequentada por pessoas e animais. Contudo, certas espécies de fungos podem causar infeções ou alergias em humanos. Estudos anteriores mostraram que existem microrganismos patogénicos ou patogénicos oportunistas que sobrevivem e crescem na areia. O conjunto de doenças resulta da inalação e da ingestão de esporos fúngicos e de células vegetativas, ou do contato direto com células fúngicas.

Uma vez que as zonas balneares são locais frequentados por um elevado número de pessoas, especialmente no verão, a qualidade microbiológica das areias e das águas balneares é particularmente importante. Assim sendo, o objetivo deste estudo é a recolha de dados sobre as espécies de fungos existentes nas três zonas balneares em estudo – Carcavelos, Alburrica e Praia Verde. A identificação dos isolados foi realizada através da observação de caracteres morfológicos e através de ferramentas moleculares.

Para isto, foram analisadas 18 amostras de areia e 18 amostras de água. No total, nas amostras de areia foram identificados 1 538 isolados, ao passo que nas amostras de água foram identificados 180 isolados. Os isolados fúngicos detetados com mais frequência foram *Cladosporium* sp. (na Praia Verde e em Alburrica) e *Acremonium kiliense* (em Carcavelos). Foram também identificadas algumas espécies responsáveis por causar alergias e infeções, tais como *Exophiala dermatitidis*, *Alternaria alternata*, *Trematosphaeria grisea* e *Aspergillus nidulans*. No entanto, não foi possível identificar 19 isolados presentes nas amostras.

A realização desta dissertação permitiu identificar os isolados fúngicos presentes nos locais em estudo, assim como a frequência de cada uma das espécies presente nas amostras. Permitiu também verificar a presença de determinadas espécies que podem provocar doenças graves, o que representa um risco para a saúde dos utilizadores das praias.

Palavras-chave: Zonas balneares; areia de praia; contaminantes fúngicos; infeções fúngicas; alergias

Abstract

Filamentous fungi and yeast are ubiquitous in nature, including bathing areas. Sand that is visited both by people and animals has a growing population of human and animal-specific fungi, in comparison to sand that is not. However, certain fungal species can cause infections or allergies in humans. Previous studies have shown that there are opportunistic or pathogenic microorganisms that can survive and grow in sand. The diseases can result from inhalation and ingestion of fungal spores and vegetative cells, or by direct contact with fungal cells.

Since bathing areas are frequented by large numbers of people, especially during the summer months, the microbiological quality of sand and bathing water is particularly important. Thus, the aim of this study is to collect data on the fungal species present in the three bathing areas in this study - Carcavelos, Alburrica and Praia Verde. The identification of the isolates was performed by observing morphological characteristics and by using molecular tools.

For this purpose, 18 sand samples and 18 water samples were analysed. The total number of colonies identified in sand samples was 1 538; the total number of colonies identified in water samples was 180. The most frequently isolated fungi were *Cladosporium* sp. (at Praia Verde and Alburrica) and *Acremonium kiliense* (at Carcavelos). Some species responsible for causing allergies and infections, such as *Exophiala dermatitidis*, *Alternaria alternata*, *Trematosphaeria grisea* and *Aspergillus nidulans* have also been identified. However, it was not possible to identify 19 isolates found on the samples.

For this dissertation, it was possible to identify the fungal isolates present at the chosen locations. It was also possible to determine the frequency of each species present in the samples. Lastly, this work has made it possible to confirm the presence of certain species that can cause serious illness, which potentially poses a health risk to all beach users.

Keywords: Bathing areas; sand beach; fungal contaminants; fungal infections; allergies

Índice

Agradecimentos	II
Resumo	V
Abstract	VI
Lista de Tabelas	VIII
Lista de Figuras	IX
Lista de Abreviaturas	X
1.Introdução	1
1.1 Presença de microrganismos em zonas balneares	1
1.2 Características gerais dos fungos.....	3
1.3 Implicações na saúde.....	7
1.4 Ferramentas moleculares para a identificação de fungos	11
1.5 Objetivos	12
2. Materiais e Métodos	13
2.1 Locais e periodicidade.....	13
2.2 Recolha de amostras de areia e de água	14
2.3 Processamento das amostras.....	15
2.4 Identificação morfológica.....	15
2.5 Identificação molecular	16
3. Resultados	21
3.1 Praia Verde	21
3.2 Carcavelos	24
3.3 Alburrica.....	27
4.Discussão	31
5. Conclusões finais e perspectivas futuras	36
6. Referências bibliográficas	38
7.Anexos	43
ANEXO I	43
<u>Protocolo para a análise micológica da areia (adaptado de Sabino et al., 2011)</u>	43
ANEXO II	45
<u>Protocolo para a extração de DNA - <i>Invisorb Spin Plant Mini Kit</i> (Invitex Molecular)</u>	45
ANEXO III	46
<u>Protocolo de Extração de DNA (Adaptado de Santos, Jorge & Phillips, Alan, 2009)</u>	46

Lista de Tabelas

Tabela 2.1-Sequência do par de primers utilizado	17
Tabela 2.2-Composição da Master Mix para PCR de amplificação.....	17
Tabela 2.3-Condições de PCR otimizadas para o par de primers utilizado.....	17
Tabela 2.4-Composição da Master Mix para PCR de sequenciação	19
Tabela 2.5-Condições de PCR de sequenciação.....	20
Tabela 3.1-Fungos filamentosos presentes na Praia Verde	21
Tabela 3.2-Leveduras presentes na Praia Verde.....	22
Tabela 3.3-Fungos filamentosos presentes em Carcavelos	24
Tabela 3.4-Leveduras presentes em Carcavelos.....	25
Tabela 3.5-Fungos filamentosos presentes em Alburrica.....	27
Tabela 3.6-Leveduras presentes em Alburrica	29

Lista de Figuras

Figura 1.1-Ciclo de vida de um fungo pertencente ao filo Ascomycota. Adaptado de Madigan et al., 2012	4
Figura 1.2-Ciclo de vida de um fungo pertencente ao filo Basidiomycota. Adaptado de Madigan et al., 2012	4
Figura 1.3-Morfologia de um fungo filamentosos. Adaptado de Madigan et al., 2012	6
Figura 1.4-Localização da região ITS e dos respetivos primers. As setas indicam a posição aproximada e a orientação dos primers. Adaptado de Baldwin et al., 1995	12
Figura 2.1-Localização dos pontos de amostragem. A-Carcavelos; B-Alburrica; C-Praia Verde	14
Figura 2.2-Fotografia de um gel de agarose de um PCR convencional. 1 e 9 - Marcador de DNA; 2 a 6 - amostras A6, A7, A8, B6, B7; 7 - controlo positivo; 8 - controlo negativo; 10 a 15 - amostras B8,C6,C7,F4,H2,I02; 16 - controlo positivo	18
Figura 3.1-Variação dos valores médios dos principais grupos de fungos na Praia Verde. As barras a cinzento representam os fungos filamentosos que pertencem ao grupo dos fungos potencialmente alergénicos/patogénicos.	23
Figura 3.2-Variação mensal dos valores médios dos principais grupos de fungos na praia de Carcavelos. As barras a cinzento representam os fungos filamentosos que pertencem ao grupo dos fungos potencialmente alergénicos/patogénicos.	26
Figura 3.3-Variação mensal dos valores médios dos principais grupos de fungos na praia de Alburrica. As barras a cinzento representam os fungos filamentosos que pertencem ao grupo dos fungos potencialmente alergénicos/patogénicos.	30

Lista de Abreviaturas

Abs - Absorvância

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

Bp – *Base pairs*

BSA – Albumina de Soro Bovino

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

rDNA – *Ribosomal Deoxyribonucleic acid*

dNTPs – Nucleósidos trifosfato de desoxirribose

ECMM - *European Confederation of Medical Mycology*

EUA – Estados Unidos da América

HIV – *Human Immunodeficiency Virus*

INSD - *International Nucleotide Sequence Databases*

IgE - Imunoglobulina E

ITS – *Internal transcribed spacer*

ITS1 – *Internal transcribed spacer 1*

ITS2 – *Internal transcribed spacer 2*

MBPA – Micoase Bronco Pulmonar Alérgica

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

NGS - *Next generation sequencing*

PCR – *Polymerase chain reaction*

RNA – *Ribonucleic acid*

RPM – Rotações por minuto

SIDA – Síndrome de Imunodeficiência Humana Adquirida

UFC – Unidade formadora de colónias

1.Introdução

1.1 Presença de microrganismos em zonas balneares

As zonas balneares são um local muito importante no que toca a atividades lúdicas, criando centenas de milhares de postos de trabalho e gerando, anualmente, uma receita de milhares de milhões de dólares. Estas atividades originam oportunidades para o contato direto com as comunidades microbianas presentes na praia (Weiskerger et al., 2019).

Existem muitos países a implementar programas de monitorização da qualidade da água para proteger a saúde dos utilizadores das praias. As análises são realizadas para quantificar os indicadores fecais e para verificar a conformidade de acordo com os limites que estão estabelecidos pelos regulamentos legais (Pereira et al., 2013).

Os fungos filamentosos e as leveduras são omnipresentes na natureza como microrganismos que habitam o solo. Nas areias das praias também são ubíquos. A temperatura e a disponibilidade de nutrientes são os principais fatores que determinam a composição da comunidade de leveduras. A água doce e os ambientes marinhos costeiros sujeitos a ações terrestres e a atividades humanas estão fortemente colonizados por fungos. A sua persistência está relacionada, principalmente, com a disponibilidade de matéria orgânica para se alimentarem e com a temperatura (Efstratiou, 2018).

O aumento do uso de recursos hídricos recreativos, combinado com o desejo de salvaguardar a saúde pública, trouxe, nas últimas décadas, a questão da areia de praia que atua como um veículo de infeção. Todavia, a qualidade microbiológica da areia não está incluída na monitorização das praias. Para além do mais, a contribuição da areia poluída nas incidências de doenças entre os banhistas tem sido negligenciada durante décadas (Efstratiou, 2018).

As doenças que afetam os utilizadores das praias têm sido atribuídas, predominantemente, à exposição a organismos patogénicos no mar ou em água doce. No entanto, os banhistas também entram em contato com a interface sedimento-água e com a própria areia (Efstratiou, 2018). É possível que o público que está exposto à areia contaminada por fungos patogénicos apresente um maior risco de exposição, através do contato direto com a pele e com as membranas mucosas, ou pela inalação de esporos (Heaney et al., 2009).

Apesar de a superfície de contato da água com a pele e com a mucosa humana ser maior do que a superfície de contacto da areia, muitos utilizadores das praias permanecem mais tempo em contato com a areia do que em contacto com a água (Pereira et al., 2013).

As pessoas e os animais que frequentam praias regularmente podem ser parcialmente responsáveis por contaminar as suas areias, seja porque transportam microrganismos que estavam presentes na areia ou porque descartam lixo orgânico na areia ou na água. Este lixo inclui materiais de pesca, que fornece o alimento e a humidade necessárias para a preservação e desenvolvimento de microrganismos, tais como leveduras, fungos filamentosos e bactérias (Sabino et al., 2011).

Várias pesquisas têm mostrado que existem grandes populações de microrganismos patogénicos ou patogénicos oportunistas que sobrevivem e crescem na areia. Na comunidade científica, tem crescido o conhecimento sobre como a areia pode atuar como um veículo de exposição a agentes patogénicos bacterianos, fúngicos, protozoários ou virais, uma vez que a água balnear poluída não é a única fonte de preocupação para os banhistas (Efstratiou, 2018).

Apesar de alguns surtos de doenças terem sido associados à ingestão acidental de areia proveniente de caixas de areia (Doorduyn et al., 2006; Staff et al., 2012), não foram ainda registados surtos ligados especificamente à exposição a areia de praia. O número de estudos que deteta agentes patogénicos em areias de praia de vários locais do Mundo está a aumentar; contudo, é fundamental perceber a prevalência

comparativa dos diversos agentes patogénicos encontrados em areias de praia e os riscos de saúde que lhes estão associados. Uma das dificuldades em comparar a prevalência de patogénicos em areias de praia está no facto de que a ocorrência de agentes patogénicos está, possivelmente, relacionada com a proximidade local de fontes de contaminação (por exemplo, banhistas ou contaminação fecal), assim como as diferentes variáveis do meio ambiente onde a praia está inserida, por exemplo as suas características geológicas, da flora circundante, as infraestruturas de acesso e a existência de transportes, assim como atividades comerciais ou lúdicas nas águas circundantes e as características ecológicas destes patogénicos (Whitman et al., 2014).

As areias das praias podem atuar como um elemento passivo da poluição cumulativa e podem ser contaminadas por lixo, dejetos de animais ou pela própria água, que pode transportar microrganismos patogénicos e oportunistas, e parasitas. O contexto microbiológico dos sedimentos na interface sedimento-água em águas balneares está a receber uma atenção progressiva. Há evidências de que o indicador fecal e as bactérias patogénicas sobrevivem por períodos mais longos nos sedimentos do que na água sobrejacente e foi proposto que os sedimentos atuam como sumidouros para bactérias fecais com potencial para poluir a água sobrejacente (Ashbolt et al., 1993; Howell et al., 1996; Nix et al., 1993). No entanto, e apesar da bem estabelecida relação causa-efeito entre a poluição fecal das águas de recreio e os surtos de gastroenterite, não foi encontrada nenhuma prova epidemiológica de uma transmissão entre uma contaminação microbiológica da areia e uma infeção humana. Pessoas com diferentes sistemas imunitários são todas frequentadoras de praias, mas indivíduos com o sistema imunitário comprometido são mais suscetíveis a adquirir infeções causadas por microrganismos encontrados na praia da areia (Sabino et al., 2011).

A areia também pode atuar como um mecanismo de transmissão para agentes patogénicos oportunistas de origem não-fecal, como acontece com os dermatófitos, que podem ser levados pelos próprios utilizadores das praias (Weiskerger et al., 2019). A areia frequentada por pessoas e por animais tem uma população crescente de fungos específicos de humanos e específicos de animais, em comparação com a areia não frequentada. As leveduras patogénicas isoladas de areia de praias balneares incluem as espécies *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Rhodotorula mucilaginosa*. Os fungos filamentosos patogénicos e patogénicos oportunistas incluem *Aspergillus* sp., *Chrysosporium* sp., *Fusarium* sp., *Scedosporium* sp., *Scytalidium* sp., *Scopulariopsis* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., *Mucor* sp., *Stachybotrys* sp., *Phialemonium* sp., *Acremonium* sp. Os géneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os mais frequentes na areia de praias. A areia das praias balneares também serve como reservatório de dermatófitos, incluindo *Trichophyton* sp., *Microsporum* sp., *Chrysosporium* sp. As leveduras negras *Exophiala dermatitidis* e *Aureobasidium melanogenum* também já foram isoladas de areia da praia (Efstratiou, 2018).

Regra geral, a proteção da saúde pública baseia-se na monitorização de microrganismos indicadores fecais em águas balneares. As bactérias indicadoras são enumeradas de modo a avaliar o nível de poluição fecal e, por conseguinte, o risco para os banhistas de exposição a microrganismos patogénicos fecais. A concentração microbiológica de bactérias consideradas indicadores de contaminação fecal é comparada com os níveis permissíveis dos mesmos micróbios como um índice de aceitabilidade ou não. Os esquemas de monitorização, que são extensos, são determinados pela legislação, pelos padrões e pelas diretrizes nacionais e internacionais. A monitorização das águas das praias, de acordo com as regulamentações, trouxe uma melhoria notável na qualidade das águas balneares, apesar do facto de as atividades balneares e recreativas nas praias continuarem a ter, por vezes, um impacto adverso na saúde (Efstratiou, 2018).

Atualmente, a qualidade microbiológica das águas balneares é um dos indicadores relacionado com a qualidade ambiental e sanitária da praia que está disponível para os utilizadores. No entanto, as areias e os sedimentos presentes na zona costeira podem constituir um habitat onde os microrganismos podem sobreviver e até prosperar nas condições corretas (Pereira et al., 2013). Apesar de a legislação existente

se concentrar na quantificação de bactérias presentes na água, a areia não está incluída no quadro regulamentar (Pereira et al., 2013; Sabino et al., 2014).

Nos últimos anos, tem havido um crescente conhecimento sobre os microrganismos que são importantes a nível da saúde pública e que são detetados na areia da praia. O conhecimento sobre o papel da areia como um reservatório de poluentes e como fonte de contaminação para os banhistas, assim como sobre as águas balneares também tem aumentado nos últimos anos (Efstratiou, 2018).

1.2 Características gerais dos fungos

Os fungos são organismos eucarióticos, heterotróficos e sem clorofila que estão dependentes dos nutrientes de origem externa. Assim, vivem como saprófitos, parasitas, ou em simbiose com plantas e animais, em praticamente todas as condições ambientais. O fenótipo destes organismos vai desde um aspeto unicelular a um aspeto dimórfico ou filamentoso (Simon-Nobbe et al., 2008).

Estes organismos parecem estar presentes em todos os habitats, incluindo em água potável destinada ao consumo humano, em água doce e em oceanos. Podem ser divididos com base na sua capacidade para colonizar ambientes diferentes. Esta divisão consiste em três grupos: fungos mesofílicos, fungos generalistas e fungos especialistas. As espécies mesofílicas ocupam nichos ecológicos com parâmetros físicos e químicos moderados; as espécies generalistas vivem em ambientes com condições variáveis, mas o seu crescimento ótimo ocorre sob condições ambientais moderadas; as espécies especialistas vivem em habitats extremos e são incapazes de crescer sob condições moderadas (Babič et al., 2017).

As comunidades de fungos são altamente diversas, mas têm poucas descrições. Os corpos vegetativos são compostos por filamentos microscópicos que interagem diretamente com o meio ambiente na escala do micrómetro (μm). Existem cerca de 30,000 espécies de Ascomycota e 25,000 espécies de Basidiomycota descritas. O tamanho dos esporos fúngicos varia entre 2 e 3 μm (como acontece nos géneros *Cladosporium*, *Aspergillus* e *Penicillium*) até aos 160 μm (como acontece com o género *Helminthosporium*). O tamanho médio situa-se entre os 2 e os 10 μm , mas também são conhecidos esporos com 500 μm na espécie *Alternaria longissima* (Simon-Nobbe et al., 2008).

Os esporos fúngicos que, frequentemente, se encontram na escala dos micrómetros, são produzidos em grande número e são capazes de se dispersar a longas distâncias. Este aspeto microscópico torna os fungos quase impossíveis de observar nos seus estados vegetativos ativos e, portanto, é necessário frequentemente recorrer a ferramentas moleculares para a sua identificação e quantificação (Peay et al., 2008).

Os fungos são organismos maioritariamente filamentosos e esporulados, que representam uma entidade separada dentro dos organismos vivos. Em geral, uma geração sexuada é seguida por uma geração assexuada durante um ciclo de vida. Cada uma destas gerações pode propagar-se independentemente, exibindo diferentes morfologias (pleomorfismo) (Simon-Nobbe et al., 2008).

A grande maioria dos fungos causadores de alergias pertence aos filamentos Ascomycota ou Basidiomycota. Os fungos do filo Ascomycota produzem os seus ascósporos no decurso da reprodução sexual no asco, enquanto os fungos do filo Basidiomycota produzem os seus basidiósporos no basídio (Simon-Nobbe et al., 2008).

A figura 1.1 representa o ciclo de vida de um fungo do filo Ascomycota, ao passo que a figura 1.2 representa o ciclo de vida de um fungo do filo Basidiomycota (Madigan et al., 2012).

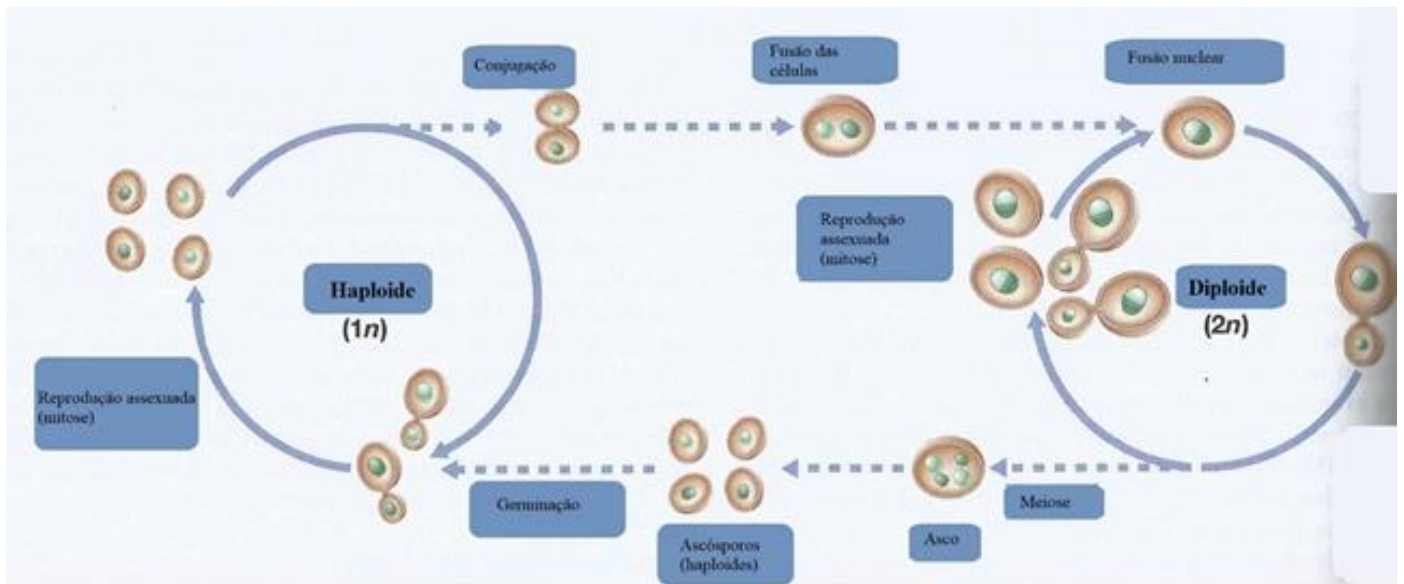


Figura 1.1-Ciclo de vida de um fungo pertencente ao filo Ascomycota (Madigan et al., 2012).

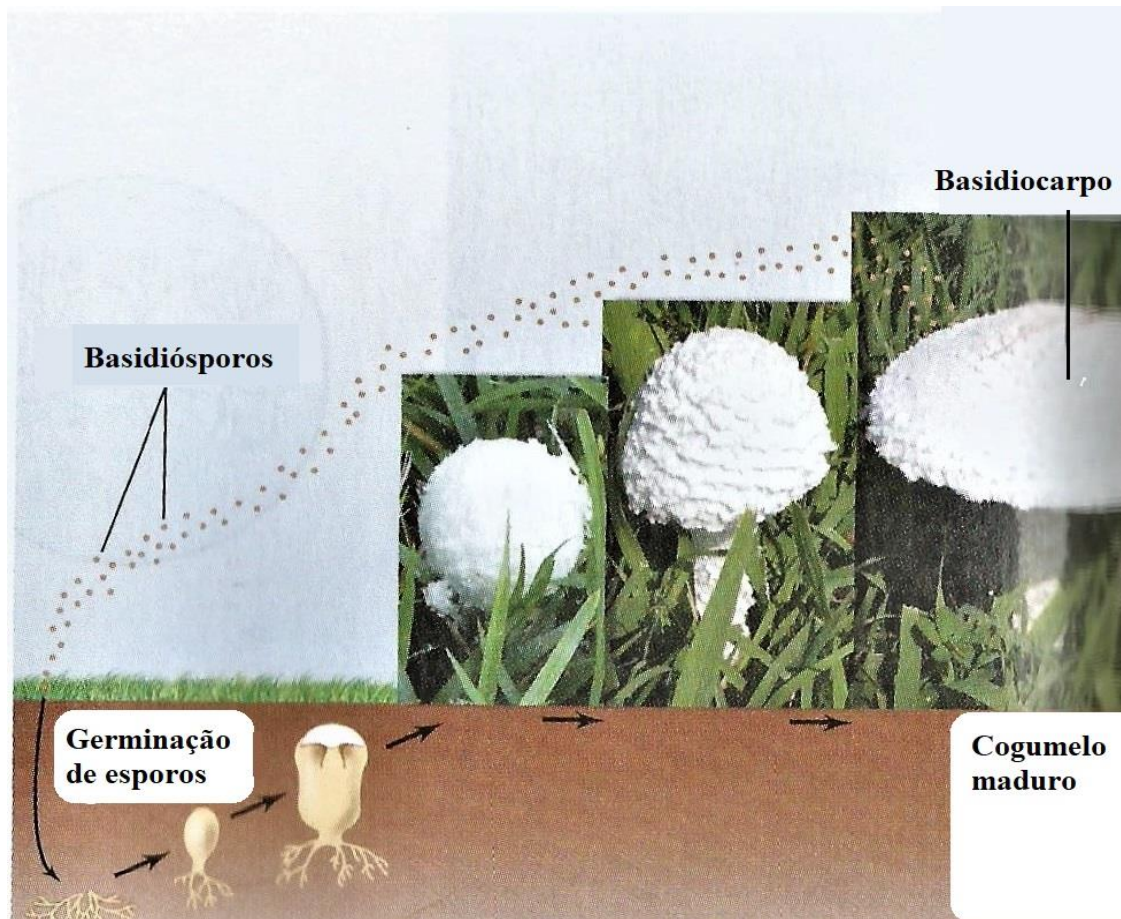


Figura 1.2-Ciclo de vida de um fungo pertencente ao filo Basidiomycota (Madigan et al., 2012).

Estima-se que existam 1.5 milhões de espécies de fungos. Os fungos são responsáveis por muitas funções ecológicas essenciais, tais como a decomposição de madeira e de lixo, associações de micorrizas, e outras formas de reciclagem de nutrientes. Naturalmente imperceptíveis, os fungos costumam ser mais visíveis apenas quando formam corpos de frutificação, ou outros propágulos, acima do solo (Nilsson et al., 2009).

Os fungos não parecem exibir uma frequência alta de transferência gênica horizontal. Assim sendo, os traços funcionais são relativamente estáveis, e os conceitos de espécies são úteis e estão desenvolvidos de uma forma razoável (Peay et al., 2008).

Embora os fungos sejam fundamentais para a vida na Terra devido ao seu papel na reciclagem de nutrientes, e aos seus usos presentes e potenciais na biotecnologia, eles também causam graves problemas em vários aspectos. Alguns desses problemas são bastante conhecidos e são bem divulgados (bolor no pão, cogumelos venenosos, podridão de madeira em casas, agentes patogênicos para os humanos), enquanto outros são igualmente perigosos, mas menos conhecidos do público (fungos do ar interior, produtores de micotoxinas, surtos hospitalares) (Hyde et al., 2018).

Estes organismos são os agentes patogênicos de plantas mais comuns e importantes, pois provocam graves perdas de colheitas, alterando também a composição e a estrutura das comunidades naturais de plantas de diversas maneiras expressivas que são, muitas vezes, subestimadas (Peay et al., 2008).

Das mais de 100.000 espécies de fungos já descritas, algumas centenas são espécies oportunistas, enquanto que cerca de 100 espécies são conhecidas por provocar micoses no ser humano e em animais (Simon-Nobbe et al., 2008).

Em traços gerais, podem ser reconhecidas três categorias de fungos: **fungos patogênicos**, ou seja, espécies que têm uma vantagem de maior aptidão se um vertebrado for usado em qualquer estágio do seu ciclo de vida; **oportunistas**, isto é, espécies que ocupam habitats ambientais onde têm características que, coincidentemente, melhoram a invasão de tecidos se forem acidentalmente introduzidos num corpo humano; **fungos colonizadores**, que dependem de produtos do corpo humano, geralmente sem se tornarem invasivos (Hyde et al., 2018).

Os indivíduos saudáveis podem ser mais prejudicados por espécies oportunistas do que por espécies patogênicas. A nossa imunidade celular adquirida consegue controlar de modo eficaz a infecção por agentes patogênicos. Consequentemente, as infecções por microrganismos em indivíduos saudáveis são assintomáticas ou provocam apenas infecções ligeiras. Assim sendo, as doenças causadas por fungos patogênicos graves estão tipicamente associadas a uma disfunção do sistema imunitário adquirido e, por conseguinte, estas infecções estão habitualmente associadas a SIDA ou quimioterapia para o cancro (Hyde et al., 2018).

Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos possuem filamentos designados por hifas, que podem ser divididas em compartimentos celulares – são as hifas septadas (Sykes and Rankin, 2013). Cada uma das hifas cresce, principalmente, através da extensão da célula terminal (Madigan et al., 2012). A figura 1.3 representa a morfologia e o ciclo de vida de um fungo filamentoso. Um conjunto de filamentos é conhecida como um micélio. Um grânulo formado por um grupo compactado de filamentos fúngicos é um eumicetoma (Sykes and Rankin, 2013).

Embora as condições ótimas de crescimento variem entre os fungos filamentosos, a sua temperatura ótima de crescimento varia entre os 18°C e os 32°C. Para o seu crescimento, necessitam de oxigénio, água e uma fonte de hidratos de carbono. Os fungos filamentosos estão presentes em ambientes internos e externos e crescem em praticamente qualquer substrato, incluindo superfícies de vidro e de plástico (Simon-Nobbe et al., 2008).

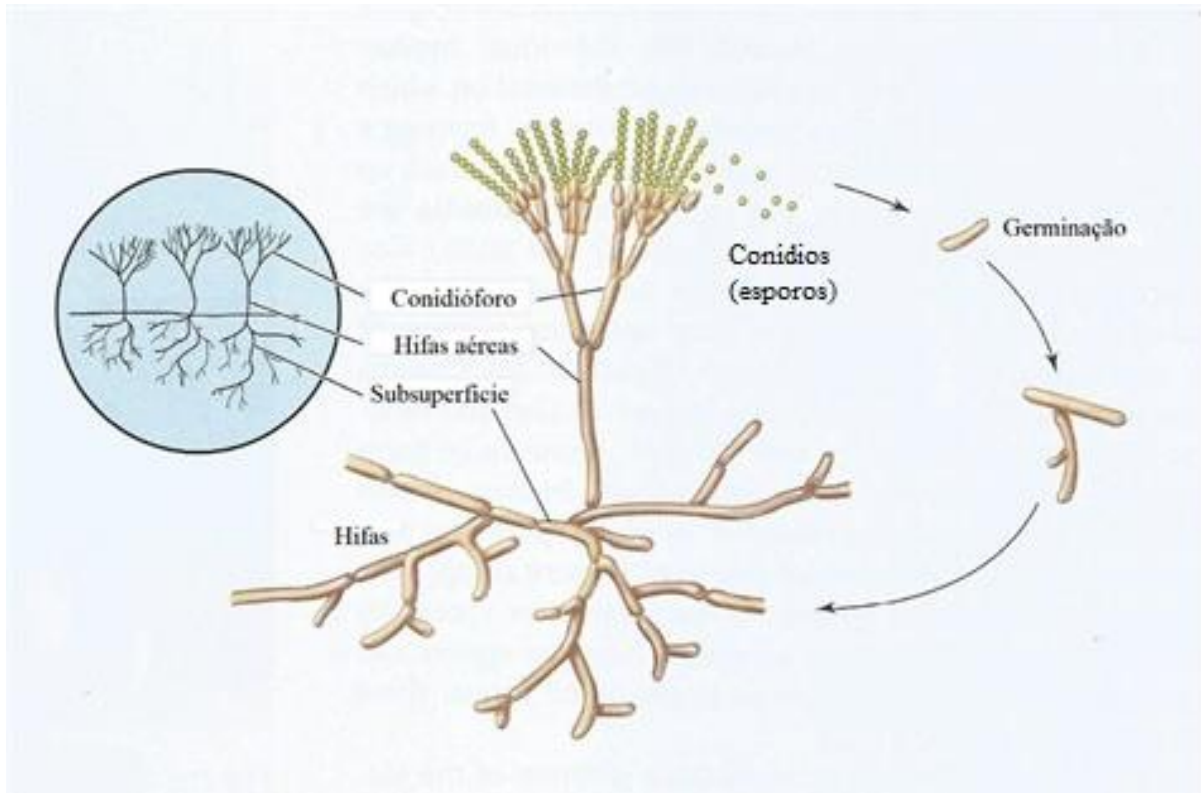


Figura 1.3-Morfologia de um fungo filamentosos. Adaptado de Madigan et al., 2012

Leveduras

As leveduras são organismos unicelulares que se reproduzem por gemulação (*budding*). Em alguns casos, as gémulas não se separam da célula mãe; em vez disso, formam uma cadeia. As cadeias alongadas, constituídas por várias gémulas, podem assemelhar-se a hifas. Quando isto acontece, as cadeias recebem o nome pseudo-hifas (Sykes and Rankin, 2013).

Alguns fungos patogênicos existem sob a forma de fungo filamentosos no meio ambiente, mas quando estão nos tecidos sofrem mudanças e têm o aspeto de uma levedura. Estes fungos são designados de fungos dimórficos. Um exemplo de um fungo dimórfico é a espécie *Blastomyces dermatitidis* (Sykes and Rankin, 2013).

1.3 Implicações na saúde

Infeções fúngica

As leveduras podem provocar infeções se entrarem em contato direto com a pele. Os fungos filamentosos podem atuar adicionalmente como microorganismos transportados pelo ar, dado que os seus esporos, os fragmentos de micélios e de hifas podem ser inalados e provocar doenças (Efstratiou, 2018).

As doenças causadas por fungos têm um impacto preocupante na saúde humana. No entanto, têm sido continuamente negligenciadas ao longo dos anos. Algumas estimativas recentes apontam para uma ocorrência global anual de, sensivelmente, 3 000 000 de casos de aspergilose pulmonar crónica, mais de 200 000 casos de meningite provocada por *Cryptococcus*, 700 000 casos de candidíase invasiva, 250 000 casos de aspergilose invasiva, mais de 10 000 000 casos de asma provocada por esporos de fungos, e 1 000 000 casos de queratite fúngica (Rodrigues and Albuquerque, 2018). Estima-se que as infeções fúngicas sejam responsáveis pela morte de mais de 1,5 milhões de pessoas por ano. É também necessário considerar a morbilidade a fungos. Duas infeções graves, a cromoblastomicose e o eumicetoma, provocam doenças debilitantes, que afetam os tecidos subcutâneos, a pele, e os ossos subjacentes (Rodrigues and Albuquerque, 2018).

A maioria dos fungos não é patogénica para os seres humanos saudáveis, apesar de alguns serem organismos patogénicos oportunistas. No entanto, certas espécies são clinicamente importantes, capazes de infetar indivíduos saudáveis, causando doenças graves. Pessoas imunocomprometidas, idosos e crianças pequenas são os grupos mais vulneráveis (Efstratiou, 2018). É também necessário ter em conta que há diversos fungos oportunistas (por exemplo:) que são capazes de provocar doenças fatais em pessoas aparentemente saudáveis. Consequentemente, estas espécies fazem parte da lista dos fungos mais perigosos, e pertencem à categoria Nível 3 de Biossegurança (Hyde et al., 2018).

As infeções fúngicas são frequentemente crónicas e difíceis de tratar. Algumas delas, após um longo e doloroso período de doença, são horrivelmente mutilantes e podem levar à morte. Felizmente, das milhões de espécies conhecidas de fungos, há apenas um pequeno grupo que causa doenças. Desde a primeira descoberta duma infeção fúngica em 1842, e apesar do aumento do número de pacientes suscetíveis que sofrem de problemas imunitários e de diabetes, apenas cerca de 650 espécies estão descritas como sendo causadoras de infeções. Com exceção dos agentes patogénicos oportunistas que só ocasionalmente causam infeções em pacientes gravemente imunocomprometidos, a lista de espécies que infetam recorrentemente os seres humanos é ainda menor. Apenas cerca de 150 espécies são relativamente comuns (Hyde et al., 2018).

Contudo, o sistema imunitário é ingénuo em relação à maioria dos oportunistas. Mesmo em hospedeiros saudáveis com um sistema imunitário funcional, estas infeções podem causar morbilidade grave. A resposta do hospedeiro pode ser inadequada, levando a uma infeção crónica, que se agrava lentamente. Regra geral, esta situação ocorre após a inoculação traumática através da pele, resultando em deformações como na cromoblastomicose ou no micetoma. Se for inalado, o oportunista pode ocasionalmente entrar na corrente sanguínea iniciando uma infeção sistémica ou disseminada. O prognóstico de infeções sistémicas por fungos é frequentemente a morte. Infeções fatais em indivíduos normalmente saudáveis são frequentemente causadas por fungos oportunistas e não por fungos patogénicos (Hyde et al., 2018).

Os fungos patogénicos estão praticamente todos incluídos numa única ordem, a Onygenales. Esta ordem contém os dermatófitos, como os do género *Trichophyton*, e os fungos com um sistema dimórfico, como os géneros *Coccidioides* e *Histoplasma*. Existem várias espécies, pertencentes de

ambos os grupos, que têm um ciclo de vida ligado ao ciclo de vida de animais selvagens, como os roedores e os morcegos (Hyde et al., 2018).

Algumas espécies ou grupos de espécies não pertencentes à ordem Onygenales, como *Cryptococcus gattii*, o complexo de espécies *C. neoformans* (Filobasidiales) e *Talaromyces marneffei* (Eurotiales), apresentam um comportamento semelhante, mas são enigmáticas, dado que não é conhecida nenhuma origem filogenética clara que explique a sua patogenicidade. Essas espécies, semelhantes às espécies da ordem Onygenales, levam a uma mortalidade elevada entre as populações HIV-positivas residentes em áreas endêmicas; contudo, são uma ameaça muito pouco frequente para indivíduos imunocompetentes (Hyde et al., 2018).

Outro aspeto que se deve ter em conta é o surgimento de resistências a alguns dos principais antifúngicos. Um exemplo deste problema é a espécie *Candida auris*, que é resistente a vários medicamentos. Este agente patogénico emergente está a tornar-se numa ameaça séria à saúde humana, uma vez que algumas infeções são resistentes a todas as principais classes de antifúngicos (Rodrigues and Albuquerque, 2018). Outro exemplo deste problema é *Aspergillus* spp. A sua resistência, tanto intrínseca como adquirida, foi documentada e o número de estirpes clínicas resistentes aos antifúngicos mais comuns está a aumentar rapidamente em algumas regiões geográficas (van der Linden et al., 2011). Algumas observações recentes sugerem que a resistência aos triazóis entre *Aspergillus* spp. pode ser mais comum do que era anteriormente conhecido; os isolados mais resistentes têm resistência cruzada a azóis (Sabino et al., 2016). A resistência aos azóis foi descrita, predominantemente, para *Aspergillus fumigatus*, a espécie responsável por aproximadamente 80% das infeções invasivas (Messer et al., 2006). No entanto, a resistência ao itraconazol também foi detetada em outras espécies na seção *Fumigati*, como *Aspergillus lentulus* (Alcazar-Fuoli et al., 2008), bem como em espécies pertencentes a outras seções taxonómicas, como *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* e *Aspergillus flavus* (Araujo et al., 2007; Gomez-Lopez et al., 2003), atualmente seções *Nigri*, *Terrei* e *Flavi*. A maioria dos dados de suscetibilidade refere-se ao itraconazol e fluconazol, embora existam cada vez mais relatórios a descrever resistência aos agentes azólicos mais recentes, incluindo posaconazol e voriconazol (Howard and Arendrup, 2011).

A mortalidade e morbidade provocadas por doenças fúngicas afetam, principalmente, indivíduos que vivem sob restrições socioeconómicas. As ferramentas de diagnóstico confiáveis e económicas estão disponíveis apenas para um número muito limitado de micoses, e as opções terapêuticas estão restritas a algumas classes de agentes farmacêuticos que são pouco eficazes, tóxicos e caros. Não existem vacinas antifúngicas licenciadas. Os últimos antifúngicos que foram aprovados para uso clínico foram as equinocandinas, em 2002. De acordo com o Fundo Global para Infeções Fúngicas, vários antifúngicos chave também não estão disponíveis ou não estão registados em diversas regiões onde as doenças fúngicas são mais letais (Rodrigues and Albuquerque, 2018).

Embora os programas direcionados tenham sido recentemente estabelecidos para o tratamento do micetoma, a maioria das micoses ainda requer atenção por parte das autoridades de saúde pública. O micetoma, a cromoblastomicose e as "outras micoses profundas" foram incluídas recentemente na lista de doenças tropicais negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS), mas as informações específicas sobre os planos da OMS para combater doenças fúngicas ainda não estão disponíveis publicamente. A meningite criptocócica, que está entre as doenças mais mal financiadas no mundo, foi recentemente proposta como uma doença tropical negligenciada (Rodrigues and Albuquerque, 2018).

Alergias provocadas por fungos

Há décadas que os esporos de fungos e as células dos micélios são conhecidos por serem um enorme risco para a saúde. Em contraste com o pólen que é transportado pelo ar, os esporos fúngicos não estão associados principalmente a alergias do tipo I mediadas por Imunoglobulina E (IgE), mas

também a um conjunto amplo de outras doenças, tais como infecções primárias e secundárias que podem colocar pacientes imunocomprometidos em risco de vida (Simon-Nobbe et al., 2008).

O conjunto vasto de doenças resulta da inalação e da ingestão de esporos fúngicos e de células vegetativas (hifas) ou do contato com células fúngicas. Em contraste com outras fontes alergênicas, os fungos são muito comuns no meio ambiente, e a exposição a esporos no ar é quase constante durante todo o ano. Uma diferença importante em relação a outras fontes, como os ácaros presentes no pó das casas ou o pólen, é que os fungos podem colonizar o corpo humano, e podem danificar as vias aéreas através da produção de toxinas, proteases, enzimas e compostos orgânicos voláteis. Assim sendo, os fungos têm um impacto muito maior no sistema imunitário humano do que o pólen ou do que outras fontes alergênicas (Simon-Nobbe et al., 2008).

A inalação de esporos de fungos é uma causa bem conhecida de asma e de alergias, incluindo a asma sazonal, que origina episódios ocasionais no final do verão e no Outono. Em algumas regiões o ritmo e a severidade de asma na população foram ligados à quantidade de esporos dos bolores *Alternaria* e *Cladosporium* presentes no ar, uma vez que houve casos graves que levaram à hospitalização. Estes fungos podem causar doenças graves em pessoas com um sistema imunitário enfraquecido ou com um sistema imunitário hiper-reativo. Em certos casos, a inalação de conídios pode manifestar-se sob a forma de infecções respiratórias agudas e violentas, mesmo em hospedeiros imunocompetentes. Esta situação pode ocorrer com fungos dos géneros *Histoplasma*, *Coccidioides*, *Paracoccidioides* e *Cladophialophora* (Whitman et al., 2014).

As alergias do tipo I são causadas por um elevado número de géneros fúngicos. Mais de 80 géneros de bolores são conhecidos por causar alergias do tipo I em pessoas suscetíveis, enquanto que proteínas alergênicas foram identificadas em 23 géneros de fungos. A maioria destes géneros são membros das divisões Ascomycota ou Basidiomycota. Os géneros mais importantes de fungos causadores de alergias do filo Ascomycota são: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Candida*, *Cladosporium*, *Epicoccum* e *Phoma*. Os géneros *Calvatia*, *Coprinus*, *Ganoderma*, *Pleurotus* e *Psilocybe* são os causadores de alergias mais relevantes do filo Basidiomycota (Simon-Nobbe et al., 2008).

A incidência de alergia a fungos filamentosos varia de 6% a 24% na população geral, chega até aos 44% entre os atópicos (pessoas com predisposição hereditária para algumas reações alérgicas) e até aos 80% entre os asmáticos. A incidência de alergia a fungos filamentosos em crianças asmáticas é de 45%, ao passo que em adultos asmáticos é de 70%. Para além de alergias, os fungos têm sido descritos como causadores de micose bronco pulmonar alérgica (MBPA), pneumonite por hipersensibilidade, sinusite fúngica e pneumonia tóxica. Para além disto, foi registado um grande número de micotoxinas (Simon-Nobbe et al., 2008).

Micotoxinas

As micotoxinas são produzidas pelos micélios de fungos filamentosos. As micotoxinas são metabolitos secundários - não desempenham nenhum papel bioquímico no crescimento e desenvolvimento dos fungos (Hussein and Brasel, 2001).

Estes metabolitos constituem um grupo heterogéneo, que foram agrupados apenas porque todos estes compostos podem causar doenças e levar à morte de seres humanos e de outros vertebrados. Contudo, muitas micotoxinas apresentam efeitos tóxicos em invertebrados, plantas e em microrganismos. Estas toxinas enquadram-se em várias classes que não estão relacionadas quimicamente, são produzidas de uma forma específica de cada estirpe e provocam algumas reações toxigênicas complicadas em espécies sensíveis. Estas reações incluem carcinogenicidade, inibição da síntese de proteínas, supressão do sistema imunitário, irritação dérmica e outras perturbações metabólicas (Zain, 2011).

Estas substâncias apresentam diferentes níveis de complexidade, podendo ser compostos simples com apenas quatro átomos de carbono, ou substâncias complexas. Atualmente, são conhecidas mais de 300 micotoxinas. A exposição humana a micotoxinas pode resultar do consumo de alimentos derivados de plantas que estão contaminados com toxinas dos fungos que as infetam, do transporte de micotoxinas e dos seus metabolitos em produtos de origem animal (por exemplo, carne e ovos), ou da exposição ao ar e poeira que contém toxinas (Zain, 2011).

Algumas das micotoxinas que têm uma grande importância para a saúde pública e para as atividades agrícolas e econômicas incluem aflatoxinas (AF), ocratoxinas (OT), tricotecenos, zearalenona (ZEN), fumonisinas (F), toxinas tremorgênicas e alcalóides. Estas toxinas são responsáveis por causar, em diversos países, prejuízos de milhões de dólares, por ano, nas áreas da saúde humana, saúde animal e produção agrícola (Hussein and Brasel, 2001).

Os fungos filamentosos toxigênicos produzem um ou mais destes metabolitos secundários. No entanto, nem todos os fungos são toxigênicos, do mesmo modo que nem todos os metabolitos secundários dos fungos são tóxicos (Zain, 2011).

Dermatófitos

As infecções fúngicas da pele e das unhas constituem o grupo mais numeroso e mais comum de todas as micoses. A frequência das infecções micóticas superficiais subiu tão rapidamente nas últimas décadas que, em 2010, as micoses cutâneas afetavam cerca de 20% a 25% da população mundial, tornando-as uma das formas mais frequentes de infecções (Havlickova et al., 2009).

Os casos de dermatofitoses em humanos são, essencialmente, infecções fúngicas superficiais, dado que os dermatófitos invadem e espalham-se em tecidos queratinizados, como o cabelo, a pele e as unhas. Os dermatófitos podem afetar várias partes do corpo. Estes fungos têm tendência para formar um padrão externo na pele à medida que crescem, produzindo assim uma lesão em forma de anel (Coulibaly et al., 2018).

A filogenia dos dermatófitos reflete, de modo geral, um padrão consistente de evolução de modo a aumentar a adaptação a hospedeiros que sejam mamíferos (Hyde et al., 2018). Os dermatófitos crescem a temperaturas entre os 25°C e os 28°C, e as infecções em pele humana desenvolvem-se em condições quentes e húmidas. Por estas razões, as infecções fúngicas superficiais são relativamente comuns em países tropicais e são exacerbadas pelo uso de roupas que cobrem grande parte do corpo. Além disso, a frequência de dermatomicoses é maior em comunidades com baixo nível socioeconómico: habitar em locais muito populosos oferece múltiplas oportunidades para o contato pele a pele e para a proximidade com animais, enquanto que a higiene pode não ser a ideal. Para além do mais, as infecções cutâneas superficiais mostram uma baixa tendência para a correta identificação da infeção, e a falta ou a má assistência médica aumenta ainda mais a disseminação epidémica de micoses cutâneas (Havlickova et al., 2009).

Algumas espécies estão distribuídas em todo o mundo, como *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes var. interdigitale*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum*. Outras espécies têm limites geográficos parciais, como *T. schoenleinii* (Ásia, África, Europa), *T. soudanense* (África), *T. violaceum* (África, Ásia e Europa) e *T. concentricum* (Ilhas do Pacífico, Ásia Oriental e Índia) (Ameen, 2010).

M. canis é o dermatófito predominante na Europa Central e do Sul, como resultado da alta taxa de tinea capitis. Na Ásia, *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* são os dermatófitos mais comumente isolados, e, como na Europa, resulta da alta prevalência de tinea pedis e tinea unguium. Na América Latina, África e Médio Oriente, o padrão de infeção dermatofítica é muito mais variável, e existem algumas associações regionais fortes. Por exemplo, *M. audouinii* é a espécie mais frequente em África; no entanto, a infeção por *T. violaceum* é altamente endémica em de África, assim como no Norte de África

e na África do Sul, e a infecção por *T. soudanense* é muito frequente no noroeste tropical central de África (Ameen, 2010).

A maioria dos casos de tinea unguium, tinea cruris, tinea corporis e tinea pedis é causada pela espécie *T. rubrum*, que é o dermatófito mais comum na maioria dos países desenvolvidos, bem como em áreas urbanas de alguns países em desenvolvimento (Ameen, 2010).

É provável que a epidemiologia das infecções por dermatófitos se altere com a mudança dos padrões de migração, o crescimento do turismo e as mudanças nas condições socioeconômicas (Ameen, 2010). Para além destes fatores, as atividades desportivas internacionais também podem fazer com que algumas espécies menos comuns ou esquecidas comecem a ser importadas e disseminadas (Havlickova et al., 2009). É de notar que alguns dermatófitos endêmicos dos continentes Asiático e Africano, como o *T. soudanense*, o *T. violaceum* e o *M. audouinii*, aumentaram de frequência na Europa e na América do Norte como resultado de migrações. As mudanças na epidemiologia dos agentes causadores também são um reflexo da mudança nos padrões das dermatofitoses (Ameen, 2010).

1.4 Ferramentas moleculares para a identificação de fungos

O estudo ecológico das comunidades de fungos tem sido reprimido por haver uma incapacidade em identificar espécies nos seus estados vegetativos. Embora as estruturas reprodutivas possam ser usadas como caracteres de diagnóstico, não são as mais adequadas para os estudos ecológicos, dado que são produzidas com pouca frequência no meio ambiente, podem albergar complexos crípticos de espécies e não representam com precisão a abundância de espécies (Peay et al., 2008).

A recente adoção e disseminação de ferramentas moleculares baseadas em DNA e RNA reduziu enormemente as barreiras que existiam na amostragem e identificação de fungos a partir de material vegetativo. Devido à sua natureza altamente críptica, foi a aplicação de ferramentas moleculares na ecologia fúngica que permitiu reconciliar com sucesso a lacuna que existe entre os micro e os macroorganismos (Peay et al., 2008).

Em micologia, a região espaçadora interna transcrita (*internal transcribed spacer region* - ITS) da unidade de repetição do ribossoma nuclear é a região que é mais frequentemente sequenciada para responder a questões sobre sistemática e taxonomia ao nível do género e abaixo deste (Nilsson et al., 2009). Esta região do DNA ribossomal nuclear evolve muito depressa e pode variar entre espécies dentro de um género ou entre populações (White et al., 1990).

Apesar de a região ITS não ser completamente não problemática, o número de sequências da região ITS de fungos que está armazenado na *International Nucleotide Sequence Databases* (INSD) desde o início da década de 1990 é superior a 100,000 (Nilsson et al., 2009).

Esta região tem três vantagens principais em relação a outras regiões do genoma: 1) tem locais de *priming* específicos para fungos bem conservados, que se encontram diretamente adjacentes a variadas regiões altamente variáveis; 2) existem muitas sequências que já estão disponíveis para comparação, o que facilita bastante a identificação de amostras desconhecidas; 3) correlaciona-se bem com espécies que estão definidas morfológicamente em diversos grupos (Peay et al., 2008).

Os *primers* ITS utilizam as regiões conservadas dos genes de DNA ribossomal 18S, 5.8S, e 28S para amplificar as regiões não-codificantes entre eles (White et al., 1990). Esta região, que tem cerca de 650 bp, é, geralmente, obtida numa única sequenciação de Sanger. Na figura 1.4, é possível observar a localização dos *primers* ITS1, ITS2, ITS3, ITS4 e ITS5, assim como a localização das regiões de DNA ribossomal nuclear 5.8S, 18S e 28S (Baldwin et al., 1995).

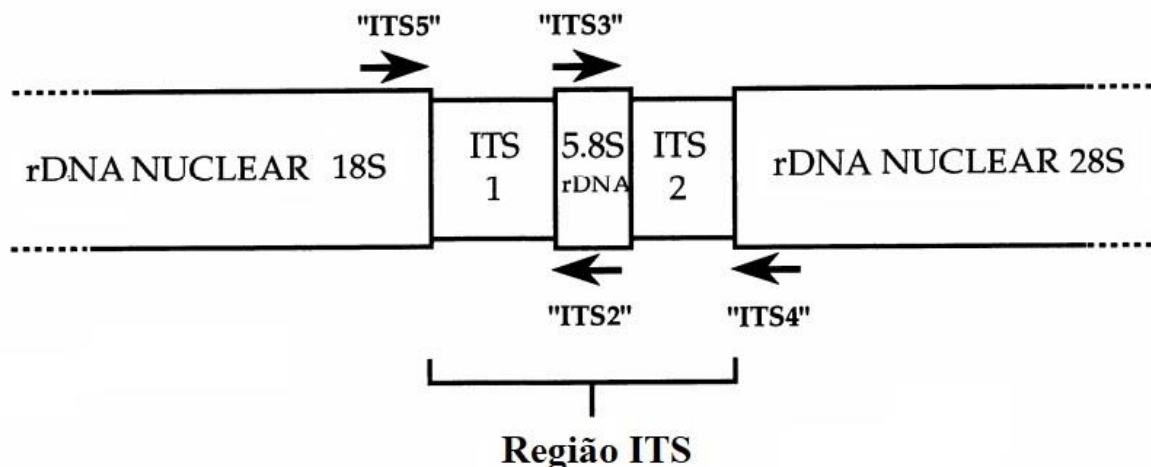


Figura 1.4-Localização da região ITS e dos respectivos primers. As setas indicam a posição aproximada e a orientação dos primers. Adaptado de Baldwin et al., 1995

O ITS1 e ITS2 – exibem uma alta taxa de evolução e, regra geral, são específicas de cada espécie. O elevado número de cópias de ITS por célula torna esta região um alvo relevante para sequenciar amostras onde a quantidade inicial de DNA é baixa, como acontece com amostras ambientais de solo e de madeira (Nilsson et al., 2009).

Como regra geral, aproximadamente 97% de semelhança para uma sequência é, geralmente, apropriada para distinguir espécies em estudos de amostras ambientais (Peay et al., 2008).

1.5 Objetivos

O objetivo principal desta dissertação é a recolha de dados sobre as populações típicas de fungos existentes nas comunidades microbianas nas três zonas balneares estudadas. Pretende-se identificar todos os isolados existentes nas amostras até à espécie ou, quando tal não é possível, até ao género. A identificação dos isolados presentes nas amostras é feita através da observação de caracteres morfológicos diagnosticantes e através de ferramentas moleculares (sequenciação da região ITS). Para além de identificar os isolados, pretende-se também quantificar o número de colónias em cada amostra, de modo a determinar a frequência das espécies em cada mês e a espécie prevalente em cada praia.

Este estudo está inserido no projeto Europeu “*Exploring fungal contamination in the sand and water around the Mediterranean Sea and other water bodies of Europe – relevance to human health and wellbeing*”, da European Confederation of Medical Mycology (ECMM), sendo que representa os primeiros sete meses da contribuição de Portugal para este mesmo projeto.

2. Materiais e Métodos

2.1 Locais e periodicidade

As colheitas começaram no final de novembro de 2018 e terminaram em junho de 2019, tendo sido realizadas mensalmente. Em cada sessão de amostragem, foram recolhidas uma amostra de areia e uma amostra de água.

O processamento das amostras foi executado durante todo o período do estudo, enquanto as identificações moleculares se iniciaram em janeiro de 2019.

As amostragens ocorreram em três praias: praia de Carcavelos (Lisboa); praia de Alburrica (Setúbal); Praia Verde (Algarve). Estas praias foram selecionadas por questões de logística e por serem praias muito frequentadas.

Na Praia Verde, nos meses de janeiro, fevereiro e maio de 2019, não foi possível realizar amostragens. No total, durante o período de estudo, foram recolhidas sete amostras na praia de Carcavelos, sete amostras na praia de Alburrica, e quatro amostras na Praia Verde.

As praias em estudo estão localizadas em três distritos diferentes. As praias mais próximas entre si são Carcavelos e Alburrica. Das três praias, a praia de Alburrica é a única praia fluvial com águas de transição, uma vez que está localizada no estuário de rio Tejo. Por sua vez, a praia de Carcavelos e a Praia Verde são praias marítimas. Alburrica é também a menor praia das três em estudo, ao passo que a Praia Verde tem uma extensão de aproximadamente 550 m, e Carcavelos tem uma extensão de 1,25 km, o que faz com que seja a maior praia deste grupo. A Praia Verde e Carcavelos são praias vigiadas, enquanto Alburrica não é vigiada, dado que não é oficialmente reconhecida. A Praia Verde está inserida na rede natura 2000: Ria Formosa/Castro Marim, tem uma grande extensão de dunas bem preservadas, existem pinheiros mansos nas proximidades, e situa-se numa zona de relevo mais elevado. A figura 2.1 mostra a localização geográfica das três praias onde as amostragens foram realizadas.



Figure 2.1-Localização dos pontos de amostragem. A-Carcavelos; B-Alburrica; C-Praia Verde

2.2 Recolha de amostras de areia e de água

O procedimento referente às colheitas das amostras de areia e de água foi realizado de acordo com o protocolo presente no Anexo I. Este mesmo protocolo foi adaptado de Sabino et al., 2011.

Areia: A recolha de areia foi feita em três pontos da praia, usando um único saco de plástico estéril. A colheita da areia foi feita na superfície do areal, utilizando luvas descartáveis para colocar a areia dentro do saco. De seguida, a areia foi misturada no interior do saco, de modo a garantir que as areias provenientes dos três pontos se misturaram de modo homogêneo e que representaram uma média dos três locais diferentes de colheita.

Água: A colheita de água foi realizada num único ponto, com recurso a um frasco de plástico estéril, que se encheu com água. A recolha de água foi efetuada junto ao areal, onde o rio/oceano é pouco profundo.

Todas as amostras (de areia e de água) foram transportadas para o laboratório à temperatura ambiente e conservadas a 4 °C (+/- 1°C), até ao seu processamento. O processamento das amostras foi efetuado até ao quarto dia seguinte à colheita por corresponder ao limite de validade da amostra de acordo com o laboratório de acolhimento (informação não publicada).

2.3 Processamento das amostras

O processamento das amostras em estudo e a contagem das unidades formadoras de colónias foram efetuados segundo o protocolo presente no Anexo I. As fórmulas utilizadas também podem ser encontradas no protocolo usado (Anexo I).

A partir de cada um dos sacos de areia, foi retirada uma amostra de 40 g de areia, que foi diluída em 40 mL de água destilada estéril. De seguida, cada uma das amostras foi agitada durante trinta minutos a 100 rpm. Retiraram-se 200 µL da suspensão de cada amostra, que foram espalhados em três placas de Petri que continham agár com extrato de malte e cloranfenicol (para crescimento e identificação de fungos filamentosos e leveduras), e em três placas de Petri que continham agár micobiótico (para crescimento e identificação de dermatófitos). As placas de Petri de agár com extrato de malte e cloranfenicol foram incubadas durante sete dias a 27,5°C, enquanto que as placas com agár micobiótico foram incubadas durante três semanas a 27,5°C.

Os resultados obtidos estão apresentados em UFC/g. Para tal, foi utilizada a fórmula (2.1):

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad (2.1)$$

Onde \bar{x} é o valor médio, X_i é o número total de colónias e n é o número total de réplicas. O resultado final é obtido aplicando a fórmula (2.2):

$$\text{Resultado por ml ou equivalente em g de areia} = (\text{valor médio de replicas} * 5) * \text{fator de diluição} \quad (2.2)$$

A identificação de cada um dos fungos foi realizada através de observação macroscópica e microscópica (utilizando o corante azul de lactofenol) de colónias de fungos filamentosos, com o auxílio de guias de identificação. Quando inconclusivo, este método de identificação, procedeu-se à identificação molecular dos isolados, tal como descrito no ponto '**Identificação molecular**'.

2.4 Identificação morfológica

A identificação morfológica das colónias que cresceram no meio de agár com malte e cloranfenicol foi feita após sete dias de incubação. Este tipo de identificação foi realizado para todos os isolados presentes nas placas, sendo composto pela caracterização macroscópica e microscópica das colónias.

De modo a caracterizar macroscopicamente cada um dos isolados, foram analisadas as seguintes características: a cor do lado frontal da colónia, a cor do reverso da colónia, a sua topografia, a sua textura e o seu tamanho.

A fim de caracterizar microscopicamente os isolados, foram feitas preparações microscópicas com recurso a duas técnicas: 1) a técnica da fita-cola, que consiste em retirar uma pequena porção de hifas e de esporos com um fragmento de fita-cola, para de seguida a colocar numa lâmina coberta com uma gota de azul de lactofenol; 2) a remoção de uma pequena secção da colónia, que é dissociada com uma lanceta, e colocada na lâmina coberta com uma gota de azul de lactofenol, onde por fim, a lâmina é coberta com uma lamela. A observação e identificação morfológica microscópica foi feita com ampliação de 400x. As principais características examinadas foram as hifas, os macroconídios e os microconídios (Campbell et al., 2013).

No total, foram analisados 1005 isolados - 305 isolados na Praia Verde, 124 isolados em Carcavelos, 576 isolados em Alburrica.

2.5 Identificação molecular

Esta análise foi executada com o propósito de identificar todos os isolados que não foi possível identificar através da identificação morfológica. Este tipo de identificação foi um método complementar à análise dos caracteres morfológicos, e permitiu efetuar a identificação de cada colónia até ao género ou até à espécie.

Foram selecionadas 51 colónias para análise molecular. Para esta análise, foi utilizada a região ITS (*Internal transcribed spacer*) dos genes de RNA ribossomal para, posteriormente, se proceder à sua sequenciação.

Extração de DNA

Os procedimentos de análises moleculares iniciaram-se com a extração de DNA a partir de amostras de colónias de fungos. As extrações foram feitas utilizando o *kit* comercial para extração de DNA *Invisorb Spin Plant Mini Kit* (Invitex Molecular), de acordo com o protocolo do fabricante (Anexo II).

Nem todas as extrações de DNA feitas com este kit comercial foram bem-sucedidas. Assim sendo, para estas amostras, foi necessário repetir as extrações de DNA mas utilizando outro método, que utiliza os compostos fenol / clorofórmio (Santos and Phillips, 2009) (Anexo III).

Determinação da concentração das amostras

Após a extração de DNA, é necessário determinar a concentração e o grau de pureza das amostras de DNA. Para este efeito, foi utilizado o espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific).

Foram colocados 2 µL de branco (*Elution Buffer*) no Nanodrop, de modo a fazer a linha de base. De seguida, foram colocados 2 µL de cada amostra de DNA no aparelho. Por fim, foram registadas a concentração de DNA e as relações Abs_{260nm}/Abs_{280nm} e Abs_{260nm}/Abs_{230nm} . O grau de pureza das amostras é estimado a partir das relações Abs_{260nm}/Abs_{280nm} e Abs_{260nm}/Abs_{230nm} .

Amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

De seguida, para identificar a espécie a que pertencia cada uma das colónias, foi executado um PCR para amplificar a região ITS.

Cada reação de PCR foi feita num volume de 25 μL .

Os *primers* utilizados foram os seguintes:

Tabela 2.1-Sequência do par de primers utilizado

Nome do <i>primer</i>	Sequência	Referência
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	(White et al., 1990)
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	

A tabela seguinte apresenta os constituintes da *Master Mix*:

Tabela 2.2-Composição da *Master Mix* para PCR de amplificação

Reagentes	Volume por reação (μL)
Água bidestilada	12,5
Tampão de PCR (10x)	2,5
DMSO	0,5
dNTPs (10 nM)	1,25
<i>Primer</i> ITS1 (10 μM)	1
<i>Primer</i> ITS4 (10 μM)	1
MgCl ₂ (50 mM)	2
BSA (1 mg/mL)	1
Taq polimerase	0,25

O volume de DNA (~50 ng/ μL) usado em cada reação foi de 3 μL .

As condições de PCR foram as que se seguem:

Tabela 2.3-Condições de PCR otimizadas para o par de primers utilizado

Fase	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação inicial	95 $^{\circ}\text{C}$	4 min 30 s	1 ciclo
Desnaturação	95 $^{\circ}\text{C}$	30 s	40 ciclos
<i>Annealing</i>	48 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
Extensão	72 $^{\circ}\text{C}$	1 min	
Extensão final	72 $^{\circ}\text{C}$	3 min	1 ciclo

Este programa dura, aproximadamente, 2 horas.

Gel de Eletroforese

Para preparar um gel de agarose a 1%, utilizou-se 40 mL de solução tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 0,5x e 0,4 g de agarose. De seguida, a solução foi aquecida no micro-ondas, durante 1 minuto. Adicionou-se 1,0 μ L de GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium) a esta solução, enquanto estava quente. Uma “cama” para gel foi preparada com pentes de oito poços para, seguidamente, se colocar a solução composta por TBE, agarose e Gel Red. O gel ficou a solidificar durante 20 minutos. Quando o gel ficou sólido, foi colocado numa tina de eletroforese. Esta tina contém solução tampão TBE 0,5x, que é a mesma solução que é utilizada para preparar o gel.

A eletroforese foi efetuada a 85 V, durante 50 minutos, com recurso ao equipamento VWR Power Source 300V.

A figura 2.2 é um exemplo do gel de agarose que foi preparado para cada uma das amostras. No primeiro poço de cada fila pipetou-se 8 μ L do marcador de DNA HyperLadder 1kb (200 bp – 10037 bp) (Bioline); em cada um dos poços seguintes, pipetou-se 6 μ L, tendo 3 μ L de *Loading Buffer* e 3 μ L de cada um dos produtos de PCR.

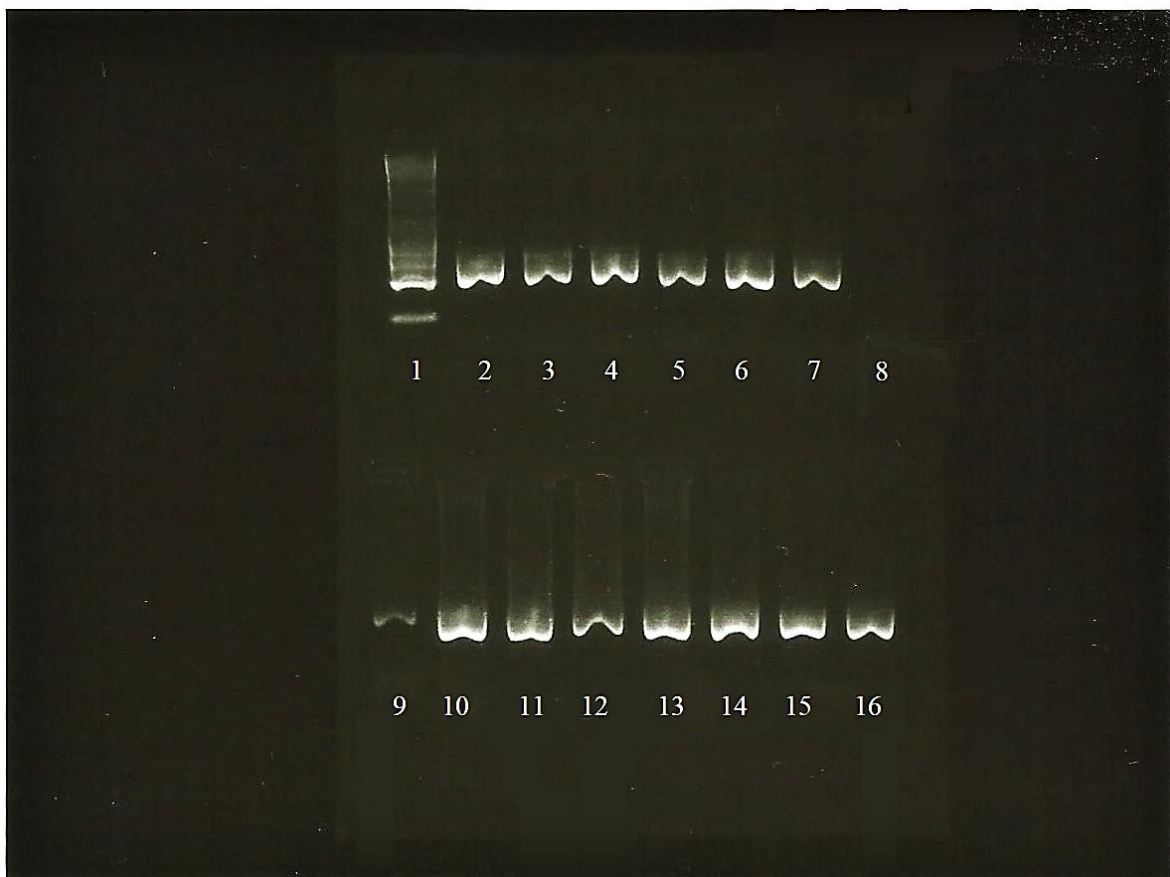


Figura 2.2-Fotografia de um gel de agarose de um PCR convencional. 1 e 9 - Marcador de DNA; 2 a 6 - amostras A6, A7, A8, B6, B7; 7 - controlo positivo; 8 - controlo negativo; 10 a 15 - amostras B8,C8, C6,C7,F4,H2,I02; 16 - controlo positivo

Depois da eletroforese estar terminada, o gel de agarose foi colocado numa câmara sob luz ultravioleta. Para visualizar as bandas, foi utilizado o programa informático FireReader (Uvitec Cambridge).

Se as bandas presentes no gel estivessem visíveis, a identificação molecular prosseguia, passando para o próximo passo: a purificação dos produtos de PCR amplificados. Nos casos em que as bandas não eram visíveis (o que significava que não tinha havido amplificação), foi necessário fazer um novo PCR de amplificação ou repetir a extração de DNA.

Purificação

Os produtos de PCR resultantes foram purificados com 5 μL de cada produto de PCR e 2 μL de ExoProStar 1-Step (GE Healthcare Life Sciences).

As condições de purificação são as que se seguem:

- Incubação a 37°C durante 15 minutos;
- Incubação a 80°C durante 15 minutos;

Sequenciação

Cada produto de PCR purificado foi sequenciado apenas com o primer Forward. Verificou-se que, quando se faz a sequenciação apenas da cadeia *Forward*, é possível obter uma identificação correta da amostra em questão (a homologia e o *coverage* apresentam valores muito altos, próximos dos 100%). Assim sendo, a sequenciação da cadeia *Reverse* foi feita apenas quando a sequenciação da cadeia *Forward* não foi suficiente para identificar uma amostra.

O volume total de cada reação de PCR para sequenciação foi de 10 μL .

Tabela 2.4-Composição da Master Mix para PCR de sequenciação

Reagentes	Volume por reação (μL)
Água bidestilada	5
Tampão <i>BigDye</i>	1
<i>BigDye</i>	1
Primer (10 nM)	1

O volume de produto de PCR purificado usado em cada reação foi de 2 μL .

As condições de PCR foram as que se seguem:

Tabela 2.5-Condições de PCR de sequenciação

Fase	Temperatura (°C)	Tempo	Número de ciclos
Desnaturação	96	10 seg	24 ciclos
<i>Annealing</i>	50	5 seg	
Extensão	60	4 min	
Extensão final	72	10 min	1 ciclo

Este programa dura, aproximadamente, 2 horas e 30 minutos.

A sequenciação dos produtos de PCR ocorreu na Unidade de Tecnologia e Inovação, do Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Por fim, as sequências obtidas foram analisadas com os *softwares* Chromas, ClustalX2 e BioEdit; os dados obtidos a partir das mesmas foram comparados com as sequências disponíveis no banco de dados *online* do GenBank, com recurso à ferramenta BLAST, em combinação com a base de dados MycoBank.org (*online*).

3. Resultados

Não foi possível identificar alguns dos isolados que foram para sequenciação. Os resultados da sequenciação destas amostras de DNA não permitiram a identificação da espécie em causa. Nas tabelas apresentadas de seguida, estas espécies estão denominadas “Colónia não identificada”. Esta situação aconteceu em 15 isolados.

A designação “não foi possível sequenciar” refere-se às amostras de DNA cuja amplificação por PCR não foi bem-sucedida, apesar de repetida. Uma vez que não foi possível amplificar estas quatro amostras, estas não foram enviadas para sequenciação e, como consequência, as espécies em causa não foram identificadas. Esta situação aconteceu em quatro isolados.

3.1 Praia Verde

Nesta praia, foi recolhida uma amostra de areia e uma amostra de água em quatro meses – novembro de 2018, março, abril e junho de 2019. A tabela seguinte apresenta as espécies de fungos filamentosos presentes nas amostras em estudo.

Tabela 3.1-Fungos filamentosos presentes na Praia Verde

Espécie	Amostra	Mês	Identificação
<i>Aspergillus</i> secção <i>Nigri</i>	Areia	novembro	Morfológica
<i>Aspergillus</i> secção <i>Terrei</i>	Areia	novembro; junho	Morfológica
<i>Acremonium</i> sp.	Areia	março; junho	Morfológica
<i>Acremonium atrogriseum</i>	Água	novembro	Biologia molecular
<i>Alternaria abundans</i>	Areia	junho	Biologia molecular
<i>Alternaria alternata</i>	Areia	março	Morfológica
<i>Alternaria multiformes</i>	Areia	junho	Biologia molecular
<i>Alternaria tenuissima</i>	Areia	novembro	Biologia molecular
<i>Acrostalagmus luteoalbus</i>	Água	novembro	Biologia molecular
<i>Cladosporium</i> sp.	Areia	novembro; março; junho	Morfológica
<i>Cladosporium ramotenellum</i>	Areia	novembro; abril	Biologia molecular
<i>Diaporthe foeniculina</i>	Água	novembro	Biologia molecular
<i>Didymella</i> sp.	Areia	novembro	Biologia molecular
<i>Fusarium</i> sp.	Areia	novembro	Biologia molecular

<i>Fusarium proliferatum</i>	Areia	novembro	Biologia molecular
<i>Paecilomyces</i> sp.	Areia	novembro	Morfológica
<i>Penicilium</i> sp.	Areia; água	novembro; março; abril	Morfológica
<i>Penicilium</i> sp. 1	Areia	março; abril; junho	Morfológica
<i>Penicilium</i> sp.2	Água; areia	março; abril	Morfológica
<i>Penicillium glabrum</i>	Água	novembro	Biologia molecular
<i>Plectosphaerella plurivora</i>	Areia	abril	Biologia molecular
<i>Phaeosphaeria spartinae</i>	Água	novembro	Biologia Molecular
<i>Phialemoniopsis curvata</i>	Água	novembro	Biologia molecular
<i>Phoma</i> sp.	Areia	novembro	Biologia molecular
<i>Rhizopus</i> sp.	Areia	junho	Morfológica
<i>Roussoella neopustulans</i>	Água	novembro	Biologia molecular
<i>Sarocladium strictum</i>	Água	novembro	Biologia molecular
<i>Torula masonii</i>	Areia	abril	Biologia molecular
Colónia não identificada	Água	novembro	-
Colónia não identificada	Areia	novembro	-
Colónia não identificada	Areia	junho	-
Número Total		31	

A tabela que se segue apresenta as espécies de leveduras presentes nestas amostras.

Tabela 3.2-Leveduras presentes na Praia Verde

Espécie	Amostra	Mês	Identificação
<i>Candida albicans</i>	Areia	novembro	Biologia molecular
<i>Rhodotorula</i> sp.	Areia	novembro, março	Morfológica
	Água	novembro	

Na Praia Verde, a espécie mais abundante foi *Cladosporium* sp. - no total, foram encontrados 95 isolados desta espécie; as espécies menos abundantes foram *Didymella* sp., *Fusarium proliferatum*, *Penicillium glabrum*, *Phaeosphaeria spartinae*, *Sarocladium strictum*, *Acremonium atrogriseum*, *Phialemoniopsis curvata*, *Acrostalagmus luteoalbus* e *Rousoella neopustulans* – para cada uma destas espécies, foi encontrado apenas um isolado.

Registou-se o maior número de isolados no mês de novembro – o número médio de colónias na amostra de areia foi 200 e o número médio de colónias na amostra de água foi 65. O menor número de isolados foi registado no mês de junho - em média, cresceram 84 colónias na amostra de areia, ao passo que não cresceu nenhuma colónia na amostra de água.

Nesta praia, estiveram presentes quatro espécies de fungos alergénicos: *Aspergillus* secção *Nigri*, *Aspergillus* secção *Terrei*, *Fusarium* sp. e *Fusarium proliferatum*. Em relação às leveduras, foram encontradas duas espécies: *Candida albicans* e *Rhodotorula* sp. Não esteve presente nenhuma espécie de dermatófito nas amostras desta praia. É possível observar a variação do número de unidades formadoras de colónias destes três grupos na figura 3.1.

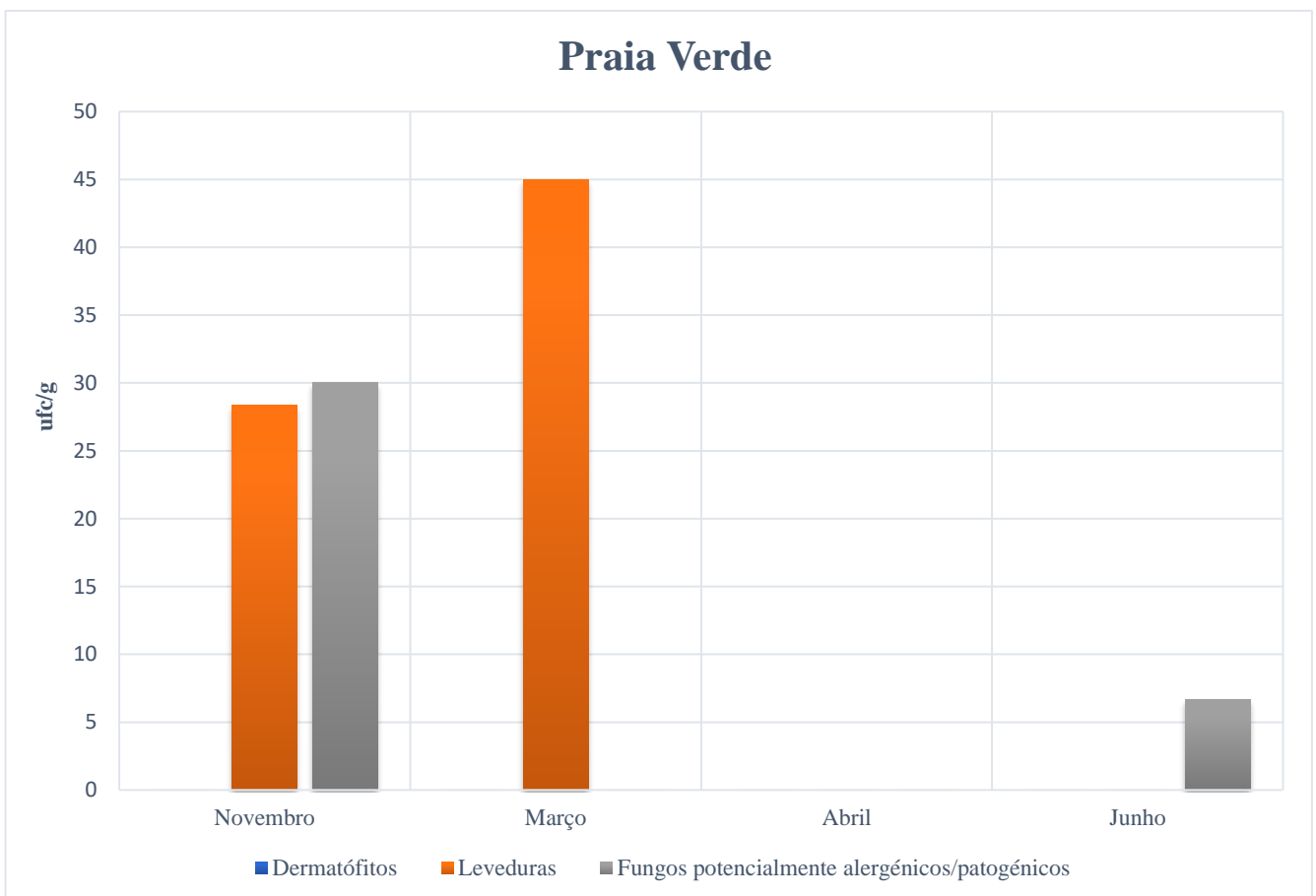


Figura 3.1-Variação dos valores médios dos principais grupos de fungos na Praia Verde. As barras a cinzento representam os fungos filamentosos que pertencem ao grupo dos fungos potencialmente alergénicos/patogénicos.

3.2 Carcavelos

Nesta praia, foi recolhida uma amostra de areia e uma amostra de água durante sete meses – o período de amostragem decorreu entre dezembro de 2018 e junho de 2019. A tabela seguinte apresenta as espécies de fungos filamentosos presentes nas amostras em causa.

Tabela 3.3-Fungos filamentosos presentes em Carcavelos

Espécie	Amostra	Mês	Identificação
<i>Acremonium sp.</i>	Areia; água	fevereiro; março	Morfológica
<i>Acremonium killiense</i>	Areia	fevereiro	Biologia molecular
<i>Aspergillus</i> secção <i>Nidulantes</i>	Água	março	Morfológica
<i>Aspergillus</i> secção <i>Nigri</i>	Areia	março; abril	Morfológica
<i>Cladosporium sp.</i>	Areia; água	dezembro; fevereiro; abril; maio	Morfológica
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Areia	janeiro	Biologia molecular
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Água	fevereiro; março	Biologia molecular
<i>Exophiala sp.</i>	Água; areia	janeiro; fevereiro; março	Morfológica
<i>Exophiala cancerae</i>	Areia	maio	Biologia molecular
<i>Fusarium equiseti</i>	Areia	março	Biologia molecular
<i>Penicilium sp.1</i>	Água	dezembro	Morfológica
<i>Penicilium sp.2</i>	Água; areia	dezembro; março	Morfológica
<i>Penicilium sp.3</i>	Água; areia	janeiro; março	Morfológica
<i>Penicillium glabrum</i>	Água	dezembro	Biologia molecular
<i>Phoma sp.</i>	Areia	maio	Biologia molecular
<i>Rhizopus sp.</i>	Areia; água	janeiro; março	Morfológica
<i>Trematosphaeria grisea</i> (nome antigo <i>Madurella grisea</i>)	Água	dezembro	Biologia molecular
Colónia não identificada	Areia	janeiro	-
Colónia não identificada	Areia	fevereiro	-
Colónia não identificada	Areia	março	-
Colónia não identificada	Areia	abril	-
Colónia não identificada	Areia	junho	-

Colónia não identificada	Areia	junho	-
Não foi possível sequenciar	Areia	abril	-
Não foi possível sequenciar	Areia	Abril	-
Não foi possível sequenciar	Areia	maio	-
Número Total		26	

A tabela que se segue apresenta as espécies de leveduras presentes nestas amostras.

Tabela 3.4-Leveduras presentes em Carcavelos

Espécie	Amostra	Mês	Identificação
<i>Candida lusitaniae</i>	Areia	janeiro	Biologia Molecular
<i>Rhodotorula</i> sp.	Areia	dezembro, fevereiro	Morfológica

Em Carcavelos, a espécie mais abundante foi *Acremonium killiense* - no total, foram encontrados 21 isolados desta espécie. As espécies menos abundantes foram *Aspergillus* secção *Nidulantes*, *Phoma* sp. e *Trematosphaeria grisea*. Para além destas três espécies, houve mais quatro espécies que não foram possíveis de identificar que também fazem parte das espécies menos abundantes, pois para cada uma delas foi encontrado apenas um isolado.

O maior número de isolados foi registado no mês de março - na amostra de areia, cresceram, em média, 67 colónias; na amostra de água, cresceram 22 colónias. O menor número de isolados foi registado no mês de junho - o número médio de colónias na amostra de areia foi quatro; não cresceu nenhuma colónia na amostra de água.

Nesta praia, estiveram presentes três espécies de fungos alergénicos: *Aspergillus* secção *Nigri*, *Aspergillus* secção *Nidulantes* e *Fusarium equiseti*. Em relação às leveduras, foram encontradas duas espécies: *Candida lusitaniae* e *Rhodotorula* sp. Não esteve presente nenhuma espécie de dermatófito nas amostras desta praia. É possível observar a variação mensal do número de unidades formadoras de colónias destes três grupos na figura 3.2.

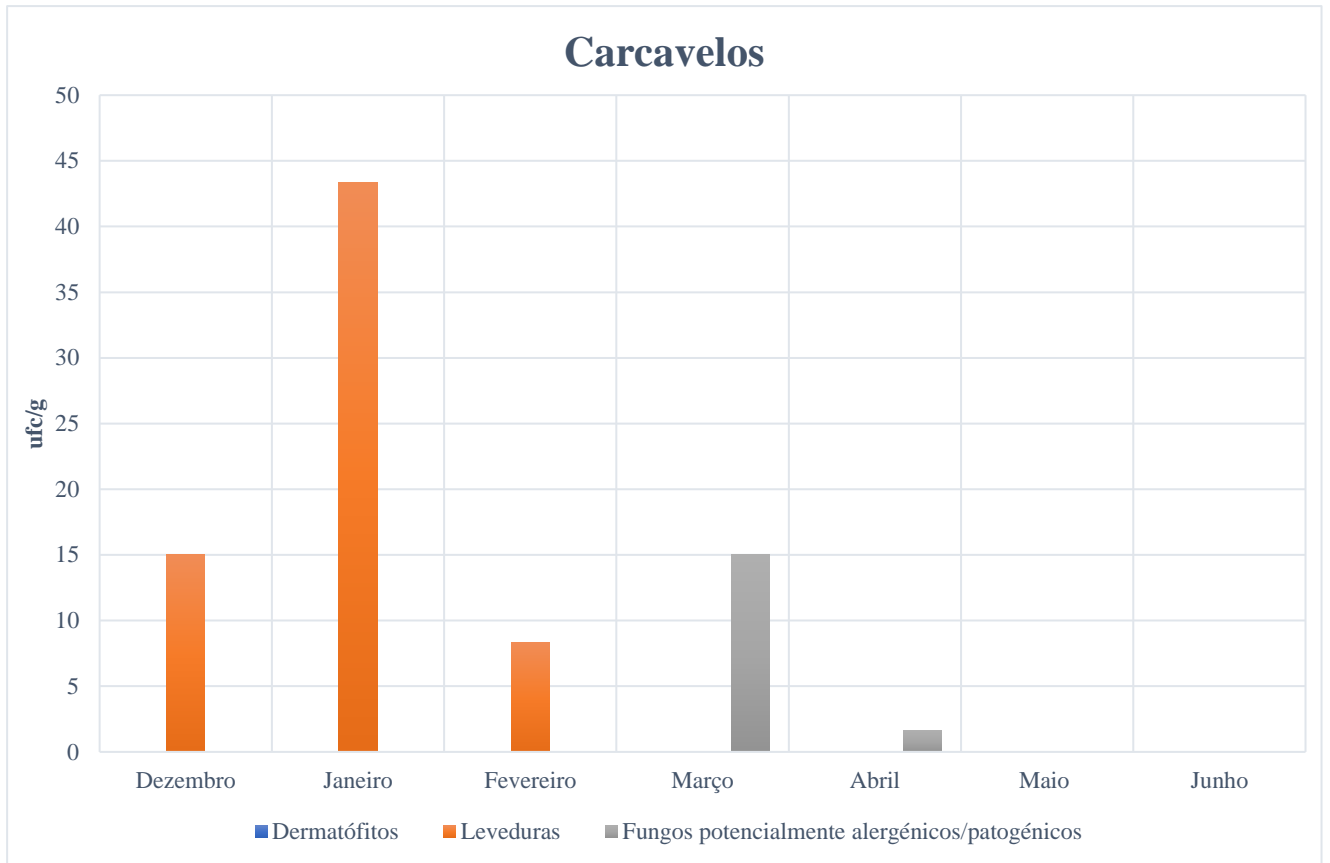


Figura 3.2-Variação mensal dos valores médios dos principais grupos de fungos na praia de Carcavelos. As barras a cinzento representam os fungos filamentosos que pertencem ao grupo dos fungos potencialmente alergénicos/patogénicos.

3.3 Alburrica

Nesta praia fluvial com águas de transição, tal como aconteceu em Carcavelos, foi recolhida uma amostra de areia e uma amostra de água durante sete meses – o período de amostragem decorreu entre dezembro de 2018 e junho de 2019. A tabela seguinte apresenta as espécies de fungos filamentosos presentes nas amostras desta praia.

Tabela 3.5-Fungos filamentosos presentes em Alburrica

Espécie	Amostra	Mês	Identificação
<i>Acremonium egyptiacum</i>	Areia	dezembro; fevereiro	Biologia molecular
<i>Acremonium killiense</i>	Água; areia	fevereiro; abril	Morfológica
<i>Acremonium vitellinum</i>	Areia	janeiro	Biologia molecular
<i>Acrostalagmus luteoalbus</i>	Areia	janeiro, fevereiro	Biologia molecular
<i>Alternaria alternata</i>	Areia	fevereiro	Morfológica
<i>Aspergillus glaucus</i>	Areia	fevereiro	Morfológica
<i>Aspergillus</i> secção <i>Nidulantes</i>	Água	janeiro; março	Morfológica
<i>Aspergillus</i> secção <i>Nigri</i>	Areia	dezembro; março	Morfológica
<i>Aspergillus</i> secção <i>Terrei</i>	Areia	janeiro; junho	Morfológica
<i>Aspergillus</i> secção <i>Versicolores</i>	Areia	janeiro	Morfológica
<i>Bipolaris</i> sp.	Água	dezembro	Morfológica
<i>Cladosporium</i> sp.	Areia	dezembro; fevereiro; abril; junho	Morfológica
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Areia	janeiro	Biologia molecular
<i>Cladosporium ramotenellum</i>	Água	abril; junho	Biologia molecular
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Água	janeiro	Biologia molecular
<i>Chrysosporium</i> sp.	Água	março	Morfológica
<i>Exophiala</i> sp.	Areia; água	dezembro; fevereiro; junho	Morfológica
<i>Exophiala dermatitidis</i>	Água	dezembro	Biologia molecular
<i>Fusarium equiseti</i>	Areia	fevereiro	Biologia molecular
<i>Fusarium proliferatum</i>	Areia	abril	Biologia molecular
<i>Fusarium oxysporum</i> f. <i>cubense</i>	Areia	fevereiro	Biologia molecular
<i>Fusarium semitectum</i>	Areia	janeiro	Morfológica
<i>Neocamarosporium</i> sp.	areia	janeiro	Morfológica
<i>Paecilomyces</i> sp.	Areia; água	janeiro; fevereiro	Morfológica

<i>Penicilium</i> sp.1	Areia; água	dezembro; janeiro; fevereiro	Morfológica
<i>Penicilium</i> sp.2	Areia	janeiro; março	Morfológica
<i>Penicilium</i> sp.3	Areia	dezembro; fevereiro	Morfológica
<i>Penicilium</i> sp.4	Areia	maio; junho	Morfológica
<i>Penicilium</i> sp.5	Areia	janeiro	Morfológica
<i>Penicillium glabrum</i>	Areia	fevereiro	Biologia molecular
<i>Peniophora quercina</i>	Água	março; junho	Biologia molecular
<i>Phaeosphaeria</i> sp.	Água	março; maio	Biologia molecular
<i>Phoma</i> sp.	Areia	abril; maio	Biologia molecular
<i>Plectosphaerella plurivora</i>	Areia	abril; maio	Biologia molecular
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Areia	janeiro	Morfológica
<i>Roussoellaceae</i> sp.	Água	dezembro; janeiro	Biologia molecular
<i>Sarocladium glaucum</i>	Água; areia	janeiro; fevereiro	Biologia molecular
<i>Scopulariopsis</i> sp.	Areia	fevereiro	Morfológica
<i>Scytalidium hyalinum</i>	Areia	abril	Morfológica
<i>Trichoderma</i> sp.	Areia	maio	Morfológica
Colónia não identificada	Areia	fevereiro	-
Colónia não identificada	Água	abril	-
Colónia não identificada	Areia	abril	-
Colónia não identificada	Areia	abril	-
Colónia não identificada	Areia	maio	-
Colónia não identificada	Areia	junho	-
Não foi possível sequenciar	Areia	fevereiro	-
Número Total		47	

A tabela que se segue apresenta as espécies de leveduras presentes nestas amostras.

Tabela 3.6-Leveduras presentes em Alburrica

Espécie	Amostra	Mês	Identificação
<i>Candida atlantica</i>	Areia	dezembro	Biologia Molecular
<i>Candida zeylanoides</i>	Água	janeiro	Biologia Molecular
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	Areia	maio	Morfológica
<i>Rhodotorula</i> sp.	Areia	dezembro, janeiro, fevereiro	Morfológica
	Água	dezembro, janeiro	

Em Alburrica, a espécie mais abundante na areia foi *Cladosporium* sp. – no total, estavam presentes 150 isolados. As espécies menos abundantes foram *Chrysosporium* sp., *Rhizopus arrhizus*, *Plectosphaerella plurivora*, *Peniophora quercina*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Aspergillus* secção *Nigri*, *Fusarium proliferatum*, *Acremonium vitellinum* e *Sarocladium glaucum* - para cada uma destas espécies, foi encontrado apenas um isolado.

Em Alburrica, registou-se o maior número de isolados no mês de fevereiro - cresceram, em média, 245 colónias na amostra de areia e 27 colónias na amostra de água. Em dezembro registou-se o menor número de isolados - na amostra de areia, o número médio de colónias foi 50; na amostra de água, o número médio de colónias foi 5.

Nesta praia, estiveram presentes 12 espécies de fungos alergénicos: *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus* secção *Nidulantes*, *Aspergillus* secção *Nigri*, *Aspergillus* secção *Terrei*, *Aspergillus* secção *Versicolores*, *Chrysosporium* spp., *Fusarium equiseti*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium oxysporum* f. *cubense*, *Fusarium semitectum*, *Scopulariopsis* spp. e *Scytalidium hyalinum*. Em relação às leveduras, foram encontradas quatro espécies: *Candida atlantica*, *Candida zeylanoides*, *Sporobolomyces salmonicolor* e *Rhodotorula* spp. Não foi encontrada nenhuma espécie de dermatófito nas amostras desta praia. É possível observar a variação mensal do número de unidades formadoras de colónias destes três grupos na figura 3.3.

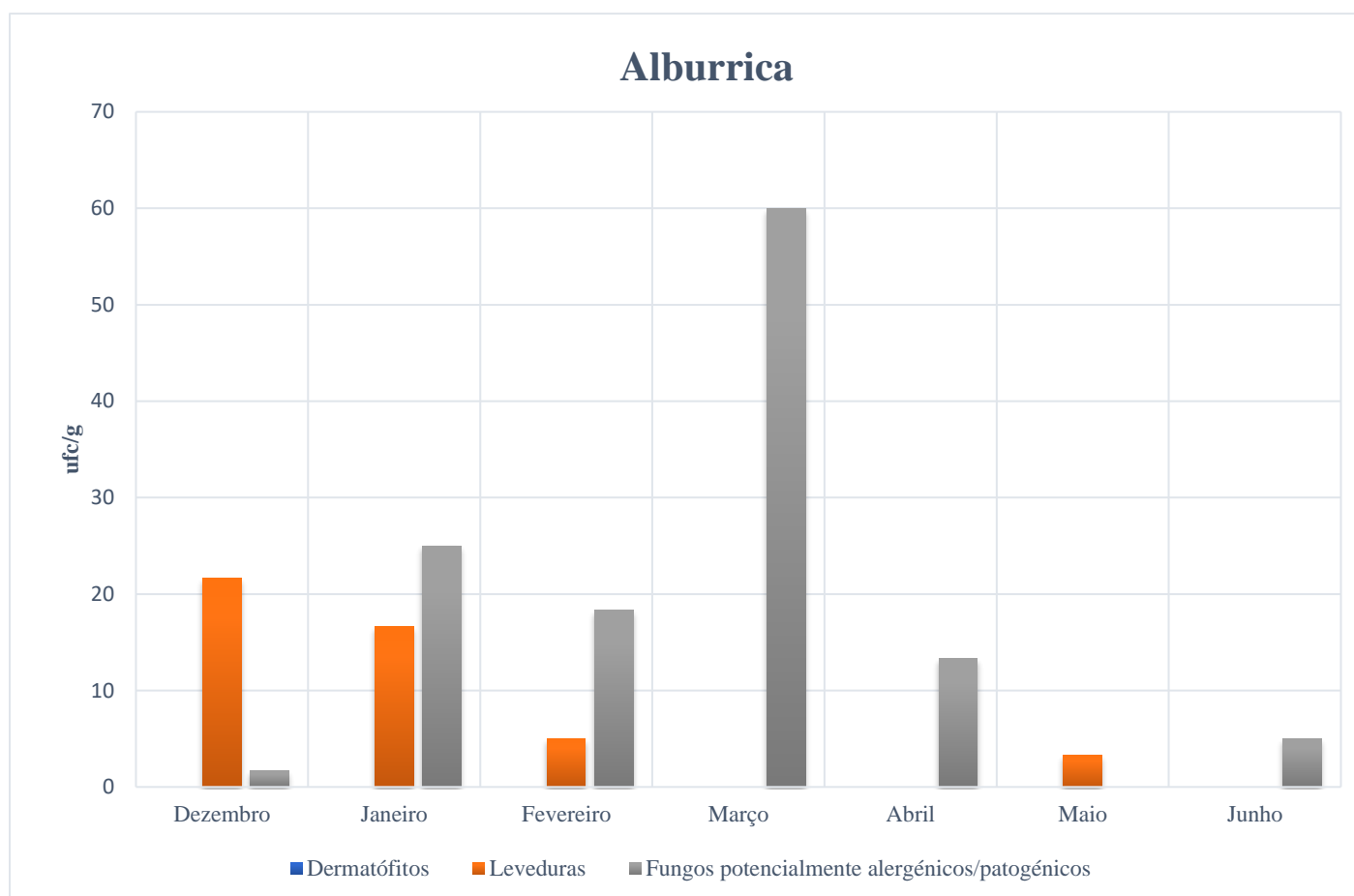


Figura 3.3-Variação mensal dos valores médios dos principais grupos de fungos na praia de Alburrica. As barras a cinzento representam os fungos filamentosos que pertencem ao grupo dos fungos potencialmente alergénicos/patogénicos.

No geral, verificou-se que o número de colónias que cresceu nas amostras de areia foi superior ao número de colónias que cresceu nas amostras de água.

Nas amostras analisadas, a maioria dos fungos filamentosos que foram encontrados não estão inseridos no grupo dos fungos potencialmente alergénicos/patogénicos, sendo esta a razão para que os valores que são abaixo mencionados sejam superiores aos valores que estão indicados nos gráficos.

Alburrica foi a praia onde se registou o maior número de espécies (51), seguida pela Praia Verde (33 espécies), e pela praia de Carcavelos, onde foi registado o menor número de espécies (28).

A praia de Alburrica foi também a praia onde se registou o maior número de isolados (576), seguida pela Praia Verde (305 isolados). Na praia de Carcavelos registou-se o menor número de isolados (124).

Na Praia Verde, o número médio de isolados decresceu desde novembro até junho. No mês de novembro registou-se o maior número de isolados (265); em março registaram-se, em média, 107 isolados; em abril, o número médio de isolados foi 97; por fim, em junho, registou-se o menor número de isolados (84).

Em Carcavelos, a variação do número médio de isolados não ocorreu de forma decrescente durante o período do estudo. Em dezembro, registaram-se, em média, 10 isolados; em janeiro, o número médio de isolados foi 10; em fevereiro, o número médio de isolados foi 77; em março, registaram-se 89 isolados; em abril, registaram-se 7 colónias; em maio, o número médio de colónias foi 12; em junho, o número de colónias registadas foi quatro.

Em Alburrica, tal como aconteceu em Carcavelos, não se observou uma variação do número médio de isolados decrescente entre dezembro e junho. Em dezembro, registaram-se, em média, 55 colónias; em janeiro, o número médio de isolados foi 129; em fevereiro, o número de colónias registado foi 272; em março, registaram-se 64 colónias; em abril, registaram-se 159 colónias; em maio, o número médio de colónias foi 220; em junho, o número médio de colónias registado foi 64.

4. Discussão

Segundo Sabino et al., 2011, os fungos que estão frequentemente associados a infeções em pessoas podem ser reunidos em três grupos: leveduras; fungos filamentosos potencialmente patogénicos ou alergénicos; e dermatófitos. Dentro destes destacam-se do grupo das leveduras *Cryptococcus* spp e por todas as espécies pertencentes ao género *Candida* – com atenção especial à espécie *Candida albicans*. Os fungos filamentosos potencialmente patogénicos ou alergénicos incluem todas as espécies pertencentes ao género *Aspergillus*, com maior atenção às secções *Fumigati* e *Nigri* (de acordo com a taxonomia atual); *Chrysosporium* spp., *Fusarium* spp., *Scytalidium* spp., *Scedosporium* spp., *Scopulariopsis* spp. O grupo dos dermatófitos é composto pelas espécies pertencentes (atualmente) aos géneros *Arthroderma*, *Epidermophyton*, *Lophophyton*, *Microsporum*, *Nannizzia*, *Paraphyton* e *Trichophyton* que correspondem aos antigos taxa *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*.

Destes três grupos, os fungos filamentosos potenciais patogénicos ou alergénicos foram os fungos com maior representação. Destes, o género *Aspergillus* foi o mais abundante. O género *Fusarium* foi o segundo mais abundante, seguido pelo género *Scytalidium*. Os géneros *Chrysosporium* e *Scopulariopsis* foram os menos frequentes deste grupo – cada um deles foi detetado apenas numa amostra.

O número de espécies de leveduras presentes nas amostras foi inferior ao número de espécies de fungos filamentosos, que tendencialmente esporulam garantindo assim uma presença mais ampla e frequente. No total, foram identificadas seis espécies de leveduras pertencentes a três géneros. Na praia Verde e em Carcavelos, foi encontrada apenas uma espécie de levedura do género *Candida* em cada uma das praias. Na Praia Verde, a espécie *Candida albicans*, parcialmente indicadora de contaminação (Brandão et al., 2002), estava presente na amostra de areia de novembro e foi-nos comunicado que teria havido um problema de infraestruturas associadas ao tratamento de esgoto urbano rapidamente reparado; em Carcavelos, a espécie *Candida lusitaniae* estava na amostra de areia de janeiro. Em Alburrica, estavam presentes duas espécies de leveduras do género *Candida* – *Candida atlantica* foi encontrada na amostra de areia do mês de dezembro; *Candida zeylanoides* foi encontrada na amostra de água de janeiro. Estas três últimas espécies são tipicamente aquáticas e do Oceano Atlântico (Fell, 1976). A espécie *Sporobolomyces salmonicolor* (a única espécie deste género presente nestas amostras) foi encontrada na amostra de areia de maio. O género *Rhodotorula* foi o mais abundante. Foi encontrado em algumas amostras das três praias, e o número de leveduras deste género foi superior ao número de leveduras do género *Candida*.

O baixo número de espécies de leveduras encontrado nas amostras em estudo pode ser explicado pelo facto de não terem sido feitas amostragens nos meses de maior afluência de banhistas. De acordo com Abreu et al., 2016 e com Whitman et al., 2014, a presença de leveduras nas praias pode estar ligada à presença de banhistas. Assim sendo, a realização de sessões de amostragem nos meses de menor afluência de banhistas pode justificar o número reduzido de espécies de leveduras presentes nas amostras.

A levedura *Candida albicans* é conhecida por provocar infeções – candidíase, que pode ser localizada ou sistémica (Brandão, 2019; Simon-Nobbe et al., 2008). Este estudo não é o único onde se regista uma frequência baixa desta levedura. A ausência ou a incidência baixa de *Candida albicans* foi registada por outros investigadores (Sabino et al., 2011) e possivelmente prende-se com a ausência de contaminação fecal nos locais em estudo.

A espécie *Rhodotorula mucilaginosa* é uma das espécies de leveduras mais frequentemente encontradas no meio ambiente e é responsável por infeções do foro hematológico, causando inclusive endocardites em doentes imunodeprimidos. Estará provavelmente de acordo com Simon-Nobbe et al., 2008, representada neste estudo, em que se optou por não identificar espécies deste género.

Os dermatófitos não estão representados nestas amostras, uma vez que não foi encontrada nenhuma espécie de dermatófitos em nenhuma amostra das três praias. De acordo com Sabino et al., 2011, a presença de dermatófitos e de números elevados de leveduras em areia seca pode indicar contaminação humana. Uma vez que, neste estudo, não houve nenhum dermatófito presente nas amostras e o número de leveduras foi baixo, é possível concluir que, nos locais em estudo, é provável que não tenha havido grande contribuição humana para a flora das praias analisadas durante o período do estudo.

A ausência de dermatófitos nas amostras estudadas pode também estar relacionada com as limitações da microbiologia clássica. O meio utilizado, agár micobiótico, é usado para identificar fungos de crescimento lento, que são tolerantes à actidiona – dermatófitos e restantes fungos queratinofílicos. Deste modo, os fungos viáveis são os únicos que crescem neste meio, uma vez que os fungos não viáveis, mesmo que estejam presentes nas amostras, não são capazes de crescer.

Antes do início da época balnear, a Câmara Municipal de Cascais procede habitualmente à limpeza e desinfecção da praia de Carcavelos. Esta limpeza pode eliminar uma grande quantidade de isolados fúngicos que se encontravam no areal, o que pode explicar os resultados obtidos nas amostras de Carcavelos no mês de junho (em média, foram identificados quatro isolados na amostra de areia, enquanto na amostra de água, não foi identificado nenhum isolado).

A espécie *Trematosphaeria grisea* (nome antigo *Madurella grisea*) é, geralmente, encontrada em águas, e foi descrita como sendo um agente causador de infeções subcutâneas em humanos, chamadas micetomas (Chowdhary et al., 2015). Foi encontrada apenas numa amostra, que era da água de Carcavelos. O isolamento desta espécie, no entanto, sendo tipicamente de climas tropicais e, portanto, não endémica em Portugal, presume-se que seja uma coincidência e não uma presença constante.

Os fungos pertencentes ao género *Cladosporium* são conhecidos por provocarem alergias, como rinite alérgica. Pensa-se que estes fungos também estejam implicados em casos de asma alérgica. A espécie *Cladosporium cladosporoides* faz parte da lista de alérgenos fúngicos (Simon-Nobbe et al., 2008). Esta espécie foi encontrada nas amostras de areia de Alburrica e areia de Carcavelos, ambas em janeiro e é muito frequente em areias de praias dado serem fungos negros que usam melanina na sua produção energética.

Nestas amostras foram também encontrados alguns fungos do género *Alternaria*. Este género é maioritariamente composto por agentes patogénicos de plantas e por alguns saprófitos de restos de plantas. Estes organismos podem ser encontrados no solo ou no ar (Chowdhary et al., 2015; De Lucca, 2007). As manifestações clínicas das espécies de *Alternaria* são, geralmente, lesões cutâneas ou subcutâneas causadas por um trauma, em pacientes que estão sob um tratamento com corticosteroides prolongado (Halaby et al., 2001; Lo Cascio et al., 2004). Outras manifestações clínicas, tais como infeções cerebrais, sinusites, queratites, e micoses bronco pulmonares alérgicas, são muito raras (Chowdhary et al., 2015).

A espécie *Alternaria alternata* é um dos agentes mais comuns, e é uma das espécies encontradas neste estudo (areia de Alburrica; areia da Praia Verde). Outras espécies pertencentes a este género presentes em amostras deste estudo são *Alternaria tenuissima* (areia da Praia Verde), *Alternaria*

abundans (areia da Praia Verde), *Alternaria multiformes* (areia da Praia Verde). Destas, sabe-se que a espécie *Alternaria tenuissima* é um alergénio fúngico (Simon-Nobbe et al., 2008).

Outra espécie encontrada foi *Bipolaris* sp (água de Alburrica). A maioria das espécies pertencentes a este género são organismos patogénicos específicos de um determinado hospedeiro e são encontrados em ervas. Algumas espécies saprófitas habitam em solos onde existem plantas mortas ou em decomposição, e estas espécies podem ser oportunistas em humanos (Revankar and Sutton, 2010). Estes fungos podem provocar infeções graves tanto em indivíduos imunocompetentes como em indivíduos imunocomprometidos (Saenz et al., 2001). Estas espécies podem causar sinusite crónica em indivíduos imunocompetentes (Toul et al., 2006), para além de também poderem causar endoftalmite (Sheyman et al., 2013), celulite na órbita (Newell et al., 2006), pneumonia necrotizante, micose bronco pulmonar alérgica (Saenz et al., 2001), peritonites (Bava et al., 2003) e encefalites (Chowdhary et al., 2015; Saenz et al., 2001).

Foram identificadas algumas espécies do género *Exophiala* nas amostras estudadas. Em geral, estas espécies podem ser encontradas em ambientes tóxicos ou pobres em nutrientes, como madeira impregnada com creosoto, minas tóxicas, ou banhos de vapor. Uma das espécies mais relevantes a nível clínico é a espécie *Exophiala dermatitidis*, que é uma das espécies presentes em algumas das amostras (água de Alburrica). Esta espécie provoca infeções disseminadas, eventualmente com neuro tropismo (Chowdhary et al., 2015). A espécie *Exophiala cancerae* foi identificada numa amostra de areia da praia de Carcavelos. Assim sendo, é necessário ter atenção especial a esta espécie, pois pode ter um grande impacto na saúde de utilizadores das zonas balneares com algum grau de imunossupressão.

O género *Aspergillus* também está presente nestas amostras. Este género saprófito inclui 132 espécies diferentes. Está distribuído de forma ubíqua no meio ambiente e representa um microrganismo patogénico dominante em locais fechados. As espécies que constituem este género crescem no meio ambiente, em vegetação em decomposição, podendo crescer também em locais fechados, como nos sistemas de ar condicionado. Os fungos deste género têm a capacidade de libertar grandes quantidades de pequenos conidiósporos. Em caso de inalação, estes esporos ficam nas vias respiratórias terminais ou são depositados em grandes grupos no trato respiratório superior. As doenças provocadas por *Aspergilli* variam desde a colonização do trato respiratório, pneumonite de hipersensibilidade (alveolite alérgica extrínseca), rinite alérgica, sinusite e asma, até a aspergilose invasiva sistémica com risco de vida e aspergilose bronco pulmonar alérgica. Muito frequentemente, a aspergilose é favorecida por um estado imunitário debilitado do paciente, causado por um tratamento imunossupressor após uma cirurgia de transplante, por uma infeção por HIV, por certas leucemias ou por hospitalização sob cuidados intensivos (Simon-Nobbe et al., 2008). Para além destas doenças, os fungos deste género também podem provocar onicomiose e aspergiloma (Brandão, 2019). Neste estudo foram identificadas duas espécies consideradas alergénios fúngicos: *Aspergillus* secção *Nidulantes* (amostras de água de Alburrica de janeiro e de março; amostras de água de Carcavelos de março) e *Aspergillus* secção *Nigri* (amostras de areia de Alburrica de dezembro e de março; amostras de areia de Carcavelos de março e de abril; amostra de areia da Praia Verde de novembro).

Sabe-se que existem mais de 150 espécies de *Penicillium*, algumas das quais foram descritas como sendo fungos filamentosos comuns em locais fechados. As espécies pertencentes a este género podem causar asma atópica, em pessoas sensíveis, após a inalação dos seus esporos (Simon-Nobbe et al., 2008). Nas amostras estudadas, foram identificadas cinco espécies como *Penicillium* spp. A sua identificação foi feita apenas através da sua morfologia por ser um género com pouca variedade de manifestações clínicas. A espécie *Penicillium glabrum* foi a única espécie deste género a ser identificada até à espécie – na amostra de areia de Alburrica de fevereiro; na amostra de água de Carcavelos de dezembro; na amostra de água da Praia Verde de novembro.

O fungo *Chrysosporium* spp., que é um fungo queratinolítico, é conhecido como sendo um agente causador de infeções em animais e em humanos (Sabino et al., 2011). Foi encontrada apenas uma

colónia desta espécie na amostra de água de Alburrica de março. Os fungos *Scopulariopsis* sp. e *Scytalidium hyalinum*, que também são queratinolíticos, foram identificados apenas em amostras de Alburrica. Não foi a primeira vez que estes fungos foram identificados em praias portuguesas, visto que no estudo de Sabino et al., 2011, estes três géneros foram encontrados em algumas das amostras analisadas. Considerando que são agentes comuns em onicomicoses poderá considerar-se que os utilizadores serão contribuidores para a presença destas espécies por descamação de tecidos lesionados.

As espécies do género *Phoma* são saprófitos omnipresentes em plantas e têm sido ocasionalmente associadas a infeções em pessoas, incluindo infeções subcutâneas, queratites ou onicomicoses que são adquiridas de forma traumática (Chowdhary et al., 2015). A espécie identificada como *Phoma* sp. esteve presente na amostra de areia de Carcavelos de maio; na amostras de areia de Alburrica de abril e de maio; na amostra de areia da Praia Verde de novembro.

As espécies *Aspergillus* secção *Nigri*, *Aspergillus* secção *Terrei* e *Fusarium* spp. são fungos produtores de micotoxinas (Amadi and Adeniyi, 2009). Estas três espécies foram identificadas em algumas das amostras estudadas. Muitos dos fungos toxigénicos são omnipresentes no meio ambiente e, em alguns casos, aparentam ter uma forte relação ecológica com os alimentos. A flora fúngica natural que existe em conjunto com a produção de alimentos é dominada por três géneros: *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. As espécies de *Fusarium* são agentes patogénicos que destroem as culturas de cereais e de outros alimentos, para além de produzirem micotoxinas antes ou imediatamente após a colheita. Algumas espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* também são agentes patogénicos ou comensais de plantas, mas esses géneros estão, geralmente, associados à secagem e ao armazenamento de alimentos (Pitt, 2000).

Para além dos três géneros acima referidos, os fungos pertencente aos géneros *Alternaria*, *Claviceps* e *Stachybotrys* também são fungos toxigénicos importantes (Zain, 2011).

Em Portugal, a primeira amostragem de areia de praia conhecida foi realizada em 2001. Neste estudo, a amostragem foi realizada em três praias em cada região do país – Norte, Centro, Lisboa e Vale do Tejo, Alentejo, Algarve. Foram efetuadas sete amostragens, em que cada amostragem foi realizada de dois em dois meses (Brandão et al., 2002). Os resultados obtidos mostraram que o número de unidades formadoras de colónias que foram encontradas em amostras de água do mar foi inferior ao número de unidades formadoras de colónias em amostras de areia, o que foi verificado também no estudo atual, uma vez que o número médio de isolados que cresceu em amostras de água foi, regra geral, inferior ao número médio de isolados que cresceu em amostras de areia.

O estudo realizado por Sabino et al., 2011 também permitiu recolher dados sobre os contaminantes fúngicos presentes na areia das praias. Neste estudo, as amostragens foram feitas entre 2006 e 2010, e foram recolhidas amostras em 33 amostras em diversos locais de Portugal. Os resultados obtidos mostraram que o número de unidades formadoras de colónias de leveduras e de dermatófitos tem tendência a aumentar ao longo das sessões de amostragem, o que não se verificou no estudo atual, dado que o número de unidades formadoras de colónias de dermatófitos foi zero em todas as amostras, e o número de unidades formadoras de colónias de leveduras registou o valor mais elevado em março (em Praia Verde), em janeiro (em Carcavelos) e em dezembro (em Alburrica). Estas diferenças entre o estudo de Sabino et al., 2011 e o estudo atual podem ser resultado da duração do período de amostragem, do número de praias analisadas e da localização das praias estudadas ou de mais atenção dedicada às praias e às dermatofitias na clínica. Os resultados deste mesmo estudo mostram ainda que o género de leveduras mais frequente foi *Candida*, enquanto o género de fungo potencialmente patogénico mais frequente foi *Aspergillus*. No presente trabalho, o género *Rhodotorula* foi o género de leveduras mais frequente nas amostras analisadas. O género *Aspergillus* foi, como no estudo feito por Sabino et al., 2011, o género de fungo potencialmente patogénico predominante. As diferenças relacionadas com as leveduras nestes dois estudos prendem-se, possivelmente, com a implementação da diretiva comunitária

de águas balneares entre 2006 e 2015, que obrigou a uma redução significativa da contaminação da água com esgoto.

Segundo Abreu et al., 2016, fungos dos géneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Cladosporium* apresentaram valores elevados em areia negra de praias do Egipto. Em algumas praias portuguesas, *Cladosporium* sp. e *Penicillium* sp. foram os fungos mais comuns nas amostras analisadas. Em praias brasileiras, os fungos mais frequentes nas amostras de areia foram *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Em algumas praias de Itália, as espécies predominantes foram *Acremonium* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. Os resultados obtidos neste estudo foram semelhantes aos resultados acima mencionados, dado que foram identificados isolados de todas estas espécies neste estudo, e que a espécie *Cladosporium* sp. foi a mais frequente em Alburrica e na Praia Verde.

Existem outros trabalhos que mostraram resultados semelhantes aos obtidos neste estudo. No estudo de Pereira et al., 2013, que foi realizado em praias na Madeira, foram encontrados 14 taxa de fungos em 2010 e 12 taxa em 2011. Destes taxa, oito espécies – *Candida* sp., *Aspergillus* sp., *Aspergillus* secção *Nigri*, *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Paecilomyces* sp. e *Acremonium* sp. – foram também encontrados nas amostras das três praias analisadas neste trabalho. 2010 foi o ano de uma tempestade tropical que originou enxurradas em vários pontos da ilha da Madeira, tendo sido destruídos infraestruturas de saneamento básico. A presença de *Candida* spp não foi, portanto, surpresa para os autores. Também no Havai, os géneros *Aspergillus* e *Penicillium* estiveram presentes num grande número de amostras (Dunn and Baker, 1984; Steele, 1967). Em Espanha, em amostras de areia de praias de Mediterrâneo, os géneros mais frequentes foram *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Fusarium* (Pereira et al., 2013).

É possível observar que algumas das espécies presentes no presente trabalho são as mesmas que já foram anteriormente identificadas noutros estudos, sendo algumas das espécies de fungos mais conhecidas. As espécies em questão foram encontradas em diferentes tipos de areia e em vários locais, alguns dos quais estão muito distantes entre si. Tendo em conta que estas espécies já tinham sido identificadas em algumas praias portuguesas, a presença destes fungos nas três praias em estudo pode indicar que eles estão distribuídos pela costa portuguesa, com as diferenças apontadas entre estudos anteriores e o atual.

5. Conclusões finais e perspectivas futuras

A realização desta dissertação permitiu identificar os isolados fúngicos existentes nos três locais amostrados. Verificou-se a existência de diversas espécies, algumas das quais são responsáveis por causar infeções e alergias muito graves. As espécies *Trematosphaeria grisea*, *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima*, *Exophiala dermatitidis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus* secção *Nigri* e *Cladosporium cladosporoides* são exemplos de espécies presentes nas amostras deste estudo que podem causar alergias e infeções em humanos. Contudo, não foi possível identificar, nem através dos caracteres morfológicos nem através da identificação por biologia molecular, 19 isolados existentes nas amostras recolhidas.

Dos três grupos funcionais sugeridos por Sabino et al., 2011 – leveduras, fungos filamentosos potencialmente patogénicos ou alergénicos, dermatófitos, foi possível determinar que os fungos filamentosos potencialmente patogénicos ou alergénicos foram os mais frequentes nos locais em estudo. Em relação a espécies, as mais frequentes foram *Cladosporium* sp., na Praia Verde e em Alburrica, enquanto em Carcavelos *Acremonium kiliense* foi a espécie mais frequente.

Neste estudo, a identificação molecular dos isolados através da sequenciação da região ITS foi bastante importante, uma vez que permitiu complementar a identificação morfológica. Sem este tipo de identificação, um grande número de isolados presentes nas amostras ficaria por identificar. A extração de DNA com os solventes fenol/clorofórmio também foi muito útil. Dado que não foi possível amplificar por PCR algumas amostras de DNA cuja extração foi feita com o *kit* comercial, a repetição da extração com este método foi essencial, pois ajudou a resolver algumas dificuldades que existiam na amplificação por PCR.

Verificou-se a existência de limitações nas ferramentas utilizadas na identificação molecular. Estas limitações acontecem porque os métodos moleculares utilizados foram aplicados depois das colónias fúngicas já terem crescido, o que fez com que fosse possível identificar apenas os fungos viáveis. Para identificar todos os fungos (viáveis e não-viáveis) presentes nas amostras, poderiam ter sido utilizadas outras técnicas que poderiam ser aplicadas antes de as amostras serem inoculadas nos meios de cultura. A mais simples seria extrair o DNA total do sobrenadante de cada amostra e pesquisar os organismos alvo por PCR. Por outro lado, poder-se-ia recorrer à Sequenciação de Nova Geração (NGS, *Next-generation sequencing*). Com a aplicação deste método, é possível identificar os fungos viáveis e os não-viáveis presentes numa amostra e a proporção de cada um, o que permite obter resultados mais completos e uma melhor caracterização das zonas balneares estudadas.

De modo geral, é possível observar que a abundância e diversidade de espécies encontrada nestas três zonas balneares é influenciada pelas características geológicas e pelas áreas envolventes das praias. A presença de estabelecimentos comerciais, como bares e restaurantes, e a existência de transportes públicos perto das zonas balneares, são fatores que influenciam o número de pessoas que visita uma praia.

Verificou-se também que as espécies fúngicas podem ajudar a caracterizar a praia de onde são identificadas, uma vez que algumas das espécies são saprófitas vegetais, o que revela uma componente mais natural. Por outro lado, os fungos negros sugerem uma potencial contaminação com hidrocarbonetos, como combustíveis e plásticos que podem resultar de atividades realizadas em zonas circundantes. Esta informação sobre combustíveis aplica-se, em especial, à praia de Alburrica, uma vez que a água desta praia é fortemente influenciada pelas embarcações que fazem a travessia entre o Barreiro e Lisboa há vários anos.

Num estudo posterior a este, seria essencial estender este estudo e realizar sessões de amostragem em outras zonas balneares costeiras, como a região Norte, a região Sul, e a região Oeste do Algarve, durante o ano inteiro, de modo a abranger a época balnear completa. Para além destas, as

amostragens também poderiam ser realizadas em mais praias fluviais, em pontos distintos do país. Deste modo, seria possível reunir mais dados sobre as populações típicas de fungos presentes em zonas costeiras, para poder caracterizar outras praias portuguesas.

Seria também fundamental divulgar os resultados obtidos neste estudo, de modo a informar as autoridades competentes (como as autarquias) para poderem tomar medidas, de forma a melhorar a qualidade das areias, de modo semelhante ao que é feito com as águas. É importante salientar que os utilizadores das praias passam a maior parte do seu tempo na areia (e não na água), e que não têm conhecimento dos microrganismos que aí habitam, o que faz com que não tenham consciência das doenças a que podem estar expostos quando visitam uma praia. Assim sendo, é essencial sensibilizar os utilizadores das praias para que eles adotem medidas de higiene adequadas (nomeadamente, tomar sempre um duche depois de estarem na praia).

É, de igual modo, importante realizar campanhas de sensibilização destinadas ao público em geral para que os utilizadores das praias tenham consciência que devem ter atenção aos comportamentos que podem provocar contaminações. Alguns destes comportamentos são a falta de recolha dos dejetos dos animais domésticos (que leva à sua permanência no areal das praias ou nos locais envolventes) e a deposição de lixo e de resíduos no areal em detrimento dos caixotes e contentores próprios para esse efeito.

6. Referências bibliográficas

- Abreu, R., Figueira, C., Romão, D., Brandão, J., Freitas, M.C., Andrade, C., Calado, G., Ferreira, C., Campos, A., Prada, S., 2016. Sediment characteristics and microbiological contamination of beach sand – A case–study in the archipelago of Madeira. *Sci. Total Environ.* 573, 627–638. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.160>
- Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Alastruey-Izquierdo, A., Cuenca-Estrella, M., Rodriguez-Tudela, J.L., 2008. *Aspergillus* Section *Fumigati*: Antifungal Susceptibility Patterns and Sequence-Based Identification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 1244–1251. <https://doi.org/10.1128/AAC.00942-07>
- Amadi, J.E., Adeniyi, D.O., 2009. Mycotoxin production by fungi isolated from stored grains. *African J. Biotechnol.* 8, 1219–1221. <https://doi.org/10.5897/AJB2009.000-9193>
- Ameen, M., 2010. Epidemiology of superficial fungal infections. *Clin. Dermatol.* 28, 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.12.005>
- Araujo, R., Pina-Vaz, C., Rodrigues, A.G., 2007. Susceptibility of environmental versus clinical strains of pathogenic *Aspergillus*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 29, 108–111. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.09.019>
- Ashbolt, N.J., Grohmann, G.S., Kueh, C.S.W., 1993. Significance of Specific Bacterial Pathogens in the Assessment of Polluted Receiving Waters of Sydney, Australia. *Water Sci. Technol.* 27, 449–452.
- Babič, M.N., Gunde-Cimerman, N., Vargha, M., Tischner, Z., Magyar, D., Veríssimo, C., Sabino, R., Viegas, C., Meyer, W., Brandão, J., 2017. Fungal contaminants in drinking water regulation? A tale of ecology, exposure, purification and clinical relevance. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060636>
- Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S., Donoghue, M.J., 1995. The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA: A Valuable Source of Evidence on Angiosperm Phylogeny. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 82, 247–277. <https://doi.org/10.2307/2399880>
- Bava, A.J., Fayad, A., Céspedes, C., Sandoval, M., 2003. Fungal peritonitis caused by *Bipolaris spicifera*. *Med. Mycol.* 41, 529–531. <https://doi.org/10.1080/13693780310001610065>
- Brandão, J., 2019. Microorganisms in Beach Sand: What Do We Still Not Know?, in: Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409548-9.11763-4>
- Brandão, J., Veríssimo, C., Rosado, L., Falcão, M.L., Giraldes, A., Rosado, C., 2002. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE AREIAS DE PRAIAS LITORAIS - Relatório Final. Associação Bandeira Azul da Europa (ABAE) - Instituto do Ambiente (IA).
- Campbell, C.K., Johnson, E.M., Warnock, D.W., 2013. Identification of Pathogenic Fungi, 2nd ed, Identification of Pathogenic Fungi. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ.
- Chowdhary, A., Perfect, J., De Hoog, G.S., 2015. Black molds and melanized yeasts pathogenic to humans. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5, 1–21. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019570>
- Coulibaly, O., L'Ollivier, C., Piarroux, R., Ranque, S., 2018. Epidemiology of human dermatophytoses in Africa. *Med. Mycol.* 56, 145–161. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx048>

- De Lucca, A.J., 2007. Harmful fungi in both agriculture and medicine. *Rev. Iberoam. Micol.* 24, 3–13. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(07\)70002-5](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(07)70002-5)
- Doorduyn, Y., Van Den Brandhof, W.E., Van Duynhoven, Y.T.H.P., Wannet, W.J.B., Van Pelt, W., 2006. Risk factors for Salmonella Enteritidis and Typhimurium (DT104 and non-DT104) infections in The Netherlands: Predominant roles for raw eggs in Enteritidis and sandboxes in Typhimurium infections. *Epidemiol. Infect.* 134, 617–626. <https://doi.org/10.1017/S0950268805005406>
- Dunn, P.H., Baker, G.E., 1984. Filamentous fungal populations of Hawaiian beaches. *Pacific Sci.* 38, 232–248.
- Efstratiou, M.A., 2018. Microorganisms in Beach Sand: Health Implications, in: Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409548-9.10914-5>
- Fell, J.W., 1976. Yeasts in Oceanic Regions, in: Jones, E.B.G. (Ed.), Recent Advances in Aquatic Mycology. Elek Science, London, pp. 93–124.
- Gomez-Lopez, A., Garcia-Effron, G., Mellado, E., Monzon, A., Rodriguez-Tudela, J.L., Cuenca-Estrella, M., 2003. In vitro activities of three licensed antifungal agents against Spanish clinical isolates of *Aspergillus* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3085–3088. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.10.3085-3088.2003>
- Halaby, T., Boots, H., Vermeulen, A., Van Der Ven, A., Beguin, H., Van Hooff, H., Jacobs, J., 2001. Phaeohyphomycosis caused by *Alternaria infectoria* in a renal transplant recipient. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1952–1955. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.5.1952-1955.2001>
- Havlickova, B., Czaika, V.A., Friedrich, M., 2009. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses* 51, 2–15. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01668.x>
- Heaney, C.D., Sams, E., Wing, S., Marshall, S., Brenner, K., Dufour, A.P., Wade, T.J., 2009. Contact with beach sand among beachgoers and risk of illness. *Am. J. Epidemiol.* 170, 164–172. <https://doi.org/10.1093/aje/kwp152>
- Howard, S.J., Arendrup, M.C., 2011. Acquired antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus*: Epidemiology and detection. *Med. Mycol.* 49, 90–95. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.508469>
- Howell, J.M., Coyne, M.S., Cornelius, P.L., 1996. Effect of sediment particle size and temperature on fecal bacteria mortality rates and the fecal coliform/fecal streptococci ratio. *J. Environ. Qual.* 25, 1216–1220. <https://doi.org/10.2134/jeq1996.00472425002500060007x>
- Hussein, H.S., Brasel, J.M., 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology* 167, 101–134. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00471-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00471-1)
- Hyde, K.D., Al-Hatmi, A.M.S., Andersen, B., Boekhout, T., Buzina, W., Dawson, T.L., Eastwood, D.C., Jones, E.B.G., de Hoog, S., Kang, Y., Longcore, J.E., McKenzie, E.H.C., Meis, J.F., Pinson-Gadais, L., Rathnayaka, A.R., Richard-Forget, F., Stadler, M., Theelen, B., Thongbai, B., Tsui, C.K.M., 2018. The world's ten most feared fungi. *Fungal Divers.* 93, 161–194. <https://doi.org/10.1007/s13225-018-0413-9>
- Lo Cascio, G., Ligozzi, M., Maccacaro, L., Fontana, R., 2004. Utility of molecular identification in

- opportunistic mycotic infections: A case of cutaneous *Alternaria infectoria* infection in a cardiac transplant recipient. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5334–5336. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.11.5334-5336.2004>
- Madigan, M., Martinko, J., Stahl, D., Clark, D., 2012. *Brock Biology of Microorganisms* 13th Edition, Global Edi. ed. Pearson Education, Inc., San Francisco, California.
- Messer, S.A., Jones, R.N., Fritsche, T.R., 2006. International Surveillance of *Candida* spp . and *Aspergillus* spp .: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). *J. Clin. Microbiol.* 44, 1782–1787. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.5.1782>
- Newell, C.K., Steinmetz, R.L., Brooks, H.L., 2006. Chronic postoperative endophthalmitis caused by *Bipolaris australiensis*. *Retin. J. Retin. Vit. Dis.* 26, 109–110. <https://doi.org/10.1097/00006982-200601000-00017>
- Nilsson, R.H., Ryberg, M., Abarenkov, K., Sjökvist, E., Kristiansson, E., 2009. The ITS region as a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiol. Lett.* 296, 97–101. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01618.x>
- Nix, P.G., Daykin, M.M., Vilkas, K.L., 1993. Sediment bags as an integrator of fecal contamination in aquatic systems. *Water Res.* 27, 1569–1576. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(93\)90102-N](https://doi.org/10.1016/0043-1354(93)90102-N)
- Peay, K.G., Kennedy, P.G., Bruns, T.D., 2008. Fungal Community Ecology: A Hybrid Beast with a Molecular Master. *Bioscience* 58, 799–810. <https://doi.org/https://doi.org/10.1641/B580907>
- Pereira, E., Figueira, C., Aguiar, N., Vasconcelos, R., Vasconcelos, S., Calado, G., Brandão, J., Prada, S., 2013. Microbiological and mycological beach sand quality in a volcanic environment: Madeira archipelago, Portugal. *Sci. Total Environ.* 461–462, 469–479. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.025>
- Pitt, J.I., 2000. Toxicogenic Fungi and Mycotoxins. *Br. Med. Bull.* 56, 184–192. <https://doi.org/10.1201/9780203970553>
- Revankar, S.G., Sutton, D.A., 2010. Melanized fungi in human disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 884–928. <https://doi.org/10.1128/CMR.00019-10>
- Rodrigues, M.L., Albuquerque, P.C., 2018. Searching for a change: The need for increased support for public health and research on fungal diseases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006479>
- Sabino, R., Carolino, E., Veríssimo, C., Martinez, M., Clemons, K. V., Stevens, D.A., 2016. Antifungal susceptibility of 175 *Aspergillus* isolates from various clinical and environmental sources. *Med. Mycol.* 54, 740–756. <https://doi.org/10.1093/mmy/myw024>
- Sabino, R., Rodrigues, R., Costa, I., Carneiro, C., Cunha, M., Duarte, A., Faria, N., Ferreira, F.C., Gargaté, M.J., Júlio, C., Martins, M.L., Nevers, M.B., Oleastro, M., Solo-Gabriele, H., Veríssimo, C., Viegas, C., Whitman, R.L., Brandão, J., Jorge, R., 2014. Routine screening of harmful microorganisms in beach sands: Implications to public health. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.091>
- Sabino, R., Veríssimo, C., Cunha, M.A., Wergikoski, B., Ferreira, F.C., Rodrigues, R., Parada, H., Falcão, L., Rosado, L., Pinheiro, C., Paixão, E., Brandão, J., 2011. Pathogenic fungi: An unacknowledged risk at coastal resorts? New insights on microbiological sand quality in Portugal. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1506–1511. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.04.008>

- Saenz, R.E., Brown, W.D., Sanders, C. V., 2001. Allergic bronchopulmonary disease caused by *Bipolaris hawaiiensis* presenting as a necrotizing pneumonia: Case report and review of literature. *Am. J. Med. Sci.* 321, 209–212. <https://doi.org/10.1097/00000441-200103000-00012>
- Santos, J.M., Phillips, A.J.L., 2009. Resolving the complex of *Diaporthe* (*Phomopsis*) species occurring on *Foeniculum vulgare* in Portugal. *Fungal Divers.* 34, 111–125.
- Sheyman, A.T., Cohen, B.Z., Friedman, A.H., Ackert, J.M., 2013. An outbreak of fungal endophthalmitis after intravitreal injection of compounded combined bevacizumab and triamcinolone. *JAMA Ophthalmol.* 131, 864–869. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2013.88>
- Simon-Nobbe, B., Denk, U., Pöll, V., Rid, R., Breitenbach, M., 2008. The spectrum of fungal allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* <https://doi.org/10.1159/000107578>
- Staff, M., Musto, J., Hogg, G., Janssen, M., Rose, K., 2012. Salmonellosis outbreak traced to playground sand, Australia, 2007-2009. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1159–1162. <https://doi.org/10.3201/eid1807.111443>
- Steele, C.W., 1967. Fungus Populations in Marine Waters and Coastal Sands of the Hawaiian, Line, and Phoenix Islands. *Pacific Sci.* 21, 317–331.
- Sykes, J.E., Rankin, S.C., 2013. Isolation and Identification of Fungi, in: *Canine and Feline Infectious Diseases*. Elsevier Inc., pp. 29–36. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0795-3.00004-1>
- Toul, P., Castillo, L., Hofman, V., Bouchara, J.P., Chanalet, S., Gari-Toussaint, M., 2006. A pseudo tumoral sinusitis caused by *Bipolaris* sp. *J. Infect.* 53, 235–237. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.02.008>
- van der Linden, J.W.M., Snelders, E., Kampinga, G.A., Rijnders, B.J.A., Mattsson, E., Debets-Ossenkopp, Y.J., Kuijper, E.J., van Tiel, F.H., Melchers, W.J.G., Verweij, P.E., 2011. Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1846–1854. <https://doi.org/10.3201/eid1710.110226>
- Weiskerger, C.J., Brandão, J., Ahmed, W., Aslan, A., Avolio, L., Badgley, B.D., Boehm, A.B., Edge, T.A., Fleisher, J.M., Heaney, C.D., Jordao, L., Kinzelman, J.L., Klaus, J.S., Kleinheinz, G.T., Meriläinen, P., Nshimiyimana, J.P., Phanikumar, M.S., Piggot, A.M., Pitkänen, T., Robinson, C., Sadowsky, M.J., Staley, C., Staley, Z.R., Symonds, E.M., Vogel, L.J., Yamahara, K.M., Whitman, R.L., Solo-Gabriele, H.M., Harwood, V.J., 2019. Impacts of a changing earth on microbial dynamics and human health risks in the continuum between beach water and sand. *Water Res.* <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.07.006>
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S.B., Taylor, J.W., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics, in: *PCR - Protocols and Applications - A Laboratory Manual*. pp. 315–322.
- Whitman, R.L., Harwood, V.J., Edge, T.A., Nevers, M.B., Byappanahalli, M., Vijayavel, K., Brandão, J., Sadowsky, M.J., Alm, E.W., Crowe, A., Ferguson, D., Ge, Z., Halliday, E., Kinzelman, J., Kleinheinz, G., Przybyla-Kelly, K., Staley, C., Staley, Z., Solo-Gabriele, H.M., 2014. Microbes in beach sands: Integrating environment, ecology and public health, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s11157-014-9340-8>
- Zain, M.E., 2011. Impact of mycotoxins on humans and animals. *J. Saudi Chem. Soc.* 15, 129–144.

<https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>

7. Anexos

ANEXO I

Protocolo para a análise micológica da areia (adaptado de Sabino et al., 2011)

A. Amostragem

1. Areia: recolher, de três locais diferentes da praia, um punhado de areia. Colocar a areia num único saco de plástico estéril (a recolha de areia deve ser feita entre a superfície do areal e os 10 cm de profundidade). Misturar bem para garantir que as três partes estão bem misturadas e que representam uma média dos três pontos diferentes.

Transportar as amostras refrigeradas para o laboratório; processar dentro de cinco dias.

2. Água: Encher um balão Schott de 250 ml com água. A tampa deve ser removida dentro de água, a cerca de 20 cm de profundidade, onde a coluna de água tem 1 m de profundidade.

B. Procedimento analítico para cultura (para as amostras de água, o procedimento começa no ponto 5)

1. Retirar 40 g de areia do saco; colocar num balão do tipo Schott com capacidade de 500 ml;
2. Adicionar 40 ml de água destilada estéril;
3. Agitar suavemente cerca de 60 vezes, ou durante meia hora a 100 rpm;
4. Diluir a água de lavagem da areia para 1/10 e 1/100;
5. Inocular 0,2 ml de cada diluição do sobrenadante em 6 placas de Sabouraud com cloranfenicol e incubar 3 placas a 30°C, e as restantes 3 placas a 37°C durante, no máximo, 10 dias (monitorizar o crescimento, pois pode ser necessário inocular diluições devido ao excesso de colónias; as placas com mais de 100 unidades formadoras de colónias devem ser rejeitadas; a próxima diluição deve ser inoculada ou diluída, conforme seja necessário, até que cresça um número aceitável de colónias);
6. Repetir o passo acima com ágar Mycosel. As incubações devem durar 20 dias (fungos com um crescimento lento e que são tolerantes à actidiona - dermatófitos e outros fungos queratinofílicos);
7. Executar um duplicado de uma amostra como se fosse uma amostra independente em cada conjunto de amostras processadas no mesmo dia (para fins de determinação da reprodutibilidade);
8. Manter a amostra combinada de areia / lavagem não utilizada (selada) refrigerada a $(5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3) \text{ }^\circ\text{C}$ até que o resultado seja registado/emitido;
9. Quando as colónias começarem a crescer, enumerar as unidades formadoras de colónias para a avaliação quantitativa.

C. Leitura e interpretação

1. Após a incubação, contar e marcar cada tipo de colônia, assumindo que as colônias idênticas pertencem à mesma espécie. Identificar ou isolar 1 colônia de cada tipo. Atenção especial às colônias escuras que crescem no Mycosel a 37°C, pois podem ser *Cladophialophora* spp.;

2. Análise de réplicas

a) Somar todas as colônias. O cálculo do número médio de colônias é feito com base na fórmula

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n Xi}{n}$$

Onde \bar{x} representa a média, Xi representa o número total de colônias e n o número total de réplicas;

b) Os resultados devem ser expressos usando a seguinte fórmula: resultado = (valor médio de réplicas * 5) * fator de diluição.

ANEXO II

Protocolo para a extração de DNA - *Invisorb Spin Plant Mini Kit* (Invitek Molecular)

- 1) Homogeneizar cerca de 60 mg de material inicial com um pilão sob N₂ líquido.
- 2) Transferir a “planta em pó” para um tubo de reação de 1,5 mL.
- 3) Adicionar 400 µL de Tampão de Lise P e 20 µL de Proteinase K e agitar no vórtex durante alguns segundos.
- 4) Incubar a 65°C durante 30 minutos ou mais. Durante a incubação, colocar o pré-filtro num tubo recetor de 2,0 mL.
- 5) Transferir a solução de lise para o pré-filtro.
- 6) Centrifugar durante 1 minuto a 11.100 x g (11.000 rpm). Descartar o pré-filtro.
- 7) Adicionar 200 µL de tampão de ligação A e agitar bem no vórtex.
- 8) Colocar um novo filtro num tubo recetor de 2,0 mL. Transferir a suspensão para o filtro e incubar durante 1 minuto.
- 9) Centrifugar a 11.100 x g (11.000 rpm) durante 2 minutos.
- 10) Descartar o filtrado e colocar novamente o filtro no tubo recetor de 2,0 mL.
- 11) Adicionar 550 µL de tampão de lavagem I e centrifugar a 11.100 x g (11.000 rpm) durante 1 minuto.
- 12) Descartar o filtrado, colocar novamente o filtro no tubo recetor de 2,0 mL.
- 13) Adicionar 550 µL de tampão de lavagem II e centrifugar a 11.100 x g (11.000 rpm) durante 1 minuto.
- 14) Descartar o filtrado, voltar a colocar o filtro no tubo recetor.
- 15) Repetir o passo de lavagem anterior.
- 16) Finalmente, descartar o filtrado e centrifugar durante 4 minutos a 11.100 x g (11.000 rpm) para remover etanol residual.
- 17) Colocar o filtro num novo tubo recetor de 1,5 mL e adicionar 100 µL do tampão de eluição pré-aquecido. Incubar durante 3 minutos.
- 18) Centrifugar durante 1 minuto a 11.100 x g (11.000 rpm).
- 19) Descartar o filtro.
- 20) Fechar o tubo recetor de 1,5 mL e armazenar as amostras de DNA a -20°C.

ANEXO III

Protocolo de Extração de DNA (Adaptado de Santos, Jorge & Phillips, Alan, 2009)

Material:

- Tubos de 1,5 mL e 2 mL
- Microesferas de vidro 425-600 μm
- Tampão de lise
- Fenol
- Clorofórmio
- Isopropanol
- Etanol 70%
- Gelo
- Água destilada *DNase/RNase free*
- Micropipetas e pontas

Equipamento:

- *Hotte*
- Vórtex
- Centrífuga

Procedimento:

1. Colocar uma pequena quantidade de cultura previamente liofilizada em tubos de 2 mL.
2. Adicionar 0,2 g de microesferas de vidro 425-600 μm (SIGMA Life Science).
3. Juntar 500 μL do tampão de lise aos tubos de 2 mL.
4. Transferir as amostras para o gelo.
5. Adicionar 250 μL de fenol e 250 μL de clorofórmio.
6. Agitar no vórtex durante 20 min, à velocidade máxima.
7. Centrifugar durante 25 min, a 14500 rpm.
8. Transferir o sobrenadante para novo tubos de 1,5 mL.
9. Adicionar um volume de isopropanol frio igual ao volume de amostra transferida.
10. Agitar por inversão suave.
11. Centrifugar durante 10 min, a 14500 rpm.
12. Descartar o sobrenadante.
13. Lavar o *pellet* com 1 mL de etanol 70% frio.
14. Centrifugar durante 5 min, a 14500 rpm.

15. Descartar o sobrenadante.
16. Secar o *pellet* com o tubo aberto e invertido à temperatura ambiente durante 5 - 10 min.
17. Adicionar 50 μ L de água destilada *DNase/RNase free*.
18. Conservar a -20°C .